



HAL
open science

Implication du saut de l'exon 14 du récepteur MET dans le cancer du poumon : caractérisation des mécanismes d'activation

Marie Fernandes

► To cite this version:

Marie Fernandes. Implication du saut de l'exon 14 du récepteur MET dans le cancer du poumon : caractérisation des mécanismes d'activation. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2021. Français. <NNT : 2021LILUS009>. <tel-03685199>

HAL Id: tel-03685199

<https://theses.hal.science/tel-03685199v1>

Submitted on 2 Jun 2022

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.



HAL Authorization

Université de Lille - Ecole Doctorale Biologie – Santé
Institut de Biologie de Lille – UMR 9020 CNRS UMR1277 Inserm CANTHER

THESE DE DOCTORAT

En vue de l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Lille
Discipline : Biologie cellulaire
Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par

Marie Fernandes

*Implication du saut de l'exon 14 du récepteur MET
dans le cancer du poumon :
caractérisation des mécanismes d'activation*

Soutenue le 1^{er} avril 2021 devant la commission d'examen :

Présidente du jury : Pr. Christelle Cauffiez (Université de Lille)
Rapporteurs : Dr. Fabienne Lamballe (Institut de Biologie du Développement, Marseille)
Dr. Luc Friboulet (Institut Gustave Roussy, Villejuif)
Examineurs : Dr. Servane Tauszig-Delamasure (Institut Neuromyogène, Lyon)
Dr. Paulo De Sepulveda (Centre de Recherche en Cancérologie, Marseille)
Directeur de thèse : Dr. David Tulasne (Institut de Biologie de Lille)

*« La recherche est un processus sans fin dont on ne peut jamais dire comment il évoluera.
L'imprévisible est dans la nature même de la science. »*
François Jacob

« Lorsque deux forces sont jointes, leur efficacité est double. »
Sir Isaac Newton

« A cœur vaillant, rien d'impossible. »

Résumé

Les thérapies ciblant les récepteurs tyrosine kinase ont contribué à améliorer le pronostic de certains patients et apportent un véritable espoir thérapeutique dans la lutte contre les cancers. Bien que la majorité des mutations des RTK impactent le domaine kinase et conduisent à leur activation constitutive, celles touchant le récepteur MET dans le cancer du poumon conduisent au saut de l'exon 14 (MET ex14) codant le domaine juxtamembranaire. Le domaine perdu comporte au moins trois sites de régulation négative. Parmi eux, les résidus phosphorylables S985 et Y1003 permettent respectivement l'inhibition de l'activité kinase et la dégradation de MET en réponse à l'HGF, le ligand du récepteur. Le motif ESVD¹⁰⁰², quant à lui, est un site de clivage par les caspases permettant la génération du fragment p40MET impliqué dans l'apoptose.

Dans ce contexte, mon objectif de thèse a été de mieux caractériser les mécanismes d'activation du récepteur MET ex14 en déterminant l'implication de l'HGF et la contribution relative de ces sites de régulation dans les capacités transformantes des cellules MET ex14.

Pour répondre à ces questions, dans un premier temps nous avons établi par technologie CRISPR-Cas9 une lignée épithéliale pulmonaire présentant un saut de l'exon 14 à partir de la lignée 16HBE. Au travers d'un travail collaboratif avec une équipe londonienne, nous avons montré que le récepteur MET ex14 est dépendant de l'HGF pour l'établissement de ses capacités transformantes complètes. En effet, seules les cellules 16HBE ex14 induisent la formation de tumeurs et ce développement tumoral est significativement plus fréquent et de volume supérieur dans des souris transgéniques exprimant l'HGF humain. Par ailleurs, nous montrons que parmi 18 patients MET ex14 testés, au moins un tiers d'entre eux présentent une co-expression d'HGF et MET. Néanmoins, les mécanismes moléculaires à l'origine de cette expression ainsi que ses conséquences fonctionnelles restent à déterminer.

Dans un second temps, afin de mieux caractériser les sites de régulations impliqués dans le potentiel transformant de MET ex14, nous avons établi des lignées cellulaires épithéliales T47D exprimant des versions de MET sauvage, dépourvu de l'exon 14 ou muté sur chacun ou la totalité des sites de régulation décrits. Nos résultats montrent qu'en réponse à l'HGF, la mutation du résidu Y1003 induit une activation des voies de signalisation en aval plus forte et prolongée associée à des capacités migratoires plus importantes similaires au récepteur MET ex14. Par ailleurs, le programme transcriptionnel de MET ex14 et Y1003F en réponse à l'HGF présente des similitudes en incluant notamment des gènes associés à l'invasion. En revanche, la mutation du site de clivage par les caspases induit la perte des capacités pro-apoptotiques de MET favorisant ainsi la survie des cellules MET ex14.

Les cellules T47D MET n'induisant pas le développement de tumeurs *in vivo*, nous avons développé également une lignée 16HBE mutée Y1003F par technologie CRISPR. De manière intéressante, la perte du site Y1003 seule ne confère pas les mêmes capacités tumorigéniques que la mutation MET ex14 en xénotransplantes murines en permettant le développement de peu de tumeurs par rapports aux cellules MET ex14.

L'ensemble de ces résultats révèle que la perte de l'exon 14 conduit à un mode d'activation original et différent d'autres mutations de MET activatrices de la kinase. Nous montrons notamment que le récepteur MET ex14 est dépendant de l'HGF pour le développement d'un potentiel transformant complet et que ces capacités sont la conséquence de la perte combinée d'au moins deux mécanismes de régulation du récepteur impactant la migration mais également la survie cellulaire. Ces éléments confortent l'utilisation des inhibiteurs kinase ciblant MET et pourraient permettre d'envisager l'HGF comme un potentiel biomarqueur d'agressivité tumoral et/ou de réponses aux inhibiteurs de MET.

Abstract

Targeted therapies against receptor tyrosine kinases improved the prognosis in some patients and provide real therapeutic hope in the fight against cancer. Although the majority of RTK mutations impact the kinase domain and lead to their constitutive activation, those affecting the MET receptor in lung cancer lead to the skipping of exon 14 (MET ex14) encoding the juxtamembrane domain. The lost domain contains at least three negative regulatory sites. Among them, the phosphorylatable residues S985 and Y1003 respectively allow the inhibition of kinase activity and the degradation of MET in response to HGF, the ligand of the receptor. The motif ESVD1002, for its part, is a caspase cleavage site allowing the generation of the p40MET fragment involved in apoptosis.

In this context, my thesis objective was to characterize the activation mechanisms of the MET ex14 receptor by determining the involvement of HGF and the relative contribution of these regulatory sites in the transforming capacities of MET ex14 cells.

To answer these questions, we first established using CRISPR-Cas9 technology a pulmonary epithelial line presenting an exon 14 jump from the 16HBE line. Through collaborative work with a team in London, we have shown that the MET receptor ex14 is dependent of HGF for the establishment of its full transformative capacities. In fact, only 16HBE ex14 cells induce tumor formation and this tumor development is significantly more frequent and presents a higher volume in transgenic mice expressing human HGF. Furthermore, we show that among 18 MET ex14 patients tested, at least a third of them present co-expression of HGF and MET. However, the molecular mechanisms behind this expression and its functional consequences remain to be determined.

Secondly, in order to determine the regulatory sites involved in the transforming potential of MET ex14, we established T47D epithelial cell lines expressing wild type MET version, lacking exon 14 or mutated on each or all of the regulatory sites described. Our results show that in response to HGF, the mutation of the Y1003 residue induces a stronger and prolonged activation of downstream signaling pathways associated with greater migratory capacities similar to the MET receptor ex14. Furthermore, the transcriptional program of MET ex14 and Y1003F in response to HGF shows similarities, notably including genes associated with invasion. On the other hand, the mutation of the cleavage site by the caspases induces the loss of the pro-apoptotic capacities of MET, thus promoting the survival of the MET ex14 cells.

As T47D MET cells are not able to induce tumor development *in vivo*, we have also developed a 16HBE Y1003F line mutated by CRISPR technology. Interestingly, the loss of the Y1003 site alone does not confer the same tumorigenic capacities as the MET ex14 mutation in murine xenografts by allowing the development of few tumors compared to MET ex14 cells.

Taken together, these results reveal that the loss of exon 14 leads to a novel mode of activation that is different from other kinase activating MET mutations. We show in particular that the MET ex14 receptor is dependent on HGF for the development of a full transforming potential and that these capacities are the consequence of the combined loss of at least two regulatory mechanisms of the receptor impacting migration but also cell survival. These elements support the use of kinase inhibitors targeting MET and could allow HGF to be considered as a potential biomarker of tumor aggressiveness and / or responses to MET inhibitors.

Remerciements

Au Pr. Christelle Cauffiez, au Dr. Servane Tauszig-Delamasure et au Dr. Paulo De Sepulveda de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse et de l'intérêt qu'ils portent à mon travail. Je remercie sincèrement Dr. Fabienne Lamballe et Dr. Luc Friboulet d'avoir accepté d'être mes rapporteurs.

J'aimerais remercier tout particulièrement mon encadrant de thèse David Tulasne. Je souhaite à tout jeune étudiant d'avoir un directeur de thèse ayant cette bienveillance. Je vous remercie d'abord pour votre enthousiasme et votre patience à toutes épreuves. Vous m'avez toujours soutenue, écoutée et permise d'exprimer toutes mes idées. Grâce à ces années de thèse passées sous votre tutelle, j'ai pu prendre confiance en moi et conserver cette soif d'apprendre et de découvrir qui vous habite également. J'espère que vous êtes fier de mon évolution durant ces quatre années.

Un grand merci à Zoulika Kherrouche, pour tout ce que tu m'as apporté au quotidien et pour la confiance que tu as envers moi. Ta franchise est une qualité rare et nos innombrables discussions-débats-débriefs-pauses ont été une chose merveilleuse pour l'avancée de nos projets communs mais aussi toujours enrichissants concernant ma vie personnelle.

A Sonia Paget, mon binôme de choc. Tu m'as accompagnée quasiment du début jusqu'à la fin de ma thèse, on a traversé toutes nos galères de CRISPR ensemble et nos relais-manips étaient limpides. Je te remercie pour avoir été celle sur laquelle je pouvais compter et c'était si facile d'accorder nos violons. Merci pour ta volonté et ton optimisme contre vents et marées.

A Marie-Josée Truong, mon ange gardien de ces derniers mois. Ton arrivée récente dans la team « METex14 » m'a permis d'écrire beaucoup plus sereinement mon manuscrit. Merci pour ton courage, ta détermination dans les manips et ta générosité. Merci pour les petits encas déposés sur mon bureau le soir pour que je tienne le coup.

Je remercie également le Pr. Alexis Cortot pour vos conseils, votre sagesse et votre point de vue toujours pertinents qui nous permettent d'avoir un regard éclairé sur un millième des problématiques de la clinique.

A Philippe, pour nos échanges sur notre projet MET ex14 mais aussi pour tout le reste, nos discussions et ton soutien.

A Audrey et Anne Chotteau pour leur participation à mon projet et sans qui les résultats présentés ici seraient grandement moins sympathiques.

Merci au destin de m'avoir permis de rencontrer ici des gens formidables qui ont pris une place particulière dans ma vie. Leslie, « mon mentor », tu as été mon premier pilier dans l'équipe. Je t'ai tellement épuisée avec mes mille questions et tu as toujours eu la patience de répondre à chacune d'entre elles. Tu es mon modèle de rigueur, de calme et d'ingéniosité. Tu m'as manqué au travers de l'Atlantique cette dernière année mais je suis admirative du chemin que tu te construis. A Catherine, ta bienveillance envers tes petits poussins de labo est incroyable. Tu m'as accueillie dès mon arrivée avec ta gentillesse et d'une certaine façon tu as toujours su prendre soin de moi avec ton détecteur automatique auquel on ne peut rien cacher... Je ne peux exprimer à quel point je pense que tu es une personne extraordinaire. Martine, mon italienne, mon acolyte. Plus qu'une collègue, une voisine de bureau, c'est un partner in crime et une amie que j'ai trouvée. Les deux minimoy toujours ensemble ! Je te souhaite tout le courage du monde pour cette dernière ligne droite et je sais que tu y arriveras avec brio. Angela, mon italienne aussi. Ta générosité et ton courage font de toi une personne si géniale. La femme de l'ombre, tu m'as toujours donné des petits coups de pouce en cachette, comme ça, parce que c'est naturel pour toi. Je souhaite à tous d'avoir une collègue comme toi, ton amitié est précieuse et elle doit être gardée comme un trésor. Hana, tu es déjà partie du labo maintenant depuis quelques temps mais tu gardes toujours une place importante dans ma tête, déjà parce que j'ai ton visage barbu en photo sur ma paillasse, mais parce que je me souviens aussi que tu étais déjà prête à m'aider pour n'importe quoi, y compris transporter un canapé à deux dans un escalier minuscule.

Un grand merci à l'ensemble des membres de l'équipe Target pour votre regard toujours pertinent sur nos résultats, votre sympathie et votre bienveillance. J'ai une pensée particulière pour Isabelle qui m'a toujours encouragée en culture et qui a toujours apporté son soutien en culture cellulaire quand je m'inquiétais pour mes souris mais aussi dans les galères de ma vie. J'ai également une pensée pour tous les anciens « Signaux » médecins qui ont participé à une vie de laboratoire toujours très chouette : Camille, Santiago, Louise, Charbel et Bryan. Je souhaite beaucoup de courage aux étudiantes Célia, Elisa et Aline. Le chemin peut sembler long et sinueux mais gardez toujours espoir et détermination, ça paiera !

Je remercie notre directrice d'unité Isabelle Van Seuningen ainsi que l'ensemble de l'unité CANTHER. Je remercie aussi Yvan de Launoit, notre ancien directeur d'unité, pour votre bienveillance à mon égard et pour le temps que vous preniez pour discuter scientifiquement avec chacun d'entre nous.

Je remercie tout particulièrement toutes les personnes du R+3 de l'IBL. Merci pour tout ce que vous êtes, votre sens de l'accueil, votre gentillesse. Collectivement, vous avez créé pour moi le meilleur environnement que l'on puisse espérer et vous avez fait de ce laboratoire un foyer pour moi, le chauffage en moins. J'ai une pensée pour mes acolytes de galère : Erwan, Alexandre, Amélie, Anthony T., Anthony L. et Abishek. Nous nous sommes serrées les coudes tout le long du parcours et c'était cool de partager ça avec vous. Un gros bisou de courage pour Clara, mon experte immobilière et stats.

A Sarah, merci pour tout ce que tu es. Nos soirées à refaire le monde accompagnées de nos habituels verres de vin rouge sur la terrasse du Paon d'Or me manquent beaucoup trop ! Vivement ...

Je souhaite remercier mes amis qui m'ont toujours soutenu. Mes Vampes, malgré nos séparations géographiques vous êtes toujours là depuis déjà un paquet d'années. Nos fous rires me manquent mais maintenant que je vais avoir un peu plus de temps je vais pouvoir venir vous embêter aux quatre coins de la France et aux alentours bien plus souvent ! A mes escrocs dispersés, le Club des 5, du DUT nous voici enfin arrivés au bout de notre (premier) périple et j'ai l'honneur d'ouvrir le bal, mais je sais qu'on est trop fous pour continuer notre quête... J'aimerai en profiter pour remercier du plus profond de mon cœur Marion, Mélanie et Alison. Pour tout ce que vous me croyez capable de faire, bien souvent plus que moi. « Il n'y a pas plus belle famille que celle qu'on choisit. »

Enfin, je voudrais remercier ma famille, mon frère, mon père et mon beau-père. J'espère que vous êtes fiers de moi, même si tout cela vous paraît bien obscur... Vous avez cru en moi et avez toujours soutenu votre éternelle étudiante de la famille. Merci pour tout ce que vous êtes, je vous aime.

A ma mère, l'héroïne de ma vie et la femme la plus courageuse que je connaisse. Je te remercie pour toutes les valeurs de détermination et d'enthousiasme que tu m'as transmises et qui font de moi ce que je suis aujourd'hui.

Publications

Articles scientifiques :

Ligand-dependent oncogene addiction of the MET exon14 skipping mutant.

Marie Fernandes, Brynna K. Hoggard, Philippe Jamme, Sonia Paget, Valérie Grégoire, Audrey Vincent, Clotilde Descarpentries, Angela Morabito, Jean-Pascal Meneboo, Martin Figeac, Shéhérazade Sebda, Sarah Humez, Luca Grumolato, Marie-Christine Copin, David Tulasne, Alexis B. Cortot, Stéphanie Kermorgant and Zoulika Kherrouche. (*en préparation*)

MET exon 14 skipping mutations trigger a unique biological program promoting tumor growth

Marie Fernandes, Sonia Paget, Zoulika Kherrouche, Audrey Vincent, Marie-José Truong, Jean-Pascal Meneboo, Shéhérazade Sebda, Elisabeth Werkmeister, Clotilde Descarpentries, Anne Chotteau-Lelièvre, Martin Figeac, Luca Grumolato, Alexis Cortot, David Tulasne. (*en préparation*)

Alterations in the PI3K pathway drive resistance to MET inhibitors in NSCLC harboring MET exon 14 skipping mutations.

Philippe Jamme, Marie Fernandes, Marie-Christine Copin, Clotilde Descarpentries, Fabienne Escande, Angela Morabito, Valérie Grégoire, Matthieu Jamme, Simon Baldacci, David Tulasne, Zoulika Kherrouche, Alexis B. Cortot. *Journal of Thoracic Oncology*, Mai 2020.

Germline MET pathogenic variants in papillary renal cell carcinomas type I: specific phenotype in French population and novel germline pathogenic variant MET, c.3389T>C, p.(Leu1130Ser)

M. Sebai, D. Tulasne, S. M. Caputo, M Fernandes, V. Verkarre, S. Adams, C. Maugard, O. Caron, M. Guillaud-Bataille, P. Berthet, Y.-J. Bignon, J. Chiesa, T. Frebourg, S. Giraud, S. Lejeune, J.-M. Limacher, A de Pauw, D Stoppa-Lyonnet, H. Cannoni, S. Deveaux, R. Lidereau, S. Richard, E. Rouleau. (*soumis*)

Revues :

Proteolytic cleavages of MET: the divide-and-conquer strategy of a receptor tyrosine kinase

Marie Fernandes, Leslie Duplaquet and David Tulasne. *BMB Reports*, Avril 2019.

When the MET receptor kicks in to resist targeted therapies

Marie Fernandes, Philippe Jamme, Alexis B Cortot, Zoulika Kherrouche and David Tulasne. (*soumis*)

Communications scientifiques :

- 12^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, 2019.
1^{er} prix communication orale (Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer)
- Conférence grand public de l'Institut Pasteur de Lille.
« Les thérapies ciblées anti-cancéreuses : les jeunes préparent l'avenir », 2020.
- Journée des Doctorants CANTHER, Lille, 2019.
1^{er} prix communication orale pour les étudiants en 2^{ème} année de thèse
- 11^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, 2018. *(Poster)*
- Journée « André Verbert », Lille, 2019. *(Poster)*
- International Symposium Longevity, Lille, 2019. *(Poster)*

Sommaire

Résumé.....	4
Abstract	5
Remerciements	6
Publications	9
Abréviations	1
Index des figures et tables.....	2
Introduction.....	3
I. Cancers : des enjeux actuels majeurs.....	4
Les cancers du poumon.....	4
L'ère des thérapies ciblées	5
II. La famille des récepteurs tyrosine kinase	8
III. Le récepteur MET : de sa découverte à son rôle physiologique essentiel	10
Les premières découvertes	10
Structures du récepteur MET et de son ligand HGF.....	10
Mécanismes d'activation et cascades de signalisation du récepteur	13
Internalisation du récepteur par endocytose	20
Implications des clivages de MET dans plusieurs processus biologiques	25
Fonctions physiologiques du couple MET/HGF.....	31
IV. Le récepteur MET : un acteur de la tumorigenèse.....	33
Mutations ponctuelles	34
Surexpression et amplification de MET.....	37
Dérégulation de l'expression d'HGF.....	39
Transcrits de fusion	40
Stratégies thérapeutiques ciblant MET.....	43
Implication de MET comme mécanisme de résistance.....	48
V. Saut de l'exon 14 de MET : une nouvelle implication dans les cancers.....	51
Caractérisations cliniques.....	51
Conséquences fonctionnelles du saut de l'exon 14	53
Mécanismes de régulation siégeant sur l'exon 14.....	54
Thérapies ciblées pour les patients MET ex14.....	57
Les challenges : vers une meilleure compréhension de MET ex14.....	59
Objectifs de thèse.....	65
Résultats	66
Publication n°1 : MET ex14 addiction to HGF	67
Publication n°2 : Unique mechanisms of MET ex14 capacities.....	68

Discussion	69
I. Modèles cellulaires.....	70
Lignées T47D par expression exogène	70
Lignées 16HBE par CRISPR-Cas9	71
II. Dépendance à l'HGF	73
Modèle murin.....	73
Impact clinique du rôle de l'HGF	75
III. Des mystères non élucidés	78
Un programme transcriptionnel unique ?.....	79
La question de la stabilité.....	80
Des localisations inattendues ?	81
Des partenaires inconnus ?	83
IV. Conséquences sur la prise en charge thérapeutique.....	84
Conclusion	86
Annexes	88
Revue n°1 : MET cleavages.....	89
Revue n°2 : MET receptor in resistance to targeted therapies	90
Article original : PI3K alterations drive resistance to MET TKIs.....	91
Références.....	92

Abréviations

ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase

ALK : Anaplastic Lymphoma Kinase

CBL : Casitas B-lineage

CBNPC : Carcinomes Bronchiques Non à Petites Cellules

CGH : Comparative genomic hybridization

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

ERK : Extracellular signal-regulated kinases

ETS : Erythroblast Transformation Specific

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

GAB1 : GRB2-associated binder

GRB2 : Growth factor receptor-bound protein 2

HER2 : Human epidermal growth factor receptor 2

HGF : Hepatocyte Growth Factor

IHC : Immunohistochimie

IPT : Immunoglobulin-like regions in plexins and transcription factors

ITK : Inhibiteurs tyrosine kinase

KI : Knock-in

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

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MDCK : Madin-Darbin Canine Kidney

MDM2 : Murine Double Minute 2

MET ex14 : Saut de l'exon 14 du récepteur MET

MMP : Matrix métalloprotéases

NF-kB : Nuclear Factor Kappa B

NGS : Next generation sequencing

NLS : Nuclear localisation sequence

PI3K : Phosphatidylinositol-3-kinase

PKC : Protéine kinase C

PSI : Plexin Semaphorin Integrin

PTB : Phosphotyrosine binding

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

PTP : Protéines tyrosine phosphatases

RTK : Récepteur Tyrosine Kinase

SF : Scatter Factor

SH2 : Src homology-2

SHC : SH2 domain containing transforming protein

SPH : Serine Proteinase Homology

STAT : Signal transducer and activator of transcription

TKD : Domaine Tyrosine Kinase

TPR : Translocated Promoter Region

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor

Index des figures et tables

- Figure 1 : Classification simplifiée des carcinomes bronchiques.
- Figure 2 : Distribution des différentes altérations moléculaires dans les CBNPC.
- Figure 3 : Structure des 20 familles de récepteurs tyrosine kinase humains.
- Figure 4 : Maturation et structure de l'HGF.
- Figure 5 : Structure du récepteur MET.
- Figure 6 : Activation du récepteur MET par l'HGF et cascades de signalisation induites.
- Figure 7 : Internalisation par endocytose du récepteur MET.
- Figure 8 : Signalisation du récepteur MET au cours de son internalisation.
- Figure 9 : Description des clivages protéolytiques du récepteur MET.
- Figure 10 : Mécanismes principaux de dérégulations du récepteur MET dans les cancers.
- Table 1 : Mutations de MET dans le cancer du rein.
- Figure 11 : Représentation schématique des fusions impliquant *MET*.
- Figure 12 : Stratégies thérapeutiques ciblant MET.
- Figure 13 : Représentation des différentes altérations impactant l'exon 14 de *MET*.
- Figure 14 : Sites de régulation du domaine juxtamembranaire du récepteur MET.
- Table 2 : Présentation des principaux essais cliniques en cours chez les patients MET ex14.
- Figure 15 : Résistances « on-target » acquises dans les CBNPC MET ex14.
- Figure 16 : Représentation du nombre de publications sur le sujet « MET ex14 »

Introduction

I. Cancers : des enjeux actuels majeurs

Malgré des progrès considérables, le cancer reste un problème de santé majeur dans le monde et en France. Il représente en France la première cause de décès chez l'homme et la deuxième chez la femme. Dans le monde, on estime le nombre de nouveaux cas à 18,1 millions associé au décès de 9,6 millions de patients. Le cancer en France c'est encore 382 000 nouveaux cas en 2018 et 157 000 décès tous cancers confondus. En termes d'incidence, les cancers les plus fréquents sont le cancer de la prostate, le cancer du poumon et le cancer colorectal chez l'homme et chez la femme le cancer du sein, le cancer colorectal et le cancer du poumon. Le nombre de nouveaux cas annuel a augmenté fortement entre 1990 et 2018 mais une part de cette augmentation est attribuable à l'augmentation de la population et à son vieillissement. Bien qu'en parallèle le nombre de décès sur cette période ait aussi augmenté, la part de mortalité attribuable au cancer lui-même est en recul chez l'homme et la femme suggérant une meilleure prise en charge globale soutenue par un diagnostic plus précoce.

Les cancers du poumon

Les cancers du poumon font partie des cancers ayant encore un pronostic défavorable et dont la survie nette à 5 ans est d'environ 20%. En France, le nombre estimé de nouveaux cas de cancer du poumon était d'environ 46 000 et le nombre de décès était de 33 000 en 2018, faisant de lui le cancer le plus meurtrier chez l'homme et le second cancer mortel chez la femme (environ 25% et 15% de la mortalité par cancer respectivement) (Rapport INCA 2020).

Les cancers du poumon sont subdivisés en deux sous-groupes majoritaires : les carcinomes bronchiques à petites cellules (CBPC ou small cell lung cancer, SCLC) représentent environ 15% des cancers bronchiques, et les carcinomes bronchiques non à petites cellules (CBNPC ou non-small cell lung cancer, CBNPC) représentent environ 85% (*Figure 1*). Les CBPC présentent fréquemment une différenciation neuro-endocrine. Parmi les CBNPC, les adénocarcinomes sont la forme histologique majoritaire en représentant plus de la moitié des cas de carcinomes bronchiques et les carcinomes épidermoïdes sont le deuxième type de CBNPC le plus fréquent (20%). Ces deux sous-types dérivent tous deux des cellules bronchiques, cependant les adénocarcinomes présentent un phénotype glandulaire alors que les carcinomes épidermoïdes ont un phénotype squameux. Les carcinomes à grandes cellules sont un sous-type indifférencié rare sans caractéristiques histologiques précises mais est le plus souvent diagnostiqué sur la base de l'exclusion d'un caractère glandulaire ou squameux et lorsque les cellules semblent plus larges et rondes. Enfin, les carcinomes pulmonaires sarcomatoïdes forment un sous-type histologique rare et particulièrement agressif associé à un phénotype cellulaire peu différencié présentant des caractéristiques épithéliales et mésenchymateuses.

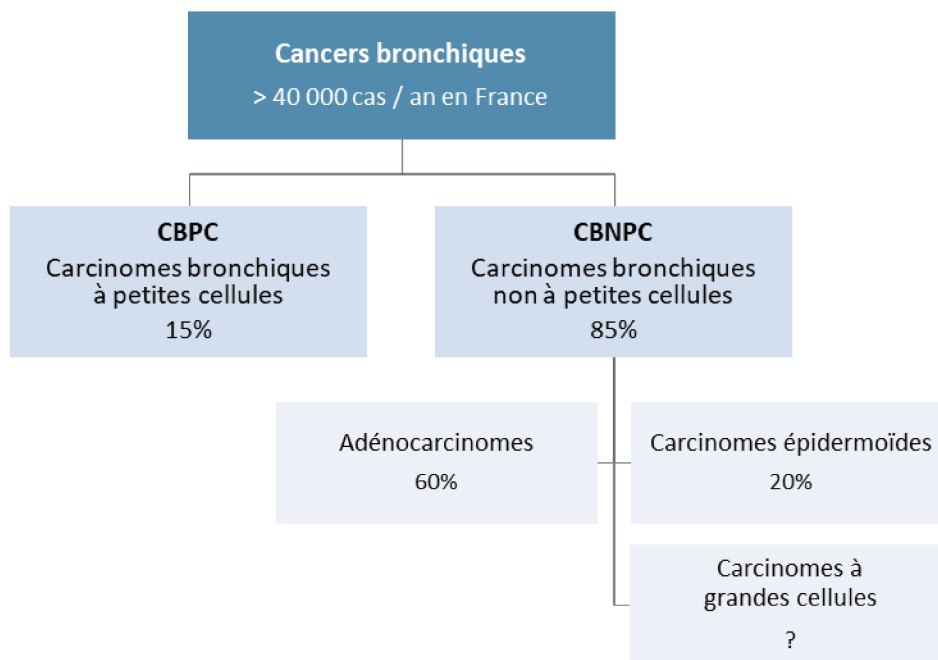


Figure 1 : Classification simplifiée des carcinomes bronchiques et représentation en pourcentage de leur fréquence de diagnostic.

Le pronostic sombre des cancers du poumon est principalement lié à un diagnostic tardif à un stade avancé de la maladie, déjà localement avancé voire métastatique. Seules les formes très localisées peuvent bénéficier d'une exérèse chirurgicale suivie d'une chimiothérapie adjuvante combinée ou non à de la radiothérapie. Jusqu'à très récemment, la prise en charge des patients de stade IV métastatiques reposait sur une chimiothérapie constituée de sels de platine et d'un agent cytotoxique. Cette prise en charge thérapeutique restait d'une efficacité modeste puisque la survie globale médiane était de 12 à 18 mois pour les patients CBNPC métastatiques.

Une des révolutions récentes de la prise en charge des cancers bronchiques concerne l'arrivée des immunothérapies dans ce cancer. L'utilisation des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (anti-PD1, anti-PDL1 et anti-CTLA4) ont permis d'améliorer significativement leur pronostic. Leur efficacité est cependant dépendante de l'expression de ces marqueurs points de contrôles (PD1, PDL1, CTLA4) par les cellules tumorales mais également de l'infiltrat immunitaire au sein de la tumeur initialement.

L'ère des thérapies ciblées

Le développement des techniques de séquençage à haut débit en routine clinique a permis de mettre en évidence de nombreuses altérations moléculaires impliquées dans le développement de la tumeur dans plusieurs cancers. De façon importante, la détection de ces altérations moléculaires

impactant des oncogènes a permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques donnant naissance à « l'ère des thérapies ciblées ». Les premières thérapies ciblées autorisées en France ont été le trastuzumab, un anticorps ciblant HER2, pour les cancers du sein métastatiques HER2+ et l'imatinib, une petite molécule inhibitrice de la kinase ABL, pour les leucémies myéloïdes chroniques présentant la fusion *BCR-ABL*. Le nombre de molécules développées puis autorisées depuis n'a pas cessé d'augmenter ces dernières années puisque 43 thérapies ciblées étaient autorisées en France en 2016 et incluait 98 indications thérapeutiques référencées pour la prise en charge des cancers. La prise en charge des cancers du poumon est un exemple représentatif de cette révolution. Dans les cancers bronchiques non à petites cellules et plus particulièrement dans les adénocarcinomes, des mutations activatrices des kinases *EGFR* et *KRAS* et des translocations de *ALK* sont les plus fréquemment identifiées (environ 12%, 30% et 5% respectivement)(Barlesi et al., 2016; Descarpentries et al., 2018; Chu, 2020). Des altérations de *ROS1*, *BRAF*, *HER2*, *PI3KCA*, *NTRK* mais également de *MET* sont retrouvées dans les CBNPC à une fréquence plus faible (*Figure 2*).

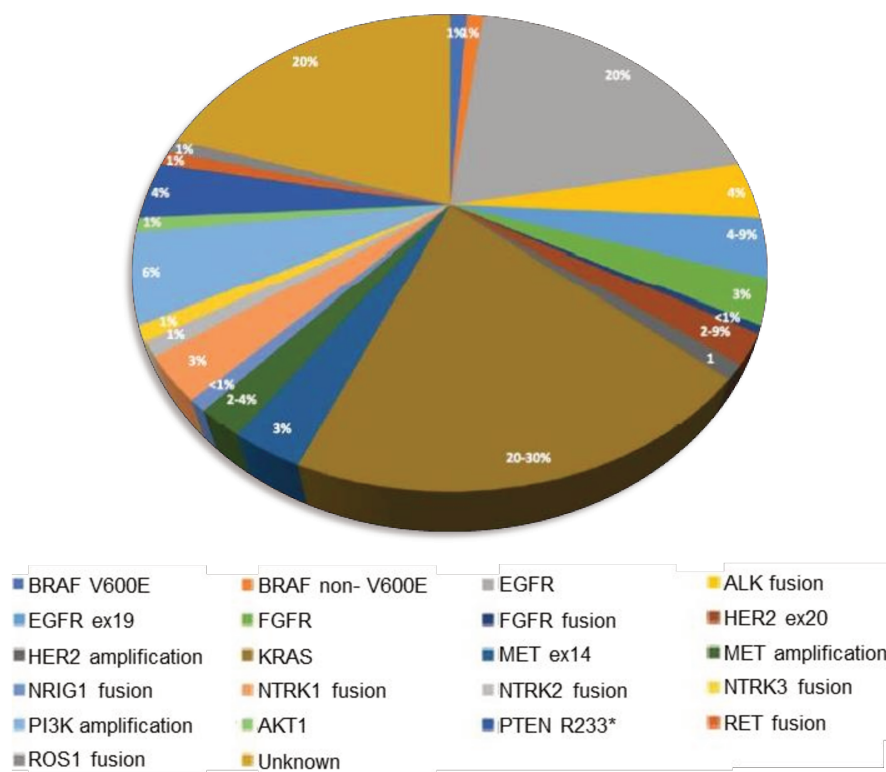


Figure 2 : Distribution des différentes altérations moléculaires dans les cancers bronchiques non à petites cellules. (extrait de Chu, 2020)

Les thérapies ciblées utilisées contre ces protéines activées dans le cancer du poumon ont changé favorablement la survie des patients atteints de CBNPC porteurs de ces altérations. En agissant plus efficacement contre la tumeur, elles réduisent également la toxicité induite en comparaison des chimiothérapies conventionnellement proposées auparavant. Un des meilleurs exemples est le cas des cancers EGFR mutés. Le traitement des tumeurs EGFR muté par des inhibiteurs a permis d'améliorer considérablement le pronostic de ces patients et est désormais considéré comme leur meilleure option de traitement. Pour cet oncogène, des inhibiteurs de plusieurs générations ont déjà été développés afin de combattre des mécanismes de résistances acquis au cours des traitements tels que l'apparition de mutations secondaires à celle initialement diagnostiquée.

Le développement de résistances pour quasiment toutes les thérapies ciblées au cours du traitement reste cependant un des problèmes majeurs de l'utilisation de ces molécules. Par ailleurs, certains oncogènes tels que *KRAS* sont difficiles à cibler par des molécules efficaces. Pour l'élaboration de nouvelles thérapies et l'anticipation des mécanismes de résistance inévitables, une compréhension fine des cibles est plus que nécessaire.

II. La famille des récepteurs tyrosine kinase

Les récepteurs tyrosine kinase (RTKs) forment une sous-famille de tyrosine kinases impliquées particulièrement dans la communication entre les cellules et contrôlent un large panel de réponses biologiques telles que la prolifération, la migration, la différenciation cellulaire, le métabolisme ou encore la survie. Chez l'humain, 58 RTKs sont connus et partagent une structure protéique similaire (*Figure 3*). Cette structure comprend un domaine extracellulaire en extrémité amino-terminale pour la fixation du ligand, une hélice transmembranaire puis une région intracellulaire contenant un domaine juxtamembranaire, le domaine tyrosine kinase (TKD) et une extrémité carboxy-terminale (Hubbard, 1999). La plupart des RTKs sont activés par un ligand spécifique et sont désignés classiquement sous le terme de « facteurs de croissance ».

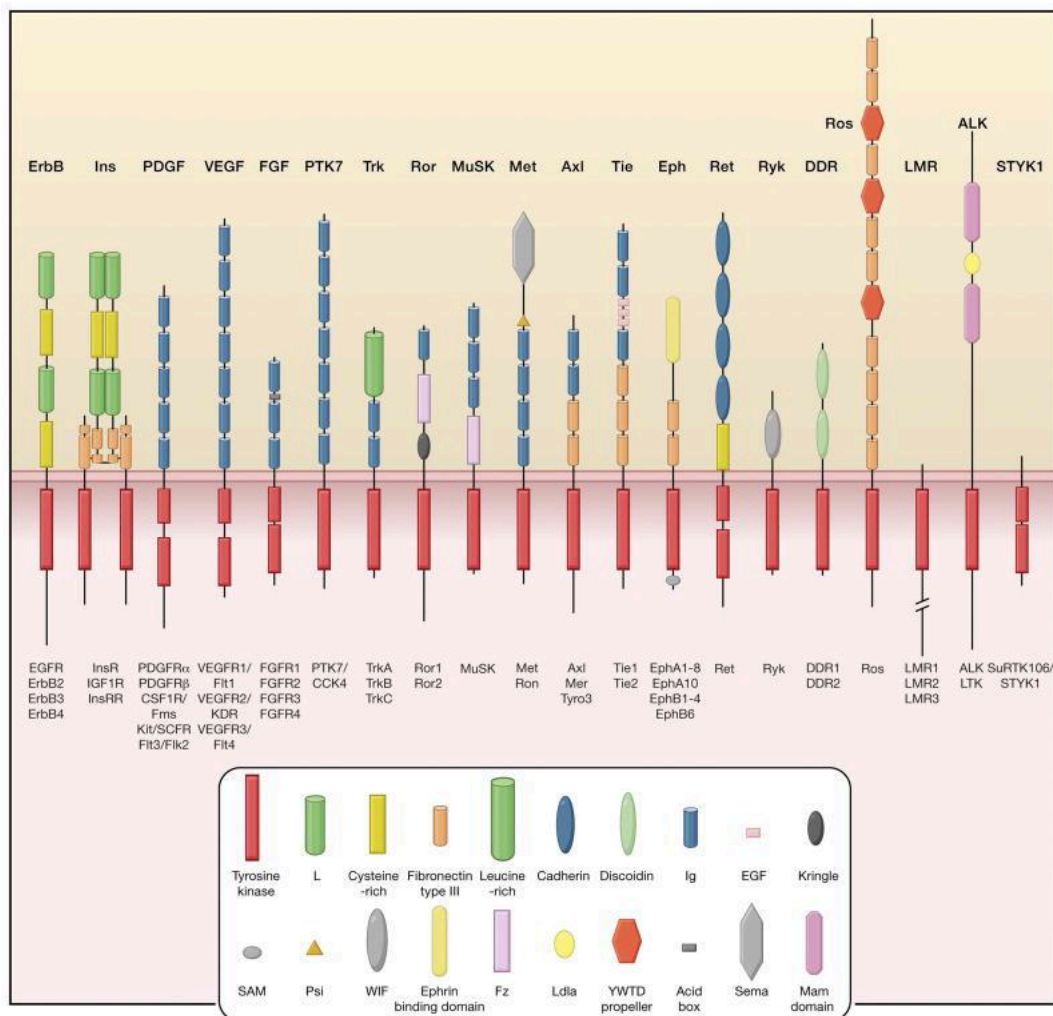


Figure 3 : Structure des 20 familles de récepteurs tyrosine kinase humains. Représentation schématique des 58 RTKs humains décrits regroupés par familles de structure. Les noms de chaque famille sont indiqués en haut et les membres y appartenant sont indiqués en bas. Les domaines extracellulaires variables identifiés par détermination de la structure ou analyse de séquence sont représentés par les rectangles de différentes couleurs alors que les domaines intracellulaires incluant le domaine kinase sont en rouge. (extrait de Lemmon and Schlessinger, 2010).

La fixation d'un ligand au domaine extracellulaire conduit classiquement à la dimérisation du récepteur. Les changements conformationnels consécutifs à la dimérisation aboutissent à la *trans*-autophosphorylation de chacun des domaines kinases ce qui libère le récepteur de son état de *cis*-inhibition. De manière intéressante, bien que les structures de positions inactives soient différentes d'un récepteur à l'autre, l'établissement des structures par cristallographie a montré que la forme active des TKD est très similaire entre eux (Huse and Kuriyan, 2002). En position « off », active, une conformation maintenue permet de bloquer le site actif en y empêchant l'accès de l'ATP et de la protéine substrat. La *trans*-phosphorylation d'un ou plusieurs résidus tyrosine dans le site actif, le domaine juxtamembranaire et/ou l'extrémité carboxy-terminale permet l'ouverture de la poche ATP et donc l'adoption ou la stabilisation de la position « active ». La phosphorylation d'autres tyrosines dans la région cytoplasmique de la plupart des RTKs permet le recrutement et l'activation d'un grand nombre de protéines de signalisation contenant un domaine SH2 (Src homology-2) ou un domaine PTB (Phosphotyrosine binding). Ces domaines interagissent spécifiquement avec ces tyrosines phosphorylées sur le récepteur et permettent l'activation de multiples voies de signalisation *via* d'autres médiateurs relais (Schlessinger and Lemmon, 2003). Certaines protéines de signalisation peuvent être activées indirectement par le récepteur par le biais de protéines d'amarrage (ou protéines « docking ») phosphorylées par le RTK. Ces protéines contiennent classiquement un site de localisation membranaire, suivi d'un ensemble de tyrosines phosphorylables permettant leur interaction avec un panel distinct de protéines de signalisation. Parmi ces protéines d'amarrage, GAB1 (Grb2-associated binder) est recruté par de multiples RTKs alors que d'autres sont restreintes à un sous-groupe particulier de récepteurs.

III. Le récepteur MET : de sa découverte à son rôle physiologique essentiel

Les premières découvertes

Le récepteur MET a été initialement découvert en 1984. Il a été caractérisé la première fois sous la forme de l'oncogène *TPR-MET* dans la lignée humaine d'ostéosarcome HOS traitée par l'agent carcinogène N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine (Cooper et al., 1984). Ce réarrangement met en jeu le gène *tpr* localisé sur le chromosome 1 et un gène encore inconnu. Ce gène inconnu présente des homologies de séquence avec d'autres récepteurs tyrosine kinase et est alors nommé *met* en référence à cet agent carcinogène. La protéine de fusion produite place ainsi le domaine kinase de MET en aval de deux motifs « leucine zipper » codés par *TPR* (*Translocated Promoter Region*). Ces motifs induisent la dimérisation des domaines kinases de MET conduisant à une activation constitutive du récepteur (Rodrigues and Park, 1993). La même année, issu de sérum de rat, un nouveau facteur de croissance d'hépatocytes primaires en culture est identifié et alors nommé « hepatotropin » ou « Hepatocyte Growth Factor » (HGF) (Nakamura et al., 1984). En parallèle, une protéine sécrétée par les fibroblastes embryonnaires humains MRC5 induisant la dispersion des cellules épithéliales MDCK est nommée « Scatter Factor » (SF) (Stoker et al., 1987). Des travaux en 1991 montrent que ces deux facteurs sont une seule et même protéine codée par un gène situé sur le chromosome 7 (Weidner et al., 1991). Dans le même temps, il est démontré que l'HGF/SF est le ligand du récepteur MET (Bottaro et al., 1991; Naldini et al., 1991).

Structures du récepteur MET et de son ligand HGF

Le gène *HGF* localisé sur le chromosome 7 (7q21.1) et constitué de 18 exons permet l'expression dans un premier temps de la protéine pré-pro-HGF formée d'une chaîne linéaire de 728 acides aminés. Cette suite d'acides aminés inclut une séquence peptide signal (aa 1-31), une chaîne α lourde (aa 32-494) et une chaîne β légère (aa 495-728). La forme immature pro-HGF est obtenue après dégradation du peptide signal puis l'HGF mature est généré par clivage entre les résidus Arg494 et Val495. Ce clivage au sein du compartiment extracellulaire peut être réalisé ou régulé par différentes protéines telles que l'urokinase-type plasminogen activator, le plasma kallikrein, les facteurs de coagulation XII et XI, la matriptase et l'hepsine mais l'HGF activator (HGF-A) semble être la sérine protéase majoritairement responsable de l'activation de l'HGF (Itoh et al., 2004; Marchand-Adam et al., 2006).

La forme biologiquement active de l'HGF (697 acides aminés – 90 kDa) est alors constituée de deux sous-unités reliées par des ponts disulfures : une sous-unité α et une sous-unité β . La sous-unité α est porteuse d'un domaine amino-terminal (domaine N) contenant un site de haute affinité pour

l'héparane sulfate (Lyon et al., 1994) et de quatre domaines en boucles (domaines « kringle » K1 à K4) stabilisés par trois liaisons disulfures tandis que la sous-unité β contient une structure serine protease-like (SPH) proche de celle du plasminogène (Figure 4).

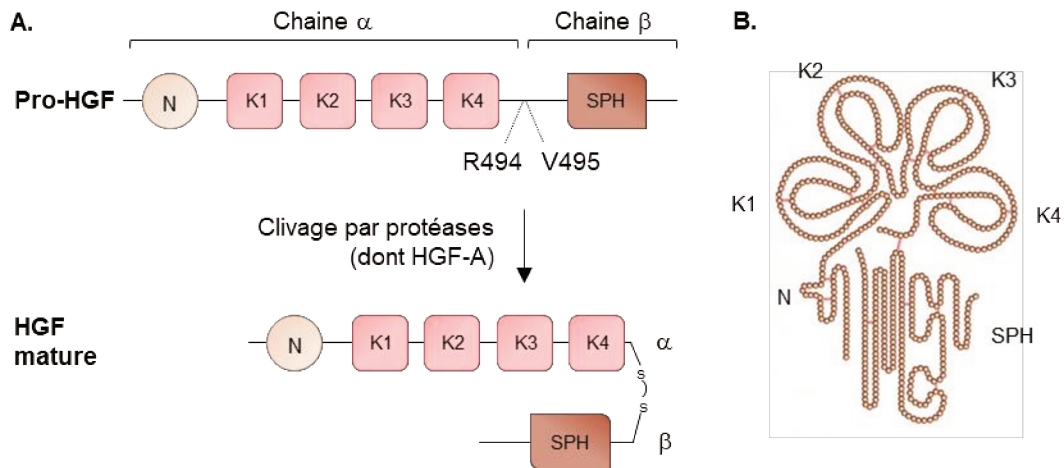


Figure 4 : Maturation et structure de l'HGF. A. L'HGF mature est généré à partir du pro-HGF après clivage par des protéases incluant l'HGF-activator. L'HGF mature est constitué d'une sous-unité α et d'une sous-unité β reliées par des ponts disulfures. La sous-unité α contient le domaine amino-terminal et quatre domaines en boucle (K1 à K4). La sous-unité β contient une structure sérine-protéase-like (SPH). B. Représentation de la structure en domaines de l'HGF mature.

Le récepteur MET, codé par le gène *MET* situé également sur le chromosome 7 (7q31), est synthétisé sous la forme d'un précurseur immature de 170 kDa. Après glycosylation, cette chaîne unique est clivée par des furines générant ainsi une sous-unité α et une sous-unité β liés par des ponts disulfures (Figure 5). Formé par les sous-unités α et β , un domaine SEMA, homologue aux sémaphorines, constitue l'extrémité extracellulaire du récepteur. Sur la chaîne β , ce domaine hétérodimérique est suivi d'un domaine PSI riche en cystéines, nommé ainsi par sa présence dans les plexines, sémaphorines et intégrines. Quatre domaines IPT (IPT 1 à 4 ; immunoglobulin-like regions in plexins and transcription factors) se succèdent ensuite pour compléter le domaine extracellulaire de MET. En 2003, la détermination de la structure par cristallographie du récepteur a permis de montrer que le domaine SEMA est organisé en sept pales concentriques à partir de feuillets β suivi du domaine PSI et des quatre domaines IPT en alignement (Gherardi et al., 2003).

La fixation de l'HGF au récepteur peut se réaliser sur deux sites. L'extrémité amino-terminale de l'HGF peut se lier au domaine SEMA mais également aux domaines IPT3 et IPT4 mais le domaine SPH pourrait également se lier au domaine SEMA de MET. Il existe une isoforme naturelle de l'HGF, N-K1, constitué uniquement des domaines N et K1, capable de reconstituer au moins partiellement les réponses induites par l'HGF, suggérant que ces domaines sont nécessaires et suffisants pour activer le

récepteur MET (Lokker et al., 1994; Rubin et al., 2001). Il a également été montré que N-K1 nécessite une liaison avec l'héparane sulfate extracellulaire comme co-facteur (Lietha et al., 2001; Lyon et al., 2004). La chaîne β du domaine SPH contenant le deuxième site de liaison au domaine SEMA de MET présente une faible affinité pour celui-ci et cette liaison n'est permise qu'après une première activation par l'HGF (Stamos et al., 2004). La détermination de la structure quaternaire des dimères de N-K1 par cristallographie a permis de montrer la structure « tête-bêche » des homodimères d'HGF responsable de la dimérisation des récepteurs MET après leur fixation au domaine SEMA (Gherardi et al., 2006). Par ailleurs, récemment une étude a démontré que le domaine amino-terminal n'est pas requis pour concevoir par synthèse un agoniste de MET puissant puisqu'une construction basée uniquement sur le domaine K1 dimérisé peut activer le récepteur et induire des réponses biologiques de morphogénèse de branchement (Simonneau et al., 2015).

Après un domaine transmembranaire unique, la partie intracellulaire de MET contient un domaine juxtamembranaire, porteur de différents sites de régulation, le domaine kinase et l'extrémité carboxy-terminale permettant le recrutement de protéines adaptatrices pour l'activation des voies de signalisation en aval (Schiering et al., 2003).

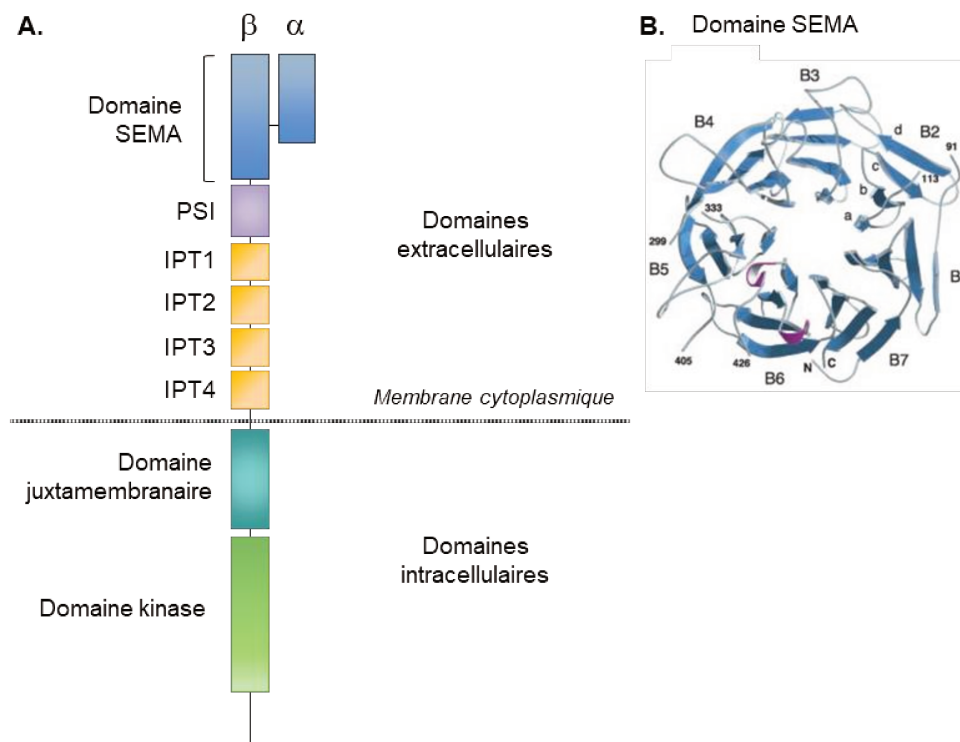


Figure 5 : Structure du récepteur MET. A. Le récepteur transmembranaire MET est constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β liés par des ponts disulfures. Le domaine SEMA, formé par les sous-unités α et β , constitue l'extrémité extracellulaire du récepteur et permet sa liaison au ligand HGF. Sur la chaîne β , le domaine SEMA est suivi d'un domaine PSI, de quatre domaines IPT, du domaine transmembranaire, du domaine juxtamembranaire puis du domaine à activité tyrosine kinase. B. La détermination de la structure par cristallographie du domaine SEMA montre que celui-ci s'organise en sept pâles concentriques par des feuillets β . (extrait de Gherardi et al., 2003).

Mécanismes d'activation et cascades de signalisation du récepteur

La voie traditionnelle : activation par son ligand

L'interaction d'un homodimère d'HGF avec le domaine extracellulaire de MET conduit à sa dimérisation puis l'autophosphorylation des résidus tyrosine situés dans la boucle d'activation du domaine kinase du récepteur (Y1234-Y1235) et la phosphorylation des résidus tyrosine situés en extrémité carboxy-terminale au sein du site Y¹³⁴⁹VHVNATY¹³⁵⁶VNV (*Figure 6*). La mutation de ces dernières tyrosines abolit les capacités transformantes de la forme oncogénique *TPR-MET* en modèle cellulaire et induit des phénotypes similaires à ceux des souris *Met^{-/-}* *in vivo* démontrant le rôle essentiel de ces résidus dans la signalisation de MET (Ponzetto et al., 1994; Maina et al., 1996).

La phosphorylation de ces résidus permet le recrutement de nombreuses protéines effectrices via un domaine SH2 (Src-homology 2) telles que la sous-unité p85 de PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase), SRC, GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2), SHC (SH2 domain-containing transforming protein), PLC γ (Phospholipase C γ) ou le facteur de transcription STAT3 (Boccaccio et al., 1998; Fixman et al., 1996; Pelicci et al., 1995; Ponzetto et al., 1994; Zhang et al., 2002). Des protéines adaptatrices telles que GAB1 (GRB2-associated-binding protein 1) s'associent à ce site phosphorylé pour renforcer la formation d'une plateforme d'amarrage multi-substrats. GAB1 peut interagir avec MET directement par le biais d'un site MBS (MET binding site) ou indirectement par sa liaison à GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2) (Weidner et al., 1996). GAB1 joue alors un rôle essentiel dans l'amplification et la persistance de l'activation des voies de signalisation par MET en recrutant d'autres effecteurs potentialisant l'effet de ceux capables de se lier directement au récepteur.

Des voies particulières indépendantes de l'HGF

En parallèle de son activation canonique par son ligand, le récepteur MET peut également être activé indépendamment de l'HGF par différents mécanismes notamment par interactions avec d'autres protéines membranaires. Ces partenaires incluent certaines intégrines, des plexines ainsi que d'autres RTKs. Il a notamment été montré que le regroupement d'intégrines dans des points focaux d'adhésion peuvent se lier au récepteur et provoquer sa phosphorylation même en absence d'HGF. En miroir, il a été observé une diminution des niveaux de phosphorylation de MET lorsque l'adhésion cellulaire à la matrice est inhibée (Wang et al., 1996; Nakamura et al., 2008). Par ailleurs, Wang et al. montrent que l'adhésion cellulaire peut activer directement le récepteur mais dépendrait également du type cellulaire (Wang et al., 2001). Ils catégorisent alors différentes lignées cellulaires en sous-groupes différenciant les lignées pour lesquelles MET peut être activé uniquement par l'HGF et celles dont MET peut être activé par l'adhésion cellulaire. Les auteurs suggèrent alors que l'activation du récepteur médiée par l'adhésion cellulaire est dépendante du niveau d'expression de MET et sa

surexpression favorise ce processus. Si l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est déjà caractérisée pour être impliquée dans l'activation du récepteur par l'HGF, les intégrines spécifiques et les mécanismes mis en jeu dans l'activation indépendante du ligand restent peu identifiés.

Parmi les autres mécanismes d'activation du récepteur indépendants de l'HGF, nous pouvons citer le rôle des plexines. Les plexines sont des récepteurs transmembranaires qui sont activés par les sémaphorines. La signalisation médiée par le couple plexines/sémaphorines module le réseau du cytosquelette en régulant notamment l'activité de Rac et Rho et l'adhésion dépendante des intégrines. Il a été montré que la stimulation de la plexine B1 par Sema4D favorise une interaction entre MET et plexine B1, cette dernière étant capable également d'interagir avec HER2 (Swiercz et al., 2008). Ces interactions spécifiques affectent particulièrement la réponse cellulaire développée lors de l'activation de la plexine B1 par Sema4D. De manière intéressante, les récepteurs plexines B et MET présentent des similarités au niveau du domaine extracellulaire puisque qu'ils contiennent tous deux un domaine SEMA formant des hélices, un motif riche en cystéine et des domaines IPT (immunoglobulin-like regions in plexins and transcription factors). Le domaine SEMA en hélices favorise les interactions protéiques, il est donc probable que l'association de MET avec plusieurs plexines B soit permise *via* ce domaine. La stimulation de la plexine B1 par Sema4 provoque la phosphorylation de MET. Et cette activation provoque une réponse invasive cellulaire dépendante de l'expression de MET (Conrotto et al., 2004; Giordano et al., 2002).

Le récepteur MET peut également être activé par le biais d'activations croisées avec d'autres RTKs indépendamment de la présence d'HGF. Il a notamment été montré que l'activation de RON par son ligand MSP conduit à la phosphorylation de MET (Follenzi et al., 2000). En outre, l'activation de IGF-1R et de RET par leurs ligands respectifs, l'IGF-1 et le GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), conduisent également à l'activation du récepteur MET (Varkaris et al., 2013; Popsueva et al., 2003). Dans ces deux cas, il a été montré que ces activations croisées ne sont pas la conséquence d'une interaction directe et impliquent la kinase Src qui joue alors le rôle d'effecteur intermédiaire entre les RTKs et MET. Enfin, il semble exister particulièrement une relation étroite et coopérative entre MET et EGFR. Étonnamment, il a été observé que le récepteur Egfr est surexprimé lorsque l'expression de Met est abolie en modèles murins transgéniques suggérant que MET et EGFR peuvent agir en coopération pour assurer le bon développement des organes (Ishibe et al., 2009). Par ailleurs, l'activation de MET est également observée après stimulation du récepteur EGFR par l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Jo et al., 2000). Ce phénomène de transactivation est particulièrement observé lorsque l'expression du récepteur EGFR est élevée. Des complexes MET-EGFR co-immunoprécipités ont pu être détectés dans des lignées de carcinomes épidermoïdes cutanés et des lignées pulmonaires tumorales suggérant la formation d'hétérodimères (Guo et al., 2008; Jo et al., 2000). La formation de

ces hétérodimères, pouvant permettre leur transphosphorylation donc leur activation croisée, n'est cependant pas formellement démontrée. Une coopération entre MET et EGFR pourrait également être indirecte et impliquer la kinase Src comme dans le cas des récepteurs IGF-1R et RET.

Récemment, un nouveau mécanisme d'activation du récepteur MET indépendant de son ligand a été également mis en évidence. Une étude a permis de montrer que la protéine tyrosine kinase FER (Feline Sarcoma-Related kinase) est capable de phosphoryler spécifiquement le résidu Y1356 de l'extrémité carboxy-terminale de MET (Fan et al., 2016) indépendamment d'une stimulation par l'HGF. Cette phosphorylation conduit au recrutement et à la phosphorylation de GAB1 puis l'activation de la voie ERK induisant des réponses migratoires.

Alors que l'activation du récepteur est le plus souvent décrite en réponse à son ligand, des interactions avec d'autres protéines incluant pour la majorité des partenaires membranaires peuvent influencer l'activité du récepteur et induire des réponses biologiques telles que la migration cellulaire. Ces mécanismes décrits apportent une vision différente d'un récepteur souvent cantonné au couple MET/HGF et élargissent notre regard en intégrant ce récepteur dans un environnement membranaire et péri-membranaire dynamique et riche. Dans cet environnement, cette vision du récepteur MET pouvant interagir avec plusieurs partenaires rend compte d'une intégration de signaux extracellulaires complexes et pouvant être combinés.

Cascades de signalisation induites par MET

La signalisation dépendante de MET est organisée en plusieurs voies principales capables de transmettre différentes informations depuis la membrane jusqu'au noyau pour la modulation de l'expression des gènes. Parmi ces voies et à titre d'exemple, nous nous intéresserons principalement à la cascade des MAPK (Mitogen-activated protein kinases), l'axe PI3K-AKT, la voie STAT (signal transducer and activator of transcription) et ses interactions avec le complexe NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) (*Figure 6*).

La voie Ras-Raf-MEK-ERK est aussi une des voies MAPK activée par les RTKs. L'activation de cette voie implique la phosphorylation consécutive plusieurs kinases MAPK. Activées par Ras-Raf, les sérine/thréonine kinases ERKs (Extracellular signal-Regulated Kinases) sont les kinases effectrices principalement impliquées dans cette voie après activation d'un récepteur tyrosine kinase. Dans ce cas-ci, Ras est activé par MET *via* le complexe GRB2/SHC (Bardelli et al., 1994). Après activation médiée par Ras-Raf-MEK1/2 (MAPK/ERK kinase 1/2), ERK phosphorylé dimérise et transloque au noyau où il est capable de phosphoryler et stabiliser plusieurs facteurs de transcription impliqués dans les phases précoces G1-S du cycle cellulaire activant ainsi la prolifération mais pouvant également activer la survie cellulaire. Par ailleurs, il a été montré que l'activation de la voie des MAPK par MET conduisait à

l'activation par phosphorylation du facteur de transcription Ets-1 (Paumelle et al., 2002). L'expression de ce facteur de transcription appartenant à la famille ETS conduit à une réponse plus forte à l'HGF en augmentant particulièrement les capacités migratoires et invasives (Jiang et al., 2001). Ets-1 est notamment connu pour réguler l'expression de plusieurs MMPs (Matrix Metalloprotéases) dont MMP1, MMP7 et MMP9 (Westermarck et al., 1997; Ozaki et al., 2000; Watabe et al., 1998). Les réponses invasives médiées par Ets-1 peuvent alors être la conséquence de la surexpression des MMPs. Par ailleurs notre équipe a montré que l'activation constitutive de MET conduisait à la surexpression des facteurs de transcription de la sous-famille PEA3 de la famille ETS (Kherrouche et al., 2015). Dans une lignée présentant une surexpression du récepteur par amplification génique, les facteurs ETV1, ETV4 et ETV5 de la famille PEA3 sont des pivots de la migration induite par MET. En outre, ces facteurs peuvent également réguler l'expression de plusieurs MMPs dont MMP2 et MMP13 (Dumortier et al., 2018; Kherrouche et al., 2015). L'expression des facteurs PEA3 est réprimée par l'utilisation d'un inhibiteur de MEK (U0126) démontrant l'implication de la voie MAPK-ERK comme relais de l'activation de MET par l'HGF.

En parallèle, la kinase PI3K p85 peut être activée directement par sa liaison au récepteur MET mais aussi indirectement en se liant à GAB1. L'activation de PI3K conduit à la synthèse de PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) à partir de PIP2 (phosphoinositide-4,5-biphosphate) permettant le recrutement à la membrane de protéines porteuses d'un domaine PH (pleckstrine homology) et notamment la sérine/thréonine AKT. L'activation de la voie PI3K/AKT peut induire de nombreuses réponses biologiques. Parmi elles, AKT peut réprimer fortement l'apoptose en inactivant par phosphorylation BAD (BCL-2 antagonist of cell death), un membre pro-apoptotique de la famille BCL-2, mais également en activant MDM2 (Murine Double Minute 2), une E3 ubiquitin-ligase responsable de la dégradation de p53 (Liu, 1999; Moumen et al., 2007). Par ailleurs, comme la voie des MAPKs, l'activation de cette voie stimule la prolifération cellulaire en inactivant la kinase GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 β) permettant la levée d'inhibition de régulateurs positifs du cycle cellulaire tels que Myc et la cycline D1 (Pap and Cooper, 1998).

De la même façon, STAT3 peut être recruté au niveau du site d'amarrage en extrémité carboxy-terminale de MET suite à son activation (Boccaccio et al., 1998; Zhang et al., 2002). Consécutivement, la phosphorylation de STAT3 provoque sa dissociation du récepteur et sa dimérisation par le biais de ses domaines SH2. Ces dimères STAT peuvent alors transloquer au noyau et réguler l'expression de gènes impliqués dans la prolifération ou la différenciation.

Enfin, parmi les voies de signalisation majeures activées, nous pouvons citer la voie NF- κ B. Ce système comprend des facteurs de transcription (p65 RelA, RelB, p100/p52 NF κ B2, p105/p50 NF κ B1)

initialement présents sous forme inactive monomérique dans le cytoplasme. Cette forme inactive est maintenue par la famille de protéines I κ Bs (Inhibitors of κ Bs). L'activation de la voie PI3K-AKT et de Src par MET conduit à l'activation des kinases IKK (I κ B kinase). Ces kinases sont alors responsables de la phosphorylation puis de l'ubiquitination des I κ Bs. Ceci conduit à leur dégradation permettant alors la libération des facteurs NF- κ B, notamment la sous-unité p65/RelA, capables de transloquer au noyau et de stimuler l'expression de nombreux gènes impliqués dans la survie cellulaire tels que cIAP1 (cellular inhibitor of apoptosis-1), cIAP2 et TRAF-2 (TNF receptor-associated-factor-12) (Fan et al., 2005).

De nombreuses protéines impliquées dans plusieurs voies participent à la signalisation du récepteur MET et seulement certaines voies majeures ont été détaillées ici à titre d'exemple. Par ailleurs, il existe des interconnexions entre ces différentes voies permettant encore l'amplification de la signalisation complexe induite par MET. L'amplification du signal et l'orientation vers l'une ou l'autre de ces voies permettent ainsi l'induction d'une réponse biologique coordonnée.

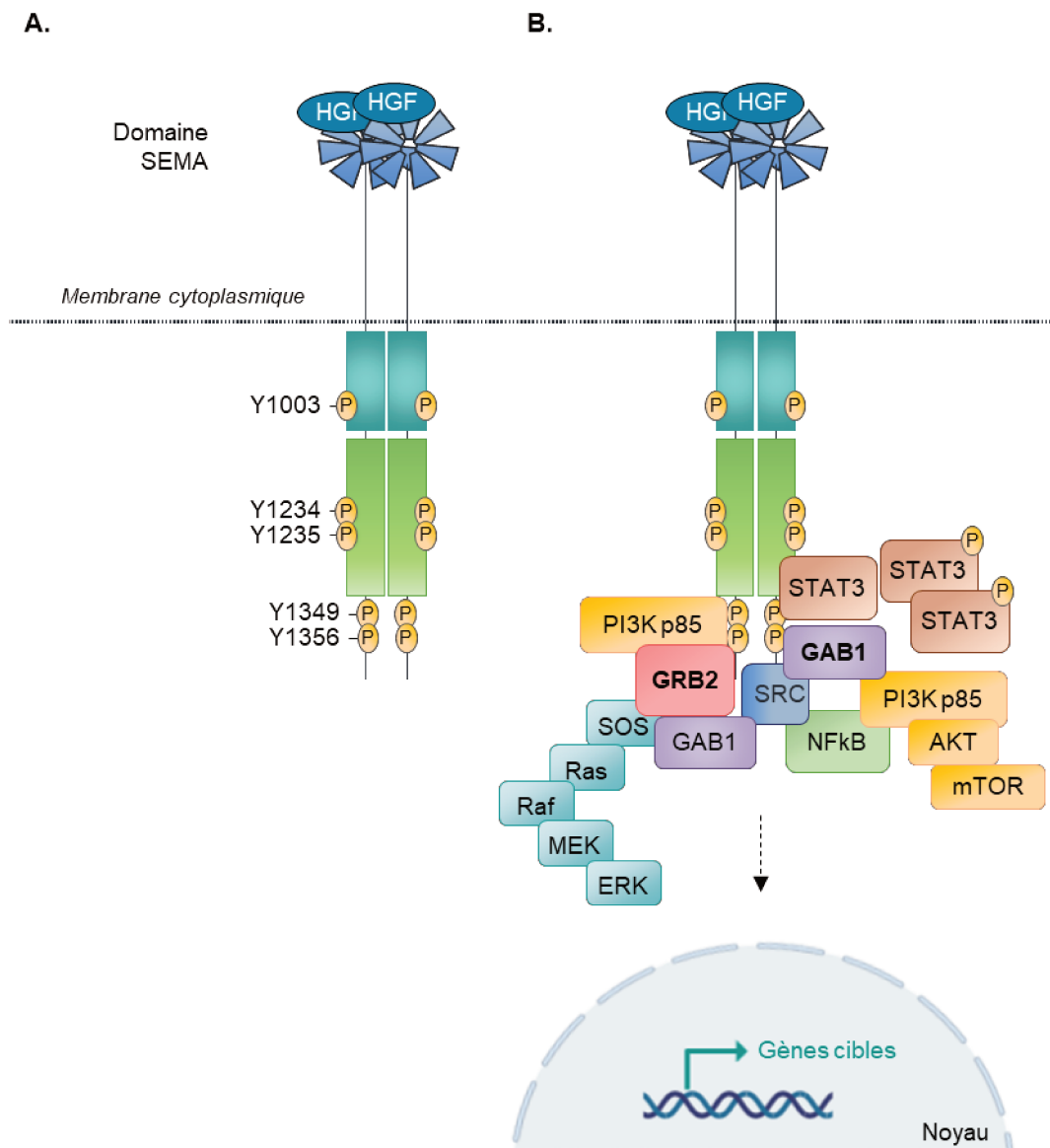


Figure 6 : Activation du récepteur MET par l'HGF et cascades de signalisation induites. A. La liaison d'un dimère d'HGF au récepteur conduit à son homodimérisation puis l'autophosphorylation de plusieurs résidus tyrosine. Au niveau du domaine kinase, les résidus Y1234 et Y1235 sont phosphorylés dans un premier temps. Ensuite, les résidus Y1349 et Y1356 du domaine carboxy-terminal sont phosphorylés permettant le recrutement de plusieurs protéines adaptatrices ou effectrices. Le site régulateur Y1003 dans le domaine juxtamembranaire est également phosphorylé après l'activation du récepteur. B. Le domaine carboxy-terminal phosphorylé peut interagir avec des protéines effectrices (PI3K, STAT3, SRC) mais également avec des protéines adaptatrices (GRB2, GAB1) par leur motif SH2. La plateforme d'amarrage formée permet l'activation de plusieurs voies de signalisation dont les voies MAPK-ERK, PI3K-AKT et NFκB. L'activation de ces voies induit diverses réponses biologiques telles que la prolifération, la survie ou encore la migration.

Régulation négative directe de l'activité du récepteur

Puisque le récepteur MET peut induire l'activation de nombreuses voies de signalisation ayant un rôle dans des fonctions telles que la prolifération, la survie et la migration, il est nécessaire que le récepteur puisse être inactivé et retourner dans un état basal. Bien que tous les mécanismes de régulation négative du récepteur MET ne soient pas forcément connus, nous pouvons au moins décrire l'implication de la sérine 985 et des phosphatases comme étant des processus à action directe sur l'activité kinase du récepteur.

Rôle particulier de la sérine 985

Au sein du domaine juxtamembranaire du récepteur, le résidu sérine 985 fut historiquement le premier site de régulation négative identifié. Cependant, son rôle physiologique et potentiellement tumorigénique reste encore assez mal connu. Après stimulation par l'HGF, le résidu S985 est phosphorylé par la PKC (*Protein Kinase C*). Cette phosphorylation induit une diminution de l'activité tyrosine kinase du récepteur par un mécanisme encore inconnu (Gandino et al., 1994). La déphosphorylation du résidu S985, permettant un retour à l'état initial, est assurée par la phosphatase PP2A (Hashigasako et al., 2004). Par ses capacités à induire une inhibition de l'activité tyrosine kinase de MET, la phosphorylation de S985 permet d'inhiber les effets mitogènes de l'HGF mais également de stimuler l'endocytose clathrine-dépendante de MET diminuant ainsi le nombre de récepteurs activables à la membrane. Enfin, ce mécanisme semble être impliqué dans la régulation de l'activité de MET *in vivo*. En effet, lors de la régénération du foie après lésion, une diminution de phosphorylation de la S985 est associée à une augmentation de la réponse mitogène induite par l'HGF (Nakayama et al., 2013).

Inactivation directe par les phosphatases

L'activité des RTKs peut être réprimée par l'action de phosphatases capables d'interagir directement avec eux. Les protéines tyrosine phosphatases (PTPs) composent une large famille de plus de 100 protéines qui peuvent être cytoplasmiques ou membranaires. Parmi elles, plusieurs phosphatases sont capables d'intervenir dans la régulation de MET. Villa-Moruzzi et al. montrent que la phosphatase PTP-S est capable de se fixer au niveau du domaine juxtamembranaire (résidus 995 à 1009) du récepteur activé après stimulation par le ligand (Villa-Moruzzi et al., 1998). De plus, les phosphatases PTP1B (ou PTPN1) et TCPTP (T-cell phosphatase ou PTPN2) déphosphorylent les résidus Y1234-Y1235 du domaine kinase activé. *In vivo*, des souris transgéniques pour lesquelles *PTP1B* est invalidé montrent une augmentation de la phosphorylation de MET plus forte au cours du temps après stimulation par l'HGF associée à une élévation de l'activation des voies de signalisation en aval telles que les voies MAPK, JNK et ERK (Sangwan et al., 2008a). D'autres phosphatases peuvent réguler MET, parmi elles, PTPRB (Receptor-type tyrosine-protein phosphatase ou RPTP- β) déphosphoryle

spécifiquement le résidu Y1356, site impliqué dans le recrutement des protéines adaptatrices, et permet de réduire significativement les capacités migratoires induites par l'HGF en inhibant l'activation de la voie ERK (Xu et al., 2011, 2012). Par ailleurs, la phosphatase PTPRF (ou LAR) dont l'expression et l'activité sont augmentées après stimulation par l'HGF, déphosphoryle également le récepteur régulant l'activité des voies MAPK et PI3K liée à l'inhibition de contact (Kulas et al., 1996; Machide et al., 2006). Enfin, PTPRJ (ou DEP-1) induit une déphosphorylation préférentielle des résidus Y1349 et Y1356 en extrémité carboxy-terminale mais également de la protéine d'amarrage GAB1 et de la sous-unité p120 de la β -caténine impliquée dans la motilité liée à MET (Palka et al., 2003). En conclusion, les modes de recrutement et d'action des phosphatases sont finalement peu connus alors qu'ils pourraient être un mécanisme clef de régulation négative de l'activité du récepteur.

Internalisation du récepteur par endocytose

Dégradation du récepteur après internalisation

Après stimulation par son ligand, le récepteur MET est rapidement soumis à endocytose pour s'accumuler dans des vésicules desquelles sa signalisation peut être maintenue, il peut ensuite être dégradé ou recyclé (*Figure 7*). L'internalisation de MET après activation par l'HGF est principalement dépendante de la clathrine et de la dynamine puisque la répression de ces deux acteurs altère significativement l'endocytose du récepteur (Hammond et al., 2001; Joffre et al., 2011; Kermorgant and Parker, 2008). L'ubiquitine ligase CBL joue également un rôle majeur dans ce processus. CBL peut être recruté à MET par deux mécanismes distincts : une interaction directe et indirecte. Le domaine TKB (Tyrosine Kinase Binding), contenant entre autre un motif variant SH2, permet la reconnaissance et l'interaction avec le site Y1003 phosphorylé inclus dans le motif DYP au sein du domaine juxtamembranaire (Peschard et al., 2004). CBL peut également se lier indirectement à MET *via* le domaine SH3 de GRB2 lié au résidu Y1356 phosphorylé (Li et al., 2007). Il peut également servir de lien entre MET et l'endophiline responsable de la courbure de la membrane via le complexe CIN85 (Petrelli et al., 2002). Comme pour la clathrine et la dynamine, la répression génique de CBL ou GRB2 ou des mutations de leurs sites de liaison à MET déstabilisent ce processus (Joffre et al., 2011; Li et al., 2007). Abella *et al.* montrent cependant que l'ubiquitination de MET par CBL n'influence pas son internalisation mais est indispensable au ciblage de MET par les composants de la machinerie lysosomale pour sa dégradation (Abella et al., 2005). L'implication de CBL dans l'initiation du processus d'endocytose reste donc en discussion.

Après cette première étape de formation des endosomes précoces, le passage des vésicules vers le compartiment périnucléaire se réalise le long des microtubules et est stimulé par la protéine PKC α (Protein kinase C) (Kermorgant et al., 2003) et la phosphatase PTP1B (Sangwan et al., 2011).

Après sa stimulation par l'HGF et probablement au cours de son internalisation, le récepteur est rapidement polyubiquitiné par CBL (Peschard et al., 2001). Le déplacement du récepteur depuis la membrane et portant ces marques d'ubiquitination est nécessaire à la phosphorylation de HRS (HGF-regulated tyrosine kinase substrate) localisé au niveau de l'endosome et impliqué dans le tri des récepteurs vers le corps multivésiculaire et leur dégradation ultérieure (Abella et al., 2005; Hammond et al., 2001, 2003).

Moins décrite, la molécule LRIG1 est impliquée dans un autre processus de dégradation de MET non médié par CBL et indépendant d'une activation du récepteur par l'HGF. L'ubiquitination de LRIG1 favorise le recrutement du complexe LRIG1-MET aux vésicules lysosomales *via* l'interaction de LRIG1 avec HRS. Leur présence au sein de ces vésicules conduira *in fine* à la dégradation concomitante de MET et LRIG1. Les mécanismes régulant positivement l'ubiquitination de LRIG1 ne sont pas connus, cependant, la désubiquitination de celle-ci par UP58 permet de réduire l'activité de LRIG1 sur MET (Shattuck et al., 2007; Lee et al., 2014).

Bien que l'inhibition du lysosome ou du protéasome conduisent tous deux à une augmentation de la stabilité du récepteur, l'implication du lysosome dans la dégradation du récepteur par fusion avec les endosomes est clairement établie alors que l'action du protéasome dans la dégradation de MET est encore peu caractérisée et pourrait être plutôt indirecte (Carter et al., 2004; Hammond et al., 2001; Kermorgant et al., 2003).

Comme pour d'autres récepteurs, MET peut aussi être recyclé vers la membrane après son internalisation, bien qu'à ce jour peu d'études aient permis de mettre en évidence tous les mécanismes sous-jacents. Cependant, il a été démontré dans les cellules HeLa qu'un pool de MET internalisé est recyclé après stimulation par l'HGF. Ce processus fait intervenir une interaction spécifique de MET avec la protéine GGA3 (Golgi-localised gamma ear-containing Arf-binding protein 3) des endosomes. De manière intéressante, les mutations activatrices M1268T (ou M1250T) et D1246N (ou D1228N) du domaine kinase du récepteur provoquent un recyclage permanent de MET à la membrane associé à un défaut de dégradation (Joffre et al., 2011).

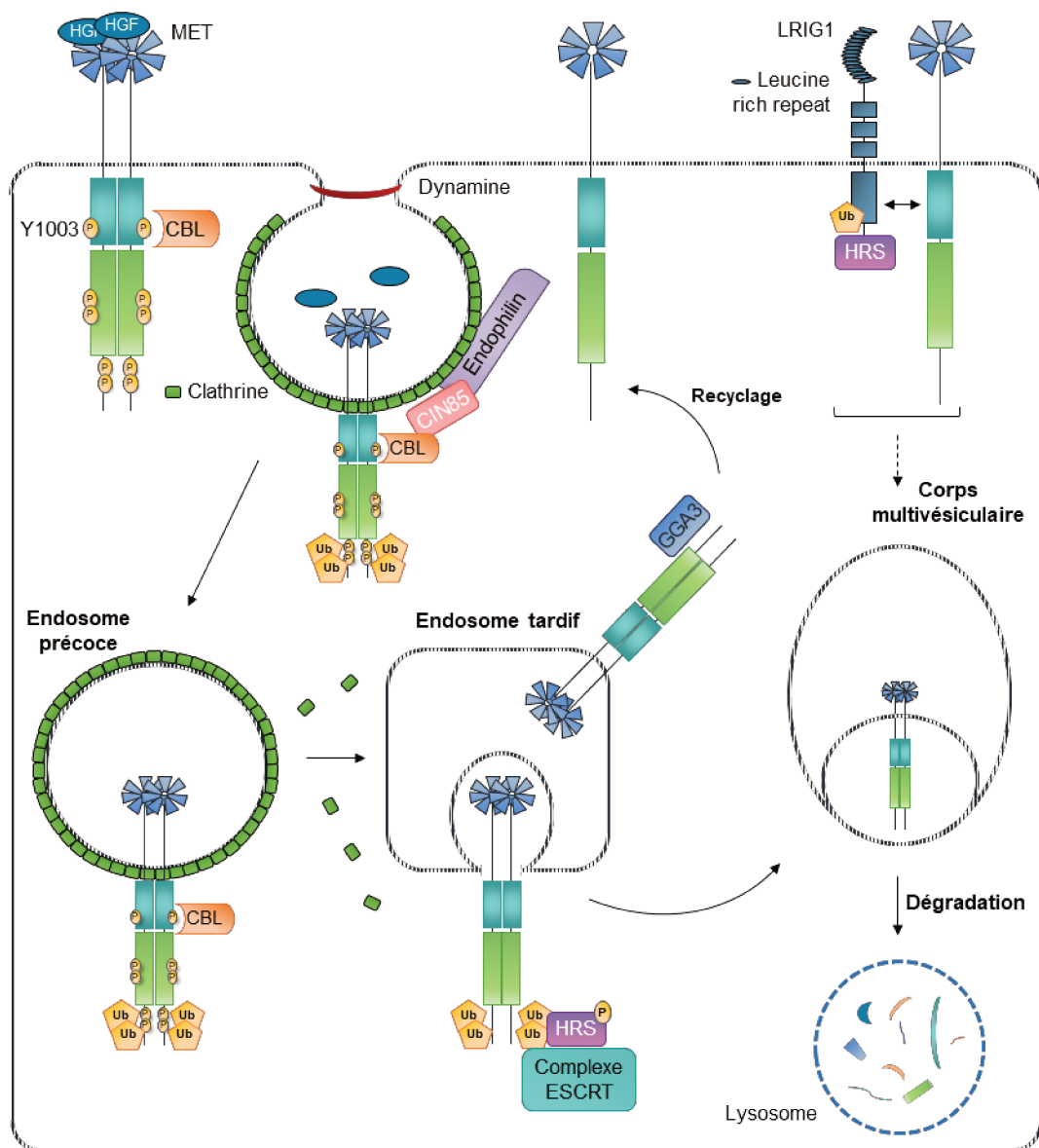


Figure 7 : Internalisation par endocytose du récepteur MET. L'activation du récepteur par l'HGF conduit à la phosphorylation du site Y1003. Cette phosphorylation permet le recrutement de l'E3 ubiquitine ligase CBL qui va ainsi fixer plusieurs molécules d'ubiquitine sur le récepteur en parallèle de l'internalisation de MET au sein de vésicules de clathrine. La formation de ces vésicules de clathrine est permise par la génération d'une hélice de dynamine autour du point de fusion de la membrane. La fixation de CBL permet également de lier MET et l'endophiline responsable de la courbure de la membrane via le complexe CIN85. Au niveau des endosomes tardifs, l'ubiquitination du récepteur permet la phosphorylation de HRS puis le recrutement du complexe ESCRT conduisant à l'adressage du récepteur vers les corps multivésiculaires. Ces corps multivésiculaires fusionnent ensuite avec des lysosomes conduisant à la dégradation du récepteur. Dans les endosomes tardifs, l'association de MET avec GGA3 permet le recyclage de MET vers la membrane. Par ailleurs, l'ubiquitination de LRIG1 à la membrane favorise le recrutement du complexe LRIG1-MET aux vésicules lysosomales médiée par l'interaction de LRIG1 avec HRS. L'adressage du complexe LRIG1-MET aux vésicules lysosomales conduit également à leur dégradation concomitante.

Maintien de la signalisation au cours de l'internalisation

Si ce processus d'internalisation puis de dégradation est traditionnellement décrit comme un mécanisme de régulation négative des RTKs, MET est capable de poursuivre sa signalisation depuis ces endosomes où il peut rester actif (Kermorgant and Parker, 2008; Kermorgant et al., 2004). Par exemple, les récepteurs mutés en M1268T et D1246N ayant un défaut de dégradation s'accumulent alors dans des endosomes d'où ils continuent leur signalisation avant d'être adressés de nouveau à la membrane. Cette persistance de signalisation sous forme endosomale est essentielle à leur potentiel tumorigénique puisque le blocage du processus d'endocytose permet de diminuer, entre autres, la croissance tumorale de cellules exprimant ces mutations de MET. La phosphorylation du récepteur n'ayant pas été affecté, la diminution des capacités transformantes de MET est donc bien la conséquence de son défaut de localisation (Joffre et al., 2011).

Plusieurs études tendent notamment à démontrer l'importance de l'internalisation du récepteur dans l'activation de la voie ERK (*Figure 8*). Dans les cellules HeLa, les capacités de migration cellulaire sont dépendantes de la localisation de MET dans les endosomes précoces desquels ERK1/2 phosphorylé transloque vers des régions activatrices relais (Kermorgant et al., 2004). Par ailleurs, la perte de GGA3, dont l'interaction permet le recyclage de MET, conduit à une diminution de l'activation de ERK1/2 (Parachoniak et al., 2011). De plus, peu de temps après la stimulation par l'HGF, MET est internalisé puis repositionné au pôle apical des cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney). De cette localisation, il se lie à GAB1 qu'il phosphoryle ensuite conduisant à la formation de « dorsal ruffles », des protrusions membranaires riche en filaments d'actine. Dans ces microdomaines, les complexes MET-GAB1 peuvent activer particulièrement ERK1/2 (Abella et al., 2010). D'autre part, l'internalisation de MET et sa sublocalisation périnucléaire est requise pour une activation efficace de STAT3. Des phosphatases cytoplasmiques déphosphorylent rapidement STAT3 inhibant ainsi son activité. L'activation de STAT3 par MET au sein du compartiment périnucléaire permet ainsi sa protection vis-à-vis de ces phosphatases et son accumulation sous forme phosphorylée dans le noyau (Kermorgant and Parker, 2008).

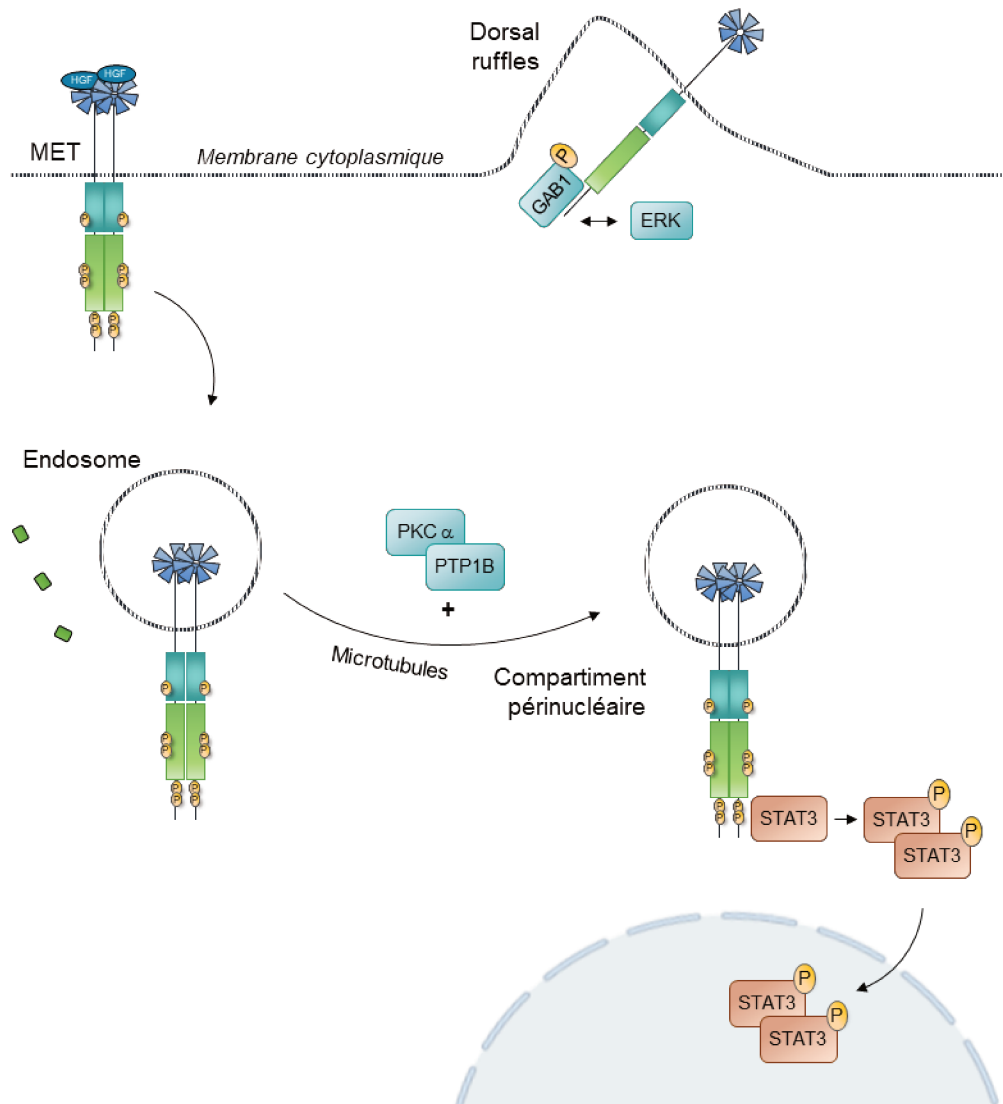


Figure 8 : Signalisation du récepteur MET au cours de son internalisation. Après internalisation du récepteur, les vésicules de clathrine fusionnent avec les endosomes. Depuis les endosomes, MET peut être repositionné au pôle apical duquel il phosphoryle GAB1 conduisant à la formation de « dorsal ruffles », des protrusions membranaires riches en filament d'actine. Dans ces régions, les complexes MET-GAB1 peuvent activer particulièrement ERK. D'autre part, les endosomes peuvent rejoindre le compartiment périnucléaire le long des microtubules et ce transport est stimulé par PKC α et PTP1B. La sublocalisation périnucléaire des complexes MET-STAT3 permet la translocation des dimères STAT3 phosphorylés.

Implications des clivages de MET dans plusieurs processus biologiques

La signalisation induite par l'activation du récepteur MET à la membrane par l'HGF est bien décrite et conduit à de nombreuses réponses biologiques communes à d'autres récepteurs tyrosine kinase. De manière particulière, le récepteur MET est également soumis à différents clivages protéolytiques et plusieurs fragments issus de ces clivages sont impliqués dans des processus biologiques (*Figure 9*). L'étude de ces fragments, découverts pour certains par notre laboratoire, permet d'avoir une vision originale des implications cellulaires de MET. La revue « Proteolytic cleavages of MET : the divide-and-conquer strategy of receptor tyrosine kinase » en annexe (p. 89) présente l'état de la littérature des fragments de MET connus et seront présentés ici un descriptif plus bref de ces éléments.

Régulation de la stabilité du récepteur MET : clivage par les sécrétases

Découvert dans les années 1990, le premier fragment de MET d'une taille d'environ 90 kDa est détecté dans un surnageant de culture (Prat et al., 1991). En fait, le récepteur MET, comme d'autres RTK, est soumis à un mécanisme de protéolyse intramembranaire régulé par les présénilines (PS-RIP, presenilin-regulated intramembrane proteolysis). Le récepteur est dans un premier temps clivé sur un site non identifié par les métallo-protéases membranaires ADAM-10 et ADAM-17 (Kopitz et al., 2007; Yang et al., 2012). Cette première étape génère un fragment soluble porteur de l'extrémité amino-terminale et constitué du domaine extracellulaire de MET (MET-NTF ou appelé également soluble MET, sMET) d'une taille d'environ 90 kDa alors que persiste transitoirement un fragment, d'environ 55 kDa, transmembranaire et cytoplasmique porteur de l'extrémité carboxy-terminale de MET (MET-CTF ou p55 MET). Ce fragment peut être internalisé puis dégradé par le lysosome. Cependant, ce fragment peut subsister et être soumis à un deuxième clivage par le complexe γ -sécrétase, dont la préséniline est la sous-unité catalytique, et ainsi générer un nouveau fragment labile intracellulaire de MET (MET-ICD ou p50 MET) dégradé ensuite par le protéasome dans le cytosol (Foveau et al., 2009; Ancot et al., 2012). Bien que ce clivage intervienne en conditions basales, il apparaît que l'interaction de MET avec l'HGF stimule ce clivage et d'une manière dose-dépendante (Wajih et al., 2002). Cet effet est par ailleurs associé à une augmentation de l'expression des métallo-protéases ADAM-10 et ADAM-17 dans le cas de trophoblastes traitées par de l'HGF (Yang et al., 2012). Ce processus de protéolyse, induisant la dégradation de MET, diminue le temps de demi-vie du récepteur et permet de prévenir son accumulation à la membrane. Bien que les fragments MET-CTF et MET-ICD soient labiles, le fragment sMET est détecté facilement dans le surnageant de culture mais également dans le sang et l'urine (Copin et al., 2016; McNeil et al., 2014; Wajih et al., 2002). Il a été démontré qu'une augmentation du fragment sMET, dans le surnageant de culture, permet de réduire les réponses d'invasion induites par l'HGF (Yang et al., 2012). En outre, l'inhibition des ADAMs induisant une accumulation de MET à la

membrane potentialise les réponses induites par l'HGF (Miller et al., 2013). Par ce contrôle d'expression membranaire du récepteur par dégradation, ce processus est un véritable mécanisme de régulation négative de MET. Le récepteur MET soluble présente une plus faible affinité pour l'HGF que le récepteur ancré à la membrane (Wajih et al., 2002). Il semblerait alors qu'un excès significatif de sMET soit nécessaire pour entrer en compétition avec le ligand. Cependant, l'action physiologique de ce fragment ou son implication dans la tumorigenèse n'est pas encore claire.

Implication de MET dans l'apoptose : clivage par les caspases

Alors que l'activité du récepteur est plutôt associée à la survie cellulaire, le récepteur MET présente également une face cachée en étant capable de potentialiser les processus apoptotiques en fonction du contexte cellulaire. En effet, après induction de l'apoptose, un fragment intracellulaire contenant le domaine kinase de MET et d'environ 40 kDa est détecté (p40 MET^{caspase}). Ce fragment résulte d'un premier clivage par les caspases sur les résidus D1376 ou D1380 en extrémité carboxy-terminale (site DNAD¹³⁷⁶DEVD¹³⁸⁰) puis d'un second clivage par la caspase 3 au sein du domaine juxtamembranaire sur le résidu D1002 (site ESVD¹⁰⁰²) (Foveau et al., 2006). En séparant le domaine extracellulaire capable de lier l'HGF du domaine kinase de MET, ce clivage ne permet plus l'activation des voies de signalisation de survie induite par l'HGF. Il a pu être mis en évidence en outre que le fragment p40 MET présente une capacité pro-apoptotique intrinsèque. En effet, la surexpression de ce fragment dans des cellules MDCK induit une augmentation de la mort cellulaire associée à l'activation de la caspase 3 (Tulasne et al., 2004). L'induction d'une hépatite fulminante *in vivo* conduit également à la génération de p40 MET (Lefebvre et al., 2013). L'implication de p40 MET dans l'apoptose est dépendante de la réalisation des deux clivages successifs au site DNADDEVD en extrémité carboxy-terminale puis dans le domaine juxtamembranaire. L'expression de la forme non-apoptotique de p40 MET, non clivée en extrémité carboxy-terminale, par des souris transgéniques/knock-in mutées sur le résidu D1374 (p. D1374N) favorise la survie des hépatocytes après induction de l'apoptose par l'agoniste de FAS (Duplaquet et al., 2020). De manière intéressante, le peptide de dix acides aminés porteur de l'extrémité carboxy-terminale généré par le premier clivage est capable d'inhiber l'activité de la caspase 3 lorsqu'il est surexprimé de manière exogène (Ma et al., 2014). Ceci suggère donc que le premier clivage favorise la survie cellulaire, une réponse biologique induite par le récepteur MET activé par son ligand, alors que le second clivage, au sein du domaine juxtamembranaire, participe ensuite activement au processus apoptotique en induisant la perméabilisation mitochondriale.

Des travaux récents de notre équipe montrent que ce fragment en se localisant au niveau de la région MAM (mitochondria-associated ER membranes), l'interface entre le réticulum endoplasmique (RE) et la mitochondrie, favorise la perméabilisation de la membrane mitochondriale,

une des étapes clés de l'apoptose (Duplaquet et al., 2020). Les membres de la famille BCL2, régulateurs majeurs de l'apoptose par régulation des flux calciques entre autres, se localisent au niveau de la membrane externe de la mitochondrie mais sont aussi présents au RE (Rong et al., 2008). Il a été montré que la répression de l'expression de BAK réduit la mort cellulaire des cellules mammaires MCF10A induite par p40 MET alors que cet effet est absent lors de la répression de BAX. (Lefebvre et al., 2013; Duplaquet et al., 2020). Des expériences de FRET ont montré que la protéine pro-apoptotique BAK est capable d'interagir avec p40 MET dans les cellules MCF10A et les cellules hépatiques IHH. Lorsque BAK est activé, il peut induire un relargage massif de calcium du RE conduisant à une accumulation mitochondriale calcique favorisant ainsi l'apoptose (Mebratu et al., 2017). Ainsi, l'interaction de p40 MET avec BAK dans les MAM favoriserait le processus apoptotique engagé en stimulant les échanges calciques entre le RE et la mitochondrie.

Par ses capacités à participer au processus d'apoptose en absence d'HGF alors que l'activation du récepteur par son ligand régule de nombreuses voies de signalisation dont certaines associées à la survie cellulaire, MET appartient à la famille des récepteurs à dépendance. En effet, bien que les récepteurs soient considérés comme inactifs lorsqu'ils ne sont pas activés par leur ligand, certains RTKs tels que TRKC, TRKA, KIT, RET, EPHA4, ALK et IGF-1R sont capables de participer à la mort cellulaire en absence de stimulation (Negulescu and Mehlen, 2018). L'équilibre fin entre survie et apoptose est donc partiellement dépendant de ces récepteurs dont fait désormais partie le récepteur MET.

Autres clivages

D'autres fragments du récepteur MET ont été mis en évidence et seront ici décrits plus brièvement. En premier lieu, nous pouvons citer un fragment généré durant la nécrose. La nécrose, souvent décrite comme un phénomène non régulé, est désormais caractérisée comme un véritable processus de mort cellulaire indépendant des caspases. L'induction de nécrose par stress calcique est associée à une diminution de l'expression de MET dans les quelques minutes suivant la stimulation. Cette baisse d'expression est associée à une perte des capacités de stimulation du récepteur par l'HGF (Montagne et al., 2015). En parallèle de cette baisse d'expression du récepteur pleine longueur, un fragment intracellulaire et un fragment extracellulaire sont détectés. Similairement au processus de protéolyse PS-RIP, un clivage réalisé par les ADAMs permet la libération du fragment extracellulaire d'environ 90 kDa. En second temps, un fragment intracellulaire d'environ 40 kDa est ensuite généré par l'action des protéases calpaïnes. Les calpaïnes, dépendantes du calcium, sont particulièrement activées durant la nécrose et clivent notamment les protéines du cytosquelette telles que la spectrine et la tubuline (Billger et al., 1988). Le fragment p40 MET^{calpaïne} généré est proche du fragment p40 MET^{caspase} car les deux clivages ont lieu dans le domaine juxtamembranaire, cependant les caspases clivent au niveau du motif ESVD1002 alors que les calpaïnes clivent au niveau du résidu T1036. En

outre, le fragment p40 MET^{calpaïne} conserve son extrémité carboxy-terminale et son expression exogène n'induit pas l'apoptose comme observé pour le fragment p40 MET^{caspase} (Montagne et al., 2015).

Enfin, un fragment intracellulaire d'environ 45 kDa est détecté lorsque des cellules sont portées à confluence. De manière intéressante, la mutation du résidu R970 au sein du domaine juxtamembranaire favorise d'autant plus la génération de ce fragment, probablement par les calpaïnes, dans ces mêmes conditions de densité cellulaire (Montagne et al., 2017). Compte tenu de la taille du fragment, le clivage de MET aux abords du résidu R970 au sein du domaine juxtamembranaire est cohérent avec la taille du fragment mais il n'a pas encore été décrit de site consensus de reconnaissance par les calpaïnes. Le fragment p45 MET se distingue des autres fragments décrits précédemment puisque sa génération n'est pas associée à une diminution de la forme pleine longueur du récepteur. Ce clivage n'apparaît donc pas comme un mécanisme de régulation négative du récepteur MET. De plus, si les fragments p40 MET^{caspases} et p40 MET^{calpaïnes} sont impliqués dans la mort cellulaire, l'expression exogène du fragment p45 MET favorise la dispersion et l'invasion cellulaire (Montagne et al., 2017). En revanche, les mécanismes par lesquels p45 MET induit la motilité cellulaire restent non élucidés. Ce fragment ne présentant pas de phosphorylation des résidus tyrosine du domaine kinase, cela suggère cependant un mécanisme différent de celui de l'activation canonique du récepteur membranaire pleine longueur.

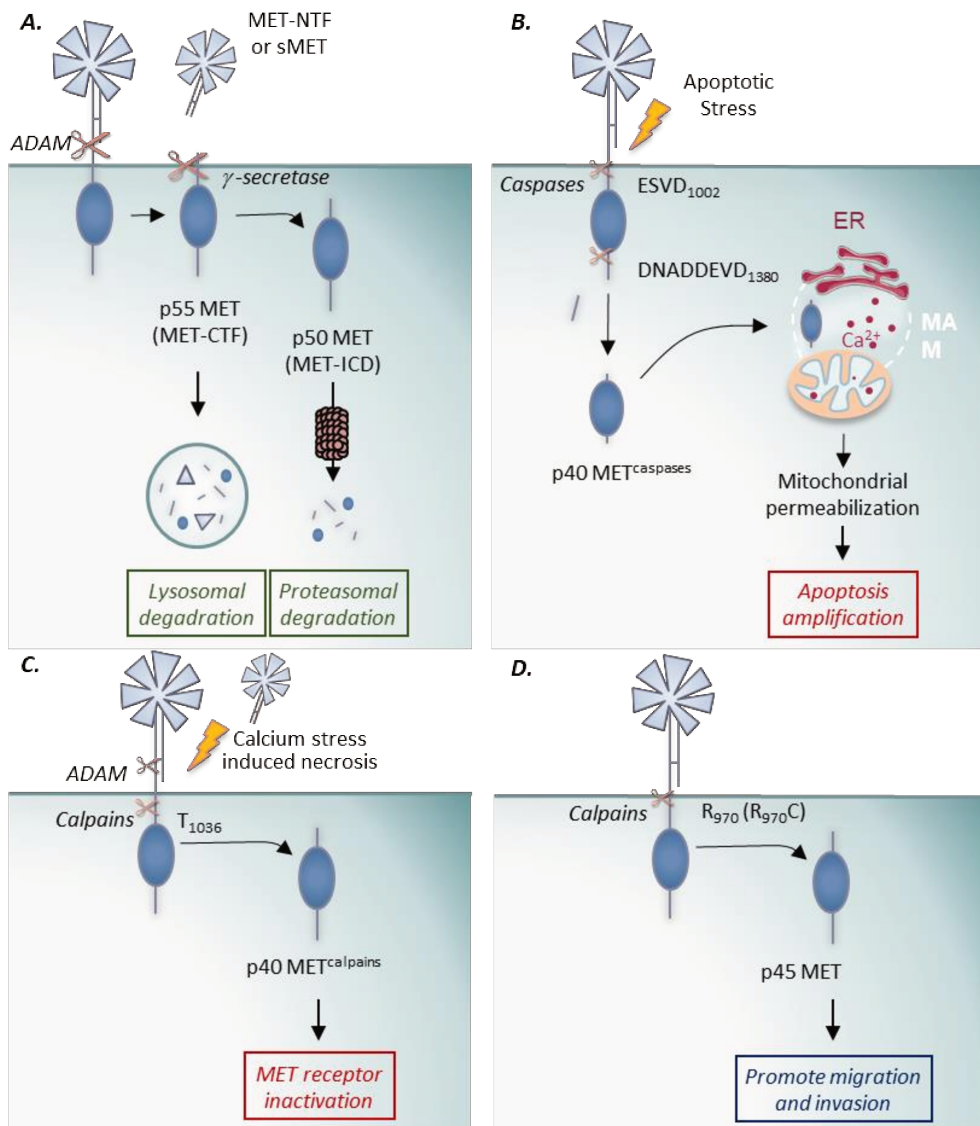


Figure 9 : Description des clivages protéolytiques du récepteur MET. A. En conditions basales, la protéolyse de MET par PS-RIP est réalisée par un premier clivage des protéases ADAM générant le fragment extracellulaire MET soluble (ou MET-NTF) et le fragment intracellulaire p55 MET (ou MET-CTF). Un second clivage de p55 MET par la γ -sécrétase génère le fragment p50 MET (ou MET-ICD). Les fragments p55 MET et p50 MET sont ensuite dégradés respectivement par le lysosome et le protéasome. B. Durant l'apoptose, le domaine juxtamembranaire est clivé par les caspases générant le fragment p40 MET^{caspase}. Ce fragment favorise la perméabilisation mitochondriale ce qui amplifie l'apoptose. C. Pendant la nécrose, le récepteur MET est clivé par les calpains sur le site T1036 ce qui génère le fragment intracellulaire p40 MET^{calpains}. Séparant le domaine kinase du domaine extracellulaire, le récepteur n'est alors plus activable. D. En condition de forte densité cellulaire ou en présence de la mutation R970C, MET est clivé par les calpains. Le fragment p45 MET intracellulaire généré favorise la migration et l'invasion. (extrait de "Proteolytic cleavages of MET: the divide-and-conquer strategy of a receptor tyrosine kinase", Fernandes et al., 2019).

MET nucléaire : une localisation inattendue

A partir de 1994, le récepteur MET a été détecté dans le noyau de mélanocytes et kératinocytes (Saitoh et al., 1994). Par fractionnement subcellulaire, il a pu être montré qu'il s'agit d'un fragment d'environ 60 kDa contenant l'extrémité carboxy-terminale et l'utilisation de différentes constructions de MET permettent la mise en évidence que la région juxtamembranaire (P1027-I1084) est nécessaire pour la génération du fragment nucléaire nMET suggérant un clivage dans cette région (Pozner-Moulis et al., 2006). En outre, la phosphorylation du résidu Y1003 de nMET dans des cellules de tumeurs pulmonaires squameuses (Ma et al., 2005) et/ou la phosphorylation des résidus Y1234-1235 dans d'autres lignées pulmonaires (Kanteti et al., 2009) suggèrent que le récepteur est actif lorsqu'il se localise dans le noyau. Evoqués par d'autres travaux, d'autres stimulations pourraient être à l'origine de ce processus. Pozner *et al.* montrent notamment que la faible confluence des cellules favorisent une expression nucléaire et cytoplasmique de MET alors qu'*a contrario* des cellules à forte densité présentent majoritairement une expression membranaire et cytoplasmique du récepteur (Pozner-Moulis et al., 2006). Les mécanismes d'internalisation de nMET restent peu élucidés et il est encore peu clair si ce processus est dépendant des vésicules de clathrine médiées par le complexe CBL-CIN85-endophiline. Il apparaît cependant que cette translocation serait dépendante de GAB1 et de l'importine puisque la répression de l'expression de l'un ou l'autre réduit significativement la présence de MET dans le noyau et GAB1, porteur d'une séquence de localisation nucléaire (NLS), transloque au noyau également après une stimulation par l'HGF (Gomes et al., 2008).

Si MET était déjà décrit dans le noyau, son rôle dans ce compartiment restait peu connu. Matteucci *et al.* en 2009 montre que nMET possède des capacités de transactivation similaires à un facteur de transcription (Matteucci et al., 2009). Particulièrement dans la prostate, dans des modèles de résistance à la privation androgénique, nMET est capable d'activer la transcription de SOX9, de la β -caténine et des homeobox Nanog, des gènes particulièrement liés aux phénotypes de cellules souches. Par ailleurs, dans ces modèles, il est montré que l'expression de nMET favorise la formation de sphéroïdes (Xie et al., 2014). Cette activité de nMET pourrait être dépendante de ARF qui en se liant au domaine cytoplasmique du récepteur permettrait sa stabilisation jusqu'au noyau (Xie et al., 2019). Enfin, il a été démontré que l'induction de l'expression de nMET augmente l'invasion de cellules de carcinomes hépatiques (HCC) *in vitro* mais aussi la formation de tumeurs et métastases pulmonaires *in vivo*. Il a également été montré que l'implication de nMET dans ces potentiels transformants est médiée par une activation directe de la voie NF- κ B, une voie majeure de la tumorigenèse (Tey et al., 2017).

En outre, de manière surprenante le récepteur MET pleine longueur peut également être détecté dans le noyau, notamment dans la lignée endothéliale hépatique SkHep1 (Gomes et al., 2008).

Certaines études montrent qu'une stimulation par l'HGF peut induire la translocation de MET au noyau dans des lignées de mélanome ou hépatiques en quelques minutes (Ye et al., 2008; Gomes et al., 2008). Bien que la localisation du récepteur dans le compartiment périnucléaire soit décrit, les mécanismes de translocation de MET pleine longueur au noyau ne sont pas connus et nécessiteraient des investigations supplémentaires.

La caractérisation de la sublocalisation nucléaire de MET, sous forme de fragment ou pleine longueur, puis la mise en évidence de ses capacités de transactivations directes sur des gènes associés à des réponses biologiques telles que la formation de sphéroïdes ou la migration sont des données nouvelles et originales dans la vision d'un récepteur tyrosine kinase membranaire. Alors que la signalisation cytoplasmique induite par l'activation du récepteur par l'HGF à la membrane est désormais bien décrite, d'autres travaux sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes permettant sa translocation au noyau d'une part mais également d'identifier plus largement ses fonctions nucléaires d'autre part.

Fonctions physiologiques du couple MET/HGF

Rapidement après la découverte du récepteur MET et de son ligand, plusieurs études montrent que l'activation de MET par l'HGF sur des cultures cellulaires peut induire de nombreuses réponses biologiques différentes. Cette variété de réponses cellulaires s'explique notamment par les nombreuses voies de signalisation activées par le récepteur et sont ordonnées en fonction du type cellulaire et de son environnement cellulaire. Les premiers travaux ayant permis l'identification de l'HGF comme ligand de MET décrivent une augmentation de la prolifération des hépatocytes en culture (Hepatocyte Growth Factor) et une réponse de dispersion à faible densité cellulaire pour les MDCK (Scatter Factor) (Nakamura et al., 1984; Stoker et al., 1987). Associé à ces observations, l'activation du récepteur par l'HGF stimule également les capacités migratoires et invasives des cellules dans une matrice extracellulaire synthétique notamment en augmentant l'expression de protéases (MMPs, Matrix Metalloproteases) permettant la dégradation de la matrice extracellulaire (Jeffers et al., 1998; Kermorgant et al., 2001).

Le couple MET/HGF joue également un rôle important dans la survie cellulaire en plus de ces effets mitogènes. Ces réponses lient alors le couple MET/HGF au processus de réparation tissulaire et ce, plus particulièrement dans le foie. En effet, une lésion hépatique conduit rapidement à une augmentation du taux d'Hgf actif dans le foie et le plasma mais également à une hausse de transcrits *Hgf* dans d'autres organes à distance tels que les poumons, les reins ou la rate (Fujiwara et al., 1993; Lindroos et al., 1991; Yanagita et al., 1992). L'établissement de souris KO *Met* conditionnel dans le foie ne montre pas d'effet sur la fonction physiologique des hépatocytes. En revanche, ces souris montrent

une plus grande sensibilité à l'apoptose dans le foie associée à un retard de réparation tissulaire après hépatectomie partielle ou traitement toxique (Borowiak et al., 2004; Huh et al., 2004). De plus, l'administration d'HGF permet de protéger de l'apoptose hépatique induite par le ligand de Fas *in vivo* (Kosai et al., 1998). De manière intéressante, alors que le récepteur de mort Fas est particulièrement exprimé dans les hépatocytes, MET peut interagir directement avec celui-lui. Par cette liaison, le récepteur Fas n'est alors plus activable et permet ainsi de protéger la cellule de l'apoptose (Wang et al., 2002). Le récepteur MET et son ligand HGF jouent donc un rôle crucial dans l'homéostasie tissulaire par les capacités de MET à induire à la fois des réponses de prolifération, survie mais également de migration.

En plus de ces rôles dans la réparation tissulaire chez l'adulte, le couple MET/HGF joue également un rôle déterminant lors de l'organogenèse. L'expression de *Met* et *Hgf* est variable en fonction du stade de développement. Lors des phases de gastrulation, la co-expression de *Met* et *Hgf* est retrouvée dans l'endoderme et le mésoderme suggérant une action autocrine de l'HGF. Lors de l'organogenèse, cette co-expression est retrouvée uniquement au niveau du tube neural, des somites et du cœur. Au-delà de ces régions et à ce stade de développement, le récepteur est exprimé plus spécifiquement dans les tissus épithéliaux alors que son ligand l'est dans les tissus mésenchymateux (Andermarcher et al., 1996). Cette cinétique d'expression suggère le passage d'un système d'activation autocrine à paracrine, plus proche de celui retrouvé dans l'organisme adulte. L'expression autocrine conservée de l'Hgf au cours de l'organogenèse conduit au maintien à l'état indifférencié des muscles squelettiques et des précurseurs des mélanocytes (Takayama et al., 1997). L'expression de MET et de l'HGF est essentielle au développement embryonnaire puisque l'extinction des gènes *Met* ou *Hgf* conduit à la mort *in utero* des embryons à environ 15 jours de développement (Uehara et al., 1995). Pour l'un ou l'autre des gènes abolis, les embryons présentent de façon similaire une altération du trophoblaste, l'absence de développement de muscles squelettiques et du diaphragme ainsi qu'un foie de taille réduite (Schmidt et al., 1995). Comme vu précédemment, l'activation de MET par l'HGF joue un rôle mitogène majeur dans les hépatocytes, la taille réduite du foie s'explique ainsi par ce défaut de prolifération de ces derniers. Par la suite, des travaux d'extinctions conditionnels de *MET* ont permis d'identifier plus précisément le rôle du récepteur dans le développement d'autres organes en dépassant la létalité *in utero*. Dans l'ensemble, ces études montrent l'impact de l'inactivation de *Met* dans le développement des alvéoles pulmonaires et le nombre de néphrons lors de KO conditionnels respectivement dans les poumons et les reins (Calvi et al., 2013; Ishibe et al., 2009). Enfin, le défaut de développement d'un sous-groupe de motoneurones est observé lors de l'inactivation de *Met* dans le système nerveux central (Lamballe et al., 2011).

Pour conclure, le couple MET/HGF joue un rôle crucial dès les premiers stades de développement embryonnaire jusqu'au maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. L'induction d'un large panel de réponses biologiques associées est alors finement régulée et dépendante du type cellulaire et de son environnement.

IV. Le récepteur MET : un acteur de la tumorigenèse

Comme nous l'avons vu précédemment, les récepteurs tyrosine kinases en général jouent un rôle majeur dans l'homéostasie tissulaire impliquant notamment des réponses biologiques telles que la prolifération, la survie ou la migration. La dérégulation de leur activité par différentes altérations moléculaires peut alors être impliquée dans l'oncogenèse de nombreux cancers et la plupart des RTKs, dont MET, sont considérés comme des proto-oncogènes. La détection et la caractérisation de ces altérations, permise par les technologies de séquençage à haut débit, ont conduit au développement de thérapies ciblant ces récepteurs et apportent un véritable espoir thérapeutique à de nombreux patients. L'activation dérégulée du récepteur peut être la conséquence de différentes altérations incluant notamment des mutations ponctuelles, des amplifications géniques ou des translocations.

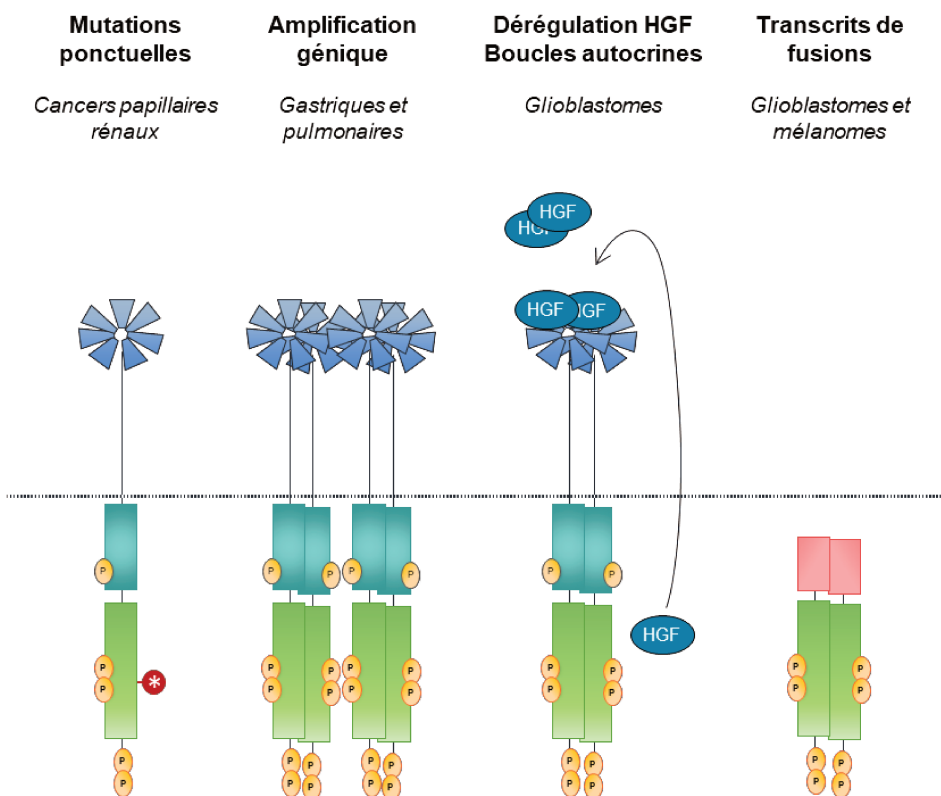


Figure 10 : Mécanismes principaux de dérégulations activatrices du récepteur MET dans les cancers. Ces mécanismes incluent des mutations ponctuelles notamment du domaine kinase (10% des cancers papillaires rénaux), des amplifications géniques de MET (3% des cancers gastriques et pulmonaires), des dérégulations de l'expression d'HGF telles que des stimulations autocrines (observé dans les glioblastomes) et des protéines de fusion issues de réarrangements chromosomiques conduisant à la dimérisation constitutive du récepteur ou une expression dérégulée.

Mutations ponctuelles

Historiquement, les premières mutations impactant MET ont été détectées dans les cancers rénaux en 1997. Des mutations germinales du domaine kinase de *MET* co-ségréguent avec une présentation familiale de carcinomes tubulo-papillaires de type I dans près de 80% des familles étudiées suggérant l'effet causal de ces mutations dans la tumorigenèse. A l'état germinale ou somatique, les premières mutations ponctuelles retrouvées sont M1149T, V1206L, Y1228C, V1238I, D1246N/H, Y1248C et M1268T (Schmidt et al., 1997). Récapitulées en *table 1*, d'autres mutations ont ensuite été diagnostiquées dans des cancers rénaux familiaux ou sporadiques (Schmidt et al., 1999).

Domaine	Mutation		
	Isoforme courte	Isoforme longue	
SEMA	V136I		■
	A320V		■
Kinase	V1092I	V1110I	■
	H1094R/L/Y	H1112R/L/Y	■ ■
	H1106D	H1124D	■
	M1131T	M1149T	■
	V1188L	V1206L	■
	L1195V	L1213V	■
	V1220I	V1238I	■ ■
	D1228N/H	D1246N/H	■ ■
	Y1230C/D	Y1248C/D	■ ■
	Y1235D	Y1253D	■
	M1250T	M1268T	■

- Mutations somatiques
- Mutations germinales

Table 1 : Mutations de MET dans le cancer du rein. Les différentes mutations de MET retrouvées dans le cancer du rein sont résumées ici et sont regroupées en fonction du domaine impacté. Il existe deux isoformes du transcrit MET, la colonne de gauche désigne les mutations selon la numérotation canonique correspondant à l'isoforme 1 alors que la colonne de droite suit la nomenclature de l'isoforme 2 contenant 18 acides aminés supplémentaires à partir du résidu S755 (TWWKEPLNIVSFLFCFAS). Les mutations détectées à l'état somatique sont indiquées en vert alors les mutations germinales sont en orange.

Par ailleurs, bien que plus rarement, des mutations du domaine kinase de MET sont impliquées dans d'autres types de cancers. Les mutations M1268T, T1191I et K1262R ont été retrouvées dans des carcinomes hépatocellulaires développés chez l'enfant. Dans les carcinomes squameux de la tête et du cou, les mutations Y1253D et Y1248H/C ont également été identifiées.

Ces versions mutées du récepteur MET apparaissent phosphorylées sur les résidus tyrosine du domaine kinase même en absence de ligand. Cette activation constitutive conduit à la transformation des fibroblastes murins NIH3T3 *in vitro* et au développement de tumeurs sous-cutanées dans des modèles de souris nude (Jeffers et al., 1997). L'implication de certaines de ces mutations dans la

tumorigenèse a été démontrée par l'établissement de modèles murins knock-in porteurs des mutations *Met* D1226N (D1246N MET_{Thu}), Y1228C (Y1248C), M1248T (M1268T) et M1248T/L1193V (L1213V). Ces souris ont développé de nombreuses tumeurs telles que des carcinomes, des sarcomes et des lymphomes et ces tumeurs présentent des duplications du gène MET muté comme cela a pu être observé dans les cas familiaux de cancers papillaires rénaux (Zhuang et al., 1999).

Bien que ces mutations conduisent à une augmentation de l'activité kinase du récepteur et à l'acquisition d'un phénotype transformant, le rôle de l'HGF dans ce contexte reste non élucidé. Michieli et al. montrent que la stimulation par l'HGF peut augmenter les capacités transformantes en NIH3T3 lorsque le récepteur est muté dans le domaine kinase. L'expression d'un récepteur incapable de fixer l'HGF ou l'utilisation d'une forme d'HGF inactive diminue la formation de colonies transformées malgré la présence des mutations (Michieli et al., 1999). S'il est possible que l'HGF accroisse les capacités transformantes du récepteur MET muté, il n'apparaît pas clair globalement qu'il soit complètement indispensable.

De manière intéressante, toutes les mutations dans le domaine kinase ne semblent pas avoir les mêmes conséquences. En premier lieu, alors que les mutations L1213V et Y1248C sont retrouvées dans des formes de cancers papillaires rénaux, ces deux mutants n'induisent pas la transformation de fibroblastes. En revanche, les cellules exprimant ces versions mutées du récepteur résistent plus fortement à l'apoptose induite par un traitement à la staurosporine que des cellules MET sauvage et cette résistance est augmentée en présence d'HGF, bien que les mécanismes en cause ne soient pas élucidés (Giordano et al., 2000). En second lieu, il a pu être montré que les mutations M1268T et D1246N favorisent un recyclage permanent du récepteur à la membrane associé à un défaut de dégradation et ceci s'ajoutant à l'activation constitutive du domaine kinase (Joffre et al., 2011).

Cependant moins répertoriées, des mutations affectant également le domaine extracellulaire de MET ont été observées. Près de 7% de cas de mésothéliomes présentent une altération dans ce domaine (N375S, M431V et N454I) (Jagadeeswaran et al., 2006). La mutation N375S mais également d'autres mutations (L211W, A347T, E355K et M362T) impactant ce domaine ont également été retrouvées dans des cas de cancer du poumon avec une prévalence plus forte dans les cancers épidermoïdes (Krishnaswamy et al., 2009). Dans cette étude, les mutations dans les tumeurs pulmonaires étaient également retrouvées à l'état germlinal suggérant que ces mutations étaient des polymorphismes n'ayant donc pas forcément de rôle transformant. Cependant, cette même étude montre que le récepteur MET N375S possède une affinité moindre pour l'HGF que le récepteur sauvage et que son expression induit une baisse de sensibilité à un inhibiteur de MET (SU11274). Récemment, des travaux montrent que ce variant de *MET* favorise l'hétérodimérisation du récepteur

MET avec le RTK HER2 (Kong et al., 2020). Indépendamment du ligand, le dimère MET^{N375S}-HER2 induit l'activation de voies de signalisation en aval du récepteur HER2 dont les conséquences sont une prolifération accrue et l'augmentation de la croissance tumorale *in vivo* et la formation de métastases. Ce contexte très particulier ne sensibilise pas les cellules MET N375S aux inhibiteurs de MET mais l'utilisation d'anticorps bloquants contre HER2 permet de réprimer ce potentiel transformant. Ces éléments concernant la mutation N375S apportent un nouvel éclairage sur les modalités d'étude des mutations de MET, notamment au niveau du domaine extracellulaire. Les conséquences fonctionnelles des autres mutations du domaine extracellulaire ne sont pas encore connues et pourraient nécessiter d'être analysées avec cette nouvelle vision.

Par ailleurs, des mutations au sein du domaine juxtamembranaire ont également été détectées telle que la mutation T992I identifiée dans les leucémies myéloïdes aigües et certains cas de cancers papillaires rénaux familiaux ou les mutations R970C, T992I et P991S retrouvées dans des cancers du poumon (Schmidt et al., 1999; Loriaux et al., 2008; Zaffaroni et al., 2005). Leur implication dans la tumorigenèse reste cependant peu claire. Il est montré que la mutation R970C conduit à une croissance dépendante de cette version mutée du récepteur associée à une augmentation de la motilité cellulaire (Ma et al., 2003a). Notre équipe a pu démontrer que cette mutation favorise le clivage du récepteur par les calpaïnes permettant la génération du fragment p45 intracellulaire et ce fragment actif favorise la migration et l'invasion de cellules épithéliales en réponse à l'HGF (Montagne et al., 2017). D'autres mutations telles que P1009S, retrouvée à l'état germinale et dupliquée dans une tumeur gastrique, ou T1010I, observée dans des tumeurs mammaires et pulmonaires, ne montrent pas d'activation constitutive du récepteur mais permettent le développement de tumeurs dans des souris nude xéno greffées (Lee et al., 2000). Cependant, une autre étude ne montre pas d'augmentation de la phosphorylation du récepteur ou des capacités transformantes des mutants R970C et T992I à partir de l'analyse de cohortes de cancers du côlon, de l'endomètre, de la thyroïde ou leucémies (Tyner et al., 2010). Des questions restent alors en suspens concernant le potentiel transformant de mutations impactant le domaine juxtamembranaire qui ne semblent pas induire d'activation constitutive du récepteur mais pourraient mettre en jeu des mécanismes différents et plus subtils à l'instar de la mutation R970C qui favorise la génération du fragment actif p45MET par les calpaïnes.

Surexpression et amplification de MET

Le récepteur MET peut être surexprimé dans plusieurs types de cancers pouvant ainsi altérer la régulation de sa fonction. Cette surexpression peut avoir un potentiel oncogénique en soi, indépendamment d'une mutation kinase activatrice. Des niveaux élevés d'expression du récepteur sont associés à son activation et sont suffisants à induire la transformation d'ostéoblastes normaux en cellules d'ostéosarcomes *in vitro* et le développement d'ostéosarcomes *in vivo* (Patanè et al., 2006). La surexpression de MET dans les hépatocytes de souris transgéniques conduit également à la formation de carcinomes hépatiques (Wang et al., 2001). Différents modèles murins développés ont permis de démontrer le potentiel tumorigénique de cette altération puisque des souris surexprimant *MET* développent spontanément des tumeurs, notamment des hépatocarcinomes, et des métastases (Wang et al., 2001; Fan et al., 2017). De plus, chez les patients, la surexpression du récepteur dans les cancers du poumon est associée à de plus hauts grades tumoraux et à un mauvais pronostic (Ichimura et al., 1996; Olivero et al., 1996; Rossi et al., 2005).

L'expression de MET est régulée par différents mécanismes. Parmi eux, l'hypoxie peut induire une augmentation de l'expression du récepteur associée à une augmentation de l'invasion médiée par l'HGF (Pennacchietti et al., 2003). Dans certaines tumeurs du côlon, il a également été montré que la surexpression de MET pourrait être un événement précoce médié par la voie de signalisation Wnt (Boon et al., 2002). L'expression de MET peut également être régulée par l'activité des facteurs de transcription de la famille PAX mais aussi des facteurs de transcription de la famille ETS (Epstein et al., 1996; Relaix et al., 2004; Gambarotta et al., 1996). Cependant, le mécanisme de surexpression de MET dans les cancers le plus documenté est l'amplification génique. Cette altération moléculaire conduit à la surexpression continue du récepteur alors que d'autres cas de surexpressions détectés faisant intervenir des mécanismes de régulation peuvent être transitoires et dépendre du contexte cellulaire. La surexpression du récepteur sans amplification génique de *MET* peut être variable dans le temps et ne pas aboutir à une activation constitutive permanente du récepteur MET.

La première détection d'une amplification de *MET* est réalisée en 1986 dans des fibroblastes NIH3T3 transfectés par le contenu génétique de lignées cellulaires néoplasiques. Certains fibroblastes transformés présentent alors une augmentation du nombre de copies du gène de 4 à 8 fois conduisant à une hausse de l'expression de transcrits d'environ 20 fois (Cooper et al., 1986). Ce mécanisme d'amplification a été ensuite retrouvé dans différentes lignées cellulaires telle que la lignée EBC-1, une lignée tumorale pulmonaire, et la lignée GTL16, une lignée tumorale gastrique, présentant 10 copies du gène (Giordano et al., 1989; Lutterbach et al., 2007; Zhao et al., 2005). La surexpression du récepteur, induite par l'amplification, provoque l'activation constitutive de MET indépendamment d'une stimulation par le ligand. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique du récepteur (PHA-665752) ou

la répression génique de *MET* par shRNA conduisent tous deux à un arrêt de la croissance cellulaire dans des lignées gastriques et pulmonaires (Smolen et al., 2006a; Lutterbach et al., 2007). Par ailleurs, un modèle transgénique murin ayant perdu l'expression de *BRCA1* et *TP53* spécifiquement dans l'épithélium mammaire développent secondairement des tumeurs présentant majoritairement une amplification de *MET* (Smolen et al., 2006b). Ces modèles sont imparfaits et miment difficilement une amplification génique. Néanmoins, des souris xéno greffées avec des cellules présentant une amplification de *MET* dérivées de tumeurs papillo-rénales de patients (PDX, patients-derived xenograft) montrent une régression tumorale en réponse au savolitinib, un inhibiteur de MET (Schuller et al., 2015).

Le diagnostic des amplifications est un challenge en clinique car les cellules tumorales présentent souvent une polysomie chromosomique et il est difficile de définir le seuil du nombre de copies de *MET* nécessaire pour être qualifié d'amplification. Par ailleurs, le seuil de copies nécessaire à l'expression massive du récepteur et son activation constitutive est mal défini et pourrait dépendre également du contexte cellulaire (Noonan et al., 2016; Smolen et al., 2006a). Afin d'objectiver l'amplification de *MET*, la technique de référence reste la FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). Pour éviter un biais lié à la polysomie, le nombre de copies du gène *MET* est alors exprimé en fonction du nombre de chromosomes 7 présents par le ratio *MET/CEP7* (centromère 7) (Noonan et al., 2016). Un consensus global s'est alors établi, les cellules présentant *a minima* un ratio *MET/CEP7* > 2 sont considérées comme présentatrices d'une amplification de *MET*. En se basant sur ce critère, l'amplification de *MET* est détectée dans environ 3% à 5% des cancers du poumon non à petites cellules, des cancers gastriques, des carcinomes hépatiques, des carcinomes naso-pharyngés et glioblastomes. Un nombre important d'études montrent que cette amplification est corrélée à la surexpression du récepteur et son activation (Burel-Vandenbos et al., 2017; Kondo et al., 2013; Lennerz et al., 2011; Li et al., 2015; Park et al., 2015; Pyo et al., 2016a; Wang et al., 2013). Dans les cancers gastriques, mammaires et gliomes, cette amplification est également associée à un mauvais pronostic (Catenacci et al., 2017a; Kwak et al., 2015; Veenstra et al., 2016). Concernant les cancers papillaires rénaux, peu de véritables amplifications sont observées bien qu'il y ait souvent une augmentation du nombre de copies de MET, celle-ci est souvent associée à une trisomie du chromosome 7 (Yin et al., 2015).

L'amplification de *MET* n'est détectée que chez une faible proportion de patients au diagnostic mais cette altération est aussi un mécanisme de résistance particulier aux inhibiteurs d'EGFR dans les cancers colorectaux et pulmonaires (Bardelli et al., 2013; Engelman et al., 2007). Dans les carcinomes colorectaux métastatiques, les amplifications de *MET* sont retrouvées à la fois dans la tumeur primaire et les métastases hépatiques dans moins de 2% des cas. En revanche, ce taux de détection passe à plus

de 20% chez des patients présentant des résistances aux anti-EGFR (Raghav et al., 2016). Ce mécanisme de résistance est retrouvé pour 5 à 20% des cas de cancer du poumon non à petites cellules résistants aux anti-EGFR. En modèles cellulaires, l'utilisation combinée de traitements ciblant MET et EGFR permet de réverser cette résistance (Engelman et al., 2007). Un des enjeux est donc d'anticiper une résistance aux ITK EGFR en dépistant l'apparition d'une amplification de *MET* et plusieurs essais cliniques en cours ont permis de démontrer le bénéfice clinique d'un co-traitement contre *MET* et *EGFR* (Wu et al., 2019).

Dérégulation de l'expression d'HGF

Des dérégulations liées à l'expression d'HGF peuvent également jouer un rôle dans la tumorigenèse dans plusieurs types de cancers, associées ou non à d'autres altérations du récepteur lui-même. Il a notamment pu être montré que chez les patients, un taux élevé d'HGF dans des tumeurs pulmonaires et mammaires est associé à un mauvais pronostic (Siegfried et al., 1998; Yamashita et al., 1994). De plus, la surexpression d'HGF est observée dans 33% des carcinomes hépatocellulaires, mais il est à noter qu'une diminution de son expression est également détectée dans 21% des tumeurs hépatiques (Kiss et al., 1997). Enfin, le taux sérique d'HGF est plus élevé pour les patients atteints de mésothéliomes et carcinomes hépatiques par rapport à des groupes sains (Jagadeeswaran et al., 2006; Vejchapipat et al., 2004). Cette élévation est négativement corrélée au temps de survie pour les hépatocarcinomes et les patients présentant un taux d'HGF supérieur à 1 ng/ml ont un taux de survie plus faible que les autres.

Il a été montré initialement que la surexpression d'HGF par des fibroblastes murins NIH3T3 conduit au développement de tumeurs et majoritairement de métastases pulmonaires dans des souris athymiques. Cette tumorigenèse est associée à un phénotype invasif favorisé par une augmentation de l'activité des protéases de la matrice extracellulaire (Rong et al., 1994). En outre, des souris transgéniques surexprimant l'HGF développent des tumeurs variées (peau, glande mammaire, foie et muscles) (Takayama et al., 1997). Dans ces deux études et dans la majorité des tumeurs développées, le récepteur est phosphorylé démontrant une activation par un mécanisme d'activation autocrine. De manière intéressante, il a été montré que l'HGF peut favoriser l'expression transcriptionnelle de *MET* (Boccaccio et al., 1994). Il existe notamment une association de l'augmentation des ARNm de *MET* et de l'HGF dans certaines tumeurs du pancréas suggérant une régulation positive de la boucle d'activation *MET/HGF* (Ebert et al., 1994).

Les gliomes sont un cas particulier des dérégulations associées à l'HGF. En effet, il a été montré que les gliomes les plus agressifs co-expriment fréquemment le récepteur *MET* et l'HGF avec une expression particulièrement plus élevée d'HGF dans les tumeurs de haut grade par rapport à ceux de

bas grade (Koochekpour et al., 1997; Lamszus et al., 1998; Rosen et al., 1996). L'injection intracrânienne d'une lignée cellulaire de glioblastome exprimant l'HGF conduit au développement de tumeurs plus volumineuses par rapport à des lignées ne l'exprimant pas (Laterra et al., 1997). De plus, les cellules de glioblastomes HGF+ présentent une phosphorylation basale de MET et un traitement par un inhibiteur de MET réduit leur prolifération et induit leur apoptose (Zhang et al., 2013). Ces éléments démontrent la mise en place d'une activation autocrine HGF/MET dans certains glioblastomes. Malgré cette boucle autocrine, l'ajout d'HGF exogène *in vitro* stimule encore la prolifération, la motilité et l'invasion des cellules HGF+. Par ailleurs, le niveau d'expression d'HGF peut être aussi un marqueur de réponses aux inhibiteurs de MET. Il existe une corrélation entre le niveau d'expression d'HGF et la sensibilité à un inhibiteur de MET dans des tumeurs formées après xénogreffes murines puisque les tumeurs exprimant le plus fortement l'HGF sont celles qui régressent le plus en réponse au traitement (Xie et al., 2012; Zhang et al., 2013). Plusieurs stratégies thérapeutiques ont été développées dans le but de bloquer spécifiquement l'activation autocrine du récepteur par l'HGF. Une des stratégies a été d'utiliser le sous-domaine NK4 de l'HGF car ce domaine constitué des domaines N et K1 à K4 mais dépourvu du domaine SPH possède une activité antagoniste sur le récepteur (Brockmann et al., 2003). En modèle murin, l'injection intratumorale du peptide NK4 a permis de réduire significativement le volume tumoral *in vivo* en ayant à la fois une action anti-proliférative et pro-apoptotique. De manière intéressante, ce traitement a également eu un effet anti-angiogénique au sein de la tumeur. D'autres stratégies se basent sur l'utilisation d'anticorps bloquants permettant de prévenir l'interaction entre le récepteur et son ligand. Administrés localement ou par voie systémique, ces anticorps sont également capables de réduire la croissance tumorale dans des modèles murins de xénogreffes de cellules de glioblastomes exprimant l'HGF (Cao et al., 2001; Kim et al., 2006; Martens et al., 2006). Moins classiquement, dans l'objectif d'éteindre l'expression de MET ou de l'HGF, des stratégies par thérapies géniques utilisant un complexe liposome-siRNA (small nuclear RNA) ou un adénovirus ont été développées en laboratoire. Ces thérapies réduisent la croissance tumorale de cellules de glioblastomes injectées en intracrânial en modèle murin. Améliorant la survie des animaux, ces traitements favorisent également l'apoptose au sein de la tumeur et permettent une diminution de l'angiogenèse locale (Abounader et al., 1999, 2002).

Transcrits de fusion

MET a été découvert sous la forme du transcrit de fusion *TPR-MET* issu d'un réarrangement chromosomique entre les chromosomes 1 et 7 (Cooper et al., 1984). Les domaines TPR des protéines produites conduisent à la dimérisation non régulée puis l'activation constitutive de deux domaines kinases de MET situés en aval. Cette fusion active fortement les voies de signalisation en aval et provoque la transformation de fibroblastes *in vitro* et le développement de tumeurs mammaires dans

un modèle de souris transgéniques (Rodrigues and Park, 1993; Liang et al., 1996). La détection de ce transcrite de fusion dans un véritable contexte tumoral est sujet à controverse car quelques études détectent le transcrite *TPR-MET* notamment dans des tumeurs gastriques (Soman et al., 1991; Yu et al., 2000) alors que d'autres analyses montrent l'absence d'expression de ce transcrite dans les carcinomes (Osaki et al., 1996; Heideman et al., 2001). Il a donc été globalement admis que des réarrangements impliquant *MET* n'étaient pas particulièrement initiateurs dans la tumorigenèse.

Le développement des séquençages des ARN à haut-débit ont permis cependant de révéler récemment de nombreuses fusions engageant *MET* dans plusieurs types de cancers. Premièrement, quatre transcrits de fusions mettant en jeu le gène *MET* et le gène *PTPRZ1* (receptor-type-tyrosine-protein phosphatase zeta 1) sont détectés parmi 272 cas de glioblastomes pédiatriques associé à un mauvais pronostic de survie (Bao et al., 2014). Ce réarrangement inclut un à plusieurs exons de *PTPRZ1* et conserve la séquence entière de *MET* de l'exon 1 à 21 (*Figure 11*). Le transcrite produit ne génère pas de protéine de fusion mais conduit à une plus forte expression de transcrits *MET*. Cette altération provoque une augmentation des capacités migratoires cellulaires (Bao et al., 2014; Chen et al., 2015). L'administration de crizotinib pour un cas de glioblastome présentant cette altération a permis une réduction de la tumeur bien que celle-ci ait fini par résister au traitement.

Dans les glioblastomes pédiatriques, deux transcrits de fusions ont été découverts ensuite et mettent en jeu les gènes *CLIP2* ou *TFG* (*TRK-fused gene*) et incluent la séquence de *MET* de l'exon 15 à 21 (Project ICGCPT, 2016). Ces réarrangements sont plus proches de la structure retrouvée dans *TPR-MET* puisqu'ils induisent la perte de la région extracellulaire mais aussi du domaine juxtamembranaire régulateur tout en conservant le domaine kinase du récepteur. Le transcrite issu du réarrangement conduit à la création d'une protéine de fusion et provoque l'activation constitutive du domaine kinase par dimérisation des domaines en amont. Les cellules exprimant le transcrite *TFG-MET* ont une croissance réduite par un inhibiteur de *MET* suggérant une prolifération dépendante de l'activité du récepteur. Dans de rares cas de mélanomes (environ 1%) différents réarrangements, en phase, ont été détectés et présentent également une structure similaire à *TPR-MET* en incluant les exons 15 à 21 de *MET* (Yeh et al., 2015). Ces fusions impliquent *MET* et des partenaires variés tels que *TRIM4*, *ZKSCAN1*, *PPFIBP1*, *LRRFIP1*, *EPS15* et *DCTN1* (*Figure 11*). L'expression de l'ensemble de ces protéines chimériques conduit à la phosphorylation constitutive du récepteur et à la formation de tumeurs sensibles au cabozantinib, un inhibiteur de *MET*, en modèles murins. Enfin, plusieurs cas de cancers du poumon présentent également des fusions *MET*. Le transcrite *HLA-DRB1-MET* en phase est observé dans au moins deux cas répondant alors au crizotinib et tepotinib, deux inhibiteurs différents de *MET* (Davies et al., 2017; Blanc-Durand et al., 2020). De plus, très récemment, un cas de transcrite de fusion *CAPZA2-MET* a été diagnostiqué dans un cancer du poumon au CHU de Lille. Ce patient a présenté une

réponse au capmatinib prometteuse pendant un an avant de montrer récemment une rechute (soumission prochaine JCO Precis. Oncol).

De manière intéressante, les fusions *MET-UBEH2* et *SPECC1L-MET* ont été diagnostiquées chez des patients en rechute et initialement traitées par un inhibiteur ciblant le récepteur EGFR suggérant l'apparition de ces transcrits comme mécanisme de résistance (Zhu et al., 2018; Nelson et al., 2019). Ces dernières années ont permis la découverte de transcrits de fusions variés et impliqués dans au moins trois cancers avec des réponses très encourageantes à des inhibiteurs de MET. Ces données récentes soutiennent la recherche de ces réarrangements en routine clinique pour améliorer encore la prise en charge des patients.

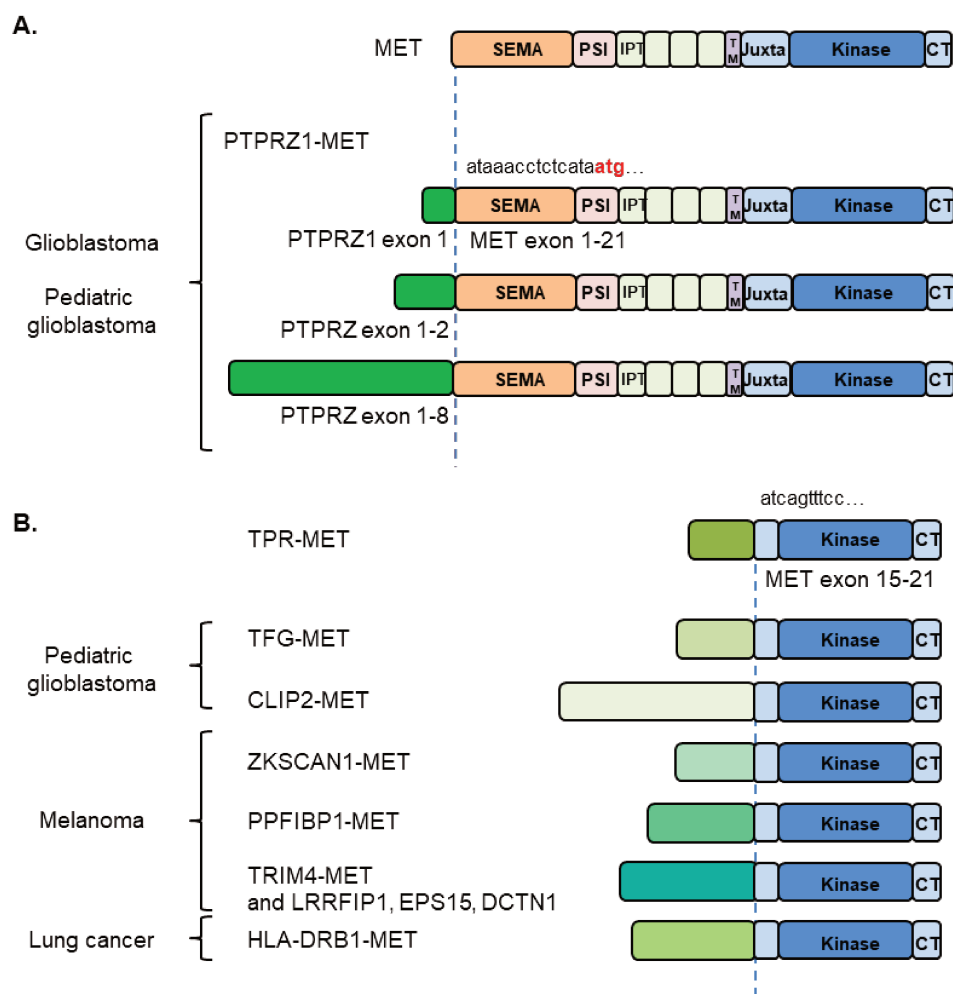


Figure 11 : Représentation schématique des fusions impliquant MET. A. Les différents domaines fonctionnels MET sont représentés : le domaine SEMA, le domaine PSI, les quatre domaines IPT, le domaine transmembranaire, le domaine juxtamembranaire, le domaine kinase et domaine carboxy-terminal. Le point de fusion dans la séquence de MET, incluant le codon start en rouge, est représenté avec les différents exons de PTPRZ1 impliqués. B. La structure de la protéine de fusion TPR-MET est représentée avec la séquence de MET contenant les exons 15 à 21 au point de fusion. Des points de fusion similaires sont décrits avec les partenaires TFG-, CLIP2-, ZKSCAN-, PPFIBP1-, TRIM4-, LRRFIP1-, EPS15-, DCTN1- et HLA-DRB1-MET. Les cancers dans lesquels ces fusions ont été détectés sont précisés. (extrait de Duplaquet et al., 2018).

Stratégies thérapeutiques ciblant MET

L'addiction à un oncogène caractérise la dépendance d'une cellule tumorale à l'activité de d'une protéine pour sa prolifération et sa survie. Ces protéines sont le plus souvent intégrées aux voies de signalisations et incluent les RTKs, KRAS et PI3K à titre d'exemple. La dérégulation de ces oncogènes est la force de la tumeur mais représente également son talon d'Achille en permettant son ciblage. Les dérégulations de MET présentées précédemment sont impliquées dans différents cancers et peuvent être caractérisées d'addiction oncogénique dans un certain nombre de cas. Les thérapies ciblant particulièrement ces oncogènes ne sont efficaces que si la tumeur a développé une addiction à cet oncogène dit « driver ». L'essor des thérapies ciblées contre d'autres RTKs comme l'EGFR a permis d'améliorer significativement la prise en charge de patients présentant des altérations de ces récepteurs. Plusieurs stratégies sont donc en cours de développement également pour cibler le récepteur MET et/ou son ligand. Cette description non exhaustive propose une vision globale de ces stratégies. Les objectifs de ces molécules de traitement peuvent être de neutraliser l'HGF, d'inhiber la dimérisation du récepteur ou d'inhiber son activité kinase (*Figure 12*). Les premiers essais cliniques utilisant des stratégies de ciblage de MET ont été plutôt insatisfaisants puisque plusieurs d'entre elles ont été arrêtées par manque de bénéfice sur la régression tumorale et/ou la survie des patients. Les raisons de ces échecs ne sont actuellement pas toujours claires mais il est probable qu'un manque d'efficacité de certaines molécules mais surtout une sélection inappropriée des patients en soient à l'origine. En effet, pour la plupart de ces essais l'inclusion des patients étaient basée sur la surexpression du récepteur détectée par IHC, or comme nous avons pu le voir, cette surexpression n'est pas toujours à l'origine d'une activation constitutive de MET. Malgré ces débuts peu concluants, grâce à une meilleure intégration de la notion d'addiction à un oncogène, l'apport des thérapies ciblant MET a dessiné un nouveau paysage de la prise en charge thérapeutique.

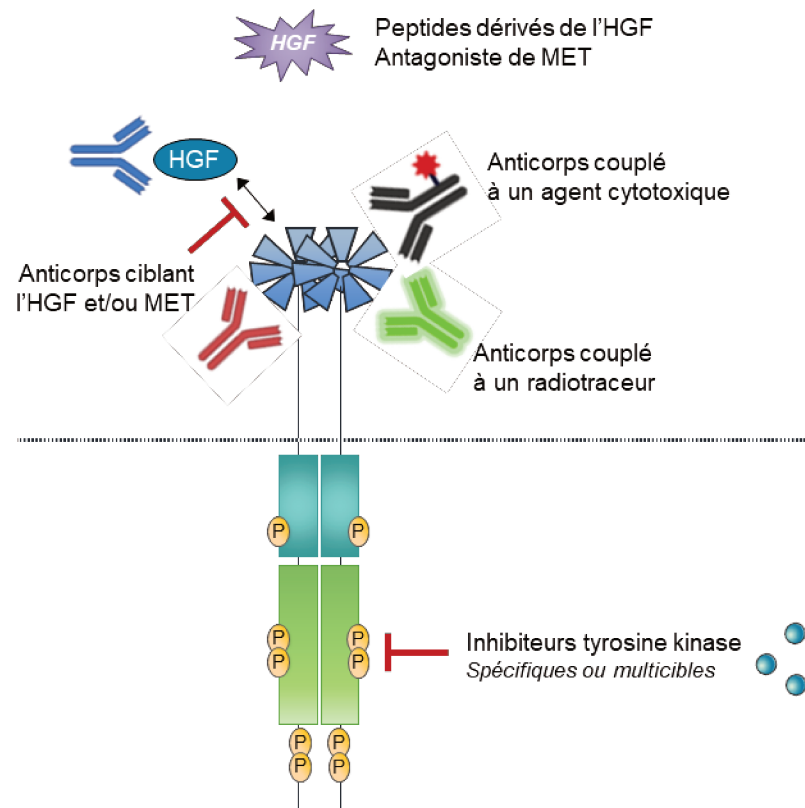


Figure 12 : Stratégies thérapeutiques ciblant MET. Les différentes stratégies proposées ici visent principalement à empêcher l'interaction du ligand avec MET par l'utilisation d'anticorps ou inhiber l'activité kinase du récepteur par de petites molécules inhibitrices. Les inhibiteurs tyrosine kinase sont majoritairement des compétiteurs ATP et peuvent être spécifique de MET ou cibler plusieurs kinases. Les anticorps ciblant MET ou l'HGF permettent de prévenir leur interaction mais peuvent également inhiber la dimérisation du récepteur. Les anticorps contre le domaine extracellulaire de MET peuvent être couplés à un agent cytotoxique pour le ciblage des tumeurs surexprimant le récepteur. Un anticorps ciblant MET et couplé à un radiotracteur permettrait le diagnostic des tumeurs et métastases MET+. Enfin, l'utilisation d'isoformes de l'HGF ayant une action antagoniste sur le récepteur est une autre stratégie.

Les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase

Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK, tyrosine kinase inhibitor) sont des petites molécules capables de bloquer le site actif du domaine kinase pour sa liaison à l'ATP. Ils sont généralement classifiés en sous-types définis par leur mode de compétitivité à l'ATP. Les inhibiteurs de type I sont des compétiteurs de l'ATP se fixant à la poche ATP en position active. Les inhibiteurs de type II sont également des compétiteurs de l'ATP mais fixent la poche hydrophobique en position inactive bloquant ainsi le site dans cet état. Enfin, certains inhibiteurs développés ciblent spécifiquement MET alors que d'autres sont multi-cibles et capables d'inhiber plusieurs RTKs.

Historiquement, un des premiers inhibiteurs ciblant spécifiquement MET développé est le PHA-665752. Sur des cellules exprimant une forme constitutivement active de MET, son utilisation permet d'inhiber la phosphorylation du récepteur, la prolifération et la migration. *In vivo*, le PHA-

665752 réduit également la croissance tumorale de manière dose-dépendante (Christensen et al., 2003). Malgré ces résultats très prometteurs, sa forte toxicité hépatique et rénale n'a pas permis d'aboutir à un usage clinique.

L'un des premiers inhibiteurs ciblant MET autorisé en clinique a été le crizotinib. Ce ITK est un inhibiteur de type I multi-cible et inhibe également les récepteurs ALK (anaplastic lymphoma kinase), ROS1 et RON. Initialement conçu pour inhiber MET, il a surtout été utilisé pour inhiber ALK dérégulé par translocation dans les cancers bronchiques non à petites cellules. Dans cette utilisation, il a pu être montré que son action multi-cibles permettait de réduire les cas de résistance impliquant les amplifications de *MET* (Dagogo-Jack et al., 2020; Mazzotta et al., 2020). Utilisé dans les CBNPC avec translocation de ALK, il a été utilisé aussi dans des cas de tumeurs porteuses d'une amplification de *MET* ou de mutations conduisant au saut de l'exon 14, une altération récemment mise en évidence dans le cancer du poumon et développée dans un paragraphe suivant. De nombreux cas cliniques ont ainsi permis de démontrer son efficacité. METROS est l'étude majeure de phase II testant actuellement le bénéfice du crizotinib dans les cancers bronchiques non à petites cellules présentant une amplification de *MET* ou des mutations conduisant au saut de l'exon 14 (NCT02499614). Les résultats montrent une réponse au crizotinib pour près d'un tiers des patients bien qu'il soit peu compris les raisons de ce taux assez faible (Landi et al., 2019).

Le capmatinib et le tepotinib sont d'autres inhibiteurs de type I ciblant sélectivement MET. Tous deux montrent une action anti-tumorale efficace dans des modèles cellulaires présentant une amplification de *MET*, un saut de l'exon 14 ou une surexpression d'HGF (Baltschukat et al., 2019; Liu et al., 2011; Bladt et al., 2013). L'essai de phase II GEOMETRY (NCT02414139) évalue actuellement l'effet du capmatinib dans les cancers bronchiques non à petites cellules présentant une amplification de *MET* ou un saut de l'exon 14. Un des rapports intermédiaires montre une réponse globale pour 41% et 68% des patients présentant un saut de l'exon 14 de MET et ayant été déjà reçu au moins une ligne de traitement ou non respectivement ainsi qu'une réponse pour 29% et 40% des patients porteurs d'une amplification de *MET* (Wolf et al., 2020). Le capmatinib présente l'avantage d'avoir une bonne capacité à passer la barrière hémato-encéphalique et les résultats préliminaires montrent une activité contre les métastases cérébrales. Les résultats d'une étude de phase Ib/II (NCT01610336) montrent également un taux de réponse de 47% chez les patients traités par capmatinib et géfinitib (inhibiteur d'EGFR) et présentant une amplification de *MET* (copies *MET* > 6 par cellule tumorale) dans un contexte de résistance à un ITK EGFR (Wu et al., 2018). Concernant le tepotinib, la phase II de l'étude VISION (NCT02864992), à laquelle participe activement le CHRU de Lille, montre une réponse globale à 46% et une survie sans progression de 11 mois pour des patients inclus présentant un saut de l'exon 14 de MET dans des cancers bronchiques (Paik et al., 2020). Dans cette étude, des patients présentant une

amplification de *MET* ont également été inclus mais les résultats ne sont pas encore disponibles. Comme pour le capmatinib, l'efficacité du tepotinib a également été étudiée en combinaison avec le gefitinib ou une chimiothérapie conventionnelle telle que le cisplatine pour des patients présentant une surexpression et/ou amplification de *MET* après un échec de thérapies ITK EGFR. La combinaison tepotinib/gefitinib permet d'augmenter la survie sans progression dans la cohorte *MET* amplifié (Wu et al., 2019).

Enfin, le cabozantinib est un inhibiteur de type II et multikinases incluant *MET*, *VEGFR2*, *RET*, *KIT*, *TIE2*, *FLT1/3/4* et *AXL* (Yakes et al., 2011). Cette molécule est déjà approuvée aux Etats-Unis pour les cancers médullaires de la thyroïde, les carcinomes rénaux à cellules claires et les carcinomes hépatiques. Son efficacité est actuellement en cours d'étude dans plusieurs cancers tels que les cancers urothéliaux, gastriques, de la prostate et les mélanomes. Une étude de phase II (NCT00940225) montre une réponse de 10% chez des patients non sélectionnés atteints de cancers bronchiques non à petites cellules (Schöffski et al., 2017). Plusieurs rapports de cas démontrent une action cérébrale du cabozantinib pour des métastases cérébrales issues de tumeurs pulmonaires *MET* ex14 suggérant un passage efficace de la barrière hémato-encéphalique (Klempner et al., 2017; Wang et al., 2019). Deux études de phase II (NCT01639508 and NCT03911193) incluant exclusivement des cas de cancers bronchiques avec des altérations de *MET* sont actuellement en cours pour le cabozantinib (D'Arcangelo et al., 2019).

Globalement, plusieurs inhibiteurs du récepteur *MET* sont actuellement en cours d'évaluation dans différents cancers et montrent une efficacité prometteuse. Nous pouvons ainsi noter le succès remarquable de plusieurs molécules telles que le crizotinib, le capmatinib et le tepotinib déjà approuvés dans certains pays pour le traitement de tumeurs présentant des altérations de *MET*.

Les anticorps monoclonaux

Certaines altérations moléculaires de *MET* ne conduisent pas forcément à l'activation constitutive du récepteur et peuvent être dépendantes de sa liaison avec le ligand HGF. Dans ce contexte, il a été développé des anticorps monoclonaux visant à bloquer cette interaction entre *MET* et l'HGF tels que l'onartuzumab, le rilotumumab, le ficlatuzumab et l'emibetuzumab. Le rilotumumab (AMG102) est un anticorps humanisé capable de fixer l'HGF, la séquestration de l'HGF par le rilotumumab empêche alors sa liaison au récepteur. L'étude de phase III RILOMET-1 ne montre pas d'amélioration de la survie pour les patients traités par rilotumumab combiné à de la chimiothérapie en comparaison des patients traités par chimiothérapie seule (Catenacci et al., 2017b). Cette étude incluait des cas de cancers gastriques *MET+* basés uniquement sur son expression protéique détectée par immunohistochimie. Il n'est pas connu si le récepteur exprimé était activé et ce, dépendamment

ou non de sa liaison avec l'HGF. L'utilisation d'un anticorps bloquant l'interaction entre MET et son ligand pourrait alors ne pas être efficace dans ce contexte où l'HGF n'induit pas d'addiction à l'activité du récepteur MET.

L'onartuzumab (MetMab) est un autre anticorps qui lui empêche l'interaction du récepteur et son ligand en fixant le domaine SEMA de MET. De plus, en se liant au domaine extracellulaire, l'anticorps inhibe la dimérisation du récepteur. Dans les cancers pulmonaires, des essais de phase II ont montré une augmentation du taux de réponse des patients recevant de l'onartuzumab combiné à un inhibiteur de l'EGFR (erlotinib) comparé à l'erlotinib administré seul. MET étant particulièrement impliqué dans les cas de résistance aux inhibiteurs ciblant l'EGFR dans les adénocarcinomes pulmonaires, ces résultats étaient donc très prometteurs. Cependant, les essais de phase III n'ont pas permis de confirmer les premiers résultats obtenus en phase II (Spigel et al., 2013, 2017). En effet, cette étude n'a pas montré de bénéfice non plus pour des cancers gastriques en comparant l'onartuzumab combiné ou non à de la chimiothérapie conventionnelle (Shah et al., 2016). Bien que la majorité des patients ayant reçu l'anticorps présentaient une forte expression du récepteur, l'amplification génique de *MET* n'a pas été recherchée. Alors que l'amplification est à l'origine de l'activation constitutive du récepteur, elle ne représente qu'environ 2% des cancers gastriques et il a pu être montré que la surexpression du récepteur n'est pas forcément corrélée à l'amplification de *MET* dans ces cancers (Lennerz et al., 2011; Pyo et al., 2016b). La surexpression de MET observée ici n'est donc pas forcément à l'origine d'une addiction à l'activité de MET pour toutes les tumeurs et pourrait ainsi expliquer les résultats négatifs obtenus. Récemment, l'onartuzumab a été utilisé d'une autre façon en le couplant à un radio-traceur permettant ainsi de suivre spécifiquement en PET-Scan les tumeurs exprimant MET (Fay et al., 2019; Jagoda et al., 2012; Klingler et al., 2020). Ainsi, il peut être utilisé comme outil de diagnostic et de suivi des patients.

Enfin, un anticorps ciblant MET et conjugué à une molécule cytotoxique a été développé et est en cours d'essai clinique. Cette stratégie a été développée à partir de l'anticorps ABT-700. Cet anticorps est capable de bloquer la dimérisation de MET sans induire d'effet agoniste et ainsi inhiber l'activation de MET, dépendante ou non de l'HGF (Wang et al., 2016). Les études précliniques montrent que cet anticorps induit l'apoptose de cellules et provoque la régression tumorale de tumeurs développées après xénogreffes murines de cellules gastriques et pulmonaires humaines porteuses d'une amplification de *MET*. La combinaison de cette molécule avec de la chimiothérapie semble apporter un effet anti-tumoral synergique. Au vu de ces données, un anticorps conjugué à une drogue représente une stratégie thérapeutique très intéressante et ne dépendant pas de l'activité même du récepteur mais de sa forte expression, plus élevée dans de nombreuses tumeurs que dans les tissus sains. Ainsi, l'ABBV-399 (ou telisotuzumab vedotin) est composé de l'anticorps ABT-700 conjugué à

l'agent cytotoxique monomethylauristatin E (MMAE) par une liaison clivable « valine-citrulline ». Les premiers travaux montrent une régression tumorale en modèle murin induite par l'ABV-399 et dont l'action est dépendante du niveau d'expression du récepteur (Wang et al., 2017). L'étude de phase II Lung-MAP S1400K a été élaborée pour évaluer la réponse à l'ABV-399 pour les cas de carcinomes pulmonaires épidermoïdes présentant une expression de MET en IHC H-score supérieur à 150. Par manque d'efficacité, cette étude a été fermée en décembre 2018 (Waqar et al., 2020). Cependant, une autre étude multicentrique de phase II est en cours avec des résultats finaux attendus pour 2023 (NCT03539536). En parallèle, l'anticorps conjugué SHR-A1403, un anticorps monoclonal ciblant MET couplé à un inhibiteur des microtubules, a également montré un effet anti-tumoral sur des lignées et cellules dérivées de patients présentant une surexpression de MET (Yang et al., 2019). La fixation de l'anticorps au récepteur conduit à l'internalisation par endocytose du complexe. La translocation ultérieure vers les lysosomes et la libération de la molécule dans ces vésicules sont probablement les mécanismes sous-jacents de l'activité anti-tumorale de SHR-A1403. Une étude de phase I est actuellement en cours en Chine pour déterminer dans un premier temps la sécurité et la tolérance de cet anticorps conjugué (NCT03856541).

En conclusion, au-delà des molécules inhibitrices de MET agissant sur l'activité kinase du récepteur, d'autres stratégies telles que des anticorps bloquant la dimérisation du récepteur et/ou sa liaison au ligand voire des anticorps couplés à des agents cytotoxiques se sont également développées. Malheureusement, les anticorps bloquant n'ont pas encore permis d'apporter de réel bénéfice chez les patients alors que les inhibiteurs de l'activité kinase ont montré des résultats très encourageants ces dernières années. La sélection des patients pouvant bénéficier de ces thérapies ciblées semble être cruciale pour améliorer le taux d'efficacité de ces nouveaux traitements et ainsi permettre de tendre vers une véritable « médecine personnalisée ».

Implication de MET comme mécanisme de résistance

L'utilisation des thérapies ciblant des oncogènes dans plusieurs cancers ont permis d'améliorer significativement la prise en charge de nombreux patients en augmentant leur survie. L'efficacité de ces thérapies fait néanmoins face à l'acquisition de résistance pour la grande majorité des patients. Les mécanismes mis en jeu peuvent être variés mais différents travaux ont permis de montrer l'implication de MET dans la résistance à des traitements ciblant EGFR, VEGFR, HER2 ou encore BRAF. De plus, puisqu'il existe désormais des inhibiteurs de MET efficaces en clinique, la mise en évidence du rôle de MET dans la résistance à d'autres inhibiteurs de tyrosine kinase ouvre la voie pour d'éventuels co-traitements afin de limiter l'apparition de ces résistances. La revue « When the MET receptor kicks

in to resist targeted therapies » que nous avons écrit, présentée en annexe (p. 90), propose une vision du rôle de MET dans ces résistances et ne sera présentée ici qu'une synthèse de la revue.

L'implication de MET dans la résistance aux thérapies contre EGFR, VEGFR et HER2 pourrait être qualifiée de mécanisme de résistance par substitution dans lequel MET remplace l'activité d'un autre RTK. Cette notion s'explique d'abord par le fait que les RTKs ont en commun l'activation de voies de signalisation intracellulaires majeures telles que la voie des MAPK et PI3K-AKT. De plus, ce mécanisme met en lumière des relations préexistantes entre différents RTKs telles que des capacités d'hétérodimérisations ou activations croisées. Par exemple, le récepteur MET est activable par l'EGF, le ligand de l'EGFR, et ces deux récepteurs peuvent s'hétérodimériser (Jo et al., 2000; Wagner et al., 2013; Werbin et al., 2017). Cet effet de substitution est particulièrement marqué dans les cancers pulmonaires puisque des altérations de MET sont retrouvées dans 10% à 20% des patients traités par des inhibiteurs de première génération d'EGFR (Engelman et al., 2007). Un processus similaire est mis en jeu dans les résistances aux molécules anti-HER2. Le trastuzumab, un des anticorps de référence pour le traitement du cancer du sein HER2+, inhibe l'homodimérisation de HER2 bloquant ainsi l'activation constitutive de sa signalisation. Cependant, cet anticorps est inefficace pour bloquer l'hétérodimérisation MET/HER2. La formation du dimère MET/HER2 conduit à leur activation croisée et l'induction des voies de signalisation en aval et spécifiques à chacun des récepteurs (Agarwal et al., 2009). Ainsi, les surexpressions de MET et de l'HGF sont associées à de plus grands risques d'échecs aux anticorps ciblant HER2 dans le cancer du sein (Minuti et al., 2012). Des résultats *in vitro* montrent que le traitement de cellules mammaires HER2 par le trastuzumab conduit à une augmentation de l'expression de MET (Shattuck et al., 2008). Ce mécanisme pourrait donc être préexistant mais également acquis au cours du traitement.

Un autre mécanisme impliquant MET dans les résistances aux anti-VEGFR est particulièrement intéressant. L'hypoxie résultante de l'action anti-angiogénique par inhibition de VEGFR conduit à une augmentation de l'expression de MET (Pennacchietti et al., 2003). De plus, VEGFR régule négativement la phosphorylation de MET en favorisant son interaction avec PTP1B (Lu et al., 2012). L'inhibition de VEGFR peut donc conduire à activer MET en favorisant son expression mais également en levant cette boucle de régulation.

La mise en lumière du rôle de MET dans la résistance à d'autres ITK permet d'envisager la possibilité de co-traitements incluant ce nouvel acteur. Dans des modèles de cellules résistantes mais également dans des expériences de tumorigenèse murine, il est montré une efficacité de double thérapies lorsque deux altérations sont présentes. En clinique, plusieurs essais explorent actuellement des stratégies de double inhibition en combinant deux ITK et/ou deux anticorps ou en développant des

molécules multi cibles. Comme déjà évoqué précédemment, l'objectif de certaines études est d'évaluer particulièrement la réponse à des inhibiteurs de MET dans un contexte de résistance déjà présent, notamment dans le cadre des amplifications de MET en résistance aux ITK EGFR. En plus des petites molécules inhibitrices, il est intéressant de noter le développement de nouvelles stratégies utilisant des anticorps bispécifiques contre MET et EGFR afin d'empêcher leurs interactions ligand/récepteur. Cet anticorps est capable de bloquer la phosphorylation de EGFR et MET par leurs ligands respectifs plus fortement qu'en utilisant un anticorps ciblant chacun des récepteurs (Moore et al., 2016). Les tumeurs formées par des lignées présentant plusieurs types d'altérations d'EGFR, MET amplifié ou non, sont sensibles à l'anticorps et la croissance tumorale est réprimée. Plusieurs études dont une de phase II (NCT03797391) testent actuellement son efficacité chez des patients EGFR mutés en échec.

Il est important d'évaluer l'action d'un RTK intégré dans un environnement extracellulaire et intracellulaire complexe. La connaissance des RTKs, depuis les années 1980, s'est fortement enrichie et l'arrivée des thérapies ciblées dans le paysage thérapeutique a impacté très favorablement la prise en charge de nombreux patients. Cependant, des résistances apparaissent et peuvent impliquer un autre RTK que celui ciblé. Ces phénomènes de résistance par implication d'un autre RTK mettent en lumière des interactions physiologiques et des voies de signalisation activées communes entre ces différents RTKs. Ces interactions pré-existantes peuvent expliquer l'émergence de clones tumoraux présentant un RTK altéré lorsqu'un autre RTK est inhibé, le compensant et prenant ainsi son relais. De manière triviale, nous pourrions comparer cela au jeu de la chasse à la taupe. Une stratégie d'utilisation de thérapies combinées ciblant deux à plusieurs RTKs est une perspective enthousiasmante en permettant de contrer plus rapidement l'émergence de ces altérations. Cependant, cette stratégie présente également l'inconvénient d'ajouter potentiellement plusieurs effets toxiques propres à chacun des inhibiteurs kinase. Une autre vision serait d'envisager chaque RTK comme intégré dans une globalité et impliquant des nœuds de signalisation communs entre eux. L'identification de ces nœuds-plateformes de signalisation particulièrement impliqués dans la tumorigenèse pourrait permettre d'envisager leur ciblage et ainsi contourner ces phénomènes compensatoires entre RTKs.

V. Saut de l'exon 14 de MET : une nouvelle implication dans les cancers

Bien que le récepteur MET soit altéré de diverses manières dans plusieurs types de cancers, son implication dans le cancer du poumon était encore récemment placée en second plan par rapport à d'autres oncogènes tels que EGFR ou ALK. Si des amplifications de *MET* sont retrouvées dans environ 10% des cas de résistance aux ITK EGFR, très peu de mutations activatrices sont retrouvées en revanche dans les cancers bronchiques. Les mutations R970C, P991S et T992I sont observées dans 3% à 10% des tumeurs pulmonaires mais ne conduisent pas à l'activation du domaine kinase et leur implication dans la tumorigenèse reste controversée. Par ailleurs, puisqu'ils ne conduisent pas à l'activation du récepteur, leur rôle ne pourrait être aboli par l'utilisation des ITK. Récemment, la découverte des mutations conduisant au saut de l'exon 14 (*MET* ex14), présentes particulièrement dans les cancers du poumon, a bouleversé la position du récepteur MET dans ces cancers.

Caractérisations cliniques

En 2003, il a été décrit pour la première fois chez des patients des mutations introniques touchant des sites d'épissages pouvant conduire au saut de l'exon 14 dans deux échantillons de cancers pulmonaires à petites cellules (Ma et al., 2003b). Très peu de temps après, un cas de mutation similaire a également été retrouvé parmi 127 tumeurs pulmonaires non à petites cellules (Ma et al., 2005). Puis, Onozato *et al.* ont mis en évidence la perte en phase des 141 nucléotides de l'exon 14 induite par des altérations différentes dans 7 échantillons tumoraux parmi 262 représentant ainsi une fréquence de 2,7% (Onozato et al., 2009). Les quatre altérations identifiées ici étaient une mutation ponctuelle au site accepteur 5' de l'épissage, des délétions emportant le site donneur en extrémité 3' de l'exon, le site de branchement et la région polypyrimidique introniques. Cette notion de diversité d'altérations est renforcée par la description de multiples variants dans une étude d'envergure d'analyse moléculaire par NGS (next-generation sequencing) de 38 028 échantillons tumoraux. En effet cette analyse a mis en évidence plus de 160 altérations différentes parmi 221 cas identifiés de tumeurs présentant un saut de l'exon 14 de *MET* (*MET* ex14). Ces dernières peuvent affecter les sites d'épissage 5' et 3' de l'exon 14 de *MET* ou les séquences introniques avoisinantes (*Figure 13*) (Frampton et al., 2015). En extrémité 5' de l'exon, la majorité des altérations sont des délétions et/ou insertions affectant le site accepteur d'épissage, le point de branchement ou la région polypyrimidique. En extrémité 3', les altérations les plus fréquentes sont plutôt des mutations ponctuelles affectant le site donneur d'épissage (Frampton et al., 2015; Schrock et al., 2016).

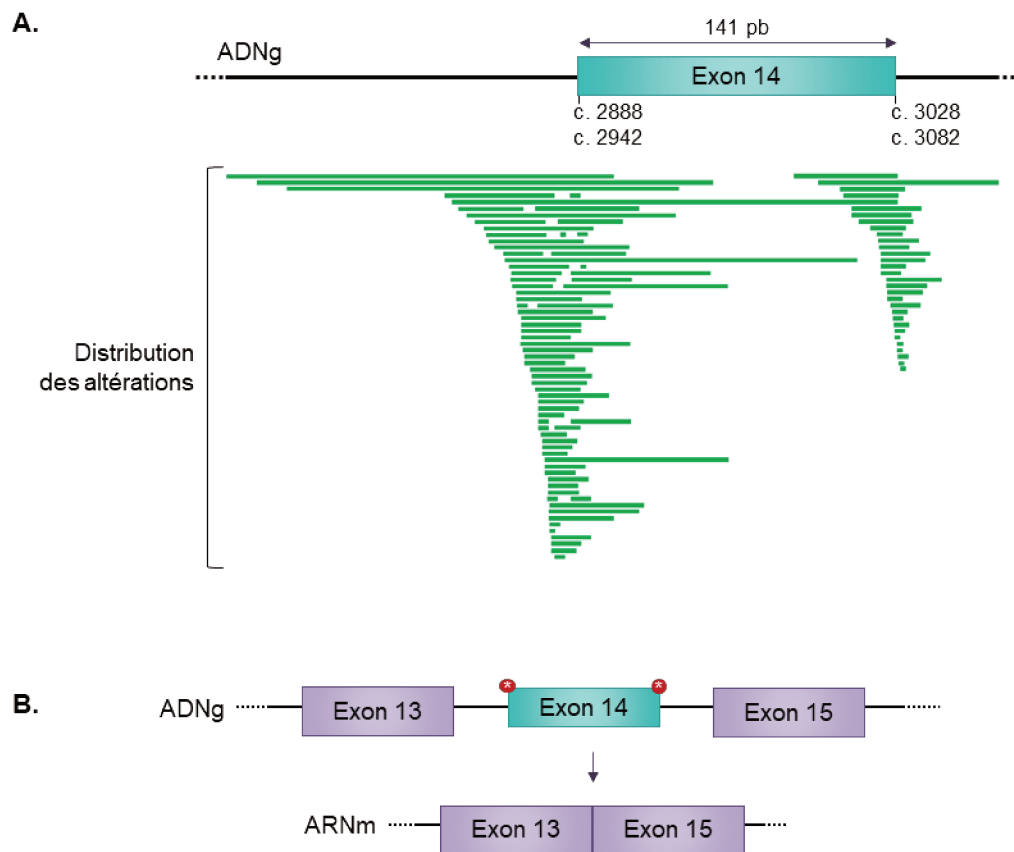


Figure 13 : Représentation des différentes altérations impactant l'exon 14 de MET. A. Présentation de l'exon 14 de MET et des régions introniques flanquantes. Décrits par Frampton et al., il existe une grande variété d'altérations incluant des délétions et mutations ponctuelles impactant les introns et les sites accepteurs et donneurs d'épissage. La première et la dernière base de l'exon sont notées selon les nomenclatures de l'isoforme 1 puis de l'isoforme 2 de MET, transcrits ID ENST00000397752 et ENST00000318493 respectivement) (adapté de Frampton et al., 2015). B. Représentation schématique des conséquences des mutations impactant les sites d'épissage. Les différentes altérations en A. conduisent au saut de l'exon 14 en phase et provoquent la perte des 141 paires de bases de l'exon.

Par ailleurs, cette large étude révèle la présence de mutations MET ex14 dans des cancers de diverses origines incluant des adénocarcinomes pulmonaires (3%) mais aussi des gliomes, des cancers gastriques et colorectaux à une fréquence plus faible (Frampton et al., 2015). Plusieurs études ont permis de confirmer la plus grande prévalence des sauts d'exon 14 de MET dans le cancer du poumon (environ 3%) par rapport aux autres cancers (Togashi et al., 2015; Schrock et al., 2016; Lu et al., 2017; Descarpentries et al., 2018). Parmi les cancers du poumon, les mutations MET ex14 sont retrouvées dans des proportions différentes selon les sous-types histologiques que sont les adénocarcinomes (2,6% à 3,2%), avec une très grande variabilité selon les études dans les tumeurs sarcomatoïdes (2,6% à 31,8%) et les carcinomes adénoquameux (4% à 8,2%) (Schrock et al., 2016). Les sauts d'exon 14 de

MET ont été également retrouvés dans des cancers pulmonaires à grandes cellules (0,8%) et dans des cancers à petites cellules (0,2%).

Au-delà du fait que les altérations impactant l'exon 14 de *MET* soient majoritairement observées dans les cancers du poumon, les caractéristiques cliniques des patients touchés ne sont pas encore bien connues. L'étude des 298 cas *MET* ex14 par Schrock. *et al* montre que ces mutations sont plutôt retrouvées chez les sujets âgés (âge médian de 73 ans) (Schrock et al., 2016). Le statut tabagique ne semble pas favoriser la prévalence des tumeurs *MET* ex14. Bien qu'une étude observe une plus faible proportion de non-fumeurs parmi les cas de saut d'exon 14, au moins une autre étude montre qu'il n'existe pas de différence dans l'histoire tabagique entre les patients *MET* ex14 et les autres (Awad et al., 2016; Tong et al., 2016). Nous avons confirmé ces données au travers de l'analyse de la cohorte de 65 patients du CHRU de Lille (Jamme et al., 2020).

L'impact pronostic des mutations *MET* ex14 n'est pas encore clair. Une étude de 687 cas de CBNPC montre cependant que les mutations *MET* ex14 comme les amplifications de *MET* sont associées à un mauvais pronostic (Tong et al., 2016). Une autre étude en Asie montre que les patients avec des tumeurs *MET* ex14 ont un taux de récurrence plus élevé après résection chirurgicale par rapport aux patients présentant une fusion de *ALK* mais leur survie globale est similaire à celle de patients présentant d'autres mutations impactant *EGFR*, *ROS1*, *ALK* ou *RET* (Lee et al., 2017).

Conséquences fonctionnelles du saut de l'exon 14

Bien que les mutations altérant l'exon 14 en clinique n'aient été détectées qu'épisodiquement à partir de 2003 puis plus massivement à partir de 2015, l'histoire de *MET* ex14 est finalement plus ancienne. En effet, dès 1994, un variant de transcrit ayant perdu 141 nucléotides et conduisant à la perte de 47 acides aminés dans la partie juxtamembranaire du récepteur est détecté dans les reins, le foie et le cerveau de souris adultes mais également chez des embryons de 9 à 10 jours (Lee and Yamada, 1994). Ce variant court est détecté dans de plus faibles proportions que la version sauvage. Les auteurs suggèrent un rôle physiologique de ce transcrit alternatif chez la souris sans que ce rôle potentiel ne soit identifié. En revanche, cet épissage alternatif n'a jamais été décrit dans des tissus humains sains. L'implication du saut de l'exon 14 dans la tumorigenèse est décrit pour la première fois en 2006 par la mise en évidence de la transformation de NIH3T3 transfectées par le variant court $\Delta 141$ et conduisant au développement de tumeurs en modèle murin, ces deux réponses étant exacerbées par la stimulation du récepteur par l'HGF (Kong-Beltran et al., 2006; Lee et al., 2006). Dans ces modèles, la stimulation du récepteur *MET* ex14 par l'HGF conduit à une activation plus forte et prolongée de *MET* et des voies de signalisation en aval. L'introduction d'une mutation conduisant au saut de l'exon 14 par méthode CRISPR dans la lignée HEK293 a permis de confirmer ces résultats en mettant

en évidence une phosphorylation accrue et prolongée du récepteur (Togashi et al., 2015). Enfin, une lignée pulmonaire MET ex14 établie par CRISPR présente les mêmes mécanismes de persistance d'activation du signal en réponse à l'HGF (Lu et al., 2017). Après stimulation par l'HGF, le récepteur MET ex14 est rapidement internalisé et persiste au niveau intracellulaire dans un état actif plus longtemps que la version sauvage dans ce modèle plus proche du contexte physiologique pulmonaire. De manière intéressante, les auteurs de cette même étude ont souhaité déterminer le potentiel transformant de MET ex14 *in vivo* par infections virales en utilisant deux stratégies différentes (Lu et al., 2017). D'une part, l'infection par des particules virales contenant l'ADN codant *MET ex14* dans les poumons de souris conduit au développement d'adénocarcinomes présentant une phosphorylation de MET. D'autre part, la délivrance de l'ARN guide ciblant le site d'épissage de l'exon 14, pour édition du génome dans les cellules murines pulmonaires, induit la formation d'adénomes. Cette différence de développement tumoral pourrait s'expliquer par le fait que la 1^{ère} stratégie peut conduire à la surexpression du récepteur provoquant une altération supplémentaire en induisant son activation constitutive. Dans plusieurs modèles cellulaires mais également dans ce dernier modèle murin, une réponse au crizotinib est observée en inhibant le développement tumoral et en réduisant le nombre de cellules prolifératives au sein de la tumeur suggérant une addiction oncogénique au récepteur MET ex14 dans ces cellules (Lu et al., 2017).

Mécanismes de régulation siégeant sur l'exon 14

Pour comprendre les origines du potentiel transformant du récepteur MET dépourvu d'exon 14, il est à savoir que le domaine juxtamembranaire, codé majoritairement par cet exon, est un domaine de régulation de l'activité du récepteur. De manière intéressante, il est à noter que la protéine de fusion TPR-MET ne comporte que les exons 15 à 21 de MET et a donc perdu les domaines extracellulaire et transmembranaire mais également le domaine juxtamembranaire. L'introduction d'une partie du domaine juxtamembranaire (aa 962-1009) au sein du transcrit *TPR-MET* réduit les capacités transformantes en fibroblastes, la prolifération, la croissance sans ancrage ainsi que l'invasion induite par TPR-MET (Vigna et al., 1999). La perte du domaine juxtamembranaire semble donc être cruciale dans le potentiel oncogénique de TPR-MET.

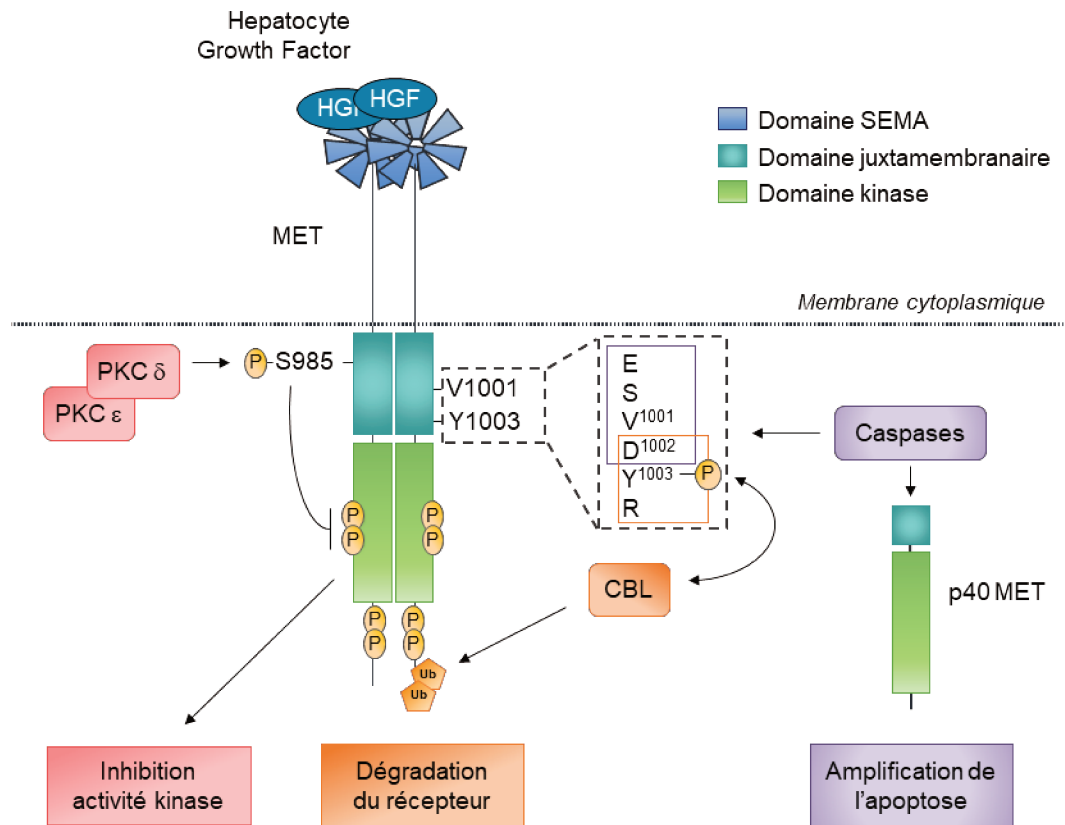


Figure 14 : Sites de régulation du domaine juxtamembranaire du récepteur MET. Le domaine juxtamembranaire du récepteur MET contient au moins trois sites de régulation. Après activation du récepteur par l'HGF, le site S985 est phosphorylé par les PKC d et e. Cette phosphorylation conduit à l'inhibition de l'activité kinase de MET. La stimulation par l'HGF provoque la phosphorylation du site Y1003 au sein du motif DY1003R et permet le recrutement de l'E3 ubiquitine ligase CBL. Le récepteur est ensuite ubiquitiné conduisant à sa dégradation lysosomale ultérieure. Enfin, en condition de stress, le site ESV1001D1002 est clivé par les caspases. Ce clivage génère le fragment p40 MET contenant une partie du domaine juxtamembranaire et le domaine kinase. Ce fragment est capable d'amplifier l'apoptose en favorisant la perméabilisation mitochondriale. La phosphorylation du site Y1003 ne permet plus le clivage par les caspases du motif ESDV.

Le premier site de régulation décrit au sein du domaine juxtamembranaire est le résidu sérine 985 (Figure 14). Après stimulation par l'HGF, le résidu S985 est phosphorylé par la PKC (Protein Kinase C). Cette phosphorylation induit une diminution de l'activité tyrosine kinase du récepteur par un mécanisme encore inconnu. La déphosphorylation du résidu S985, permettant un retour à l'état initial, est assurée par la phosphatase PP2A (Hashigasako et al., 2004). Par ses capacités à induire une inhibition de l'activité tyrosine kinase de MET, la phosphorylation de S985 permet d'inhiber les effets mitogènes de l'HGF. Enfin, le rôle de la sérine 985 a pu être mis en évidence *in vivo* chez la souris. Lors de la régénération du foie après une lésion, une diminution de phosphorylation de la S985 est observée et est associée à une augmentation de la réponse mitogène induite par l'HGF (Nakayama et al., 2013).

Actuellement le plus caractérisé, le site Y1003 est le second résidu identifié comme impliqué dans la régulation du récepteur (Figure 14). Suite à l'activation du récepteur, la phosphorylation du

résidu Y1003 conduit au recrutement de l'E3 ubiquitine ligase CBL (Casitas B-lineage lymphoma). La liaison de CBL a pour conséquence l'ubiquitination du récepteur permettant *in fine* sa dégradation par les protéases lysosomales après son internalisation. L'interaction directe entre CBL et MET est permise par le domaine TKB (tyrosine kinase binding) de CBL capable de reconnaître le site DY¹⁰⁰³R de MET (Peschard et al., 2001, 2004). CBL est également capable de se lier indirectement à l'extrémité carboxy-terminale de MET *via* GRB2. Néanmoins, la mutation du site Y1003 suffit à altérer les interactions entre MET et CBL et conduit à un défaut d'ubiquitination responsable d'une augmentation de la stabilité du récepteur. Comme décrit précédemment, l'implication directe de CBL dans l'initiation du processus d'internalisation est cependant en discussion (Abella et al., 2005; Joffre et al., 2011; Li et al., 2007). Il a pu être montré que l'expression de la version mutée Y1003F de MET provoque la motilité sans ligand des cellules MDCK qui présentent alors un phénotype dispersé (Weidner et al., 1995). D'autres travaux montrent également que ce mutant favorise la transformation de fibroblastes et est capable d'induire la formation de tumeurs *in vivo* (Abella et al., 2005).

Enfin, un troisième mécanisme de régulation influe sur l'apoptose (*Figure 14*). En effet, en réponse à un stress, après un premier clivage opéré en extrémité carboxy-terminale, le site D1002 du motif ESV¹⁰⁰¹D¹⁰⁰², au sein de l'exon 14, est clivé par les caspases pour générer le fragment p40MET (Foveau et al., 2006). Ce clivage séparant le domaine kinase de sa partie extracellulaire, le récepteur n'est plus stimuable par son ligand et ne permet plus alors l'induction des voies pro-survie classiquement activées par la signalisation de MET (Lefebvre et al., 2013). Le fragment p40MET présente également une activité pro-apoptotique directe par amplification des mécanismes de mort cellulaire en activant les flux calciques et favorisant la perméabilisation mitochondriale (Tulasne et al., 2004; Duplaquet et al., 2020). De manière intéressante, le site CBL-Y1003 est imbriqué avec le site de clivage D1002 puisque les deux sites sont respectivement D¹⁰⁰²Y¹⁰⁰³R et ESVD¹⁰⁰². La phosphorylation du site Y1003 ne permet plus le clivage du site ESVD et la génération du fragment pro-apoptotique p40MET, renforçant la notion d'équilibre entre survie et apoptose d'un récepteur à dépendance comme MET (Deheuninck et al., 2009).

Thérapies ciblées pour les patients MET ex14

Des premiers résultats précliniques puis cliniques ont fortement suggéré que les tumeurs présentant un saut de l'exon 14 pouvaient être sensibles aux inhibiteurs de MET (Engstrom et al., 2017; Frampton et al., 2015; Togashi et al., 2015) et plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours pour évaluer leur efficacité dont les majeurs sont présentés dans la *table 2*. Cette section reprend un certain nombre d'inhibiteurs déjà présentés dans le paragraphe « Stratégies thérapeutiques » (p. 43) mais propose ici un focus sur les résultats des essais cliniques et avancées pour les patients MET ex14 dans les cancers du poumon.

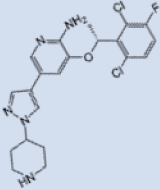
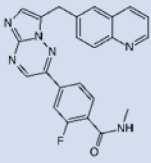
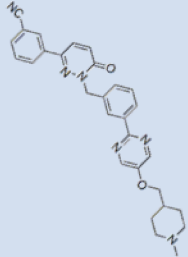
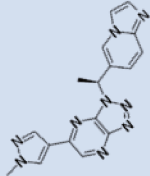
	Crizotinib	Capmatinib	Tepotinib	Savolitinib
Molécule				
Cible(s)	MET, ALK, ROS	MET	MET	MET
Type de TKI	Ia	Ib	Ib	Ib
Essai	PROFILE 1001 NCT00585195	GEOMETRY mono-1 NCT02414139	VISION NCT02864992	NCT02897479
Phase clinique	II	II	II	II
Nombre de patients	65	97	99	61
Taux de réponse	32 %	41 % à 68 %	48 %	48 %
Médiane survie sans progression	7,3 mois	5,4 à 9,7 mois	10,2 mois	6,8 mois
Publications	Drilon et al., Nat Med, 2020	Wolf et al., NEJM, 2020	Paik et al., NEJM, 2020	Lu et al., JCO, 2020

Table 2 : Présentation des principaux essais cliniques en cours testant l'efficacité d'inhibiteurs de MET pour les cancers pulmonaires présentant un saut de l'exon 14 de MET.

Les premières évidences concernent l'utilisation du crizotinib, un inhibiteur ciblant MET, ALK et ROS, qui montre une efficacité chez des patients présentant des tumeurs MET ex14 (Leprieur et al., 2016; Mendenhall and Goldman, 2015; Waqar et al., 2015). Intégrant les résultats de l'étude PROFILE 1001 (NCT00585195), le crizotinib déjà approuvé par la FDA US (Food and drug administration) pour le traitement des CBNPC ALK+ ou ROS+, reçoit le titre de « thérapie révolutionnaire » en mai 2018 pour le traitement des patients CBNPC métastatiques avec saut de l'exon 14 de MET en progression ou après une chimiothérapie aux platines (Drilon et al., 2020; Pfizer, 2018). L'étude METROS (NCT02499614) présente un taux de réponse partiel d'uniquement 27% mais seulement sur une petite cohorte de 10 patients MET ex14 (Landi et al., 2019).

L'étude majeure GEOMETRY mono-1 (NCT02414139) de phase II évaluant le capmatinib est encore en cours et inclut des patients présentant différentes altérations de MET dont 97 patients MET ex14. Des résultats intermédiaires présentent une réponse globale de 41% pour les patients ayant déjà reçu au moins une ligne de traitement et un taux de réponse de 68% pour les patients naïfs de traitement, représentant un des meilleurs taux de réponse observé actuellement (Wolf et al., 2020). La survie sans progression est également supérieure dans le groupe naïf de traitement (9,7 mois) par rapport au groupe de patients déjà traités précédemment (5,4 mois). Le capmatinib a été approuvé par la FDA en 2020 aux Etats-Unis pour les patients présentant un cancer du poumon non à petites cellules métastatiques MET ex14 (FDA, 2020). Pour les patients MET ex14 naïfs de traitement, un essai de phase II (NCT0432346) évalue également les bénéfices du capmatinib associé ou non à de l'immunothérapie (spartalizumab, un anticorps anti-PD1).

Par ailleurs, le tepotinib a montré une inhibition sélective de l'activité de MET sur des lignées cellulaires et dans des modèles de xénogreffes murines, que l'activité du récepteur soit dépendante ou non de l'HGF (Bladt et al., 2013). L'étude de phase II VISION (NCT02864992) montre une efficacité pour environ la moitié des patients MET ex14 traités par tepotinib (Paik et al., 2020). Sur la base de ces résultats prometteurs, le tepotinib a obtenu en 2020 l'agrément japonais pour le traitement des patients des CBNPC avancés présentant un saut de l'exon 14. En 2019, cette molécule était également désignée comme « thérapie révolutionnaire » par la FDA américaine (Merck Global, 2019).

D'autres molécules sont actuellement en cours d'étude comme l'inhibiteur sélectif savolitinib. Après avoir démontré un effet en modèles précliniques, il est actuellement testé en phase II chez des patients atteints de cancers localement avancés ou métastatiques (NCT02897479). Les résultats préliminaires incluant 61 patients montrent un taux de réponse encourageant de 47,5% (Lu et al., 2020). Le cabozantinib, un inhibiteur de type II multi-cibles incluant MET, VEGFR2, RET, KIT, TIE2, FLT1/3/4 et AXL, a également été reporté comme efficace contre les tumeurs MET ex14 (Klempner et

al., 2017; Wang et al., 2019). Un essai de phase II en Italie est également en cours pour évaluer l'activité du cabozantinib pour les cas d'amplification de *MET* et *MET ex14* (NCT03911193).

L'ensemble des inhibiteurs en cours de d'étude sont prometteurs et peuvent avoir un impact majeur sur la survie des patients. Une étude rétrospective incluant 27 patients traités a permis de déterminer que des patients CBNPC *MET ex14* métastatique ayant bénéficié d'un traitement par inhibiteur de *MET* (crizotinib, glesatinib, capmatinib ou ABBV-399) ont une survie médiane de 24,6 mois, représentant un prolongement de la survie en comparaison de patients métastatiques non traités par inhibiteurs (8,1 mois) (Awad et al., 2017). Une autre analyse incluant 87 patients CBNPC *MET ex14* reporte une survie médiane de 25,3 mois pour les cas ayant reçu des inhibiteurs de *MET* (36 cas) contre une médiane de 10,9 mois pour les patients n'en ayant pas bénéficié (51 cas) (Wolf et al., 2018).

Les challenges : vers une meilleure compréhension de MET ex14

1) Détecter les patients

Un des challenges concernant les patients *MET ex14* est dans un premier temps leur détection. Ce n'est finalement que récemment que les mutations impactant l'exon 14 de *MET* sont connues en clinique et leur recherche n'était pas du tout systématique initialement. Par ailleurs, les outils techniques à disposition n'étaient pas forcément adaptés ou faciles à appliquer en routine. A titre d'exemple, il n'existe pas à ce jour d'anticorps discriminant spécifiquement le variant *MET ex14* vis-à-vis de la version sauvage. Ceci permettrait un diagnostic plus aisé en routine clinique en IHC en parallèle des analyses de surexpression de *MET* déjà effectuées par cette technique. Il est donc nécessaire de réaliser des techniques sur ADN pour dépister les mutations ou d'utiliser l'ARN pour détecter directement le saut d'exon sur le transcrit. La grande diversité d'altérations et la présence de mutations introniques sont également un frein à la détection des tumeurs *MET ex14*. Confronté à ce problème y compris à Lille, il a fallu adapter les panels de séquençage de routine clinique pour inclure la détection de *MET ex14* sur ADN avec celles des autres oncogènes impliqués dans le cancer du poumon (Descarpentries et al., 2018). Un nouveau panel de séquençage par NGS a été notamment mis au point à partir de 2017 par les services de biologie moléculaire du CHRU de Lille ce qui a permis par ailleurs la création d'une cohorte de patients *MET ex14* régionale assez rapidement.

La détection du saut de l'exon 14 sur l'ARN par hybridation sur coupes (RISH, RNA In Situ Hybridisation) ou techniques plus courantes comme les tests PCR semblent être très efficaces car indépendantes de la mutation causale mais posent le problème de la qualité de l'ARN isolé à partir des échantillons cliniques et présentent des coûts élevés, ceci rend donc son utilisation restreinte en routine clinique (Davies et al., 2019). Une étude propose l'utilisation d'une méthode optimisée basée

sur une technique de PCR pour détecter les patients MET ex14 sur échantillons FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) (O'Brien et al., 2019). Avec des résultats comparables aux autres techniques, cette méthode pourrait être moins coûteuse et accessible à un grand nombre de laboratoires par rapport aux techniques standards de séquençage par NGS. Depuis plusieurs années, il est désormais possible de réaliser également ces analyses sur les « biopsies liquides », c'est-à-dire sur l'ADN tumoral circulant extrait depuis le plasma. Les biopsies liquides peuvent permettre de surpasser certaines limitations d'accès de la tumeur par exemple et sont donc également une aide précieuse pour la détection de patients MET ex14.

Puisque le récepteur MET ex14 présente une augmentation de sa stabilité, il est légitime de se demander si l'analyse des échantillons par IHC de l'expression de MET pourrait être prédictif d'une mutation MET ex14. Malheureusement, cette piste a dû être écartée car notre groupe a montré que le taux de patients MET ex14 présentant une surexpression de MET détectée par IHC est similaire à celui trouvé dans un groupe de cancers bronchiques non sélectionnés (Baldacci et al., 2020). La détection d'une surexpression du récepteur par IHC ne semble donc pas un marqueur prédictif de saut d'exon 14.

2) Résistances innées et acquises

Comme décrit précédemment, bien que les tumeurs MET ex14 soient sensibles à des inhibiteurs, les essais cliniques en cours montrent des taux de réponses d'environ 50% pour l'ensemble des inhibiteurs confondus (crizotinib, capmatinib, tepotinib et savolitinib). Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus avec des inhibiteurs ciblant d'autres RTKs altérés comme EGFR ou ALK à hauteur de 70%. Par ailleurs, les médianes de temps sans progression sont comprises entre 5,4 mois et 10,8 mois, reflétant le développement de résistances. Prenant en compte les cas de résistance dits « innés » dès l'initiation du traitement et les cas de résistance « acquis » au cours de celui-ci, il est plus que nécessaire de mieux comprendre ces phénomènes de résistance pour un meilleur ajustement des thérapies proposées. Le développement d'une résistance à une thérapie ciblée peut se produire par des mécanismes variés, incluant des mutations secondaires dans le domaine kinase, l'activation d'une voie de signalisation parallèle par mutations et/ou augmentation du nombre de copies par exemple.

La piste des co-altérations

Les mutations MET ex14 ont pu être détectées grâce à des analyses de séquençage à haut débit incluant plusieurs oncogènes souvent altérés dans les cancers. Nous pouvons ainsi nous interroger sur la présence d'altérations supplémentaires au sein des tumeurs présentant un saut d'exon 14. L'ensemble des éléments précédemment présentés tend à démontrer que les mutations MET ex14 sont à l'origine de l'addiction tumorale lorsque ce sont les seules altérations détectées dans

la tumeur mais elles peuvent également co-exister avec des mutations impactant d'autres oncogènes tels que *KRAS*, *ROS1* et *EGFR*. Les mutations MET ex14 sont ainsi assez originales par rapport à d'autres oncogènes drivers retrouvés mutés sans co-altérations dans la plupart des cas.

Dans des contextes de co-altérations, il peut être difficile de déterminer l'implication spécifique de MET ex14 dans la croissance tumorale mais également de prédire l'efficacité de thérapies ciblant MET (Bruno et al., 2017; Clavé et al., 2017; Frampton et al., 2015; Pilotto et al., 2017). Il a notamment pu être montré qu'une amplification de *KRAS* ou la mutation *KRAS* G12V/D, identifiée chez 4% des patients METex14, peut être à l'origine d'une résistance au crizotinib (Bahcall et al., 2018; Suzawa et al., 2019). En cas de suractivation de *KRAS* concomitante à une mutation MET ex14 en modèle cellulaire, une double inhibition de MET et de la voie des MAPK est nécessaire pour abolir le potentiel transformant induit par ces mutations combinées et résistant à l'utilisation d'un inhibiteur de MET en monothérapie (Rotow et al., 2020).

La voie PI3K est également altérée dans certains cancers pulmonaires car des mutations activatrices de *PI3KCA* et *AKT1* sont retrouvées respectivement dans environ 5% et 1% des cas de CBNPC (Bleeker et al., 2008; Malanga et al., 2008; Yamamoto et al., 2008). Par ailleurs, il a déjà été reporté que les altérations de la voie PI3K pouvaient être un facteur de résistance aux inhibiteurs de EGFR (Liu et al., 2018). Dans ce contexte, nous avons ainsi pu montrer que ces altérations pouvaient être également impliquées dans la résistance aux inhibiteurs de MET dans des cas de MET ex14 (Jamme et al., 2020; article "Alterations in the PI3K pathway drive resistance to MET inhibitors in NSCLC harboring MET exon 14 skipping mutations" présenté en annexe n°3). Parmi 65 patients MET ex14 inclus dans la cohorte de Lille, deux cas présentaient aussi une mutation de *PIK3CA* (soit 3%) et six tumeurs parmi 26 échantillons testés par IHC avaient une perte d'expression de PTEN (soit 23%). PTEN est une phosphatase régulatrice clefs de la voie PI3K puisqu'elle réverse la transformation de PIP₂ en PIP₃ réalisée par PI3K qui permet l'activation dans un second temps d'AKT. Parmi les patients MET ex14 traités par ITK, les trois patients présentant une altération de la voie PI3K ont montré une progression tumorale dès la première évaluation. Comme pour les mutations *KRAS*, l'inhibition de PI3K permet de restaurer la sensibilité à des inhibiteurs de MET dans plusieurs modèles incluant une lignée cellulaire dérivée d'un patient.

D'autres altérations incluant des amplifications et/ou mutations de *BRAF* et d'*EGFR* ont pu être également identifiées comme mécanismes de résistance dans des cas de MET ex14 traités par inhibiteur de MET (Awad et al., 2018). Par ailleurs, d'autres altérations non ciblées thérapeutiquement actuellement ont également été détectées. L'analyse de 298 cas de CBNPC MET ex14 montre par exemple des mutations de *TP53* dans 39% des cas, une amplification de *MDM2*,

un des régulateurs négatifs de p53, dans 27% à 35% des échantillons ou encore des altérations des régulateurs des cyclines *CDK4* et *CDKNA2*, respectivement 17% et 19% (Guo et al., 2020; Schrock et al., 2016). L'impact de ces co-altérations sur la réponse aux traitements est cependant peu connu à ce jour.

Les mutations de MET « on-target »

De surcroît, des mutations acquises du récepteur MET lui-même peuvent être un mécanisme de résistance. Ces mutations sont désignées sous le terme de « mutations on-target » puisqu'elles induisent une résistance en modifiant directement la cible visée. Les points abordés dans ce paragraphe reprennent les éléments de la revue « When the MET receptor kicks in to resist targeted therapies » (p. 90). A ce jour, au moins sept mutations différentes ont été décrites chez des patients porteurs d'un saut de l'exon 14 après un traitement à un inhibiteur de MET (*Figure 15*). Essentiellement dans le domaine kinase (H1067, H1112, G1181, L1213, F1218, D1246, Y1248), ces mutations peuvent empêcher l'action des inhibiteurs sur leur cible. Une étude récente a montré que parmi 20 patients MET ex14 résistants à un ITK MET, 7 patients présentaient une mutation « on-target » supplémentaire de MET (Recondo et al., 2020). De plus, une tumeur présentait également une amplification de la version mutée MET ex14. De manière intéressante, il est à noter que la majorité des mutations détectées dans le domaine kinase sont déjà connues comme étant des mutations activatrices indépendamment du ligand, notamment dans le cancer du rein (Tovar and Graveel, 2017).

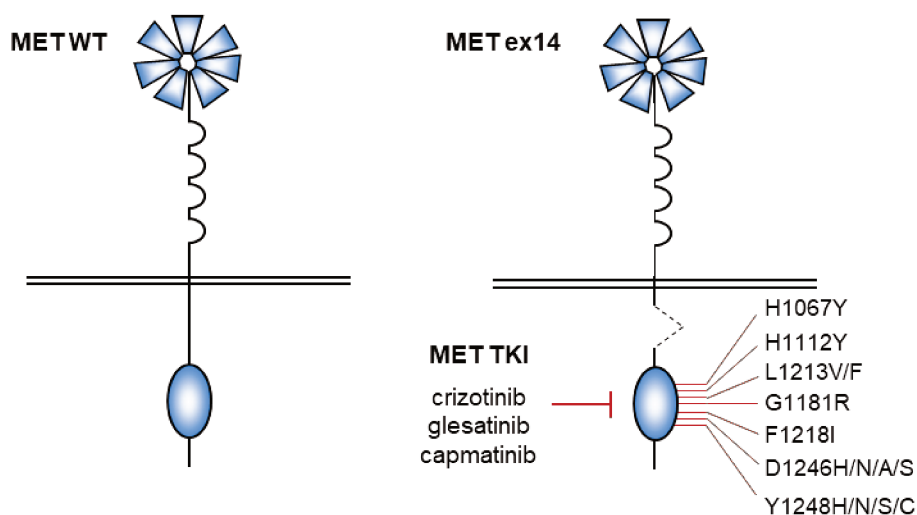


Figure 15 : Résistances « on-target » acquises dans des CBNPC MET ex14. Les récepteurs MET sauvage et MET ex14 sont illustrés, les mutations de résistance aux inhibiteurs de MET dans le domaine kinase sont indiquées. (extrait de « The emerging role of the MET receptor in resistance to targeted therapies », Fernandes et al., soumis)

Afin de confirmer le rôle de ces mutations détectées chez les patients, il a été établi des modèles cellulaires de résistance. En cellules Ba/F3, il a été mis en évidence 12 mutations de résistance de *MET* dont cinq étaient celles observées aussi chez des patients (G1181, L1213, F1218, D1246, Y1248) (Fujino et al., 2019). De manière intéressante, les différents inhibiteurs utilisés ne conduisent pas aux mêmes mutations de résistances. Ceci pouvant être lié au mode d'action différent entre les inhibiteurs de type I et type II. Les inhibiteurs de type I, qui se lient à la forme active du récepteur, ont conduit à l'émergence des mutations des sites D1246 et Y1248. En revanche, les inhibiteurs de type II, se fixant à la forme inactive du récepteur, ont eux conduit à l'émergence des mutations des sites F1218 et L1213. Au moins deux modèles cellulaires montrent que l'utilisation croisée de l'un ou l'autre des inhibiteurs permet de restaurer la sensibilité des cellules à l'inhibition de *MET*. La restauration de la sensibilité à l'un ou l'autre des inhibiteurs est aussi efficace chez certains patients ayant développé ces mutations « on-target » (Engstrom et al., 2017; Fujino et al., 2019).

L'ensemble de ces données suggèrent que les cas de résistance aux inhibiteurs de *MET* peuvent être liés à différents mécanismes incluant des co-altérations primaires ou acquises et peuvent même être inhérents au type d'inhibiteur utilisé. Une meilleure connaissance de ces mécanismes et la recherche de co-altérations sont donc essentielles pour anticiper la réponse aux traitements ciblant *MET* ex14. Par ailleurs, de nouvelles stratégies telles que des thérapies combinées ou des approches séquentielles de plusieurs inhibiteurs peuvent être nécessaires pour améliorer l'efficacité des thérapies ciblées chez les patients METex14. Le nombre de traitements précédemment reçus pourrait avoir également une influence sur l'efficacité d'un inhibiteur de *MET*. L'essai de phase II GEOMETRY mono-1 testant l'efficacité du capmatinib suggère en effet un taux de réponse supérieur pour les patients naïfs de traitement (68%) par rapport à ceux ayant déjà reçu une à deux lignes de traitement précédemment (41%) (Wolf et al., 2020). Cependant, cette conclusion est à modérer car cet effet n'a pas été observé pour le tepotinib dans l'essai VISION (Paik et al., 2020).

En conclusion, l'efficacité des inhibiteurs sélectifs de *MET*, en première ligne ou non, en monothérapie ou en association avec d'autres molécules, incluant des inhibiteurs d'autres cibles, la chimiothérapie ou les immunothérapies nécessite d'être évaluée plus précisément.

3) Caractériser les mécanismes d'activation du récepteur MET ex14

Les trois sites de régulation présents dans le domaine juxtamembranaire ont tous des modes de fonctionnement différents (*Figure 14*). Après stimulation par l'HGF, la phosphorylation de S985 permet d'inhiber directement l'activité kinase du récepteur. La phosphorylation de Y1003 permet quant à elle la fixation de CBL responsable de l'ubiquitination puis de la dégradation de *MET*. Si ces deux premiers sites agissent suite à l'activation du récepteur par l'HGF, le clivage de *MET* par les

caspases en D1002 s'opère en absence de ligand et permet de générer le fragment p40 MET capable d'amplifier l'apoptose. Ainsi, la perte de l'exon 14 conduit à la perte d'au moins trois mécanismes de régulation conduisant à un échappement du contrôle du récepteur MET. Puisque le saut de l'exon 14 ne conduit pas à l'activation constitutive de récepteur, l'implication de l'HGF dans le potentiel transformant de MET ex14 reste seulement évoquée dans plusieurs études et n'a pas été démontrée formellement, ni recherchée dans les tumeurs. Par ailleurs, comme nous l'avons vu, il a déjà été démontré que la mutation de la Y1003 induit la transformation cellulaire et un certain nombre d'auteurs résumant les capacités transformantes de MET ex14 à la perte de ce résidu (Kong-Beltran et al., 2006; Lee et al., 2006). Cependant, la contribution de la perte de la S985 ou de D1002 dans la tumorigenèse n'a pas été déterminée. De plus, alors que le saut de l'exon 14 est détecté dans environ 3% des cancers bronchiques à ce jour, les mutations de la Y1003 sont peu répertoriées. De plus, il a été montré que le récepteur MET ex14 présentait finalement qu'une faible augmentation de stabilité induite par la perte de liaison à CBL par rapport au récepteur au sauvage (Lu et al., 2017). Ceci suggère donc l'implication des autres sites de régulation de MET dans la transformation cellulaire.

Objectifs de thèse

Dans les cancers bronchiques, les mutations de *MET* touchent majoritairement l'exon 14 et ce dans 3% des adénocarcinomes pulmonaires. Il s'agit notamment de mutations ponctuelles ou délétions impactant les sites donneurs ou accepteurs d'épissage de cet exon provoquant le saut, en phase, de ce dernier. Des réponses prometteuses aux inhibiteurs ciblant MET ont été obtenues chez des patients porteurs de ces altérations. Ce saut d'exon conduit à la perte de 47 acides aminés du domaine juxtamembranaire mais ses conséquences fonctionnelles sont encore mal connues. Il a déjà été montré que le saut de l'exon 14 et la perte consécutive du domaine juxtamembranaire conduisent à l'activation de MET, la transformation cellulaire de lignées et favorisent également la croissance tumorale dans des modèles de tumorigenèse *in vivo*.

Cependant, l'origine des capacités transformantes du récepteur MET ex14 reste imprécise. Dans ce contexte, l'objectif principal de ma thèse a donc été de caractériser les mécanismes d'activation du récepteur MET ex14. Le domaine juxtamembranaire, codé par l'exon 14, porte au moins trois sites de régulation négative. Les phosphorylations du résidu Y1003 et du site S985 en réponse à l'HGF permettent respectivement la dégradation de MET et l'inhibition de son activité kinase. Le motif ESV1001D, quant à lui, est un site de clivage par les caspases permettant la génération d'un fragment pro-apoptotique en absence de ligand découvert dans le laboratoire.

Dans ce contexte, mon premier objectif a été d'interroger le rôle de l'HGF dans la tumorigenèse induite par les cellules MET ex14. Ensuite, l'implication de chacun de ces sites perdus n'est pas connue. Mon deuxième objectif a donc été de déterminer la contribution relative de ces mécanismes de régulation dans les capacités transformantes du récepteur MET ex14 en réalisant une étude systématique de l'impact de la mutation de ces sites sur différentes réponses biologiques et la croissance tumorale.

Résultats

Publication n°1 : MET ex14 addiction to HGF

Ligand-dependent oncogene addiction of the MET exon 14 skipping mutant.

Marie Fernandes, Brynna K. Hoggard, Philippe Jamme, Sonia Paget, Valérie Grégoire, Audrey Vinchent, Clotilde Descarpentries, Angela Morabito, Jean-Pascal Meneboo, Martin Figeac, Shéhérazade Sebda, Sarah Humez, Luca Grumolato, Marie-Christine Copin, David Tulasne, Alexis B. Cortot, Stéphanie Kermorgant and Zoulika Kherrouche.

Les thérapies ciblées contre les récepteurs tyrosine kinase ont considérablement amélioré la survie d'une proportion de patients dans plusieurs cancers. L'efficacité de ces thérapies dépend de l'addiction de la tumeur à un oncogène, une situation dans laquelle la prolifération et la survie des cellules tumorales dépend d'un oncogène dont l'activité est dérégulée. La plupart des mutations du domaine kinase conduisant à l'activation constitutive du récepteur MET ont été décrites dans les cancers rénaux. Alors que ces thérapies ciblées sont particulièrement utilisées dans les cancers du poumon, les mutations activatrices de la kinase ne sont que très rarement détectées dans ce cancer. Néanmoins, des mutations impactant les sites d'épissage de l'exon 14 (MET ex14) ont récemment été détectées dans environ 3% des cancers pulmonaires et ces patients présentent des réponses favorables aux inhibiteurs de MET. Ces mutations conduisent au saut de l'exon 14 et provoquent la perte du domaine juxtamembranaire de MET porteur de plusieurs sites de régulation négative. Alors que la plupart des altérations sont responsables d'une addiction oncogénique indépendante d'une stimulation par le ligand, le saut de l'exon 14 du récepteur confère un mécanisme d'activation différent des mutations impactant le domaine kinase. La perte du domaine régulateur juxtamembranaire ne conduit pas à l'activation constitutive du récepteur mais nous avons démontré que l'HGF est nécessaire aux capacités transformantes du récepteur MET ex14.

Par édition du génome, le saut de l'exon 14 de MET a été reconstitué dans une lignée épithéliale pulmonaire non transformante (16HBE) et une lignée pulmonaire mutée sur *KRAS* (A549). Dans les deux lignées, le récepteur MET ex14 ainsi que les voies de signalisation en aval en réponse à l'HGF présentent une activation accrue et prolongée au cours du temps. Particulièrement dans les cellules 16HBE MET ex14, l'HGF est essentiel au développement de réponses transformantes intégratives telles que la résistance à l'anoïkis et la croissance tumorale. Une analyse transcriptomique a permis de révéler que l'activation du récepteur MET ex14 par l'HGF permet la régulation de gènes impliqués dans l'organisation de la matrice extracellulaire. Concernant les cellules A549 MET ex14, la résistance à l'anoïkis et la croissance tumorale ne semblent pas être dépendantes de l'HGF et pourraient être médiées par l'activité dérégulée de *KRAS*. Néanmoins, la croissance tumorale est réprimée par l'utilisation d'inhibiteur de MET pour les deux lignées malgré la présence de la mutation de *KRAS* pour les cellules A549. Enfin, de manière originale, nous montrons qu'au moins un tiers des tumeurs MET ex14 issues de patients expriment l'HGF, suggérant l'existence possible d'une boucle autocrine. En conclusion, ces résultats démontrent une relation particulièrement étroite entre l'HGF et MET dans le cadre des mutations MET ex14 et permettent d'envisager l'expression d'HGF tumoral comme biomarqueur des tumeurs MET ex14.

Ligand-dependent oncogene addiction of the MET exon 14 skipping mutant

Marie Fernandes^{1,8}, Brynna Hoggard,^{2,8} Philippe Jamme^{1,8}, Sonia Paget¹, Valérie Grégoire³, Audrey Vincent¹, Clotilde Descarpentries⁵, Angela Morabito¹, Jean-Pascal Meneboo⁴, Martin Figeac⁴, Shéhérazade Sebda⁴, Sarah Humez³, Luca Grumolato⁶, Marie-Christine Copin^{1,3}, David Tulasne¹, Alexis B. Cortot^{1,7}, Stéphanie Kermorgant^{2,9} and Zoulika Kherrouche^{1,9}.

¹ Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020 – UMR1277 - Canther – Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France.

² Spatial Signalling Team, Barts Cancer Institute, Queen Mary University of London, John Vane Science Centre, Charterhouse Square, London EC1M 6BQ, UK.

³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Hormonology Metabolism Nutrition Oncology, CHU Lille, Lille, France.

⁴ Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US 41 - UMS 2014 - PLBS, F-59000 Lille, France

⁵ University Lille, CHU Lille, Institute of Pathology, UMR8161 CNRS, Institute of Biology of Lille, F-59000 Lille, France.

⁶ INSERM U1239, Unirouen, Normandie University, F-76130 Mont-Saint-Aignan, France.

⁷ Lille University Hospital, CHU Lille, Thoracic Oncology Department, Lille, France

⁸ M. Fernandes, B. Hoggard and P. Jamme contributed equally to this work.

⁹ S. Kermorgant and Z. Kherrouche contributed equally as the co-senior authors of this article.

Key words: METex14, HGF, NSCLC, MET TKI

Corresponding authors:

Zoulika Kherrouche

Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020 – UMR1277 - Canther
1, rue du Pr. Calmette

CS 50447

F-59021 Lille Cedex

Tel : +33 3 20 8711 18

Email : zoulika.kherrouche@ibl.cnrs.fr

Stéphanie Kermorgant

Department of Tumour Biology

Barts Cancer Institute - a CR-UK Centre of Excellence

Queen Mary University of London

John Vane Science Centre

Charterhouse Square

London EC1M 6BQ

Tel: +44 (0)20 7882 3578

e-mail: s.kermorgant@qmul.ac.uk

Disclosure of fundings

ABC participated in advisory boards or received honoraria from Astra-Zeneca, Bristol-Myers Squibb, Merck & Co, Pfizer, Roche, Novartis, Takeda, and received grants payed to ABC's institution from Novartis, Merck. PJ reports non-financial support from Chugai Pharma, personal fees from Boehringer Ingelheim, outside the submitted work. MCC participates in advisory boards for Pfizer and Roche. CD reports personal fees and non-financial support from AstraZeneca, Novartis pharma SAS, Roche SAS, Boehringer Ingelheim France, Pfizer, outside the submitted work. MF, SP, AV, AM, DT, MF, JPM and ZK have no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work received financial support from the CNRS, the Institut Pasteur de Lille, INSERM, the University of Lille, the Cancéropôle Nord-Ouest, the Agence Nationale de la Recherche, the Institut National du Cancer, La Ligue Contre le cancer, Hauts-de-France region, the BBSRC (LIDo consortium), Rosetrees Trust, Barts Charity, the MRC and PCRF. We thank the Animal Facility of the Institut Pasteur de Lille and of Barts Cancer Institute for access to instruments and technical assistance and advice. The authors thank Marie-José Truong for her kind support regarding blood sampling and OCTIMET for providing the OMO-1 inhibitor.

ABSTRACT

MET exon 14 (METex14) mutations, resulting in exon 14 skipping, found in approximately 3-4% of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), are gain of function mutations, making them eligible for targeted therapies against MET. In contrast to most receptor tyrosine kinase mutations, which are often located in the kinase domain and lead to ligand-independent activation, METex14 mutations induce deletion of a negative regulatory domain. Additionally, METex14 mutations have been described to co-occur with other molecular alterations in a proportion of patients. The functional implications of exon 14 skipping occurring alongside other driver mutations are unknown, and it has been suggested that MET exon 14 skipping alone may not be sufficient to drive tumorigenesis. Similarly, there are varied results from clinical studies using MET tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in patients harbouring MET exon 14 skipping.

Thus, it is increasingly important to understand what factors, if any, can predict METex14 patient response to MET targeted therapies.

Using CRISPR/Cas9, we developed two isogenic human lung cell models expressing METex14 in order to investigate the ability of exon 14 deletion to drive tumorigenesis without the confounding effects of *MET* amplification and overexpression. We report that, in the absence of MET overexpression, METex14 requires HGF binding for activation, leading to a more robust and sustained downstream signalling and enhanced colony cell scattering compared to wild type MET. Additionally, in non-transformed cells without co-occurring genetic alterations, HGF-activated METex14 mutation contributed to increased tumorigenesis in vitro and in vivo. In cells with a co-occurring *KRAS* (G12S) mutation, METex14 did not confer a growth advantage. Nevertheless, the novel selective MET TKI OMO-1 significantly reduced the growth of these tumours, indicating that in fact, such tumours are dependent on the HGF - Met Ex14 axis for their growth, thus suggesting an oncogenic switch. These results further suggest that co-occurring driver mutations may not be sufficient to predict patient response to MET-targeting therapies. Finally, we investigated HGF expression in tumour samples isolated from patients harbouring METex14 NSCLC, and found that 6 out of 12 patient samples expressed detectable levels of HGF in the cancer cells. These results are consistent with our findings that METex14 requires HGF for activation, and suggest that HGF could be used as an additional biomarker to predict METex14 patient response to MET-targeted therapies.

Introduction

Targeted therapies against receptor tyrosine kinases (RTKs) are currently used with success in patients displaying clear oncogene activation, for example in EGFR-mutated lung cancers. Indeed, mutations in EGFR's kinase domain lead to constitutive activation of its kinase activity, resulting in an addiction to this activity for cell growth and survival. The efficacy of targeted treatments relies on oncogene addiction, a situation in which the cancer cells' growth or survival depends on a single deregulated oncogene. Constitutive activation of the RTK MET has also been described in several cancers, due to both *MET* gene amplification, leading to overexpression (1,2) or, less commonly, to activating mutations in the kinase domain (3,4). In these situations, MET activation is not dependent on the presence of HGF, its high affinity ligand, and creates an oncogene addiction which can be targeted to inhibit cellular proliferation and tumor growth (5-8).

Additionally, a set of alterations have been identified in non-small cell lung cancer (NSCLC) affecting the splice donor or acceptor sites of MET exon 14. These alterations include point mutations, deletions, insertions, and complex mutations which all result in the in frame skipping of exon 14 (METex14), and the deletion of the 47 amino acid juxtamembrane domain. These mutations have been reported in adenocarcinomas (2.6 to 3.2%) (9-11) and pulmonary sarcomatoid tumors (2.6 to 31.8%)(9,11,12). They have also been observed in other tumor types, including gastric cancers (7.1%), colorectal cancers (0 to 9.3%), brain gliomas (0.4%), and other malignancies (10,13).

Exon 14 deleted MET retains its HGF-binding, dimerisation, kinase and docking domains, rendering it fully functional. However, the juxtamembrane domain contains at least three important residues involved in receptor downregulation. The best characterised of these is tyrosine 1003 (Y1003), which is the binding site for the E3 ubiquitin ligase c-Cbl, important for receptor ubiquitination and degradation (14). It also contains serine 985 (S985), a regulatory domain for tyrosine kinase activity, and aspartic acid 1002 (D1002), the site of stress-induced, caspase-mediated cleavage, which produces a pro-apoptotic 40 kDa MET fragment (15-17). Early studies indicated that juxtamembrane domain loss could lead to MET deregulation and increased tumorigenesis (18,19).

Due to their prevalence in patients and predicted function, exon 14 skipping alterations have increasingly been investigated as potentially actionable driver mutations in NSCLC (20). Some pre-clinical in vitro studies have added further evidence, citing examples where introduction of *MET* exon 14 deletion has transformed both AALE cells, a human tracheobronchial epithelial cell line, and the mouse fibroblast cell line NIH3T3 (21,22). However, MET exon 14 skipping has also been shown to co-occur with a number of other oncogenic mutations in

patients, including the known driver mutation *KKRAS*, one of the most common in NSCLC (20). Other studies have further identified MET exon 14 patients with concurrent *PIK3CA*, *EGFR*, and *TP53* mutations, *EGFR*, *MDM2* and *CDK4* amplification, and even *MET* gene amplification (10,23,24). The functional implications of exon 14 skipping occurring alongside other driver mutations are unknown, but there are reports in the literature that MET exon 14 skipping alone may not be sufficient to drive tumorigenesis (21).

Similarly, there are varied results from clinical studies using MET tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in patients harbouring MET exon 14 skipping. Results from individual patient case studies have ranged from no response to an overall survival of over 6 years from third line treatment (22,25). A clinical trial using the MET TKI tepotinib in NSCLC patients harbouring exon 14 skipping has so far reported an objective response rate (ORR) of about 50% (26), while the GEOMETRY mono-1 trial for capmatinib has reported an ORR over 70% in treatment-naïve exon 14 patients (27,28). However, there are others, such as the METROS trial for crizotinib in NSCLC patients (NCT02499614), that reported an ORR of only 27% in MET exon 14 patients (29). Despite the mixed results, several TKIs against MET, including crizotinib and capmatinib, have been approved to treat METex14 NSCLC patients.

Thus, it is increasingly important to understand what factors, if any, can predict METex14 patient response to MET targeted therapies. Some recent reports have suggested that co-occurring driver mutations, often a mechanism of acquired resistance, could also be responsible for intrinsic resistance to MET inhibitors (24,30). There is also a growing body of evidence that only MET-driven, or MET-addicted tumours, are sensitive to MET TKIs (7,31). While *MET* amplification has been shown to co-occur with exon 14 skipping, leading to constitutive MET activation and MET addiction, there is so far no evidence that exon 14 skipping alone can have the same effect (10,23).

Using CRISPR/Cas9, we developed two isogenic human lung cell models expressing METex14 in order to investigate the ability of exon 14 deletion to drive tumorigenesis without the confounding effects of *MET* amplification and overexpression. We demonstrate that METex14 mutation is a driving mutation which requires HGF for its oncogenicity in vitro and in vivo. Our results suggest that tumours bearing METex14 mutation, on its own or in conjunction with other genetic alteration such as *KRAS* mutation, will likely display some response to MET-targeted therapies if HGF is both present and accessible to the cancer cells.

Materials and Methods

Patients

Clinical and molecular data were collected retrospectively at each center. All the data reported in this non-interventional study were extracted from a database approved by the French National Data Protection Authority (CNIL). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and Good Clinical Practice guidelines and approved by a national ethics committee and by the French Advisory Committee on Information Processing Related to Research in the Field of Health. Patients received information from the referring physician.

Cell lines maintenance and generation by CRISPR/Cas9

All cell lines were cultured in media with 10% foetal bovine serum from Gibco and maintained in humidified incubators at 37 °C and 5% CO₂. The non-transformed, human bronchial epithelial 16HBE cells were cultured in MEM. The NSCLC cell line A549 was cultured in DMEM. H226 and H596 cells were both cultured in RPMI1640. All cells were routinely tested for mycoplasma MycoAlert™ (Lonza). Cells were passed two to three times a week and kept in culture for a maximum of 10 passages.

In order to induce a MET exon 14 skipping in 16HBE cell line, 16HBE were electroporated with px459 V2 vector (Addgene #62988) containing cDNA coding for Cas9 enzyme and sequence coding sgRNA (5'-TACCGAGCTACTTTTCCAGA-3') targeting exon 14 splice donor region. After 24h, cells were treated by puromycin at 1 µg/ml during 48h and then isolated by limit dilution in 96-well plates. Screening for exon 14 skipping was performed by PCR using methods described previously (Descarpentries et al, 2018). Deletions impacting splicing site of MET and absence of alteration in other oncogenic drivers were validated by NGS sequencing using the CLAPv1 targeted NGS panel. For A549, cells in 24 well plates were transfected with a Cas9-Puro plasmid and tracrRNA (Dharmacon), and two CRISPR RNAs targeting the introns flanking exon 14. Transfected cells were selected in 1.5 µg/ml puromycin and seeded by limit dilution into 96 well plates. Single cell colonies were amplified and screened by western blot. Gene editing was confirmed by reverse transcription PCR and sanger sequencing of PCR products containing exon 14 amplified from retrotranscribed RNA and genomic DNA.

Reagents and chemicals

MET inhibitors crizotinib and capmatinib were purchased from Selleck Chemicals and prepared in DMSO. For in vivo experiments, the MET TKI, OMO-1, a generous gift from OCTIMET, was suspended in a vehicle containing 0.5% methyl cellulose and 0.1% Tween80 in water, sonicated and brought to a pH of 2.5-3.5.

Western blot and cell signalling experiments

Cells were grown in plates for 24 hours and starved either overnight or 1 h before stimulation for the indicated times with recombinant HGF (Selleck Chemicals). Proteins were resolved on polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare) or Immobilon-P polyvinylidene fluoride microporous transfer membranes (Merck Millipore), and probed using the following antibodies: MET (CVD13, Invitrogen 71-8000), MET (Cell Signalling #3148), phospho-MET (Tyr1234/1235, Cell Signalling #3126), phospho-AKT (Cell Signalling #4060), AKT (Cell Signalling #9272; Santa Cruz sc-8312), phospho-ERK1/2 (Cell Signalling #9106, #4370), ERK1/2 (Cell Signalling #9102; Santa Cruz sc-154), HSC70 (Santa Cruz sc-7298), and GAPDH (Santa Cruz sc-32233). Peroxidase-coupled secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (anti-mouse 115-0350146; anti-rabbit 711-0350152) or BioRad (anti-mouse 170-6516; anti-rabbit 170-6515). Proteins were detected using Amersham enhanced chemiluminescence (ECL) detection agents (GE Healthcare) and developed on X-ray film or using the Amersham Imager 600 (GE Healthcare). Densitometry was quantified using ImageJ.

Incucyte proliferation assay

For confluence test, 16HBE and A549 were seeded (5,000 cells) in 96-well plate. Next day, complete media was replaced and supplemented or not with 20 ng/ml or 15 ng/ml of HGF respectively. From this point, cell confluence was monitored during 48h by acquisition of a phase-contrast image per well every 4 hours using the 4x objective of the IncuCyte (Essen Bioscience). Confluence analysis was performed using the Incucyte Zoom 2018 software.

Cell viability assay in 3D and anchorage independent conditions

16HBE and A549 cells were seeded (2,000 cells) in 96-well ultra-low attachment (Corning) in 100 μ l of 0.1% FBS medium with treatments. Fresh media with treatments was added every 48h to 72h (20 μ l/well). After 7 days for A549 or 14 days for 16HBE cell lines, cell viability in each well was quantified with Alamar Blue reagent (Invitrogen) and fluorescence measured on a Fluostar Optima plate reader (BMG Labtech) with 560/590 (ex/em) wavelength filter settings. Data represented the average of three independent experiments with four replicates by condition.

Immunofluorescence scatter assay

A549 and 16HBE cells were seeded at low densities (500 cells per well) on 13 mm coverslips. Every two to three days, cells were treated with MET TKI or DMSO as a control and HGF as indicated in figure legends. After six days, cells were fixed using 4% paraformaldehyde. Plasma membranes were labelled with WGA-488 (10 µg/ml) and nuclei were stained with DAPI. Images of random colonies were acquired with a Zeiss LSM 510 or 710 at 40x. CellProfiler was used to automatically detect nuclei in blue channel images. Distances from the centroid of each nucleus to the boundary of the nearest nucleus were measured. Average distances were calculated for each condition.

Transcriptomic analysis

Cells (750,000) were plated on petri-dish in complete medium. Next day, cells were serum starved 2 h and treated 24 h with HGF in serum-free medium. Total RNA was extracted with the Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel) following the manufacturer's instructions. Genomic DNA traces were removed by DNaseI treatment. HGF stimulation and RNA extraction were performed in four replicates each separated by one-week culture. Total RNA yield and quality were evaluated on the Nanodrop 2000C system (ThermoScientific) and further assessed on the Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies). One color whole Human (072363_D_F_20150612) 60-mer oligonucleotides 8x60k microarrays (Agilent Technologies) were used to analyze gene expression. cRNA labelling, hybridization and detection were carried out according to supplier's instructions (Agilent Technologies). For each microarray, Cyanine 3-labeled cRNA were synthesized with the low input QuickAmp labeling kit from 50 ng of total RNA. RNA Spike-In were added to all tubes and used as positive controls of labelling and amplification steps. The labelled cRNA were purified and 600 ng of each cRNA were then hybridized and washed following manufacturer's instructions. Microarrays were scanned on an Agilent G2505C scanner and data extracted using Agilent Feature Extraction Software© (FE version 10.7.3.1). Statistical comparisons, filtering and figures were achieved with limma R package (R3.5.1, limma 3.38.3).

In vivo tumour xenografts and approval for experimentations

The 16HBE project (19253-201903191709966 v1) received ethical approval by French Committee on Animal Experimentation and the Ministry of Education and Research. The A549 project was approved under the UK Home Office project licence number P1EE3ECB4. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

NOD.*scid*.*Il2R γ* c (NSG) mice with a humanised HGF knock in allele (KI-huHGF) or the control NSG mice (Jackson Laboratory) were used for *in vivo* experiments. The tumorigenic potential of cell lines was investigated in both female and male group of mice without noticing any

difference. A549 cells (2×10^6) in PBS and Matrigel (Corning) or 16HBE WT or Ex14 cells (2×10^6) in PBS were injected subcutaneously into the flanks of mice. Tumours were palpated and measured with callipers at least two times a week until they reached 100 mm^3 in volume, when treatment was initiated. Mice received 48 mg/kg OMO-1 or the vehicle as a control by oral gavage once daily. The tumor volume (V) was calculated with the formula $V=0.5 \times (L \times W^2)$. Animals were culled if suffering signs were noted and before tumours reached 1000 mm^3 .

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry HGF staining, the Benchmark XT automated slide processing system (Ventana Roche, Tucson AZ) was used according to the manufacturer's protocols. Briefly, after the tissue sections were deparaffinised with EZ prep (Ventana), heat-induced epitope retrieval with CC1 (Ventana) was performed and the slides were incubated with primary antibody against HGF. Immunoreactions were detected by the Ultraview DAB Universal detection kit followed by counterstaining with Hematoxylin II (Ventana) and Bluing reagent (Ventana).

Statistics

All results are expressed as mean \pm s.e.m. of at least three independent measurements. According to their distribution, quantitative variables were compared with a Student's T-test, Mann-Whitney test, or two-way ANOVA. Two-way ANOVA was performed for tumor growth analysis in subcutaneous xenograft models. All statistical testing was conducted at the 2-tailed α level of 0.05. Data were analyzed with GraphPad Prism software version 7.

Results

Activation of exon 14 skipping MET is dependent on HGF, and results in sustained downstream signalling.

MET overexpression and amplification can result in ligand-independent MET activation (1,8,32), leading to MET-dependent growth and increased sensitivity to MET inhibitors (7,31). While exon 14 skipping can co-occur with a number of other genetic alterations in patients, amplification only accounts for a small subset of these (33).

We developed in vitro isogenic models that would allow us to investigate exon 14 deletion alone or in combination with an activating KRAS mutation, a genetic alteration we have previously reported to co-occur with exon 14 deletion (33), without the confounding effects of MET amplification or overexpression. Thus we used CRISPR/Cas9 to generate MET WT or METex14 (Met lacking exon 14) 16HBE and A549 cells. 16HBE cells are immortalised, non-transformed human bronchial epithelial cells. A549 is a NSCLC adenocarcinoma cell line with homozygous KRAS mutation (G12S) (34,35) (See **Supplementary Figure S1**).

We measured the response over 30 min to increasing concentrations of HGF of our novel CRISPR/Cas9 cell lines. 16HBE and A549 cell lines' pairs were both found to be dependent on HGF for MET activation, and exhibited increasing levels of phosphorylated MET with increasing doses of HGF (**Figure 1A and B**).

When both cell lines were incubated with HGF for longer periods, up to 180 min, cells harbouring MET WT exhibited significant reduction in cellular MET levels, compared to unstimulated levels (**Figure 1D and I**). Upon HGF activation, MET is quickly internalised into the cell and progressively degraded (36,37), leading to signal attenuation. For this reason, reduced cellular levels of MET are often observed after activation with HGF. However, in A549 Ex14 cells (**Figure 1H,J**), and to a lesser degree 16HBE Ex14 cells (**Figure 1C, E**), cellular MET levels remained stable after 120 and 180 min of HGF activation, compared to the wild type. This is consistent with reports that the loss of the c-Cbl binding site, at residue Y1003 in the juxtamembrane domain, prevents ubiquitination and ultimately degradation of MET (14). Similarly, after an initial acute and statistically significant activation of MET WT with HGF (at 15min), phosphorylation significantly decreased with longer incubation times and was not anymore significantly increased at 120 and 180min. However, METex14 phosphorylation was sustained up to 180min, showing no significant decrease in either cell line (**Figure 1E and J**). This sustained activation was also observed in signalling molecules downstream of METex14. Thus AKT and ERK1/2 exhibited an acute activation in response to HGF stimulation, which was sustained up to 3 hours (**Figure 1F,G,K and L**). Sustained AKT phosphorylation was the

most consistent across both *in vitro* models, indicating that PI3K/AKT may be a key pathway in the oncogenicity of exon 14 deleted MET. Dependence on HGF, sustained METex14 signalling, as well as METex14 degradation escape, were also seen in the NSCLC H596 cells, a lung adenocarcinoma cell line with endogenous exon 14 skipping while not in the NSCLC H2296 cells expressing Met WT (**Supplementary Figure S2**).

HGF increases METex14 expressing cells' proliferation in 2D and anchorage-independent viability in 3D

To assess the influence of Ex14 MET mutation on the cell's growth and viability with and without HGF, two assays were performed. A live-cell assay measuring cell proliferation over 48h in 2D adherent cultures showed that METex14 mutation confers a proliferative benefit to 16HBE Ex14 cells compared to the WT cells. While HGF had no significant effect on WT or Ex14 cells (**Figure 2A**). By contrast, the proliferation of A549 cells, bearing a KRAS G12S driver mutation, was unaffected by the METex14 mutation. However, HGF modestly but significantly increased the proliferation of A549 expressing METex14 (**Figure 2B**).

Cell viability in 3D anchorage-independent and low-serum conditions was assessed using alamar blue (see methods) after 14 and 7 days of culture for 16HBE and A549 cells respectively. HGF significantly increased the viability of 16HBE Ex14 cells but not of 16HBE MET WT cells in these conditions. This cell viability was efficiently blocked with the addition of the MET TKI crizotinib or capmatinib. Ex14 deletion did not confer any advantage to the basal viability of A549 cells in these conditions. However, HGF stimulation of both the WT or mutated MET receptor increased anchorage-independent growth. Under MET TKI treatments, this growth was efficiently blocked (**Figure 2D**).

These results indicated that Ex14 mutation confers an advantage in basal 2D proliferation and in HGF-dependent cell viability in 3D of non-transformed 16HBE. By contrast, while the basal proliferation or viability of A549 cells, already transformed, is unchanged by Ex14 mutation, they are enhanced in response to HGF.

Cells harbouring MET exon 14 skipping exhibit increased scattering upon HGF stimulation

It is well established that in addition to cell growth and survival, MET signalling can promote cell motility and invasion. In order to assess this in the 16HBE and A549 models, we used a cell scattering assay as a readout for motility. We grew cells at low density in 2D to promote colony formation. When cells were incubated with HGF, those harbouring MET WT became more mesenchymal, appearing elongated and giving the colonies a more spread out

appearance. However, both 16HBE Ex14 and A549 Ex14 cells scattered and travelled significantly further from the original colonies, compared to the parental MET WT cells, indicating increased motility. Interestingly, HGF induced the same strength of scattering in each MET Ex14 cells. This scattering was abrogated by treatment with the MET inhibitors capmatinib or OMO-1 (**Figure 3A,B,C and D**).

Ligand-dependent transcriptomic program of MET exon 14 revealed regulation of genes involved notably in extracellular matrix organization

In order to further characterize responses induced by MET exon 14 in the absence of other oncogenic alterations, transcriptomic programs of 16HBE WT and 16HBE Ex14 cells stimulated or not by HGF for 24h were compared. First, in the absence of HGF stimulation, 1736 probes are significantly differentially regulated between 16HBE WT and 16HBE Ex14 at a fold change threshold fixed at 1.5 (absolute value) and adjusted p-value below 0.05 (865 up regulated and 871 downregulated) (**Figure 4A and Supplementary Figure S3A**). Thus, while 16HBE WT and 16HBE Ex14 displayed similar phenotype in the absence of HGF-stimulation, their transcriptomic programs are drastically different revealing existence of a ligand-independent influence of the METex14 alteration.

Furthermore, HGF stimulation induces significant differential expression of 497 probes in 16HBE Ex14 cells with the same threshold as above (260 up regulated and 237 down regulated), demonstrating also a strong ligand-dependant response of the Ex14 cells (**Figure 4A and Supplementary Figure S3B**). Among these 497 probes, 146 were also in the 1736 set of deregulated probes without HGF. Gene enrichment by the method of over representation analysis revealed that several differentially expressed genes are involved in extracellular matrix organization (**Figure 4B and C**). These include for instance matrix metalloproteases (MMP1, 3 and 9), integrins (ITG A2, A6, A10 and B8) or ADAM proteases (ADAMTSL4, ADAM 8 and 19) (**Supplementary Figure S4**). By contrast, HGF stimulation induced a discrete transcriptional response in 16HBE WT cells with none genes differentially regulated at fold change 1.5 threshold and adjusted p-value at 0.05 (**Figure 4A**). Nevertheless, most of the genes up or down regulated by HGF in 16HBE Ex14 cells are also regulated in 16HBE WT cells, however at a lower range which do not reach 0.05 threshold for adjusted p-value. This is exemplified by the mentioned above matrix metalloproteases, integrins or ADAM proteases (**Supplementary Figure S4A**). This observation could be generalized to all the HGF differentially regulated genes in 16HBE Ex14 cells, suggesting that HGF-dependent transcriptional program in WT and Ex14 cells are similar but involved much stronger activation in Ex14 cells (**Supplementary Figure S4B**).

Activation of exon 14 deleted MET by HGF promotes tumour growth and sensitises tumours to the novel TKI OMO-1

In order to investigate MET_{ex14}-dependent growth in vivo, tumour xenografts were performed in humanised HGF knock-in NSG mouse allowing MET activation in the human cell lines transplanted. Only 14% of 16HBE WT cells implanted in KI-huHGF mice formed tumours with a mean tumour size of 47 mm³, while hundred percent of the 16HBE Ex14 cells formed tumours with a larger mean size of 171 mm³ and with a maximum size of 350 mm³ (**Figure 5A**). To assess HGF influence on the tumorigenesis, both NSG control mice and NSG KI-huHGF mice were injected subcutaneously with 16HBE Ex14 cells. Interestingly, only 35% of the 16HBE Ex14 xenografts generated a tumour greater than 1 mm³ in control mice. Those tumours had a mean volume of 8 mm³, with the largest only reaching 13.5 mm³. Conversely, 86% of the 16HBE Ex14 xenografts in KI-huHGF mice grew tumours, with a mean of 50 mm³. (**Figure 5C**). It is worth noticing that the MET_{ex14} tumour sizes in NSG KI-huHGF mice are quite variable (with for instance a range between 33 and 350 in figure 5A), a likely consequence of the slow growth of these cells in animal model. Moreover, mice treatment when tumours reached 100mm³, with the novel, orally available, specific MET TKI, OMO-1, efficiently blocked tumour growth driven by 16HBE Ex14 cells compared to vehicle gavage (**Figure 5D**).

A549 WT and Ex14 cells were also injected subcutaneously in KI-huHGF mice. Both cell lines formed tumours, which did not significantly differ in size most of the time (**Figure 5E**). This is consistent with previous reports of A549 xenografts growing in NSG mice (38). However, A549 Ex14 tumours were sensitive to treatment with the MET inhibitor OMO-1, with tumour sizes significantly smaller compared to those in mice treated with vehicle (**Figure 5G**). Growth of A549 WT tumours were not altered by the MET inhibitor. Thus in both 16HBE and A549 xenografts, exon 14 deletion in the presence of HGF can lead to MET addiction, sensitising tumours to MET inhibitors, even in cells with a co-occurring oncogenic mutation.

HGF expression is detected in the cancer cells of NSCLC harbouring MET_{ex14} mutations

From the cohort of 65 NSCLC patients harboring *MET* exon 14 mutations³³, we did further molecular analysis of available residual FFPE tumor samples from 18 patients. Anatomopathological and molecular characteristics of the patients, including MET_{ex14} mutations, MET expression, *MET* gene amplification and other genomic alterations were reported in **Table 1**. MET amplification was detected in only one patient. Alteration of other genes were detected in 8 patients: TP53 mutation (2), PI3Ka mutation (1), PTEN loss (2), GNAS (1) and KRAS (1).

Since HGF appears required to trigger the majority of the observed biological responses in METex14-expressing normal and cancer epithelial pulmonary cell lines, expression of HGF was determined in patient METex14 tumours. IHC with HGF antibody was performed in 18 FFPE slides of lung adenocarcinomas harbouring MET exon 14 skipping and for which tumour slides were still available after the diagnosis process. Anatomopathological and molecular characteristics of the patients, including METex14 mutations, MET expression, *MET* gene amplification and other genomic alterations were reported in **Table 1**. HGF immunostaining was detected in stromal cells in all samples but at variable intensities. Interestingly, cancer cells were also HGF positive in some samples. The tumours of 6 patients were non-interpretable mainly due to weak proportion of tumour cells in the residual slides. Among the 12 remaining tumours, 6 did not display HGF expression in tumour cells, while staining was positive in the immune cells (**Figure 6A**). In contrast, 6 other tumours displayed HGF expression at the plasma membrane and / or in the cytoplasm of the tumour cells and in the immune cells (**Figure 6B**). These results indicate that HGF localised in the cancer cells, and thus likely activates MET in at least a third of the METex14 tumours.

Discussion

MET exon 14 skipping alterations occur in approximately 3-4% of patients with NSCLC and the use of MET inhibitors in these patients is being increasingly authorized, though response so far has been mixed. METex14 has also been found to co-occur with a range of other oncogenic alterations, and the role of these alterations in tumorigenesis and response to MET-targeted therapies remains unclear (24,30,33,39). In order to better predict response to MET-targeted therapies in patients, it is important to understand whether exon 14 skipping alone can lead to MET addiction, driving tumorigenesis and sensitising patients to MET TKIs, and what roles co-occurring oncogenic mutations might play. We have previously reported that alterations in the PI3K pathway can decrease MET TKI efficiency (33). Thus, an in-depth characterisation of all oncogenic alterations that can affect this efficiency is required to improve patient treatments and outcomes.

Here we show that METex14, in the absence of other oncogenic alterations including *MET* amplification or overexpression, is a ligand-dependent driver mutation which can transform human lung cells and leads to tumorigenesis in vivo. This is consistent with some previous reports of exon 14-driven tumorigenesis in vitro, but represents the first time human lung cells were shown to grow in an HGF-dependent manner in vivo, a valuable pre-clinical model that

more closely approximates the physiological condition, and which may be used to further characterise the mechanism of METex14 oncogenicity (19,21,22).

In our two isogenic lung cell models, the non-transformed 16HBE cells and the lung adenocarcinoma A549 cells with co-occurring activating *KRAS* mutation, we demonstrate some similar responses of METex14 to HGF activation. In both cell lines, METex14 activation and downstream signalling is more robust and sustained and leads to increased cell scattering. Cell scattering is a key function ascribed to HGF, also called Scatter Factor, and believed to contribute to HGF and MET-dependent metastatic spread (40). Interestingly, our transcriptomic results in 16HBE cells have pointed to an increase in expression of a range of genes involved in taxis, chemotaxis and extracellular matrix and structure regulation. All together, these results strongly suggest that, regardless of co-occurring oncogenic alterations, METex14 may trigger important changes that can contribute to its oncogenicity during cancer progression.

There were also some key differences between the two cell models. In A549 cells, METex14 did not appear to confer any growth advantage over the wild type in the presence of HGF in anchorage-independent conditions in vitro, or the tumour xenograft model in vivo. This could likely be attributed to the co-occurring oncogenic *KRAS* mutation in these cells. However, both 16HBE and A549 METex14 xenografts were sensitive to the novel MET TKI, OMO-1. This suggests that, although the volume of the tumours did not increase, METex14 in the presence of HGF could have triggered an oncogenic switch. Thus, we propose that these tumours can acquire either full or partial addiction to METex14 over the activating *KRAS* mutation. Our results may have important clinical implications, as recent studies have shown that *KRAS* alterations could occur in as many as 7% of METex14 patients (24,30). Consistent with our results, there is emerging evidence that co-occurring *KRAS* mutations in METex14 patients were not indicators of response to MET-targeted therapies (39). While A549 METex14 tumour xenografts were sensitive to MET inhibition, leading to stable disease, there were signs of resistance after prolonged treatment. Co-targeting MET and *KRAS* could increase this response time (24).

Importantly, our study demonstrates that METex14, in the absence of *MET* amplification or receptor overexpression, requires HGF to drive tumorigenesis. While there may be some phenotypic differences in the absence of HGF, cell survival and in vivo growth were both HGF-dependent. This result is in line with the predicted function of juxtamembrane loss, which does not impact the kinase domain or dimerisation of MET. While some studies have reported conflicting results, their cell models relied on overexpression of METex14 (10,19,21). Thus

our human cell lines, obtained by CRISPR editing of endogenous MET, have allowed us to clarify the crucial need of HGF cooperation to trigger METex14 oncogenicity.

We have also established the relevance of these experimental results using lung tumour tissues from NSCLC patients with MET exon 14 skipping. In half of the patients samples screened, HGF immunostaining was detected at the surface and/or the cytoplasm of cancer cells in addition to the classical stromal localisation. Although epithelial cells do not typically express HGF, one explanation for this finding could be that HGF transcription is switched on in cancer cells, triggering an autocrine MET stimulation. It is also possible that HGF detected in the cancer cells corresponds to HGF produced in the stroma but bound on MET at the plasma membrane or after internalisation. We have previously shown that HGF-bound MET internalises and transmits signals from endosomes (41). Moreover, signalling from endosomes by other MET mutants was shown to contribute to oncogenicity in vitro and in vivo (5). Importantly, the presence of HGF in NSCLC tumours harbouring MET exon 14 strongly indicates the presence of an HGF-METex14 signalling axis in these patients. Taken together with our experimental results, this suggest that assessing HGF immunostaining may represent a valuable biomarker in conjunction to METex14 detection, and could be used to select patients predicted respond to MET inhibition in the clinic.

This study has revealed that METex14 mutation, present in 3-4% of NSCLC cases, is a driving mutation which requires HGF for tumorigenesis. We propose that tumours bearing METex14 mutation, either alone or in conjunction with genetic alterations such as KRAS, and which are positive for HGF immunostaining, will likely display some response to MET TKI.

References

1. 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* 2016;**34**(8):794-802 doi 10.1200/jco.2015.62.0674.
2. Kawakami H, Okamoto I, Okamoto W, Tanizaki J, Nakagawa K, Nishio K. Targeting MET Amplification as a New Oncogenic Driver. *Cancers (Basel)*. Volume 62014. p. 1540-52.
3. 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**(1):68-73 doi 10.1038/ng0597-68.
4. Tovar EA, Graveel CR. MET in human cancer: germline and somatic mutations. *Ann Transl Med* 2017;**5**(10) doi 10.21037/atm.2017.03.64.
5. Joffre C, Barrow R, Ménard L, Calleja V, Hart IR, Kermorgant S. A direct role for met endocytosis in tumorigenesis. *Nature Cell Biology* 2011;**13**(7):827-37.
6. Comoglio PM, Trusolino L, Boccaccio C. Known and novel roles of the MET oncogene in cancer: a coherent approach to targeted therapy. *Nat Rev Cancer* 2018;**18**(6):341-58 doi 10.1038/s41568-018-0002-y.
7. McDermott U, Sharma SV, Dowell L, Greninger P, Montagut C, Lamb J, *et al.* Identification of genotype-correlated sensitivity to selective kinase inhibitors by using high-throughput tumor cell line profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**(50):19936-41 doi 10.1073/pnas.0707498104.
8. Tanizaki J, Okamoto I, Okamoto K, Takezawa K, Kuwata K, Yamaguchi H, *et al.* MET tyrosine kinase inhibitor crizotinib (PF-02341066) shows differential antitumor effects in non-small cell lung cancer according to MET alterations. *J Thorac Oncol* 2011;**6**(10):1624-31 doi 10.1097/JTO.0b013e31822591e9.
9. 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* 2016;**34**(7):721-30 doi 10.1200/jco.2015.63.4600.
10. Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, Chmielecki J, Lu X, Bauer TM, *et al.* Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov* 2015;**5**(8):850-9 doi 10.1158/2159-8290.cd-15-0285.
11. 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;**22**(12):3048-56 doi 10.1158/1078-0432.ccr-15-2061.
12. 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**(2):276-81 doi 10.1016/j.lungcan.2014.06.004.
13. 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**(29):28211-22 doi 10.18632/oncotarget.4721.
14. 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**(5):995-1004.
15. 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**(3):1815-20.

16. 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. *J Biol Chem* 2004;**279**(25):26445-52 doi 10.1074/jbc.M314254200.
17. Tulasne D, Deheuninck J, Lourenco FC, Lamballe F, Ji Z, Leroy C, *et al.* Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage. *Mol Cell Biol* 2004;**24**(23):10328-39 doi 10.1128/mcb.24.23.10328-10339.2004.
18. 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**(29):4275-81 doi 10.1038/sj.onc.1202791.
19. 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**(1):283-9 doi 10.1158/0008-5472.can-05-2749.
20. Rosell R, Karachaliou N. Large-scale screening for somatic mutations in lung cancer. *Lancet* 2016;**387**(10026):1354-6 doi 10.1016/s0140-6736(15)01125-3.
21. Lu X, Peled N, Greer J, Wu W, Choi P, Berger AH, *et al.* MET Exon 14 Mutation Encodes an Actionable Therapeutic Target in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Res* 2017;**77**(16):4498-505 doi 10.1158/0008-5472.can-16-1944.
22. Engstrom LD, Aranda R, Lee M, Tovar EA, Essenburg CJ, Madaj Z, *et al.* Glesatinib Exhibits Antitumor Activity in Lung Cancer Models and Patients Harboring MET Exon 14 Mutations and Overcomes Mutation-mediated Resistance to Type I MET Inhibitors in Nonclinical Models. *Clin Cancer Res* 2017;**23**(21):6661-72 doi 10.1158/1078-0432.ccr-17-1192.
23. Schrock AB, Frampton GM, Suh J, Chalmers ZR, Rosenzweig M, Erlich RL, *et al.* Characterization of 298 Patients with Lung Cancer Harboring MET Exon 14 Skipping Alterations. *J Thorac Oncol* 2016;**11**(9):1493-502 doi 10.1016/j.jtho.2016.06.004.
24. Suzawa K, Offin M, Lu D, Kurzatkowski C, Vojnic M, Smith RS, *et al.* Activation of KRAS Mediates Resistance to Targeted Therapy in MET Exon 14-mutant Non-small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2019;**25**(4):1248-60 doi 10.1158/1078-0432.ccr-18-1640.
25. 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 Discov* 2015;**5**(8):842-9 doi 10.1158/2159-8290.cd-14-1467.
26. Paik PK, Felip E, Veillon R, Sakai H, Cortot AB, Garassino MC, *et al.* Tepotinib in Non-Small-Cell Lung Cancer with MET Exon 14 Skipping Mutations. *N Engl J Med* 2020;**383**(10):931-43 doi 10.1056/NEJMoa2004407.
27. Felip E, Veillon R, Viteri S, Scheele J, Bruns R, Paik PK. Abstract A097: Phase II trial of the c-Met inhibitor tepotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer harboring MET exon 14-skipping mutations. 2018 doi 10.1158/1535-7163.TARG-17-A097.
28. Wolf J, Seto T, Han J-Y, Reguart N, Garon EB, Groen HJM, *et al.* Capmatinib (INC280) in MET Δ ex14-mutated advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): Efficacy data from the phase II GEOMETRY mono-1 study. 2019 doi 9004.
29. Landi L, Chiari R, Tiseo M, D'Inca F, Dazzi C, Chella A, *et al.* Crizotinib in MET deregulated or ROS1 rearranged pretreated non-small-cell lung cancer (METROS): a phase II, prospective, multicentre, two-arms trial. *Clin Cancer Res* 2019 doi 10.1158/1078-0432.ccr-19-0994.
30. Rotow JK, Gui P, Wu W, Raymond VM, Lanman RB, Kaye FJ, *et al.* Co-occurring alterations in the RAS-MAPK pathway limit response to MET inhibitor treatment in MET exon 14 skipping mutation-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2019 doi 10.1158/1078-0432.ccr-19-1667.

31. 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**(36):4803-10 doi 10.1200/jco.2011.35.4928.
32. Mai A, Muharram G, Barrow-McGee R, Baghirov H, Rantala J, Kermorgant S, *et al.* Distinct c-Met activation mechanisms induce cell rounding or invasion through pathways involving integrins, RhoA and HIP1. *J Cell Sci* 2014;**127**(Pt 9):1938-52 doi 10.1242/jcs.140657.
33. Jamme P, Fernandes M, Copin MC, Descarpentries C, Escande F, Morabito A, *et al.* Alterations in the PI3K Pathway Drive Resistance to MET Inhibitors in NSCLC Harboring MET Exon 14 Skipping Mutations. *J Thorac Oncol* 2020;**15**(5):741-51 doi 10.1016/j.jtho.2020.01.027.
34. Diagnosis DoCTa. A Catalog of in vitro cell lines, transplantable animal and human tumors and yeast. In: Institute NC, editor 2017.
35. 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**(24):6771-83 doi 10.1158/1078-0432.ccr-12-2347.
36. Jeffers M, Taylor GA, Weidner KM, Omura S, Vande Woude GF. Degradation of the Met tyrosine kinase receptor by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol* 1997;**17**(2):799-808 doi 10.1128/mcb.17.2.799.
37. Kermorgant S, Zicha D, Parker PJ. Protein Kinase C controls Microtubule-based traffic but not Proteasomal degradation of c-met. *Journal of Biological Chemistry* 2003;**278**(31):28921-9.
38. Kanaji N, Tadokoro A, Susaki K, Yokokura S, Ohmichi K, Haba R, *et al.* Higher susceptibility of NOD/LtSz-scid Il2rg (-/-) NSG mice to xenotransplanted lung cancer cell lines. *Cancer Manag Res* 2014;**6**:431-6 doi 10.2147/cmar.s71185.
39. Guo R, Offin M, Brannon AR, Chang J, Chow A, Delasos L, *et al.* MET Exon 14–altered Lung Cancers and MET Inhibitor Resistance. *Clinical Cancer Research* 2021;**27**(3):799-806 doi 10.1158/1078-0432.ccr-20-2861.
40. Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 1987;**327**(6119):239-42 doi 10.1038/327239a0.
41. Barrow-McGee R, Kishi N, Joffre C, Menard L, Hervieu A, Bakhouché BA, *et al.* Beta 1-integrin-c-Met cooperation reveals an inside-in survival signalling on autophagy-related endomembranes. *Nat Commun* 2016;**7**:11942 doi 10.1038/ncomms11942.

Figure comments:

Figure 1: Activation of exon 14 deleted MET is dependent on HGF, and results in sustained downstream signalling. 16HBE (A,C,D) and A549 (B,E,F) cells expressing either MET WT or METex14 were treated with a range of HGF concentration (A,B) or for the indicated time (C,D,E,F). For each condition, the same amount of whole cell lysate was resolved by SDS-PAGE and analyzed by western blotting with antibodies against MET, ERK, AKT, HSC70 and their phosphorylated forms. (D,F) Quantification by densitometry is shown, normalised to a loading control, comparing unstimulated A fold change of expression levels upon HGF stimulation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS = not significant.

Supplemental Figure S1: CRISPR/Cas9 gene editing in 16HBE and A549 cells

(A) In 16HBE cells, one crRNA, underlined in the sequence, was used to target the 3' end of the exon 14 shown in red and the flanking extremity of the intron corresponding to the donor splice site. The PAM sequences (in bold) and the predicted cut site (red arrow) are shown. (B) Melting curve analysis of amplicons of exon 14 region generated by fluorescence reverse-transcription PCR from mRNA of 16HBE WT and 16HBE Ex14 cell lines. (C) In A549 cells, two crRNAs were used, targeting introns flanking exon 14. One was designed upstream of exon 14, and two downstream. Exon 14 is shown in red, with complementary genomic sequences of crRNAs shown in green. PAM sequences are in dark green, with red arrows showing predicted cut sites. (D) cDNA products from reverse transcription PCR were sequenced for A549 WT and A549 Ex14 cell lines. Sequence chromatograms are shown. Genomic DNA was extracted from A549 WT and Ex14, and the region including exon 14 and the crRNA targets was amplified and sequenced. Consensus sequence with exon 14 deletion from the genomic DNA is shown.

Supplemental Figure S2: Sustained downstream signalling in H596 cells H596 is an established lung adenocarcinoma cell line with a homozygous point mutation in the downstream splice donor site, which causes alternate splicing of exon 14, and a concurrent activating *PIK3CA* mutation (19). For these studies, H596 cells (METex14) were compared to the NSCLC cell line H226, which expresses wild type MET. Because the cell lines are not isogenic, we assessed MET protein levels, which were not significantly different.

Figure 2: Anchorage-dependent and independent growth of 16HBE and A549 cells expressing METex14. Proliferation of 16HBE (A) and A549 (B) cell lines, stimulated or not by HGF at 30 ng/ml and 15 ng/ml respectively, was performed by measure of confluency in IncuCyte ZOOM. Presented data are the mean \pm S.D of 3 independent experiments with 4

wells per condition. For evaluation of spheroids' viability, 16HBE (C) and A549 (D) isolated cells were seeded in ultra-low attachment plate with media containing HGF (20 ng/ml or 15 ng/ml), crizotinib (1 μ M), OMO-1 (1 μ M) or capmatinib (1 μ M). Spheroid cell viability was evaluated by reduction of resazurin (Alamar Blue reagent). Presented data are the mean \pm S.D of 3 independent experiments with 4 wells per condition.. ns, nonsignificant; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ as determined by ANOVA test.

Figure 3: Scattering of 16HBE and A549 cells expressing METex14 in response to HGF.

(A) For immunofluorescence scattering assay, 16HBE (A,B) and A549 (C,D) cells were seeded at a low density on coverslips with or without HGF (15 ng/ml), capmatinib and/or OMO-1 (1 μ M). (A,C) Representative confocal sections are shown (Scale bar: 50 μ m), as well as (B,D) the distances to nearest nuclei.

Figure 4: Heat map and gene ontology (GO) enrichment of genes differentially expressed in 16HBE MET WT or 16HBE METex14 in response to HGF.

16HBE cells expressing either MET WT or METex14 were stimulated or not 24h with 10ng/ml of HGF. mRNA were extracted and gene expressions were determined by DNA microarray. (A) Heatmap of the genes significantly differentially expressed (threshold p -value-adj < 0.05 and absolute Fold Change > 1.5) between the experimental conditions ($n=4$ for each condition). The colored scale bar represents relative gene expression changes scaling. (B) Dotplot of GO enrichment of genes significantly differentially expressed in 16HBE Ex14 cells stimulated or not by HGF according to the « biological process » annotations of Gene Ontology. Colour of dot represents the adjusted p -value and their size the ratio of significantly deregulated genes in the ontology. Displayed biological process are the top 5 of significantly deregulated process in response to HGF. (C) Heatmap-like functional classification of gene list for each subgroup of GO enrichment (biological process annotation) with the colour indicating the fold change of each gene concerning the comparison 16HBE METex14 with HGF versus METex14 without HGF.

Supplementary Figure S3: Heatmap of genes differentially expressed in 16HBE MET WT and 16HBE METex14 and in 16HBE METex14 stimulated or not by HGF.

16HBE cells expressing either MET WT or METex14 were stimulated or not 24h with 10ng/ml of HGF. mRNA were extracted and gene expressions were determined by DNA microarray. (A) Heat map of the gene significantly deregulated between 16HBE MET WT and 16HBE METex14 ($n=4$ for each condition, adjusted p -value < 0.05 and FC > 1.5). (B) Heatmap of the gene significantly deregulated in 16HBE METex14 stimulated or not by HGF ($n=4$ for each

condition, adjusted p-value < 0.05 and FC > 1.5). Color of each cell represents relative gene expression.

Supplementary Figure S4: Selected examples and global view of genes differentially regulated in 16HBE MET WT and 16HBE METex14 in response to HGF. (A) Selection from the significantly deregulated GO “Extracellular matrix organization” of genes expression (intensity in log2) of MMP, ADAM and integrin families. All genes were significantly deregulated in the transcriptomic analysis of 16HBE cells expressing MET WT and METex14 stimulated or not by HGF. (B) Relative expression of all the genes up-regulated (in red) or down-regulated (in green) in the four experimental conditions.

Figure 5: MET exon 14 loss sensitises tumours to tyrosine kinase inhibitors in the presence of HGF. To assess tumour growth *in vivo*, xenograft experiments were performed with humanised HGF knock-in NSG mice. (A) Number, percentage and mean volume of tumours developed from the xenografted 16HBE WT and 16 HBE Ex14 cells in NSG KI-huHGF mice. (B) Determination of HGF concentration in blood serum of NSG and NSG KI-huHGF by ELISA assay measuring specifically human HGF. (C) 16HBE Ex14 tumours development in NSG control and NSG KI-huHGF mice. (D) Tumour growth of 16HBE Ex14 in NSG KI-huHGF mice treated with OMO-1 or vehicle control (n=8). (E) A549 tumour growth in vehicle-treated NSG KI-huHGF mice comparing METex14 to WT (n=28). (F,G) Tumour growth of A549 WT (n=30) and Ex14 (n=30) xenografts in NSG KI-huHGF treated with OMO-1 or vehicle control. Data are shown in means of indicated number of tumours. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. All other time points not significant.

Figure 6: HGF expression in METex14 tumours. HGF expression was detected by IHC on FFPE tumour samples from patient harbouring METex14 mutations. Stars indicate example of immune cells known to express HGF and arrows indicate example of tumour cells stained or not for HGF.

Table 1: Clinical and molecular characteristics of 18 NSCLC patients harboring METex14 mutations. The histological type was determined after hematein/eosin/safran staining. *METex14* mutation and other molecular alterations were diagnosed on FFPE tumor samples with the targeted CLAPv1 NGS Panel. *MET* gene copy numbers were determined by FISH. MET, HGF and PDL1 expressions were determined by IHC. Treatment by targeted therapies against MET and the observed best responses were indicated (Adenocarcinoma=ADC; negative=neg; Non-reported= NR; Non-interpretable=NI).

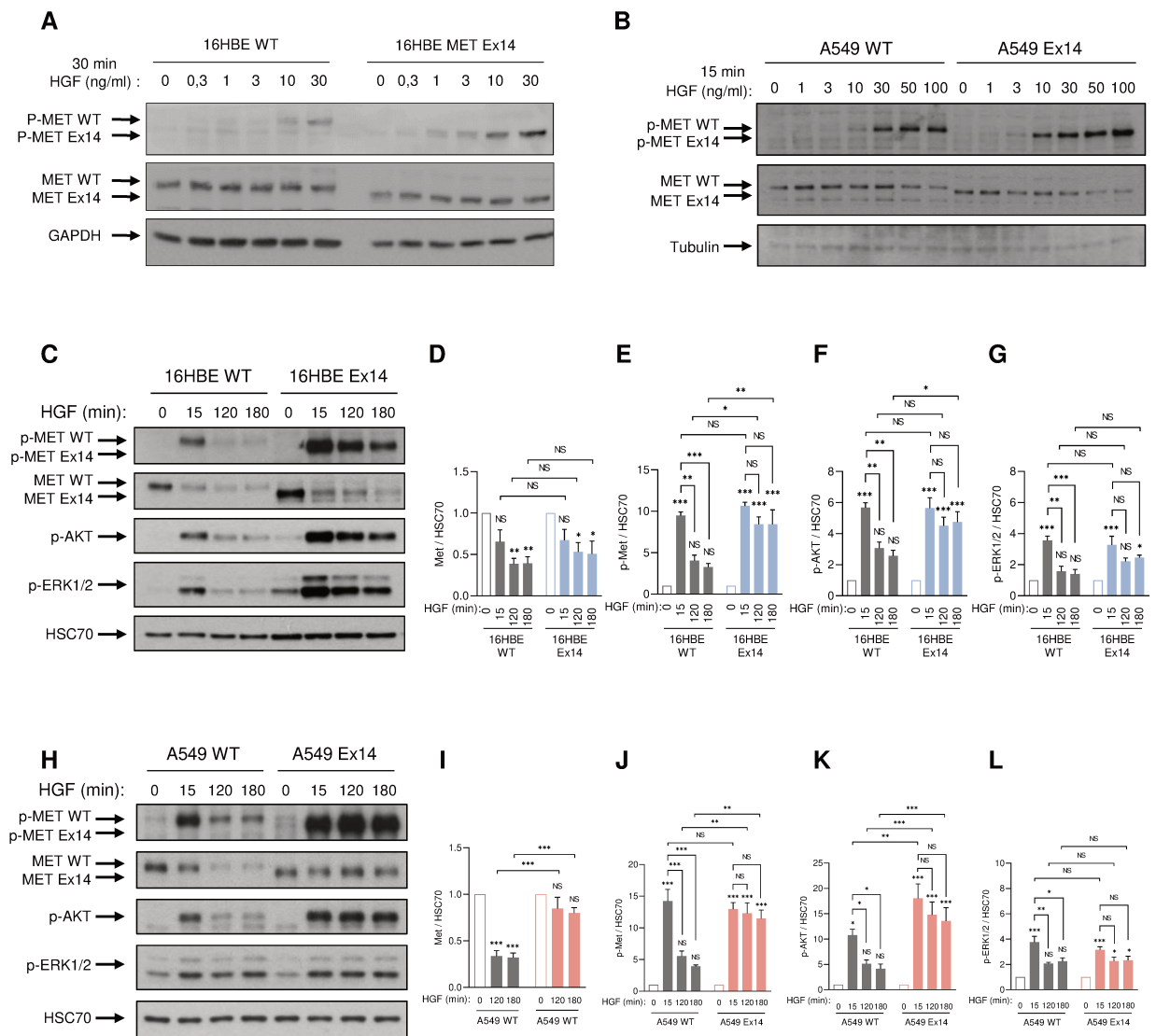
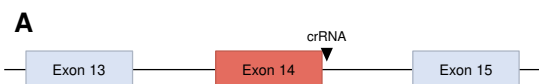
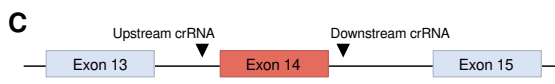


Figure 1

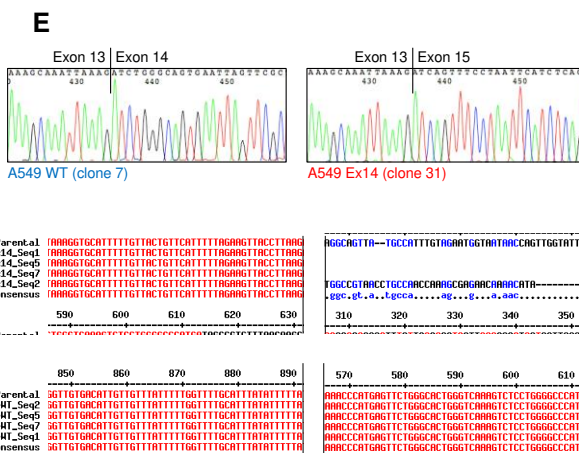
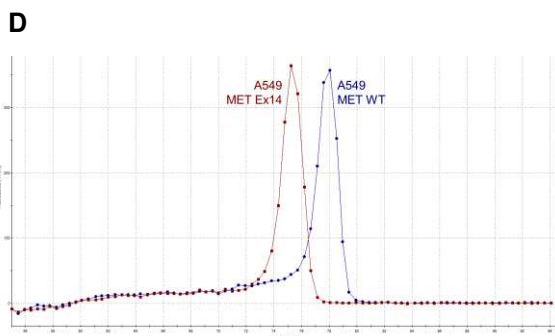
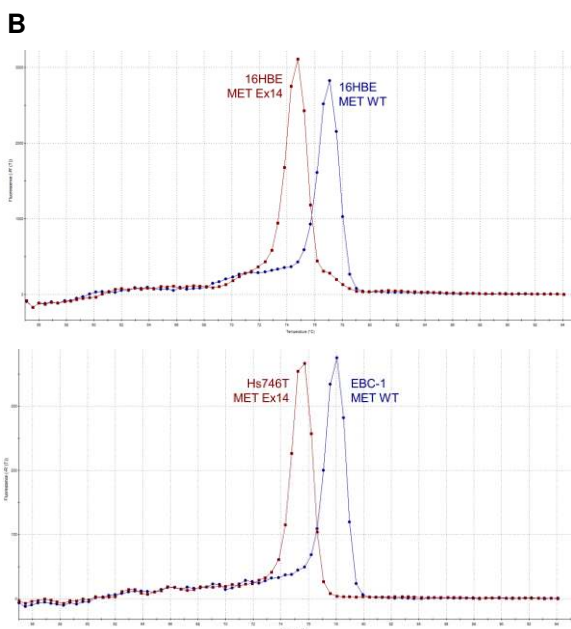


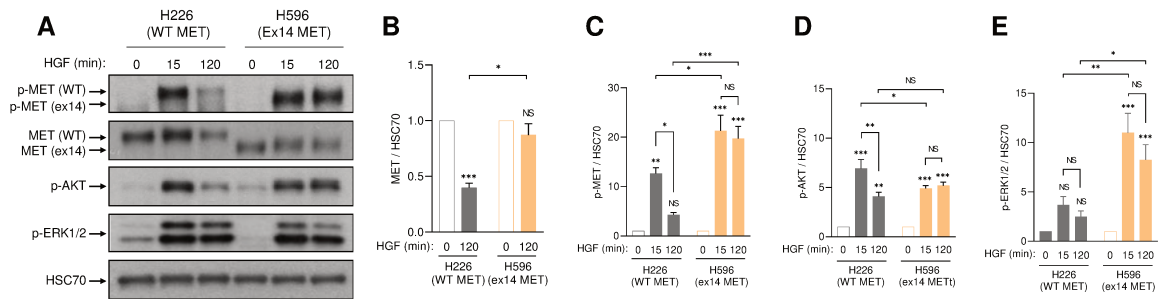
Exon 14
ATCTGGGCAGTGAATTAGTTCGCTACGATGCAAGAGTACA
CACTCCTCATTGGATAGGCTTGTAAAGTCCCGAAGTGTA
AGCCCAACTACAGAAATGGTTTCAAATGAATCTGTAGACT
 Intron
ACCGAGCTACTTTTCCAGAGAGGTATATTTTCAGTTTATTGT
 crRNA PAM
 TCTGAGAAATACCTATACATATACCTCAGTGGGTTGTGAC
 ATTGTTGTTTATTTTGGTTTT



Intron
 GTCTTATATGTAGTCCATAAAACCCATGAGTTCTGGGCACCTGGTCAAAGT
 CAGAATATACATCAGGATATTTGGGTACTCAAGACCCGTGACCCAGTTTCA
 CTCTGGGGCCCATGATAGCCGCTTTTAACAAGCTCTTTCTTCTCTGT
 GAGGACCCG**TACTATCGGCAGAAATGTT**CGAGAAAGAAAGAGAGACA
 PAM Upstream crRNA
 TTTAAG**ATCTGGGCAGTGAATTAGTTCGCTACGATGCAAGAGTACACACTC**
 AAATTC**TAGACCCGTCAC**TATCAAGCGATGCTACGTTCTCATGTGTGAG
 Exon 14
CTCATTGGATAGGCTTGTAAAGTGCCCGAAGTGTAAAGCCCACTACAGAAA
GAGTAAACCTATCCGAACATTCACGGGCTTCACATTCGGGTTGATGCTTT
TGGTTTCAAATGAATCTGTAGACTACCGAGCTACTTTCCAGAAGGTATAT
 ACCAAAGTTTACTTAGACATCTGATGGCTCGATGAAAAGTCTTC CATATA

Downstream crRNA 1 PAM
 TTCAGTTTATTGTTCTGAGAAAT**ACCTATACATATACCTCAGT**CGCTTGTG
 AAGTCAAATAACAAGACTCTTTAT**AGTATATATGGAGTCA**CCCAACAC
 PAM Downstream crRNA 2
 ACATTGTGTTTATTTTGGTTTTGCATTTATATTTTATAAAAACCTAAA
 TGTAACAACAATAAAAACCAAAACGTAATAATAAAAATATTTTGGATTT
 Intron





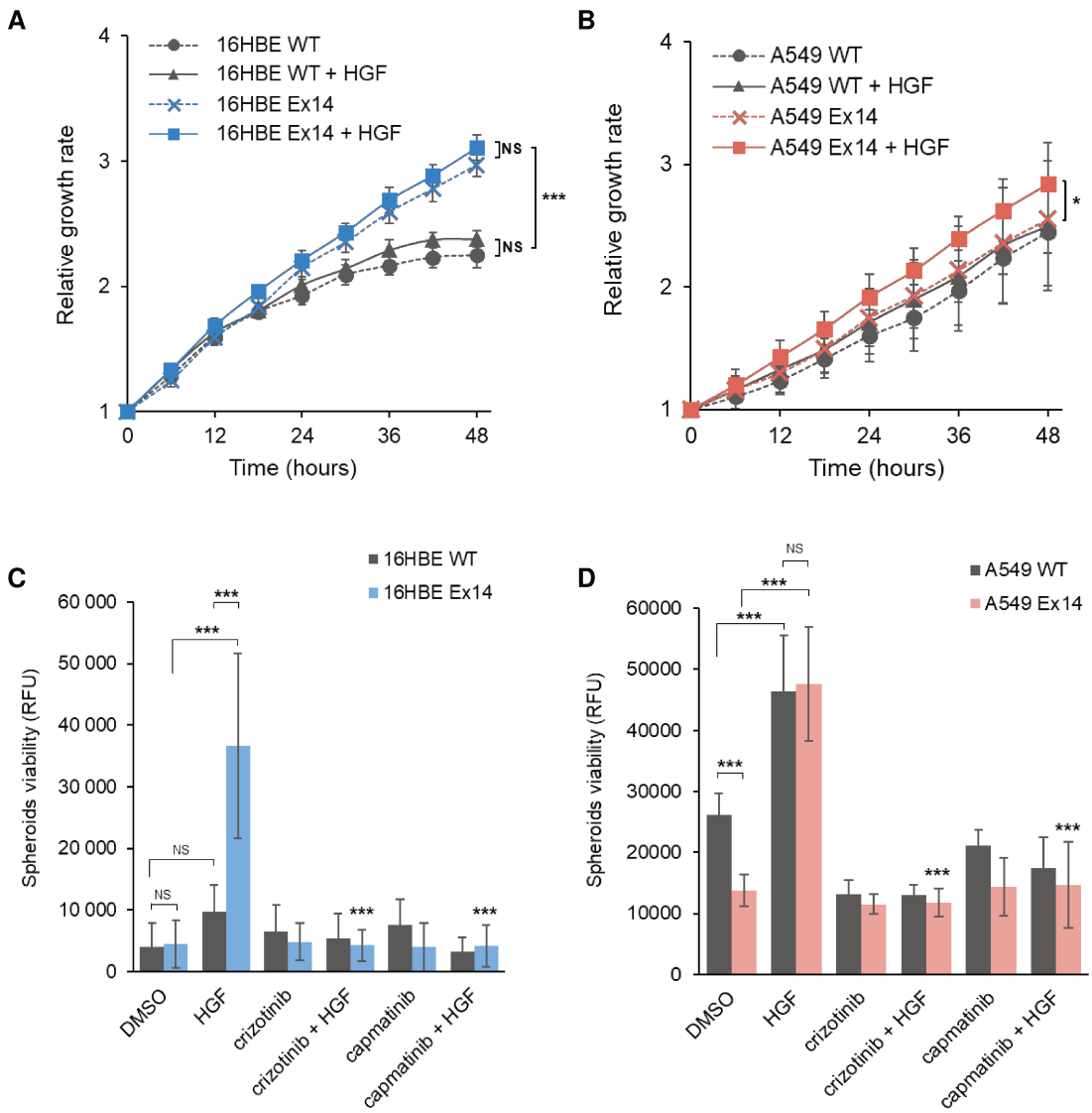


Figure 2

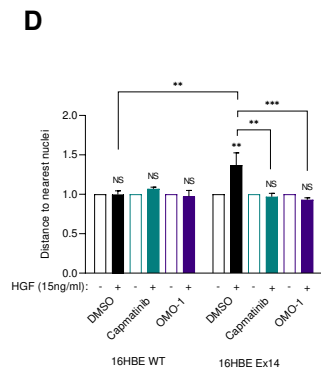
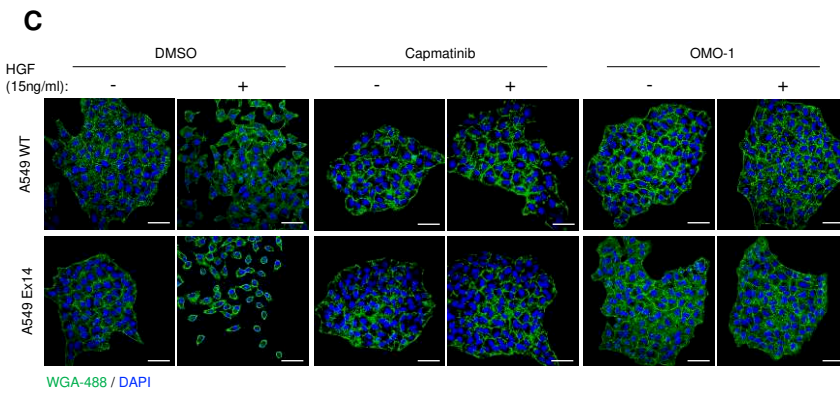
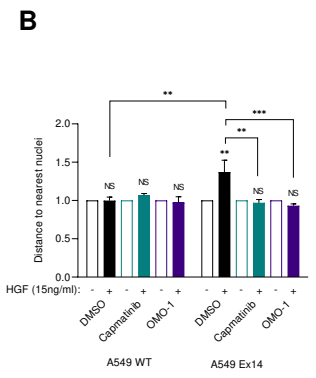
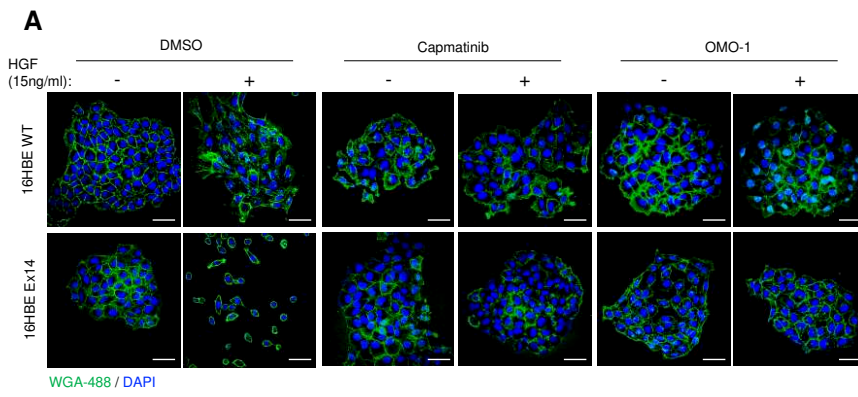


Figure 3

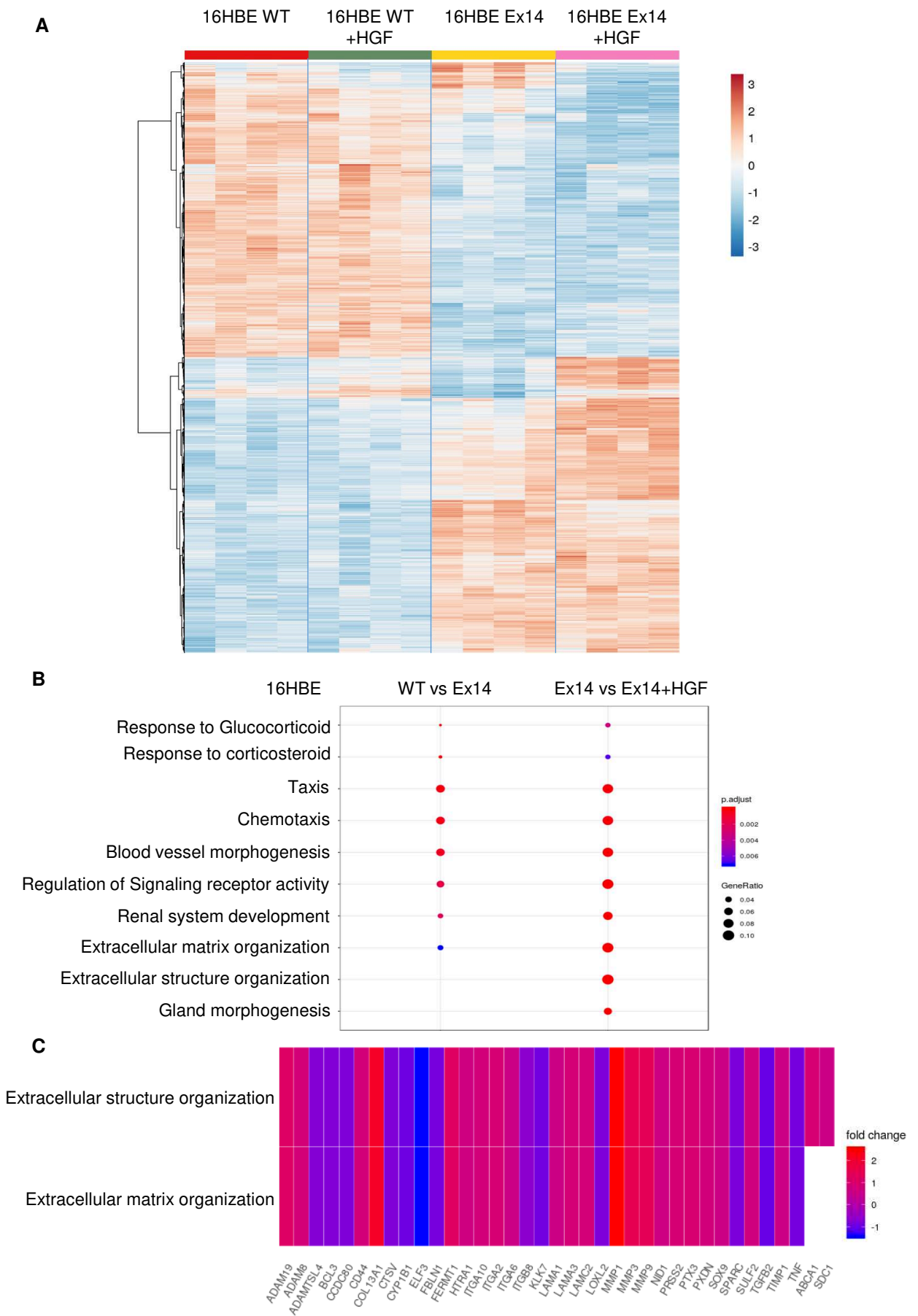
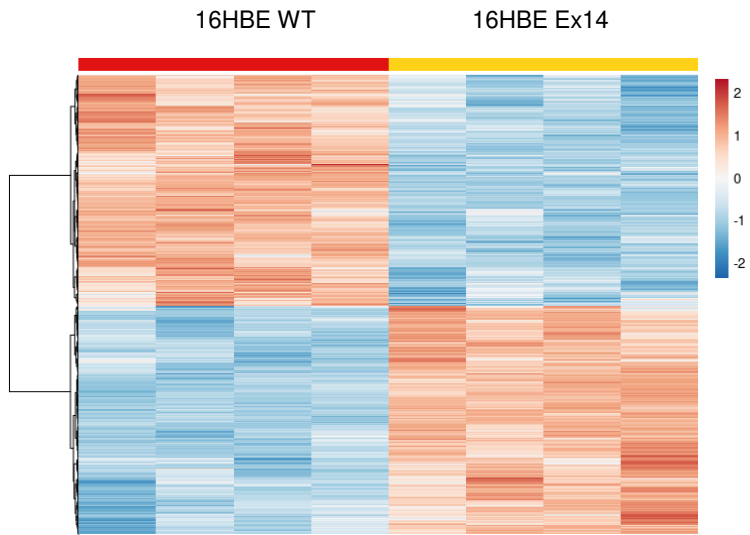
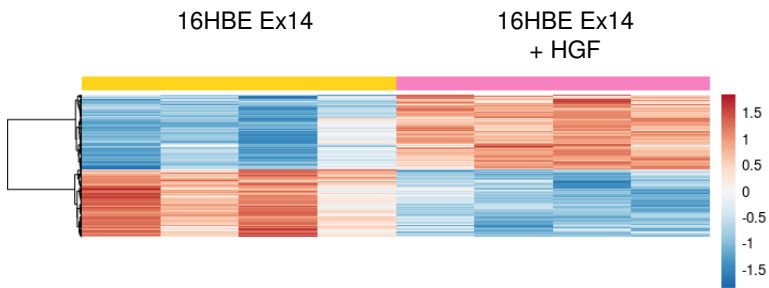


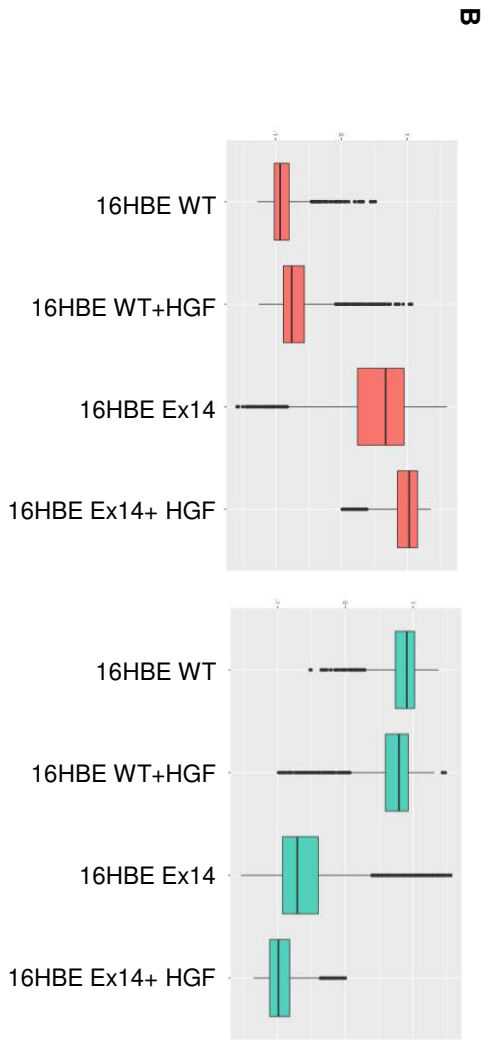
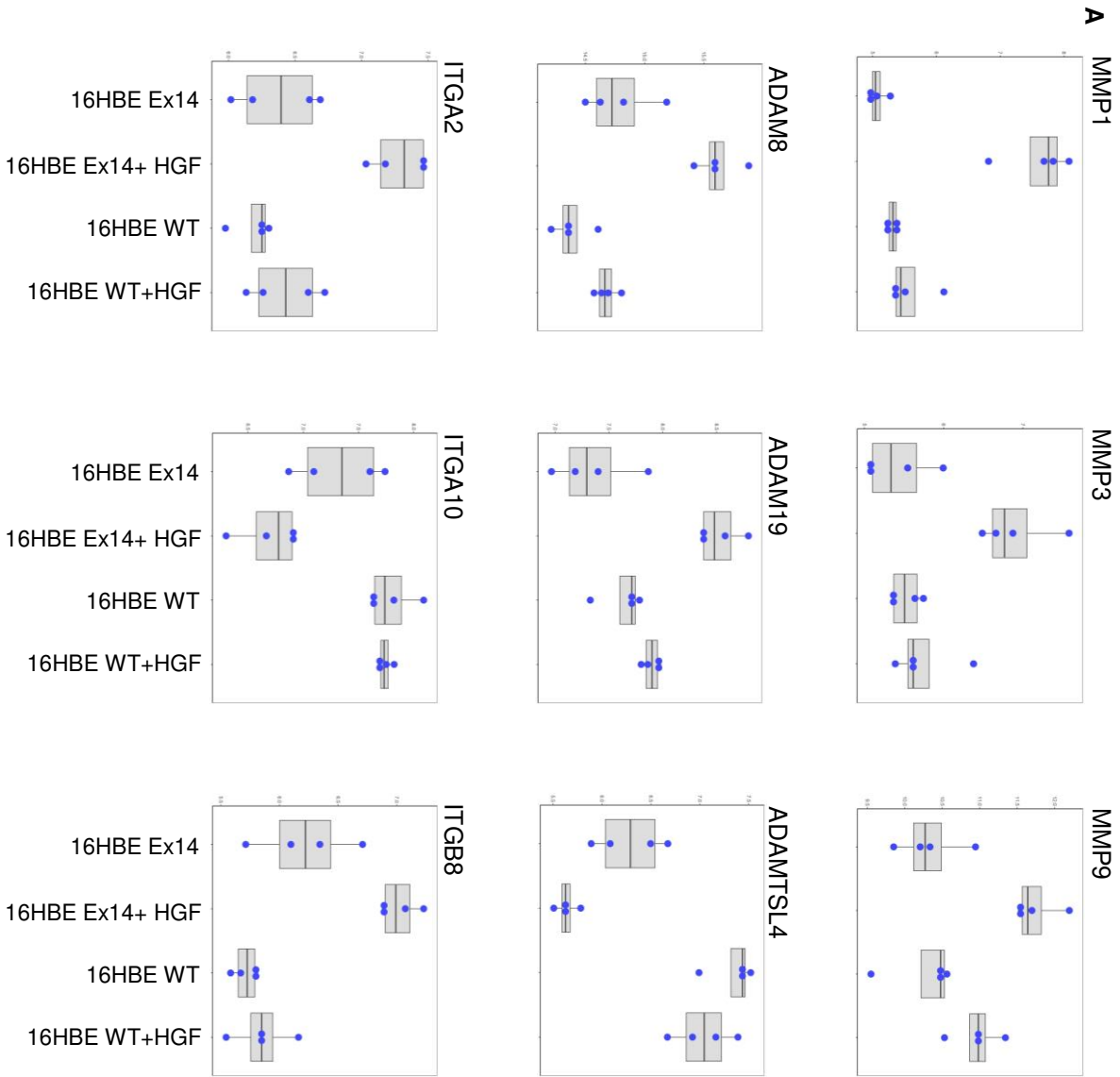
Figure 4

A



B

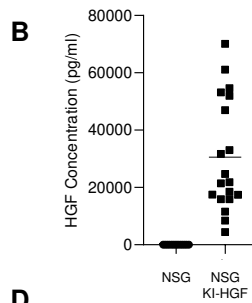




Supplementary Figure S4

A

	% of positive xenograft in KI-huHGF mice	Mean volume (mm ³)
16HBE WT	14 % (1/7)	47 +/- 0
16HBE Ex14	100 % (7/7)	171 +/- 112



C

	% of positive 16HBE-Ex14 xenograft	Mean volume (mm ³)
Control NSG mice	35 % (9/26)	8 +/- 4
KI-huHGF mice	86 % (38/44)	50 +/- 71

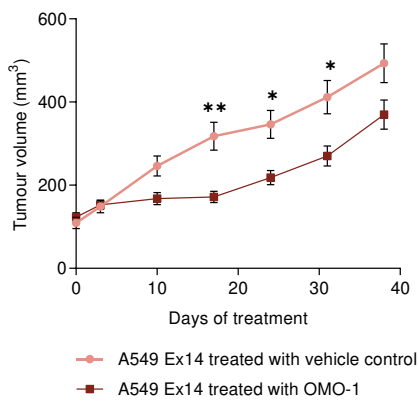
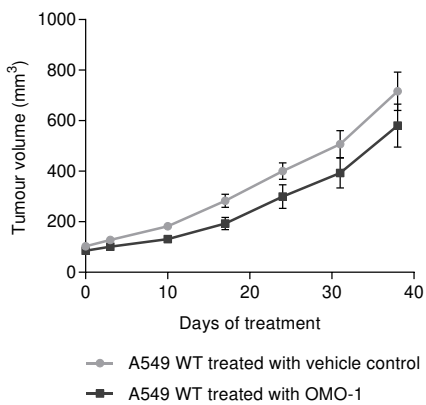
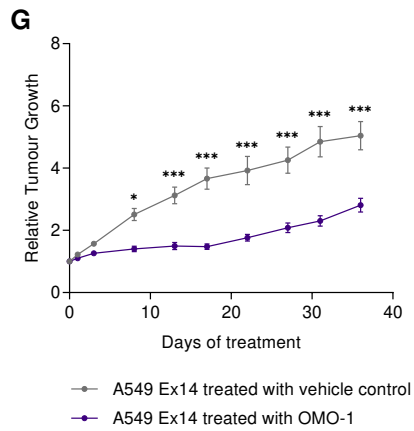
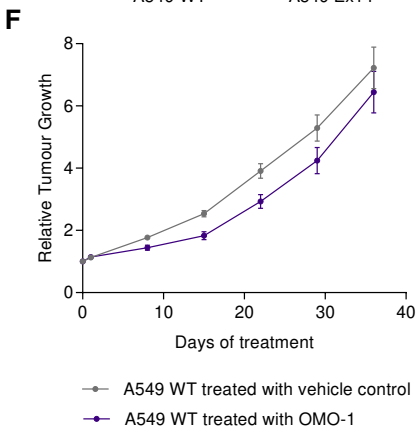
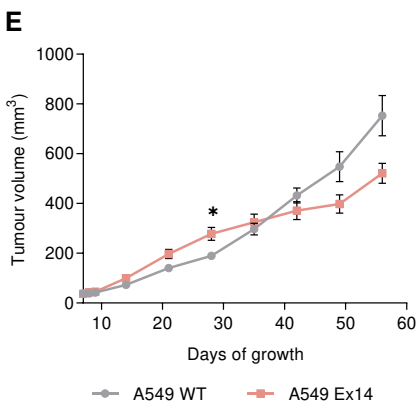
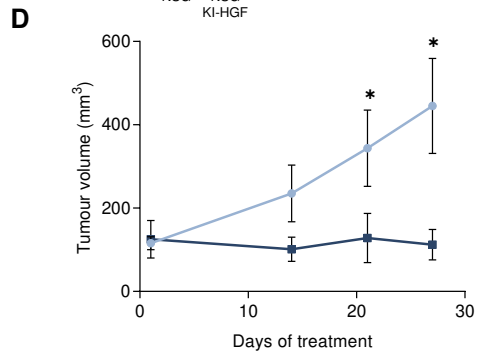


Figure 5

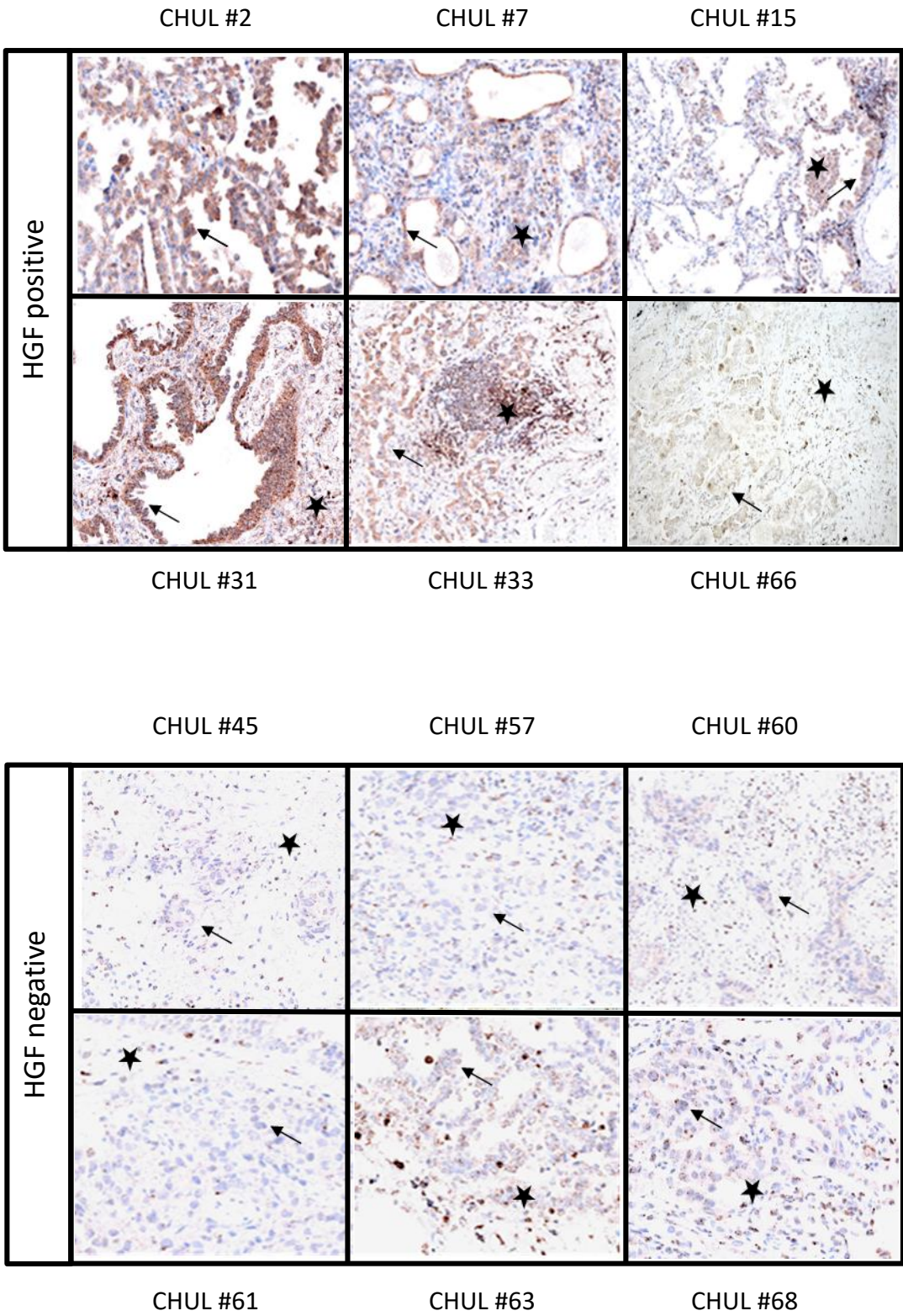


Figure 6

Patient number	MET Exon 14 mutation	Histologic subtype	IHC MET	MET amplification	Ratio/ mean of copy number	Other molecular alterations	IHC HGF
CHUL #2	c.3076_3082+2del	ADC	3+	No	1.2/3.1		Pos
CHUL #7	c.3082+2T>C	ADC	2+	No	0.36/1.67		Pos
CHUL #15	c.2942-31_2942-4del	ADC	2+	No	1.04/2.91		Pos
CHUL #31	c.2942-36_2942-4del	ADC	2+	No	0.4/1.82		Pos
CHUL #33	c.3082G>T	ADC	2+	No	0.62/3.97	TP53 c.809T>C	Pos
CHUL #68	c.3080A>G	ADC	2+	ND		KRAS c.35G>A (G12D)	Pos
CHUL #45	3077_3082+1del	ADC	ND	YES	clusters in 67% of cells	PIK3CA c.1262C>T; TP53 c.396G>C	Neg
CHUL #57	c.3082+1G>A	ADC	ND	No		GNAS c.601C>T; MDM2 and CDK4 amplification	Neg
CHUL #60	c.3082+3A>T	ADC	3+	No			Neg
CHUL #61	c.2942-21_2942-3del	ADC	ND	No			Neg
CHUL #63	c.3082+2T>C	ADC	ND	No			Neg
CHUL #66	c.2942-1G>C	ADC	ND	No		PI3KCA c.1636C>A (Q546K)	Neg
CHUL #9	c.2942-14_2942-4del	ADC	1+	No	0.99/1.84	PTEN loss	NI
CHUL #14	c.2942-47_2949del	ADC	1+	No	0.95/1.5	PTEN loss	NI
CHUL #37	c.2942-19_2942-4del	ADC	ND	ND		TP53 c.610G>T	NI
CHUL #51	c.2942-21_2945del	ADC	ND	ND			NI
CHUL #69	c.2942-21_2942-8del	ADC	ND	ND			NI
CHUL #70	c.3082G>C	ADC	ND	ND			0

Table 1

Publication n°2 : Unique mechanisms of MET ex14 capacities

MET exon 14 skipping mutations trigger a unique biological program promoting tumor growth

Marie Fernandes, Sonia Paget, Zoulika Kherrouche, Audrey Vincent, Marie-José Truong, Jean-Pascal Meneboo, Shéhérazade Sebda, Elisabeth Werkmeister, Clotilde Descarpentries, Anne Chotteau-Lelièvre, Martin Figeac, Luca Grumolato, Alexis Cortot and David Tulasne.

Les thérapies ciblant les récepteurs tyrosine kinase ont contribué à améliorer le pronostic de certains patients et apportent un véritable espoir thérapeutique dans la lutte contre les cancers. Des mutations conduisant au saut de l'exon 14 de MET (MET ex14) ont récemment été découvertes chez environ 3% des patients atteints de cancers pulmonaires qui peuvent alors bénéficier de thérapies ciblant MET. Bien que la majorité des mutations des récepteurs tyrosine kinase impactent le domaine kinase et conduisent à leur activation constitutive, les mutations impactant l'exon 14 sont originales car elles conduisent à la perte du domaine juxtamembranaire. Le domaine perdu comporte au moins trois sites de régulation négative. Parmi eux, les résidus phosphorylables S985 et Y1003 permettent respectivement l'inhibition de l'activité kinase et la dégradation de MET en réponse à l'HGF, le ligand du récepteur. Le motif ESVD1002, quant à lui, est un site de clivage par les caspases permettant la génération du fragment p40MET impliqué dans l'apoptose. Les capacités transformantes induites par le récepteur MET ex14 sont donc particulières et dépendantes de l'HGF, le ligand de MET. Néanmoins, les mécanismes d'activation du récepteur MET ex14 et la contribution des sites de régulation perdus dans la tumorigénèse de MET ex14 restent peu élucidés.

L'analyse par NGS d'une large cohorte de patients atteints de cancers bronchiques non à petites cellules a permis de révéler que la grande majorité des mutations affectant l'exon 14 conduisent au saut de ce dernier alors que des mutations impactant spécifiquement un des sites régulateurs ne sont retrouvés que très rarement. En comparant des lignées exprimant soit le récepteur MET sauvage, dépourvu d'exon 14 (MET ex14) ou muté sur chacun des sites régulateurs, nous avons montré que la signalisation prolongée après activation du récepteur par l'HGF, la migration cellulaire ainsi qu'une partie de la réponse transcriptionnelle induite par le récepteur MET ex14 sont similaires à la mutation du site Y1003. Par ailleurs, les cellules MET ex14 présentent une augmentation des capacités de survie d'une manière similaire à la mutation du site de clivage par les caspases induisant la perte du fragment p40MET pro-apoptotique. Afin d'évaluer davantage l'implication de ces sites de régulation dans la croissance tumorale, nous avons reconstitué par CRISPR-Cas9 les mutations MET ex14 et Y1003F dans des cellules épithéliales pulmonaires non transformées. Alors que ces deux mutations induisent une signalisation accrue et favorisent la migration, seules les cellules MET ex14 conduisent significativement au développement tumoral dans un modèle murin exprimant l'HGF humain. Ces résultats démontrent que les capacités transformantes complètes induites par le récepteur MET ex14 sont la conséquence de la perte d'au moins deux sites de régulation. Cependant, ces éléments suggèrent également que le récepteur MET ex14 possède un programme d'activation unique qui ne serait pas récapitulé par les sites de régulation déjà connus.

MET exon 14 skipping mutations trigger a unique biological program promoting tumor growth

Marie Fernandes¹, Sonia Paget¹, Zoulika Kherrouche¹, Audrey Vincent¹, Marie-José Truong¹, Jean-Pascal Meneboo², Shéhérazade Sebda², Elisabeth Werkmeister^{3,4}, Clotilde Descarpentries⁵, Anne Chotteau-Lelièvre¹, Martin Figeac², Luca Grumolato⁶, Alexis Cortot^{1,7} and David Tulasne¹

¹ Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020 – UMR1277 - Canther – Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

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

³ Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US41 – UMS2014 – PLBS, F- 59 000 Lille, France

⁴Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR9017 – CIIL – center for Infection and Immunity of Lille, F- 59 000 Lille, France

⁵Univ Lille, Department of Molecular Oncology, CHU Lille, F-59000, Lille, France.

⁶NormandieUniv, UNIROUEN, INSERM, DC2N, Rouen, France; Institute for Research and Innovation in Biomedicine, Rouen, France.

⁷Univ. Lille, Thoracic Oncology Department, CHU Lille, F-59000, France

Correspondence to: david.tulasne@ibl.cnrs.fr

Running Title: Transforming properties of METexon14

Keywords: Lung Cancer; Receptor tyrosine kinase; MET Ex14

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, INSERM, the Institut Pasteur de Lille and the university of Lille, and by grants from the “Agence Nationale de la recherche”, “Cancéropôle Nord-Ouest”, the “Ligue Contre le Cancer, Comités Nord et Aisne” the “SIRIC ONCOLille” and the “Institut National du Cancer”.

Abstract

MET exon14 mutations are found in about 3% of lung cancer patients for whom targeted therapies against MET demonstrated efficacy. MET exon 14 mutations are known to induce deletion of the juxtamembrane regulatory domain containing at least three regulatory sites, making elusive comprehension of its mechanism of action. Next generation sequencing of a large cohort of non-small cell lung tumors revealed first that while the large majority of MET exon 14 mutations lead to the exon skipping, only a small proportion affect a specific regulatory site. Furthermore, by comparing epithelial cell lines expressing either MET WT, MET exon 14 deletion (MET Ex14) or MET mutated in each known regulatory site, we found that HGF-dependent sustained signaling, cell migration and large part of the transcriptomic program induced by MET Ex14 are recapitulated by mutation of the E3 ubiquitine binding site Y1003. Besides, HGF-independent resistance to apoptosis was recapitulated by mutation of the ESV₁₀₀₁D caspase site. To further assess involvement of these findings for tumor growth, genome editing reconstituting either MET Ex14 or MET Y1003 mutations were performed in non-transformed lung epithelial cells. While both cell lines induced sustained downstream signaling and promote motility, only MET Ex14 trigger significant HGF-dependent tumor growth. These results demonstrate that transforming responses triggers by MET Ex14 is only partially recapitulated by the known regulatory sites of the juxtamembrane domain and demonstrate the unique property of MET Ex14 to induce tumor growth.

Introduction

The receptor tyrosine kinases (RTK) are part of the major targets of the novel therapies approved or in development to fight against cancer. They are mainly tyrosine kinase inhibitor (TKI) able to inhibit enzymatic activity of the receptor or monoclonal antibodies directed against their extracellular domain able to inhibit either ligand binding or receptor dimerization (1). In non-small cell lung cancer (NSCLC), about three-quarters of the patients displayed identified driver genomic alterations responsible to tumorigenesis. Furthermore, many of them are targetable with the novel targeted therapies (2). Patients eligible to these therapies displayed significant increase of their life expectancy and life quality (3). In NSCLC, several genomic alterations occur in genes coding RTK including mutations of EGFR, translocation of ALK or ROS1 or gene amplification of HER2. These alterations lead to direct activation of the kinase domain since EGFR mutations located in the kinase domain lead to kinase activation, ALK translocations favor receptor dimerization mimicking ligand activation and gene amplification such as for HER2 leads to massive overexpression promoting also receptor dimerization. Consequently, in each case, TKI directed against the RTK is effective to reduce tumor progression.

MET is another RTK representing an attractive target to combat cancer. Indeed, MET is activated in many tumors through various mechanisms, including *MET* gene amplification reported in 1 to 5% of gastric and lung cancers (4–6), autocrine and paracrine activation by aberrant ligand expression found notably in glioblastoma (7) and MET kinase domain mutations described mainly in renal cancers (8) (For review see (9)). MET is a receptor tyrosine kinase (RTK) produced predominantly in cells of epithelial origin, known to be activated by its stromal ligand, the hepatocyte growth factor (HGF), also called scatter factor (10). HGF and MET are essential to embryonic development (11–14) and tissue regeneration in adults (15–18).

Recently, novel mutations were found in about 3% of the profiled lung tumors (19,20). The consequences of these genomic alterations, including point mutations, deletions or insertions, are original compared to those affecting the other RTK or affecting MET in other cancers. Indeed, these alterations affect splice sites of *MET* exon 14 (*MET* Ex14 mutations) leading to in-frame exon 14 skipping and subsequent deletion of the regulatory juxtamembrane domain of MET (21,22). The juxtamembrane domain contains first the serine residue 985 (S985), phosphorylated by protein kinase C (PKC). Phosphorylation of this residue is involved in downregulation of the MET tyrosine kinase activity (23), which is instrumental for regulation of MET activity during liver regeneration (24). The juxtamembrane domain contains next the ESVD₁₀₀₂ site involved in MET cleavage at aspartic acid 1002 (D1002) by caspases during apoptosis. Caspase cleavages lead to generation of a 40 kDa cytoplasmic

C-terminal fragment (p40 MET) (25,26), able to amplify cell death by favoring mitochondrial permeabilization (27,28). Finally the juxtamembrane domain of MET contains a ligand-dependent phosphorylated tyrosine residue 1003 (Y1003 in the ESVD₁₀₀₂Y₁₀₀₃R sequence), able to recruit the E3 ubiquitin ligase CBL (Casitas B-lineage Lymphoma) involved in MET ubiquitination, a molecular mechanism underlying RTK degradation (29). MET receptor mutated at Y1003 promotes motility in epithelial cells, foci formation in fibroblasts and tumor growth in mice (30,31).

Importantly, objective responses to several MET-targeting TKIs was observed in NSCLC patients harboring MET Ex14 mutations, with for instance preliminary data of phase II clinical trial evaluating tepotinib TKI demonstrating an objective response rate of about 50% for patients with MET Ex14 mutations (32). While most of the NSCLC harboring MET Ex14 are still treated by convention chemotherapies, this recent result leads to approval of this treatment in Japan and to a breakthrough therapy designation in US.

Nevertheless, in contrast to molecular alterations of other RTK leading to direct activation of their kinase, MET exon14 skipping leads to deletion of a complex negative regulatory domain, making elusive understanding of MET activation and transforming properties in NSCLC. To support the current treatment transition from chemotherapies to targeted therapies, an understanding of the molecular mechanisms underlying tumor progression in MET Ex14 patients is needed. First, we determined from a large cohort the landscape of molecular alterations affecting exon 14 of MET. Next, we developed cellular models expressing MET receptor displaying either juxtamembrane domain deletion or mutations in each the known negative regulatory sites, by both expressing vectors and genome editing strategies. Based on these models, the intracellular signaling pathways, the transcriptional program, the cellular responses and the tumor growth were analyzed.

Materials and methods

Cell lines maintenance

T47D parental cell line and derived cells were maintained in DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Sigma, St. Louis, Missouri), 1% non-essential amino acids (Gibco, Invitrogen) and 1% Zell-shield antibiotics (Minerva Biolabs). 16HBE parental cell line and derived cells were maintained in MEM (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and 1% Zell-shield antibiotics (Minerva Biolabs, Berlin, DE). Cells were cultivated at 37°C with humidified controlled atmosphere of 5% CO₂ in air. HGF was purchased from Miltenyi Biotec (Bergish Gladbach, DE) and MEK inhibitor U0126 was from Promega (WI, US).

Plasmid engineering

MET mutations –MET Ex14, S985A, V1001A, Y1003 and triple mutant- were created with the QuickChange site-directed mutagenesis system (Agilent technologies, Santa Clara, CA) on pRS2 vector encoding MET WT. Subcloning of MET cDNA with EcoRI was next realized in pCAGGS expressing vector. All coding MET sequences were completely verified by Sanger sequencing.

Creation of T47D MET WT and MET mutant cell lines

T47D cells were transfected with pCAGGS vectors encoding MET WT or MET mutant cDNA and pSV2 vector carrying the neomycin resistance gene at a 10:1 ratio by Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Next day, cells were treated with G418 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) at 800 µg/ml for 21 days. To isolate MET expressing cells, three successive sortings were performed after staining with the extracellular MET antibody AF276 (R&D Systems, Minneapolis, MN). The T47D MET expressing cell lines were maintained in complete medium without G418.

Creation of 16HBE mutant cell lines by CRISPR-Cas9 technology

In order to induce a MET exon 14 skipping, 16HBE were electropored with px459 V2 vector (Addgene #62988) containing cDNA coding for Cas9 enzyme and sequence coding sgRNA targeting exon 14 splice donor site. In a similar manner, 16HBE Y1003F and control YY cell lines were also established but they were also electopored with ssODN to permit homologous recombination. ssODN sequences used as templates for establishment of MET Y1003F and control cell lines contain a serial of silent mutations that constitute a genetic barcode as described (33). Silent mutations are represented in green and punctual mutation is represented in red. After 24h, cells were treated by puromycine at 1 µg/ml during 48h and then they were isolated by limit dilution in 96-well plates. Then, clones presenting an exon 14 skipping or barcoding mutations were detected by RT-qPCR as described in previous methods (33,34). Deletions impacting splicing site of MET in 16HBE MET ex14 clones or mutations in 16HBE MET Y1003F

and control YY were validated by NGS sequencing with use of targeted NGS panel called CLAPv1 and derived from Colon&Lung V2 NGS panel (Descarpentries et al, 2018).

Mutation	sgRNA (5'→ 3')	ssODN
Y1003Y	AGCTACTTTTCCAGAAGGTA	TGCAAGAGTACACACTCCTCATTGGATAGGCTTGTAAAGTGCCCG AAGTGTAAGCCCAACTACAGAAATGGTTTCAAATGAATCGGTCTG ATTATCGAGCGACCTTTCCAGAAGGTATATTTTCAGTTTATTGTTCT GAGAAATACCTATACATATACCTCAGTGGGTTGTGACATTGTTGT TTATTT
Ex14	TACCGAGCTACTTTTCCAGA	/
Y1003F	AGCTACTTTTCCAGAAGGTA	TGCAAGAGTACACACTCCTCATTGGATAGGCTTGTAAAGTGCCCG AAGTGTAAGCCCAACTACAGAAATGGTTTCAAATGAATCAGTTG ACTTCAGGGCCACGCTTTCCAGAAGGTATATTTTCAGTTTATTGTTCT GAGAAATACCTATACATATACCTCAGTGGGTTGTGACATTGTTGT TTATTT

Antibodies

The following antibodies, used at a 1:1000 dilution unless otherwise indicated, were purchased from Cell Signaling Technology (Leiden, NL) : mouse monoclonal antibody against C-terminal domain of human MET (#3148), rabbit polyclonal antibody against phospho-MET Tyr1234/Tyr1235 (#3126), rabbit monoclonal antibody against phospho-AKT Ser473 (D9E #4060), mouse monoclonal antibody against phospho-ERK1/2 Thr202/Tyr204 (E10 #9106); Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX) : rabbit polyclonal antibody against AKT1/2/3 (H-136 sc-8312), rabbit polyclonal antibody against ERK2 (C-14 sc-154), mouse monoclonal antibody against GAPDH (6C5 – sc-32233; 1:10,000 dilution); R&D Systems (Minneapolis, MN) : mouse monoclonal antibody against extracellular domain of MET (#95105, MAB3582), goat polyclonal antibody against extracellular domain of MET (AF276); Life Invitrogen Biosource : rabbit polyclonal antibody against phospho-MET Tyr1003 (44-882). Alexa Fluor conjugated anti-mouse and anti-goat were from Invitrogen (Carlsbad, CA). Peroxidase-coupled secondary antibody were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (Ely, UK) and used at 1:10,000 dilution: secondary antibodies anti-mouse (#115-035-146) and anti-rabbit (#711-035-152).

Western-Blot analysis

Cells were plated on 6-well plates (250,000 per well) in complete medium. The next day, cells were serum starved overnight and treated with HGF in serum-free medium before lysis. The cells were lysed with PY lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton X-100) with proteases and phosphatases inhibitors (1% aprotinine, 1mM PMSF, 1 μM leupeptine, 1mM Na₃VO₄, 20 mM β-glycerophosphate). Protein concentrations were determined with the BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific). Equal amount of proteins were separated on precast 4% to 12% Gradient

Gel (ThermoFisher Scientific) transferred onto Immobilon-P polyvinylidene fluoride microporous transfer membranes (Merck Millipore, Darmstadt, DE). Prestained broad-range molecular mass markers (Invitrogen) were used as standards in each gel. Protein detection was performed using SuperSignal West Dura (ThermoFisher Scientific), luminescence was captured with a digital imaging using a cooled Charge Coupled Device Camera (LAS 3000, Fujifilm). Presented western blot are representative of three independent experiments.

Immunofluorescence staining

Cells were plated on glass coverslips in 12-well plates (80,000 cells per well). Next day, cells were washed and fixed in 4% PFA, permeabilized by 0.5% Triton X-100 in PBS and blocked 30 min in 0.2% casein. Incubation with mouse primary antibody against human MET (Cell Signaling, #3148) was carried out for 1 h (1:100 dilutions). The cells were washed with PBS and incubated for 1 h with corresponding Alexa Fluor-conjugated secondary antibody. The nuclei were counterstained with Hoechst 33258. Coverslips were mounted with Moviol mounting medium. For fluorescence microscopy, slides were observed in oil immersion with Zeiss AxioImager Z1 ApoTome microscope (Obj Plan Apochromat, NA 1.40 oil immersion)

Flow cytometry analysis and cells sorting

Adherent cells were detached and dissociated by StemPro Accutase reagent (Life Technologies) and washed by PBS. Cells were incubated 30 min at room temperature with primary antibody against extracellular domain of MET (#AF276, R&D systems, 2.5 µg/10⁶ cells). After two PBS washes, cells were incubated 20 min at RT with Alexa-Fluor647-conjugated secondary antibody (1:1000 dilution, # A-21469, Invitrogen, Carlsbad, CA). Finally, cells were suspended as 0.5.10⁶ cells/ml or 4.10⁶ cells/ml in PBS for cytometry analysis and cell sorting respectively. For controls, some cells were not labeled or incubated only with the secondary antibody. Labeled cells were analyzed on FACS Canto II cytometer (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) with BD FACSDiva™ and BD FlowJo softwares.

RT-qPCR

Total RNA was extracted with the Nucleospin RNA/Protein kit (Macherey-Nagel, Düren, DE) according to manufacturer's instructions. cDNA was reverse transcribed with random hexamers (Applied Biosystems, Foster city, CA). Levels of MET and MMPs mRNAs were evaluated by real-time RT-PCR with Fast SYBR Green mix (Applied Biosystems). Relative gene expression levels were calculated using the 2- Δ Ct method. The level of each transcript was normalized to the B2M (beta-2 microglobulin) or GAPDH expression level. The primers used are presented in Table S1.

Scattering assay

For scattering, 3000 cells/well (T47D) or 5000 cells/well (16HBE) were seeded onto 24-well plates in complete medium. The next day, they were treated or not 24h to 48 h with 30 ng/ml or 20 ng/ml HGF

in complete medium or 0.5% FBS-medium respectively. Cells were stained with Carazzi's hematoxylin and eosin. Random bright-field images were acquired with Axiovert 40C (Zeiss). For quantification of scattering, images were first analyzed with ImageJ (NIH). Centers of cells were marked with the multi-point selection tool. For each clusters, an Excel file with the cells X,Y coordinates was extracted (thanks to a macro to facilitate the analysis). All the Excel files were then treated with Matlab in order to estimate the dispersion of the cells. Area of each cluster was calculated by a Delaunay triangulation. The dispersion parameter represented here corresponds to the inverse of the density (number of cells per area unit).

Migration and Invasion assays

Cells were labeled with a 10 μ g/ml of DiI12(3) fluorescent dye (Corning) for 1 h in standard conditions. Cells were then harvested and resuspended in the complete medium. The FluoroBlok PET 24-well permeable support system (Corning) was used for cell migration analysis, while the Corning BioCoat™ tumor invasion 24-well system containing Corning Matrigel® matrix (Corning) was used to examine cell invasion. For cell invasion experiments, inserts were rehydrated prior to cell dispensing with 500 μ l of warm phosphate buffered saline for 2 h at 37°C, ambient atmosphere incubator. Buffer was removed following the rehydration incubation time. T47D cells (250,000 cells) or 16HBE cells (400,000 cells) in complete medium were added to the upper chambers, and the lower chambers were filled with complete medium. After 5 h (T47D cells) or 24 h (16HBE cells) of incubation, all chambers are washed with serum free medium twice. Complete (T47D cells) or serum free medium (16HBE) were then added to the upper chamber, and the lower chambers were filled with 30 ng/ml HGF complete medium (T47D cells) or 20 ng/ml HGF serum free medium (16HBE cells) for attracting factor. The fluorescence (excitation 549 nm and emission 565 nm) was measured at different time after exposure directly in the inserts using the Fluostar Optima plate reader (BMG Labtech) with "bottom optic" option. The results were shown as the relative fluorescence units - RFU (mean \pm SD).

Caspase-3/7 activity with IncuCyte analysis system

Cells were seeded onto 96-well plates in complete medium (8,000 cells/well). Next day, cells were preincubated with specific caspase3/7 Green Apoptosis reagent (Essen Bioscience; 1:1000 dilution) and Red Nuclight reagent (Essen Bioscience; 1:1000 dilution) during 1 h and then treated with staurosporine (STS, 1 μ M – Sigma Aldrich) for induction of apoptosis. Real-time increase of caspase-3/7 activation was measured by green fluorescence intensity assessed every hour during 12 h by IncuCyte ZOOM. For each condition, initial apoptotic cell rate was under 5%, measured by the ratio green object count (active caspase) : red object count (nucleus).

Transcriptomic analysis

Cells were plated on petri-dish in complete medium (750,000 cells per dish). Next day, cells were serum starved 2 h and treated or not with HGF in serum-free medium during 24 h. Total RNA was extracted with the Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel) following the manufacturer's instructions. Genomic DNA traces were removed by DNaseI treatment. HGF stimulation and RNA extraction were performed in three replicates each separated by one-week culture. Total RNA yield and quality were evaluated on the Nanodrop 2000C system (ThermoScientific) and further assessed on the Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies). One color whole Human (072363_D_F_20150612) 60-mer oligonucleotides 8x60k microarrays (Agilent Technologies) were used to analyze gene expression. cRNA labelling, hybridization and detection were carried out according to supplier's instructions (Agilent Technologies). For each microarray, Cyanine 3-labeled cRNA were synthesized with the low input QuickAmp labeling kit from 50 ng of total RNA. RNA Spike-In were added to all tubes and used as positive controls of labelling and amplification steps. The labelled cRNA were purified and 600 ng of each cRNA were then hybridized and washed following manufacturer's instructions. Microarrays were scanned on an Agilent G2505C scanner and data extracted using Agilent Feature Extraction Software© (FE version 10.7.3.1). Statistical comparisons, filtering and figures were achieved with limma R package (R3.5.1, limma 3.38.3).

Tumor xenografts

NOD.*scid*.Il2R γ c (NSG) mice with a humanised HGF knock in allele (Jackson Laboratory creation, Charles River breeding) were used for all *in vivo* experiments. 16HBE cells were detached by trypsin and suspended in PBS ($2 \cdot 10^7$ cells/ml). $2 \cdot 10^6$ cells / 100 μ l PBS were injected subcutaneously into each inguinal flanks of about 6 to 8 week-old huHGF NSG mice. Mice of comparable ages were randomly separated and 10 mice per condition were injected. Tumor size was assessed by measuring the length and width of tumors and tumor volume was estimated with formula (length x width²) /2.

Results

Landscape of the MET exon 14 mutations in a large cohort of NSCLC

It is now well-established that mutations of the splice sites of MET exon 14 are found in about 2 to 3% of the NSCLC patients (20,21,35). It is however less clear if other *MET* mutations affecting exon 14 responsible for coding of the juxtamembrane domain could also exist and at which frequency. For instance, a study reported a case patient harboring a MET Y1003S mutation associated with a response to crizotinib treatment (36). However, the frequency of such alterations was not assessed. In order to determine the frequency of MET mutations in NSCLC, FFPE tumor sample from 2808 patients received between May 2017 and September 2020 for molecular screening as part of the routine practice were analyzed with the optimized NGS panel CLAPv1 (20). This panel allows full sequencing of the MET exon 14 and the flanking intronic sequence and the already known molecular alterations found in lung cancer (20). Among the 2808 patients, the main mutations detected were *KRAS* (36.1%), *EGFR* (12.4%), *BRAF* (5.1%), and *ERBB2* (1%) mutations (Table 1). 2.5% (71 patients) displayed punctual mutations or deletions within the exon 14 and its flanking intronic regions. 38% of these molecular alterations affect the 5' acceptor splicing site and 54,9 % affect the 3' donor splicing site. All these mutations are predicted to induce exon 14 skipping. Beside these well described molecular alterations, 5 punctual mutations and deletions were found to modify to coding sequence of exon 14, leading to the predicted following alterations Tyr971Cys, His979Arg, Deletion Val975-Ser985, Ser985Thr and Tyr1003Asn (Table 1). Therefore, three molecular alterations are predicted to affect the regulatory amino acid Ser985 and Tyr1003.

MET exon 14 and Y1003F mutations induce higher activation of downstream signaling pathway in response to HGF stimulation

In order to determine the transforming properties of the MET exon 14 regulatory sites, we mutated individually or together the known regulatory sites of the MET juxtamembrane domain encoded by the exon 14, compared to MET WT and MET Ex14. This includes the deletion of juxtamembrane domain of MET, the mutation Ser985Ala, the mutation Val1001Ala, the mutation Tyr1003Phe and the triple mutation Ser985Ala, Val1001Ala and Tyr1003Phe (Fig. 1A). It is worth noticing that we chose to mutate the Val1001 of the caspase site ESVD that retain its ability to bind CBL (37). MET constructs were expressed in the human T47D epithelial cells of mammary origin which have the advantage of not expressing MET (31). T47D cells were transfected with the different constructions and population of cells expressing the MET receptor were selected by fluorescence activated cell sorting. Expression of the different forms of MET were assessed by RT-qPCR, flow

cytometry, immunofluorescence and western blot (**supplementary figure 1A,B,C,D**). Except T47D parental cells, which express nearly undetectable MET, all engineered cell lines expressed MET receptor. Flow cytometry analysis indicated that MET WT expressing cells display the higher level of membrane receptor compared to all the other mutants (**supplementary figure 1B**). This result was confirmed by immunofluorescence staining (**supplementary Figure 1C**). In contrast, by western blot, MET WT cells express the lower level of receptor compare to the other cells, suggesting that MET membrane localization could be altered by the MET mutations (**supplementary Figure 1D**).

Dose response and time course experiment show that HGF stimulations in MET WT and V1001A cells induced similar ERK and AKT phosphorylation. In MET Ex14, MET Y1003F and MET Triple cells both ERK and AKT phosphorylation were drastically higher and sustained until at least 8h. Response in MET S985A cells was intermediate in intensity for both ERK and AKT phosphorylation (**Fig. 1B,C**). HGF-stimulation induced increase of full length MET detection especially in the mutated forms. It is worth noticing that in the T47D cell lines MET display basal phosphorylation. As consequence and although HGF-stimulation triggered effective activation of the downstream signaling pathways, HGF stimulation did not induce increase MET phosphorylation. Increase of MET phosphorylation observed notably in time course experiment is likely the consequence of the increase of MET expression (**Fig. 1C**).

MET exon 14 and MET Y1003F trigger both a highly similar and a specific transcriptomic program

In order to further characterize the responses induced by these different MET mutants, transcriptomic programs of the T47D cells stimulated or not by HGF were compared. It is worth noticing that triple mutant was not included in this analysis. First, global unsupervised clustering of the differentially regulated genes revealed that unstimulated T47D cell lines are clustered in the same group indicating that under unstimulated condition all cell lines display similar pattern of gene expression (**Fig. 2A**). Under HGF-stimulated condition, MET Ex14 and MET Y1003F are clustered in the same group, while MET WT, V1001A and S985A are clustered in another. Analysis of gene expression at a fold change threshold fixed at 2 (absolute value) and adjusted p-value below 0.05 revealed that HGF-stimulation induced differential expression of only 44 probes for MET WT, 218 probes for MET V1001A and 536 for MET S985A (**Fig. 2B and supplementary Figure S2**). HGF-stimulation of MET Ex14 and MET Y1003F induced the largest number of gene expression modulation with 2139 and 1916 probes for MET Ex14 and MET Y1003F respectively. Interestingly, 1505 probes are commonly regulated by MET Ex14 and MET Y1003F, while 634 probes and 409 probes are specially regulated by MET Ex14 and MET Y1003F respectively. This large-scale analysis demonstrates that MET Ex14 and MET Y1003 triggered differential expression of much more genes compare to the other mutants. In addition, MET

Ex14 and MET Y1003F shared about two-third of these genes but display also a specific panel of genes, demonstrate that MET Ex14 and MET Y1003F transcriptional program are close but not identical.

Gene enrichment by listing of the main hallmarks of cancer (38) confirmed first that all unstimulated cell lines displayed similar expression pattern. In MET WT, S985 and V1001A, HGF-stimulation induced weak modification of these cancer associated genes, while MET Ex14 and MET Y1003F induced stronger modulation, which are nearly identical for both mutant (**Fig. 2C**). For instance, HGF-stimulated MET Ex14 and MET Y1003F strongly modulated expression of genes involved in activation of invasion and metastasis including the matrix metalloproteases (MMP1, 3, 9, 10 and 13). Individual analysis of each MMP confirmed that in response to HGF MET Ex14 and MET Y1003F induced stronger expression of these genes compare to the other mutants (**Supplementary figure S3A**). It is worth noticing that MET WT, MET S985A or MET V1001A induced also expression of MMP but at a lower range which could not reach 2 fold-change.

Interestingly, it has been shown that expression of some MMP are positively regulated by the RAS-RAF-MEK-ERK signaling that we identified as one of the downstream signaling displaying sustained activation in MET Ex14 and MET Y1003F cell lines (**Fig. 1**) (39–41). First, quantitative RT-PCR confirmed that HGF-stimulated MET Ex14 and MET Y1003F induced strong expression of MMP1, 3 and 13 (**Fig. 3A**). Second, inhibition of MEK by U0126, which induce effective inhibition of ERK phosphorylation in HGF-stimulated cells expressing MET Ex14 (**Fig. 3B**), abrogated expression of tested MMPs (**Fig. 3C**). These results suggest that sustained activation of RAS-ERK signaling by MET Ex14 and MET Y1003F support the strong expression of MMPs.

Y1003F mutation recapitulates motility induced by MET Ex14

Because T47D cells are polarized epithelial cells, cellular responses including cell scattering or mobility were evaluated. Without cytokine stimulation, all the cell lines grew in 2D culture in compact epithelial islet as the T47D parental cells, indicating that ectopic MET expression of the WT or the mutated forms do not induce phenotypic modifications. In T47D parental cells, in accordance with nearly undetectable MET expression, HGF stimulation did not induce morphological changes. In MET WT and V1001A cells, HGF stimulation induced only weak scattering, while in MET Ex14, MET Y1003F and MET triple cells the scattering was drastically higher and easily quantified (**Fig. 4A and B**). MET S985A cells displayed intermediate response. In transwell migration assay, HGF-stimulation did not induce measurable migration in MET WT cells. In V1001A and S985A cells, HGF induced a weak migration, while stronger responses were observed for MET Y1003F, MET Triple and MET Ex14 cells (**Fig.4C**).

Taken together, our results demonstrate first that HGF is required to induce downstream signaling pathway and cellular responses in MET WT and all the mutated forms including the MET Ex14. Second, in response to HGF, MET Ex14, MET Y1003F and MET Triple induce similar and stronger signaling and motility compare to MET WT and the other mutants. Because MET Ex14 and MET Y1003F display similar responses and that MET Triple do not further increase it, this suggests that stronger ERK and AKT signaling and epithelial cell mobility observed in MET Ex14 is supported by loss of the Y1003.

Mutation on the juxtamembrane caspase site recapitulates MET Ex14 HGF-independent resistance to apoptosis

As we previously demonstrated that juxtamembrane caspase cleavage of MET leads to the generation of the pro-apoptotic fragment p40 MET able to promote apoptosis, we assessed the p40 MET generation by caspase 3 from the different MET mutants. As expected caspase cleavage of MET WT, MET S985A and MET Y1003F lead to production of p40 MET, while from MET Ex14, MET V1001A and MET triple, in which caspase site is absent or mutated, the pro-apoptotic fragment is not produced (**Fig. 5A**). Next, T47D cells were subjected to an apoptotic stress and the cell death was monitored in real time through caspase activation sensitive probe. T47D cells segregated in two groups, with MET WT, S985A and Y1003F displaying higher apoptosis compare to MET ex14, V1001A and triple, which do not produce p40 MET (**Fig 5B**). Since MET Ex14 and V1001A display similar resistance to apoptosis and that MET triple do not further increase it, this suggests that resistance to apoptosis observed in MET Ex14 is supported by the loss of the caspase site ESV¹⁰⁰¹D.

In pulmonary epithelial cells only MET exon14 trigger effective invasion and tumor growth

Beside T47D cellular model, we performed genome edition by CRISPR-Cas9 of the non-transformed pulmonary epithelial cell lines 16HBE in order to induce either MET exon 14 skipping or MET Tyr1003Phe punctual mutation which share the most similarity to MET Ex14 in the model presented above. The skipping of exon 14 was reconstituted by targeting the exon 14 donor splice site, while MET Tyr1003Phe mutations was reconstituted by targeting the exon 14 coding sequence followed by homologous recombination. Genome edition and homologous recombination was also performed with DNA donor sequence that does not modify coding sequence to engineered a control cell line (16HBE Ctrl). All the genome edited 16HBE cells, including the MET WT, MET Ex14 and MET Tyr1003Phe, displayed the expected genome edition in one allele, while the second allele displayed out frame deletion leading to allele inactivation, as assessed by NGS sequencing of MET exon 14 region (**Supplementary Fig. S4A**). Exon 14 skipping was confirmed by mRNA analysis by RT-qPCR, since the amplicon dissociation temperature of mRNA harboring exon 14 skipping in 16HBE MET Ex14 and the

cell line Hs746T cells differed from non-spliced mRNA 16HBE Ctrl and EBC1 cells (**Supplementary Fig. S4B**). Exon 14 skipping in 16HBE MET Ex14 was confirmed by Western blot with slightly lower detection of MET Ex14 compare to WT (**Supplementary Fig. S4C**). Furthermore, MET WT displayed effective Y1003 phosphorylation in response to HGF, while MET Ex14 and MET Y1003F did not (**Supplementary Fig. S4C**). Flow cytometry analysis revealed that all 16HBE engineered cell lines expressed MET at the plasma membrane at strictly similar level (**Supplementary Fig. S4D**).

In 16HBE cells expressing MET WT, time course experiment showed that HGF induced modest MET, ERK and AKT phosphorylation which rapidly decreased from 3h following the stimulation. In contrast, in MET Ex14 cells, MET, ERK and AKT phosphorylation were higher and sustained over 8h post HGF-stimulation. In MET Y1003F cells, sustained activation of MET and downstream signaling pathways were also observed but at a lesser extent compare to MET Ex14 cells.

Since MET Ex14 does not contain the Y1003 required for recruitment of the E3 ubiquitin CBL known to be involved in MET internalization and lysosomal degradation, MET Ex14 stability was determined upon inhibition of protein synthesis. Without HGF stimulation, MET WT and MET Ex14 phosphorylation were undetectable and their expression remain stable until 8h. As expected, HGF-stimulation induced effective MET WT and MET Ex14 phosphorylation. In this condition, MET WT expression as well as its phosphorylation decrease gradually, a response observed however also with MET Ex14 (**Supplementary Fig. S5**).

While the three cell lines grew in 2D culture in compact epithelial islet, HGF stimulation induces effective islet scattering which was more pronounced for both MET Ex14 and MET Y1003 (**Fig. 6C**). In transwell migration assay, weak HGF-independent migrations were observed notably for MET Ex14 cells. However, HGF-stimulation induced effective migration of all cell lines with a stronger response for MET Ex14 cells (**Fig.6D**). In contrast, in an invasion assay through Matrigel, only HGF-Stimulated MET Ex14 cells displayed efficient invasion (**Fig.6E**). Taken together, these functional assays in 16HBE cells demonstrate that while MET Ex14 and MET Y1003F induce both sustained downstream signaling and promotes migration with an advantage for MET Ex14, only MET Ex14 is able to promote invasion.

In order to investigate involvement of these MET mutant stimulated by HGF in tumor growth, the 16HBE cell lines were injected in immunodeficient NSG mouse expressing human HGF by knock-in. In this model, human HGF allow MET activation of the transplanted human cell lines. We previously demonstrated that 16HBE MET Ex14 cells developed tumor in these mice, while they did not in NSG control mice expressing the murine HGF (Fernandes et al). In contrast to 16HBE expressing wild type form of MET, which did not develop any tumors, 80% of the injected 16HBE MET Ex14 developed tumors with a mean volume of 66 mm³ (**Fig. 7A**). It is worth noticing that the MET Ex14 tumor sizes in NSG KI-huHGF mice are quite variable (with for instance a range between less than 10 to 256 mm³), a likely consequence of the slow growth of these cells in animal model. Importantly, only 20% of the

16HBE Y1003 developed tumors and whose volumes do not exceed 10 mm³ (Fig.7A). This demonstrate that under HGF-stimulation tumorigenic potential of MET Ex14 is much higher that MET Y1003F mutation.

Discussion

Importance of the Y1003 of the MET juxtamembrane domain was established from 2000. Indeed, it has been shown that following MET activation, Tyr1003 phosphorylation triggers recruitment of the E3 ubiquitin ligase CBL leading to MET ubiquitination (29). Consequently, mutation of Tyr1003 alters the interaction of MET with CBL, reduce MET ubiquitination and promote its stability. Importantly, mutation of MET Y1003 promote cell transformation and favor tumor growth in animal models (29,30), suggesting several years before discovery of MET Ex14 mutations that the loss of this juxtamembrane regulatory site could promote tumorigenesis. Therefore, when MET exon 14 skipping was discovered in NSCLC, it has been proposed that transforming properties of these mutants were directly related to the loss of Y1003 docking site (42,43). Furthermore, the description of case report of NSCLC patient with Y1003 punctual mutation responding to MET TKI were in favor of this proposition (36). Nevertheless, the frequency of these punctual mutations, in comparison to the MET Ex14 mutations found in about 2 to 3 % in NSCLC (20), was not clearly assessed. In addition, at least two other negative regulatory sites including phosphorylated S985 and caspase site ESVD were described in the juxtamembrane domain. However, their involvement was neglected, likely because their role in cell transformation or tumor growth were not described.

We found from analysis of a large cohort of about 3000 patients of the Lille hospital that only one patient displays punctual mutation at Y1003 and two patients with either punctual mutation or small deletion affecting S985, representing thus a very small proportion of patient compare to the 71 patients (2.3%) displaying exon 14 skipping mutation. Therefore, while MET Ex14 mutations represent a group of patients with a rate of detection comparable to ALK fusion for instance (44), mutation of individual regulatory site in the juxtamembrane domain represent rare events, suggesting that full deletion of juxtamembrane domain would be more effective to induce tumorigenesis that loss of an individual regulatory site including Y1003.

MET exon 14 skipping was already reconstituted by ectopic expression in several types of fibroblast cell lines, which do not allow however proper reconstitution of biological responses (45,46). MET exon 14 skipping was also reconstituted by genome edition in human kidney embryonic (HEK) cells and in a human pulmonary cell line (47,48). These studies confirmed that MET Ex14 triggers stronger activation of the downstream signaling pathway, promotes proliferation, anchorage-independent growth and favors experimental tumor growth. Nevertheless, involvement of the Y1003 regulatory site in the context of the exon 14 were investigated only indirectly. Indeed, exon 14

reintroduced of in TPR-MET fusion, an constitutively dimerized form of MET kinase, was able to abolish the transforming capacity of the fusion (48,49). Interestingly, mutation of the Y1003 site in these constructs did not restore the transforming capacities, supporting the view that MET exon 14-induced transformation is not fully supported by the Y1003.

In our study, the ectopic expression of MET WT, MET Ex14 and the mutated form on the known juxtamembrane regulatory sites in the polarized epithelial cells T47D allowed a well-controlled characterization of the signaling pathways and functional analysis of a large panel of biological responses. These analyses demonstrate that in T47D cells expressing MET Ex14 and MET Y1003F induced very similar responses under HGF-stimulation, including sustained activation of RAS-ERK and PI3K-AKT signaling and stronger motility and migration. It worth noticing that MET S985A mutant is also able to promote these responses, even though at a lower level. Nevertheless, since the triple mutant (S985A/V1001A/Y1003F) displayed very similar responses than MET Ex14 and MET Y1003, our data suggest that Y1003F is able to recapitulate both the sustained signaling and the cell motility trigger by MET Ex14 under HGF-stimulation. Transcriptomic analysis confirmed that MET Ex14 and Y1003F share a large transcriptional program, with about two-thirds of their genes commonly regulated. Interestingly these genes include the matrix metalloproteases, first known to promotes motility and invasion (50), and second known to be regulated by the RAS-ERK signaling pathway (39–41). In this line, we demonstrate that pharmacological MEK inhibition efficiently inhibited expression of several MMPs induced by HGF-stimulated MET Ex14 and MET Y1003F. Therefore, we can propose that sustained RAS-ERK signaling pathway induced by MET Ex14 contributes to strong activation of the transcriptional program including MMPs which in turn promote cell motility, responses which are recapitulated by the loss of Y1003 regulatory site.

It is worth noticing that in T47D cells, MET WT stimulated by HGF differently regulated only 44 probes compare to 2139 for MET Ex14, suggesting that the transcriptional program of MET Ex14 is much more complex. However, individual analysis of gene expression, as performed for MMP, revealed that MET WT regulate also these genes but at a lower range, which would not reach the threshold for the adjusted p-value. This suggests an alternate interpretation of the data in which MET WT and MET Ex14 could differently regulate the same panel of genes but at a different level.

It is well known that phosphorylated Y1003 is required for the recruitment of the E3 ubiquitin ligase CBL involved in MET internalization and lysosomal degradation (29). Therefore, it has been largely proposed that sustained downstream signaling induced by MET Y1003F and MET EX14 is the consequence of MET degradation defect. This potential degradation defect would not be investigated in T47D cells, since MET degradation was not observed in the HGF-stimulated WT form of the receptor. In contrast, in 16HBE cells, MET WT underwent ligand-dependent degradation, but similar degradation

was also observed with MET Ex14. Therefore, it is not clear how defect in CBL recruitment affect MET Y1003F and MET Ex14 regulations.

Since MET receptor is able to favor apoptosis under ligand-independent mechanisms involving its caspases cleavages (28), we also investigated cell survival. We found that MET V1001A, uncleavable by caspases such as MET Ex14 and Triple mutants, displays resistance to cell death in response to apoptosis inducer. This suggests that MET Ex14 can promote ligand-independent survival which can be recapitulated by mutation of the juxtamembrane caspase site.

Taken together, analyses in T47D models revealed that MET Ex14 and MET Y1003F mutants share common features including sustained signaling and motility under HGF-stimulation, supported by a common transcriptional program. However, MET Ex14 and MET Y1003F displayed also divergences including a part of their transcriptional program and a ligand-independent survival. Unfortunately, since T47D cells was unable to form tumor, involvement of these common and divergent features were not investigated in the integrated model of *in vivo* tumorigenesis known to involve several biological processes including motility, invasion and survival.

In fact, such *in vivo* approach was performed with the normal epithelial lung cell line 16HBE in which we reconstituted MET Ex14 and MET Y1003 by genome edition. This model confirms that MET Ex14 and Y1003F induced sustain signaling and increase of motility but also revealed a significant advantage for MET Ex14. In addition, only MET Ex14 was able to promote invasion in Matrigel-coated transwell. Finally, while MET Ex14 cells favor tumor growth in immune-deficient mice expressing HGF, MET Y1003F induced tumor growth with a lower frequency and smaller size, demonstrating that under HGF-stimulation tumorigenic potential of MET Ex14 is much higher that MET Y1003F mutation.

Taken together, our study demonstrates that transforming responses triggered by MET Ex14 in epithelial cell models is only partially recapitulated by mutations of the individual regulatory sites. Nevertheless, even if we rarely detected mutations at these sites, including Y1003 and S985, their alterations could be involved in tumorigenesis, since they can favor, to a certain extent, HGF-dependent epithelial cell responses. Therefore, the rare patients harboring such mutations could benefit of targeted therapies. Besides, the unique property of MET exon 14 to promote tumor growth in experimental model could explain the higher rate of mutations inducing exon 14 skipping and give a strong rational for MET Ex14 targeting in NSCLC.

References

1. Yamaoka T, Kusumoto S, Ando K, Ohba M, Ohmori T. Receptor Tyrosine Kinase-Targeted Cancer Therapy. *International journal of molecular sciences*. 2018;19.
2. Skoulidis F, Heymach JV. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nature reviews*. 2019;19:495–509.
3. Politi K, Herbst RS. Lung cancer in the era of precision medicine. *Clin Cancer Res*. 2015;21:2213–20.
4. Ponzetto C, Giordano S, Peverali F, Della Valle G, Abate ML, Vaula G, et al. c-met is amplified but not mutated in a cell line with an activated met tyrosine kinase. *Oncogene*. 1991;6:553–9.
5. Watermann I, Schmitt B, Stellmacher F, Muller J, Gaber R, Kugler C, et al. Improved diagnostics targeting c-MET in non-small cell lung cancer: expression, amplification and activation? *Diagn Pathol*. 2015;10:130.
6. Yang Y, Wu N, Shen J, Teixido C, Sun X, Lin Z, et al. MET overexpression and amplification define a distinct molecular subgroup for targeted therapies in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2015;
7. 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 research*. 1997;57:5391–8.
8. 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. *Nature genetics*. 1997;16:68-73.
9. Duplaquet L, Kherrouche Z, Baldacci S, Jamme P, Cortot AB, Copin MC, et al. The multiple paths towards MET receptor addiction in cancer. *Oncogene*. 2018;37:3200–15.
10. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:915–25.
11. Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*. 1995;376:768-71.
12. 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.
13. 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;373:702–5.
14. Maina F, Hilton MC, Ponzetto C, Davies AM, Klein R. Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes Dev*. 1997;11:3341-50.
15. 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;101:10608–13.
16. Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgerirsson 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;101:4477–82.

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. *The Journal of cell biology*. 2007;177:151–62.
18. 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 genetics*. 2013;9:e1003228.
19. The cancer genome atlas research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014;511:543–50.
20. Descarpentries C, Lepretre F, Escande F, Kherrouche Z, Figeac M, Sebda S, et al. Optimization of Routine Testing for MET Exon 14 Splice Site Mutations in NSCLC Patients. *J Thorac Oncol*. 2018;13:1873–83.
21. 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;5:850–9.
22. 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.
23. Gandino L, Longati P, Medico E, Prat M, Comoglio PM. Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269:1815-20.
24. Nakayama M, Sakai K, Yamashita A, Nakamura T, Suzuki Y, Matsumoto K. Met/HGF receptor activation is regulated by juxtamembrane Ser985 phosphorylation in hepatocytes. *Cytokine*. 2013;62:446–52.
25. Tulasne D, Deheuninck J, Lourenco FC, Lamballe F, Ji Z, Leroy C, et al. Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage. *Mol Cell Biol*. 2004;24:10328–39.
26. Foveau B, Leroy C, Ancot F, Deheuninck J, Ji Z, Fafeur V, et al. Amplification of apoptosis through sequential caspase cleavage of the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ*. 2007;14:752–64.
27. 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.
28. Duplaquet L, Leroy C, Vinchent A, Paget S, Lefebvre J, Vanden Abeele F, et al. Control of cell death/survival balance by the MET dependence receptor. *eLife*. 2020;9.
29. 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. *Molecular cell*. 2001;8:995-1004.
30. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:29565–71.
31. Abella JV, Peschard P, Naujokas MA, Lin T, Saucier C, Urbe S, et al. Met/Hepatocyte growth factor receptor ubiquitination suppresses transformation and is required for Hrs phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 2005;25:9632–45.

32. Paik P, Cortot A, Felip E, Sakai H, Mazieres J, Horn L, et al. A phase II trial of tepotinib in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring MET alterations: The VISION study. *Ann Oncol*. 2020;30 Suppl 2:ii66.
33. Guernet A, Mungamuri SK, Cartier D, Sachidanandam R, Jayaprakash A, Adriouch S, et al. CRISPR-Barcoding for Intratumor Genetic Heterogeneity Modeling and Functional Analysis of Oncogenic Driver Mutations. *Molecular Cell*. 2016;63:526–38.
34. Descarpentries C, Leprêtre F, Escande F, Kherrouche Z, Figeac M, Sebda S, et al. Optimization of Routine Testing for MET Exon 14 Splice Site Mutations in NSCLC Patients. *Journal of Thoracic Oncology*. 2018;13:1873–83.
35. Champagnac A, Bringuier P-P, Barritault M, Isaac S, Watkin E, Forest F, et al. Frequency of MET exon 14 skipping mutations in non-small cell lung cancer according to technical approach in routine diagnosis: results from a real-life cohort of 2,369 patients. *J Thorac Dis*. 2020;12:2172–8.
36. Miao YL, Xu QQ. MET Y1003S point mutation shows sensitivity to crizotinib in a patient with lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2019;130:84–6.
37. Deheuninck J, Goormachtigh G, Foveau B, Ji Z, Leroy C, Ancot F, et al. Phosphorylation of the MET receptor on juxtamembrane tyrosine residue 1001 inhibits its caspase-dependent cleavage. *Cell Signal*. 2009;21:1455–63.
38. Menyhárt O, Harami-Papp H, Sukumar S, Schäfer R, Magnani L, Barrios O de, et al. Guidelines for the selection of functional assays to evaluate the hallmarks of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2016;1866:300–19.
39. Tanimura S, Asato K, Fujishiro S, Kohno M. Specific blockade of the ERK pathway inhibits the invasiveness of tumor cells: down-regulation of matrix metalloproteinase-3/-9/-14 and CD44. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304:801–6.
40. Genersch E, Hayess K, Neuenfeld Y, Haller H. Sustained ERK phosphorylation is necessary but not sufficient for MMP-9 regulation in endothelial cells: involvement of Ras-dependent and -independent pathways. *J Cell Sci*. 2000;113 Pt 23:4319–30.
41. Yang C-Q, Li W, Li S-Q, Li J, Li Y-W, Kong S-X, et al. MCP-1 stimulates MMP-9 expression via ERK 1/2 and p38 MAPK signaling pathways in human aortic smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem*. 2014;34:266–76.
42. Reungwetwattana T, Liang Y, Zhu V, Ou S-HI. The race to target MET exon 14 skipping alterations in non-small cell lung cancer: The Why, the How, the Who, the Unknown, and the Inevitable. *Lung Cancer*. Elsevier; 2017;103:27–37.
43. Van Der Steen N, Giovannetti E, Pauwels P, Peters GJ, Hong DS, Cappuzzo F, et al. cMET Exon 14 Skipping: From the Structure to the Clinic. *J Thorac Oncol*. 2016;11:1423–32.
44. Chu QS. Targeting non-small cell lung cancer: driver mutation beyond epidermal growth factor mutation and anaplastic lymphoma kinase fusion. *Ther Adv Med Oncol*. 2020;12:1758835919895756.
45. Lee J-H, Gao CF, Lee CC, Kim MD, Woude GFV. An alternatively spliced form of Met receptor is tumorigenic. *Experimental and molecular medicine*. 2006;38:565–73.
46. 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 research*. 2006;66:283–9.

47. 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;90:590–7.
48. Lu X, Peled N, Greer J, Wu W, Choi P, Berger AH, et al. *MET* Exon 14 Mutation Encodes an Actionable Therapeutic Target in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Research*. 2017;77:4498–505.
49. 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* [Internet]. 1999 [cited 2016 Nov 16];18. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=09509232&AN=8918170&h=AYqmNOEvV3gajEPXEKHOcBN%2BPfT6bJWHy8d3QsLcUefAk%2FHsfEtanzWGe1EXZEv0tJKH9Sgmt%2Fyps%2Bwh4OUfdsw%3D%3D&crl=c>
50. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, et al. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21.

Figure Comments

Figure 1: MET mutants and downstream signaling pathways activation in T47D cell models.

(A) Schematic representation of the WT and mutated MET stably expressed in T47D cells. (B, C) T47D cells were incubated overnight with serum-free medium and stimulated or not 30 min with 10 and 30 ng/ml HGF (B) or 30 min, 3h and 8h with 30 ng/ml HGF. (C) prior to cell lysis. Expression and phosphorylation of MET, AKT and ERK were determined by western blotting with the indicated antibodies. Loading of same amount of protein for each extract was assessed by ERK expression. The positions of prestained molecular weight markers are indicated. Arrow heads indicate the positions of MET, AKT, ERK2 and their phosphorylated forms.

Figure 2: Transcriptional programs induced by the mutated forms of MET. Gene expression was determined by Affymetrix microarray with total RNA extracts of T47D cells treated or not 24h with 30 ng/ml HGF in serum-free medium. (A) Unsupervised clustering analysis of transcriptional responses of T47D cells treated or not with HGF. (B) Representation in Venn diagram of significant regulated genes in response to HGF stimulation by T47D MET WT, MET Ex14 and MET Y1003F cells (Fold-change ≥ 2 or ≤ -2 ; p-value < 0.05). (C) Heatmap of relative gene expression, upregulated (red) and downregulated (green), corresponding to genes associated to hallmarks of cancer for T47D cells treated or not with HGF.

(n=3 for each condition; n=2 for MET S985A + HGF).

Figure 3: Downregulation of MMP expression by MEK inhibitor. (A) T47D cell lines were treated or not 24h with 30 ng/ml HGF in serum-free medium and RNA were extracted to determine MMP1, 3 and 13 gene expressions by RT-qPCR (n=3; mean \pm S.D.). (B) T47D cells were incubated overnight with serum-free medium pretreated 5h with 10 μ M U0126 and stimulated or not 30 min with 30 ng/ml HGF prior to cell lysis. Expression and phosphorylation of MET and ERK were determined by western blotting with the indicated antibodies. Loading of same amount of protein for each extract was assessed by ERK and GAPDH expressions. The positions of prestained molecular weight markers are indicated. Arrow heads indicate the positions of MET, AKT, ERK2 and their phosphorylated forms. (C) MMP expression were determined by RT-qPCR in HGF-stimulated T47D cells pretreated or not 1h with 10 μ M MEK inhibitor U0126 and stimulated by HGF at 30ng/ml during 24h (n=3; mean \pm S.D.).

Figure 4: Migration and invasion triggered by HGF-stimulated MET mutants. (A) T47D stably expressing MET were seeded at low density. The next day, the cells were stimulated 48h with 30 ng/ml HGF. Cell islet were then fixed and stained. (B) To quantify cell scattering, cell density of at least 15

islets were calculated in inverse function ($1/\text{density}$) and reported in boxplots. (C) Cell migration was determined by transwell assay. T47D cells were labeled by DiIC12 and seeded into the upper light-tight chamber and the lower chamber was next filled with medium containing or not HGF. Migration of fluorescent cells through 8 μm pores was assessed during time by fluorescence measure from well bottom. Data are expressed as relative mean migration from start experiment for each condition ($n=3$; mean \pm S.D; representative of two experiments).

Figure 5: Survival response triggered by the MET mutants. (A) T47D cell extracts were incubated with purified caspase-3. Samples were then analyzed by Western blotting using antibody against MET. MCF10A cell treated with staurosporine (STS, 1 μM) extracts was used as positive control. Loading of same amount of protein for each sample was assessed by GAPDH expression. (B) T47D cells were preincubated with specific caspase-3/7 green apoptosis reagent and then treated with staurosporine (STS, 1 μM) for induction of apoptosis. Real-time increase of caspase-3/7 activation was measured by green fluorescent intensity assessed every hour during 12h. Data are expressed as relative mean green fluorescent intensity from start experiment ($n=3$; mean \pm S.D).

Figure 6: Signaling pathways, migration and invasion triggered by 16HBE cells expressing mutated MET. (A) 16HBE cells expressing WT MET (MET YY), MET Ex14 and MET Y1003F cells were incubated overnight with serum-free medium and stimulated or not 30 min, 3h and 8h with 30 ng/ml HGF prior to cell lysis. Expression and phosphorylation of MET, AKT and ERK were determined by western blotting with the indicated antibodies. Loading of same amount of protein for each extract was assessed by ERK expression. (B) 16HBE cells were seeded at low density. The next day, the cells were stimulated 48h with 20 ng/ml HGF. Cell islet were then fixed and stained. (C), (D) Cell migration (C) and invasion (D) were determined by transwell assay and particularly with coated chamber with Matrigel matrix for invasion. 16HBE cells were labeled by DiIC12 and seeded into the upper light-tight chamber and the lower chamber was next filled with medium containing or not HGF. Migration or invasion of fluorescent cells through 8 μm pores was assessed during time by fluorescence measure from well bottom. Data are expressed as relative mean migration from start experiment for each condition ((C) $n=4$ from two independent experiments; mean \pm S.D; (D) $n=3$; mean \pm S.D; representative of two experiments).

Figure 7: Tumor growth of HGF-stimulated 16HBE cells expressing MET mutants. 16HBE cells expressing MET WT, MET Ex14 and MET Y1003 were injected in NSG KI-huHGF mice. Tumors size 85 days after injection were measured. Frequency and mean size are indicated.

Figure S1: MET receptor expression determined by qRT-PCR, immunofluorescence, flow cytometry and western blot in T47D cell model. (A) Relative expression of *MET* transcripts were measured by RT-qPCR in T47D cells. *B2M* gene expression was used for normalization. (B) Plasma membrane MET expression was assessed by flow cytometry with MET antibody directed against the extracellular domain of the receptor. (C) To validate MET expression in transfected T47D cells, cells were fixed and immunofluorescence staining was performed with anti-MET antibody. Nuclei were stained with Hoechst. Representative picture is shown. (D) T47D cells were incubated overnight with serum-free medium and stimulated or not 30 min with 30 ng/ml HGF prior to cell lysis. Expression and phosphorylation of MET, AKT and ERK were determined by western blotting with the indicated antibodies. Loading of same amount of protein for each extract was assessed by ERK expression. The positions of prestained molecular weight markers are indicated. Arrow heads indicate the positions of MET, AKT, ERK2 and their phosphorylated forms.

Figure S2: Heat map of genes differentially expressed in response to HGF in T47D cell lines expressing the MET mutants. T47D cells expressing the indicated MET mutants were stimulated or not 24h with 30ng/ml of HGF. mRNA were extracted and gene expressions were determined by DNA microarray. Heatmap represent the genes significantly differentially expressed (threshold p value-adj < 0.05 and absolute Fold Change > 2) between the experimental conditions ($n=3$ for each condition; $n=2$ for MET S985A + HGF). The colored scale bar represents relative gene expression changes scaling.

Figure S3 : Selected examples genes differentially regulated in T47D cell lines expressing the MET mutants in response to HGF. Selection from the significantly deregulated gene ontology “Activating invasions and metastasis” of genes expression (intensity in \log_2) of MMP1, 3, 9, 10, 13.

Figure S4: MET mutant analyses from the 16HBE cell lines determined by high throughput Sequencing, RT-qPCR, western blot and flow cytometry. (A) Introduction of silent barcode mutations (16HBE MET ctrl or WT), deletion impacting splice donor site (MET Ex14) or Y1003 site with barcode mutations (c. TAC > TTC, MET Y1003F) on once of allele for each clones was validated by next-generation sequencing. (B) Melting curve of the amplicons covering the MET exon 14 generated by fluorescence reverse-transcription PCR were analyzed to determined presence or not of the exon 14 of the engineered 16HBE cells. cDNA from cell lines expressing a characterized MET-exon-14-skipping alteration (Hs746T) or a wild-type MET (EBC1 cells) were used as controls. (C) 16HBE cells were incubated overnight with serum-free medium and stimulated or not 30 min with 30 ng/ml HGF prior to cell lysis. Expression and phosphorylation of MET, AKT and ERK were determined by western blotting with the indicated antibodies. Loading of same amount of protein for each extract was assessed by

ERK expression. The positions of prestained molecular weight markers are indicated. Arrow heads indicate the positions of MET, AKT, ERK2 and their phosphorylated forms. (D) Plasma membrane MET expression was assessed by flow cytometry with MET antibody directed against the extracellular domain of the receptor.

Figure S5: MET WT and MET Ex14 stability in response to HGF. 16HBE cells were incubated overnight with serum-free medium and treated with 75 $\mu\text{g/ml}$ of cycloheximide (CHX) and 30 ng/ml HGF for the indicated time prior to cell lysis. Expression and phosphorylation of MET were determined by western blotting with the indicated antibodies. Loading of same amount of protein for each extract was assessed by GAPDH expression. The positions of prestained molecular weight markers are indicated. Arrow heads indicate the positions of MET and its phosphorylated forms.

Table 1: Molecular alterations affecting MET exon 14 among 2808 NSCLC patients.

Molecular alterations localization from 5' to 3' end	Recurrence (n=71)	Expected consequences
Exon 14 acceptor site	27/71 (38%)	Exon 14 skipping
Exon 14 c.2966A>G	1/71	p.Tyr971Cys
Exon : 14 c.2990A>G	1/71	His979Arg
Exon : 14 c.2978_3010del	1/71	Del Val975_Ser985
Exon 14 c.3008G>C	1/71	Ser985Thr
Exons 14 c.3061T>A	1/71	Tyr1003Asn
Exon 14 donor site	39/71 (54.9%)	Exon 14 skipping

Supplementary methods

Table S1 : Primers used for RT-qPCR

<i>MET</i>	F TTTCAAATGGCCACGGGACAACACA R TGGGCTGGGGTATAACATTCAAGA
<i>MMP1</i>	F GAGCAAACACATCTGAGGTACAGGA R TTGTCCCGATGATCTCCCCTGACA
<i>MMP3</i>	F GATCTCTTCATTTTGGCCATCTCTTC R CTCCAGTATTTGTCCTCTACAAAGAA
<i>MMP13</i>	F AGGAAACCAGGTCTGGAGATATGAT R CCAATTCCTGGGAAGTCTTCTTCT
<i>B2M</i>	F GCTGGCGGGCATTCTGAAG R TGCTGGATGACGTGAGTAAACCTG
<i>GAPDH</i>	F AAGGTGGTGAAGCAGGCGT R GAGGAGTGGGTGTCGCTGTT

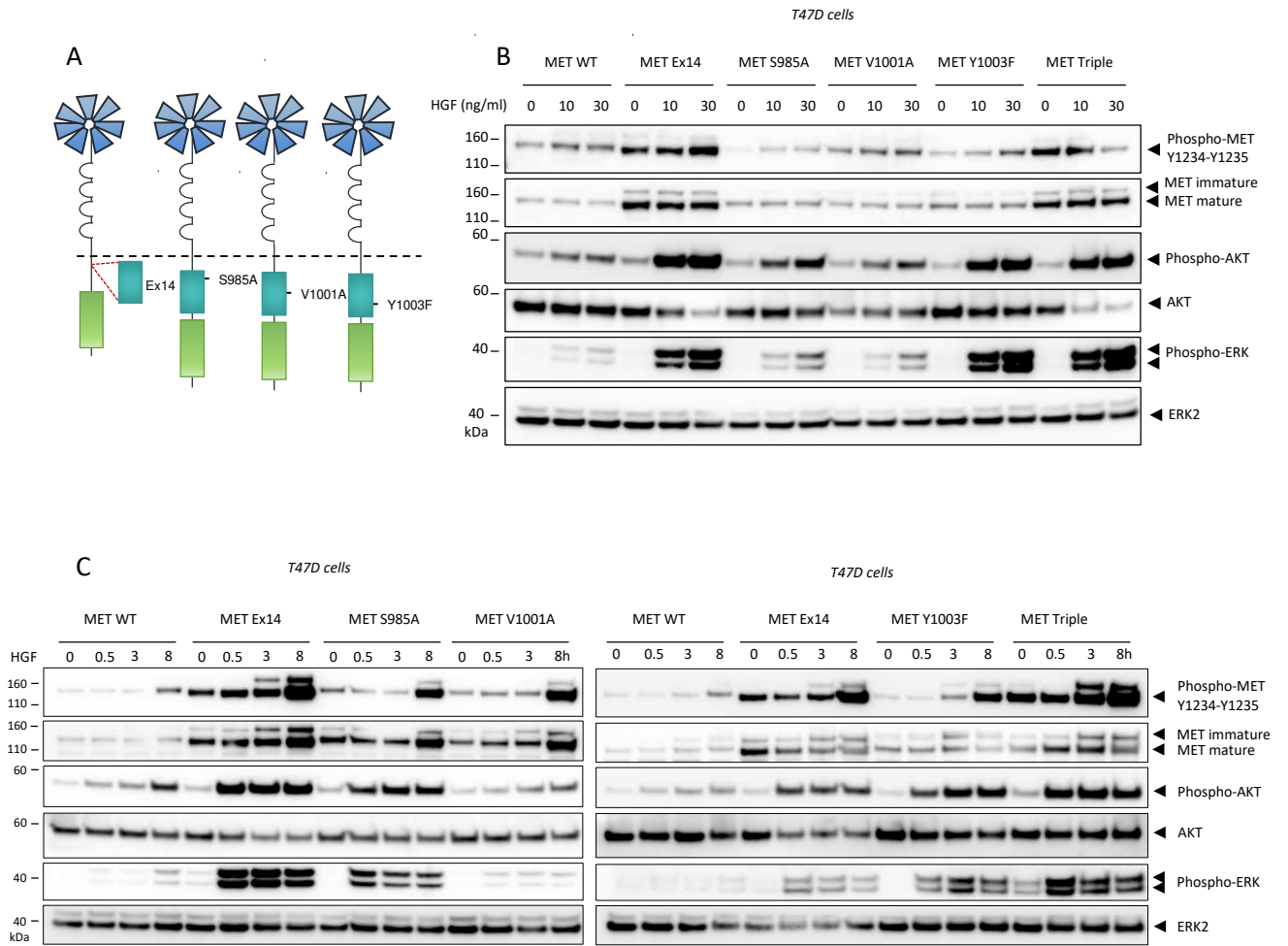
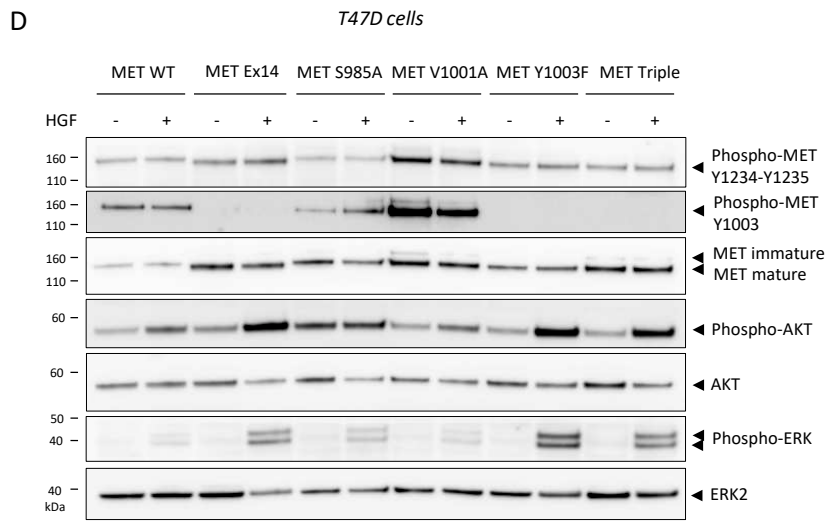
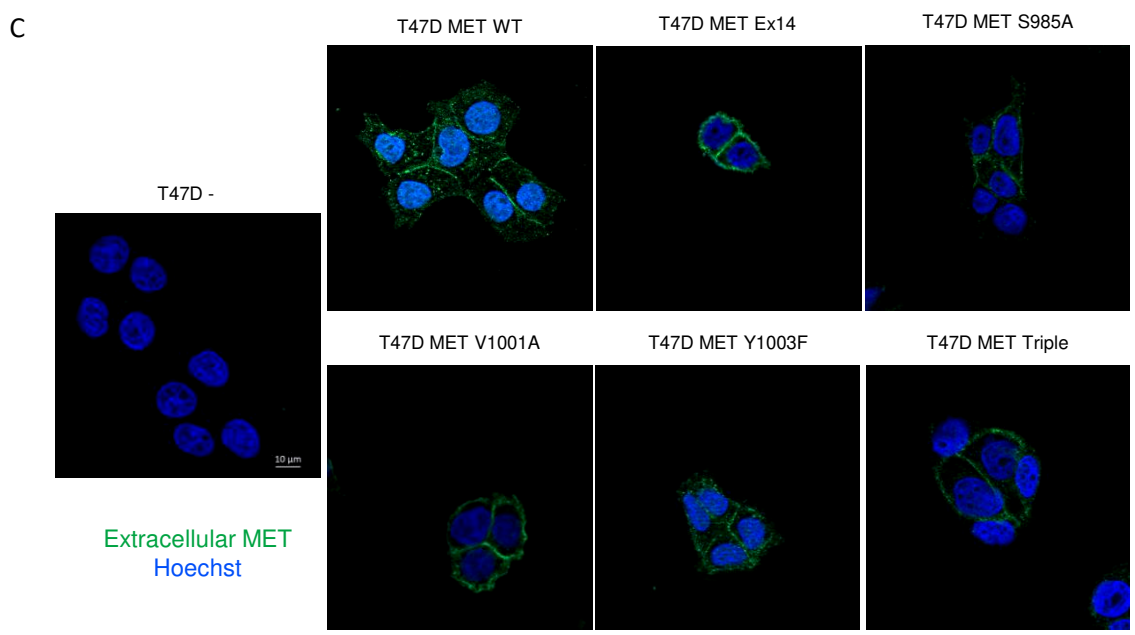
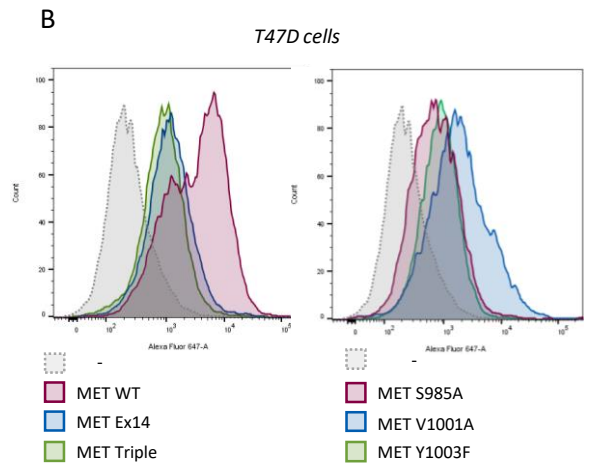
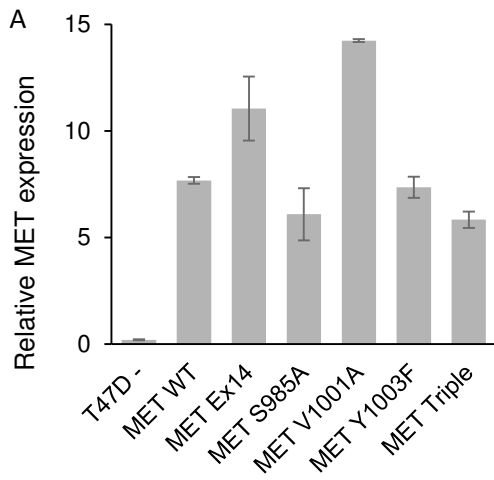


Figure 1



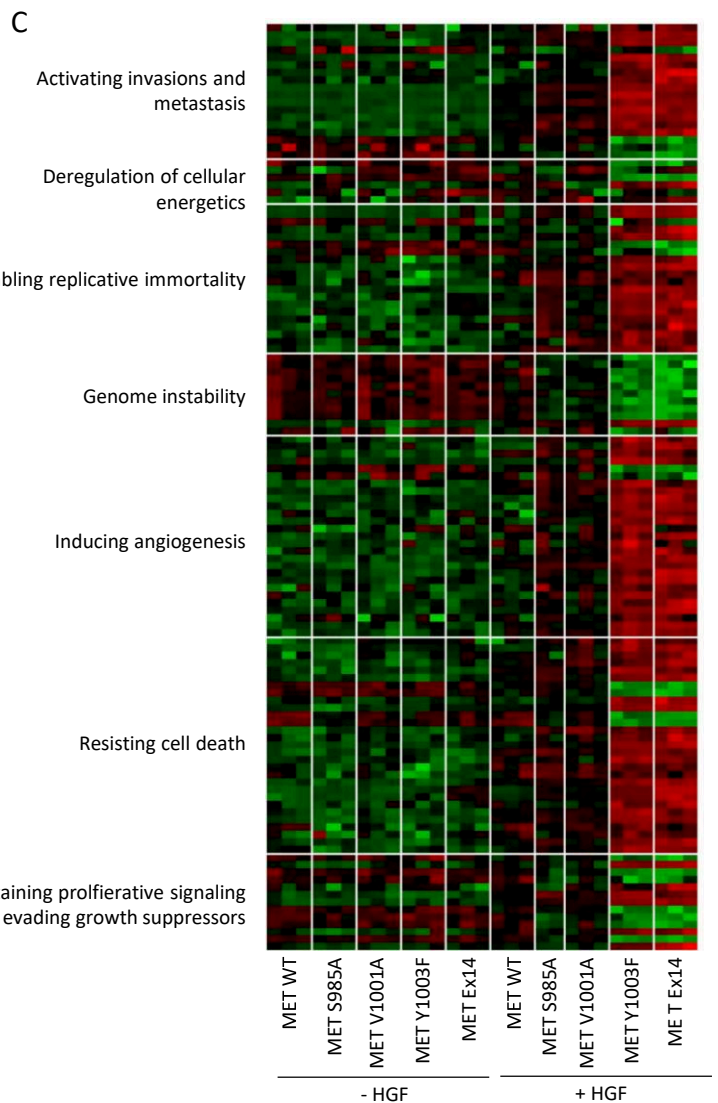
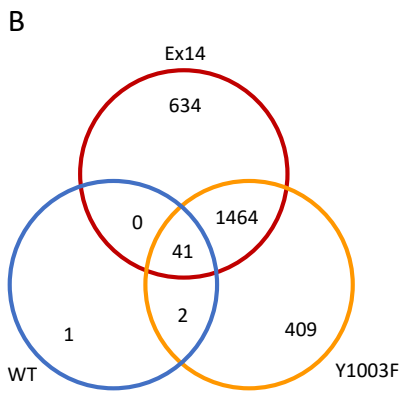
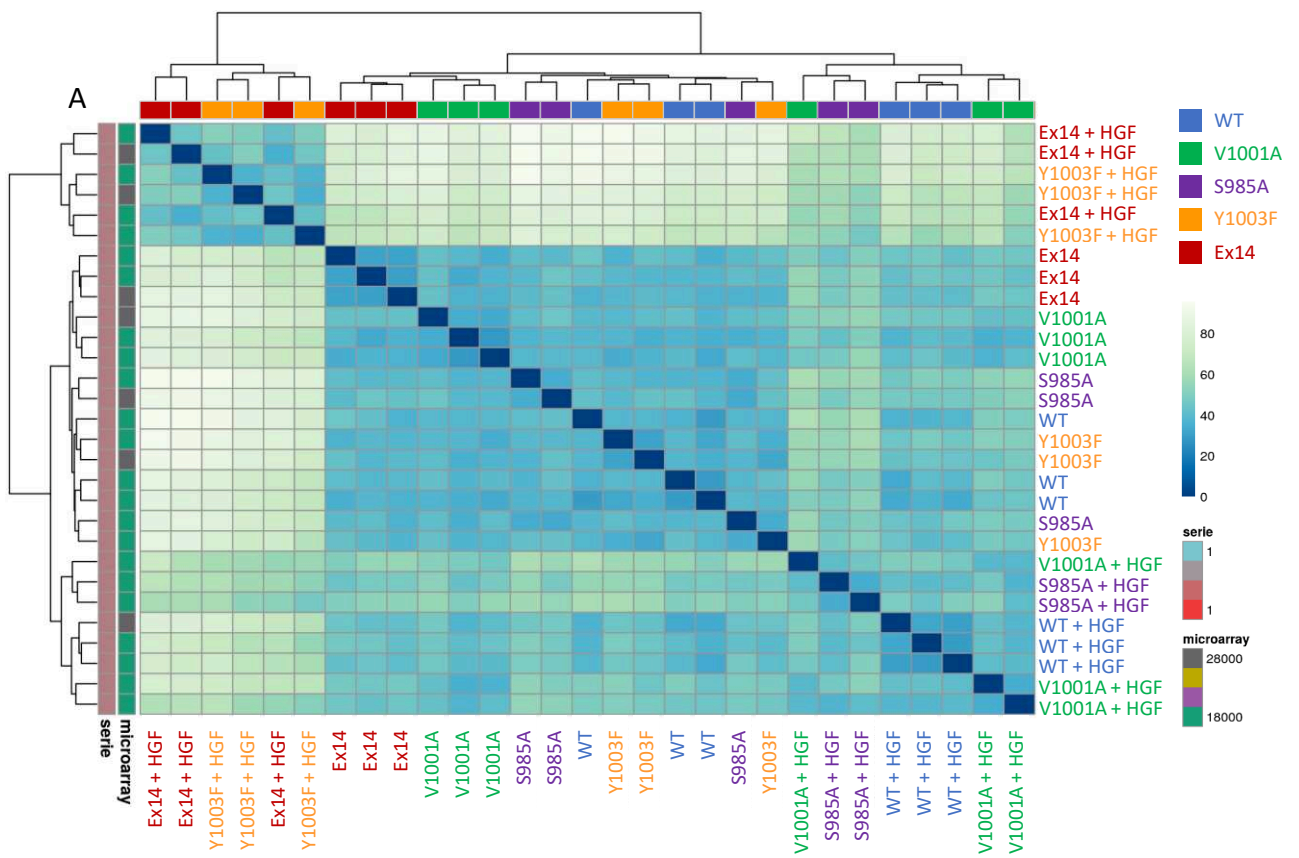
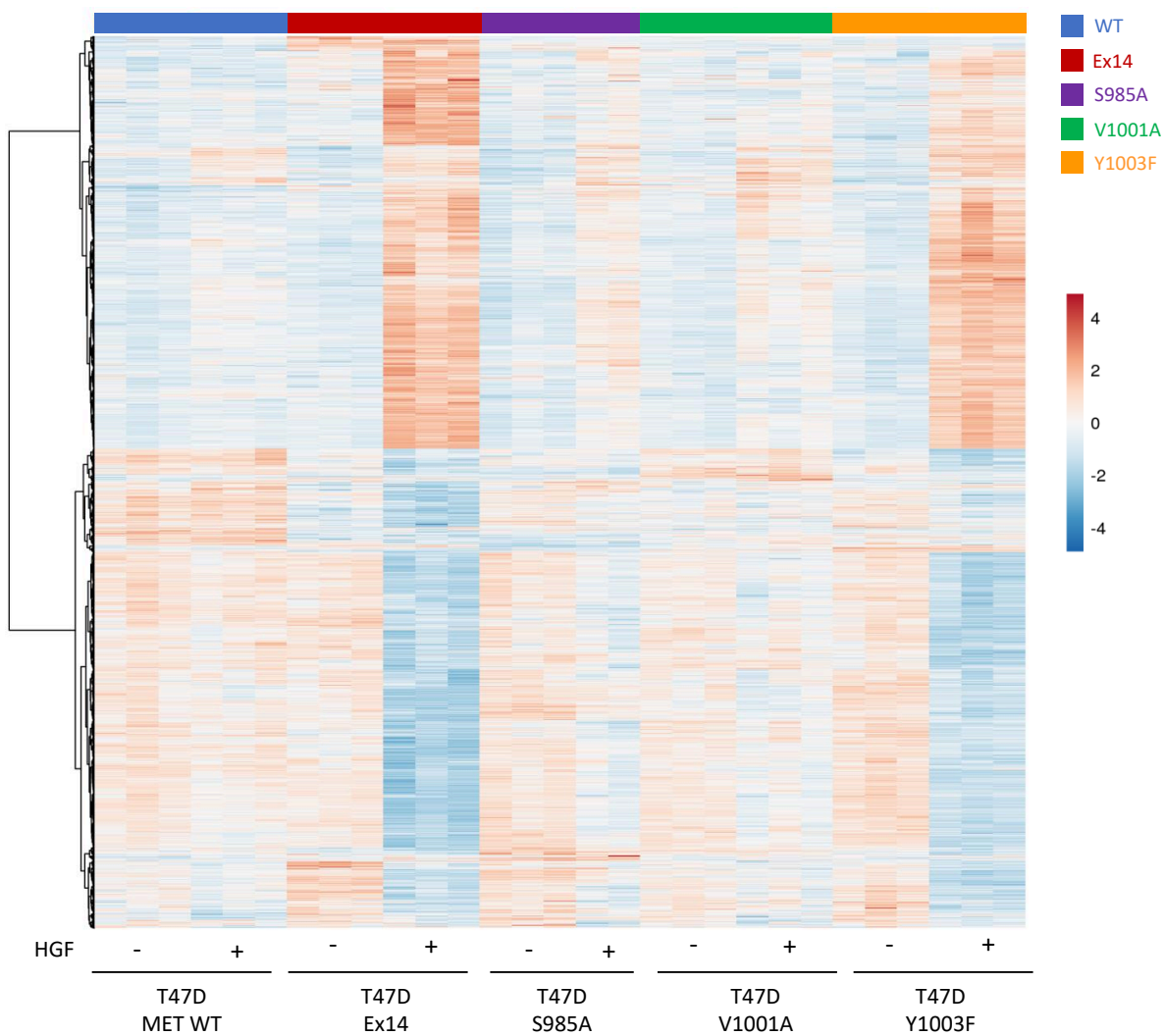
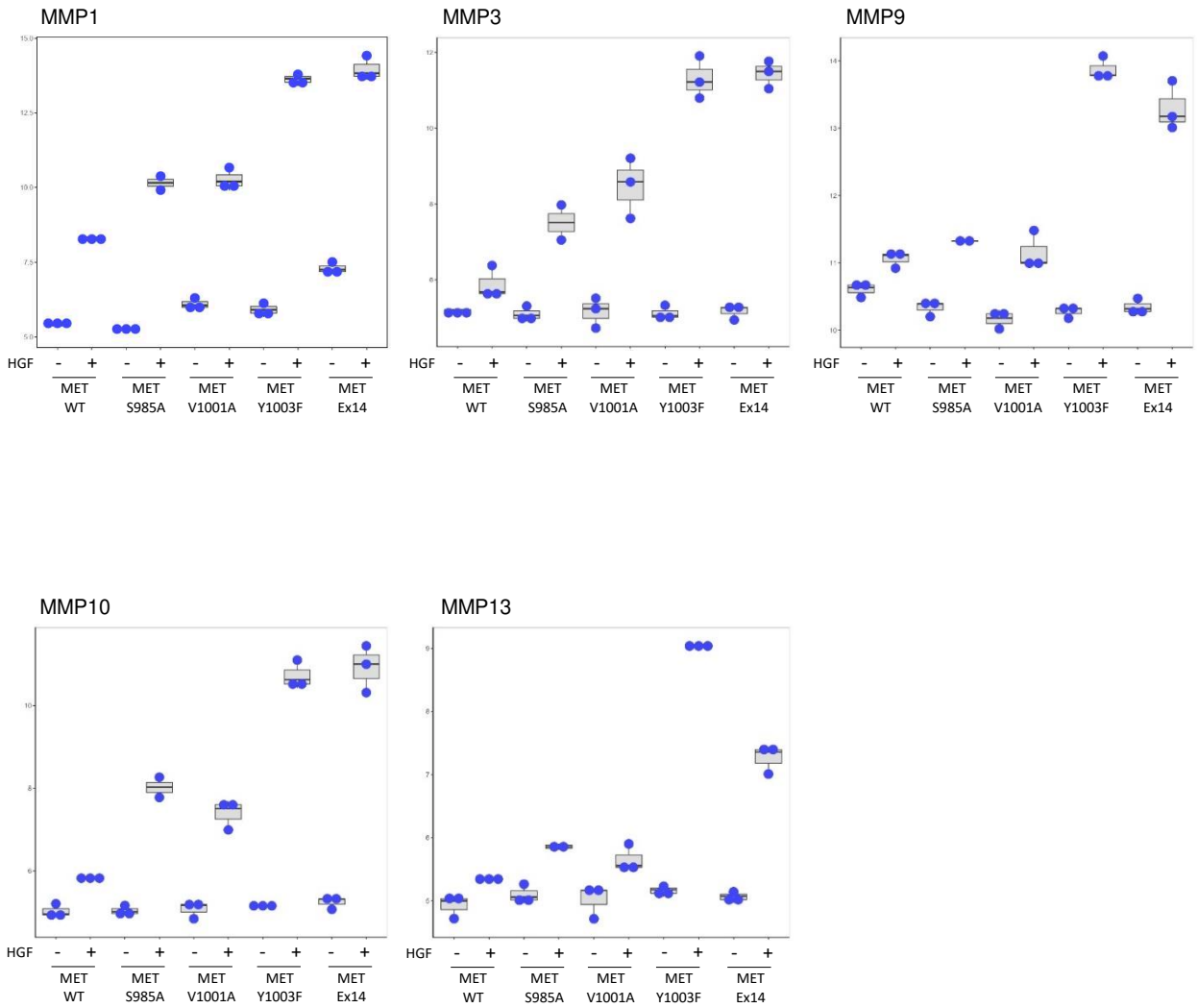


Figure 2





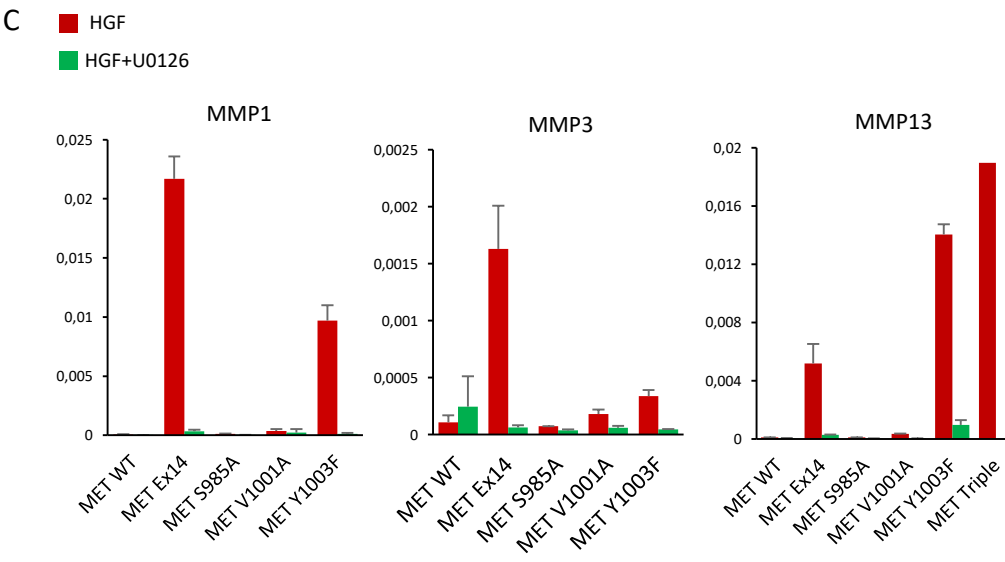
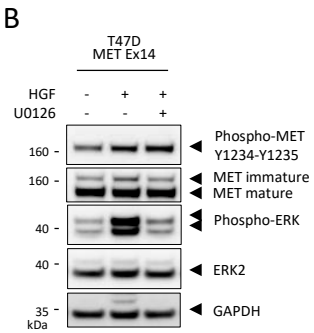
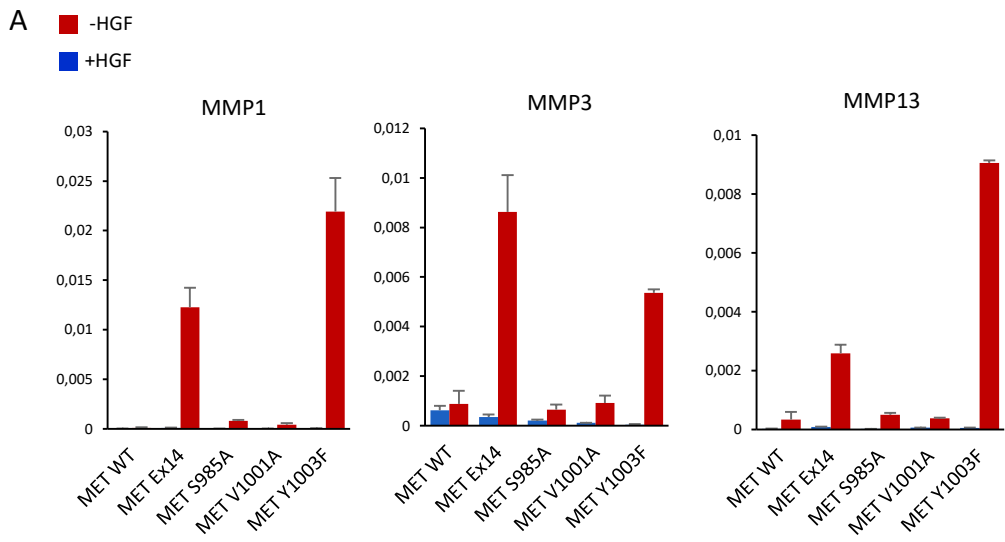


Figure 3

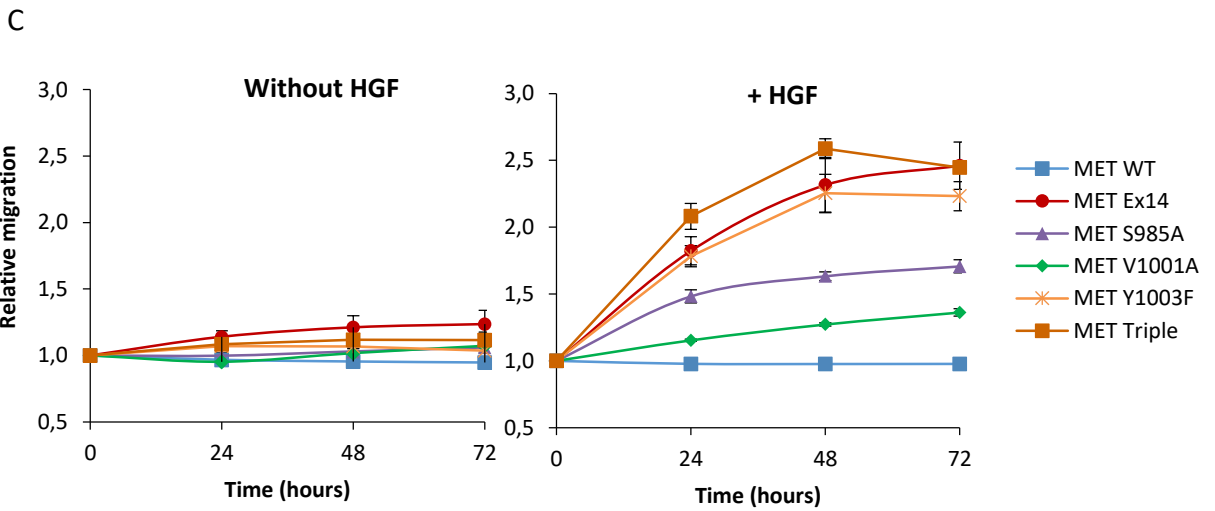
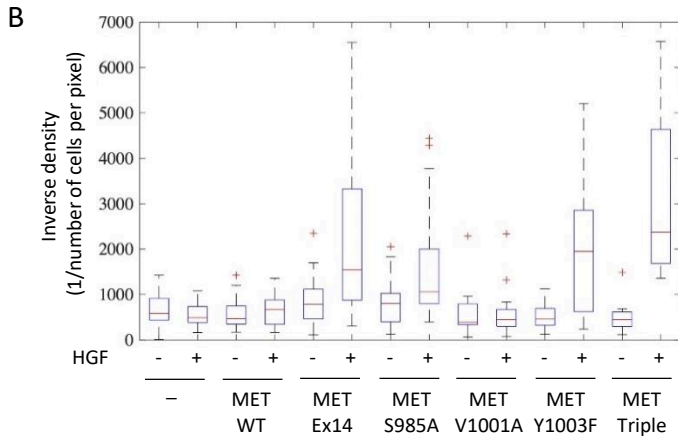
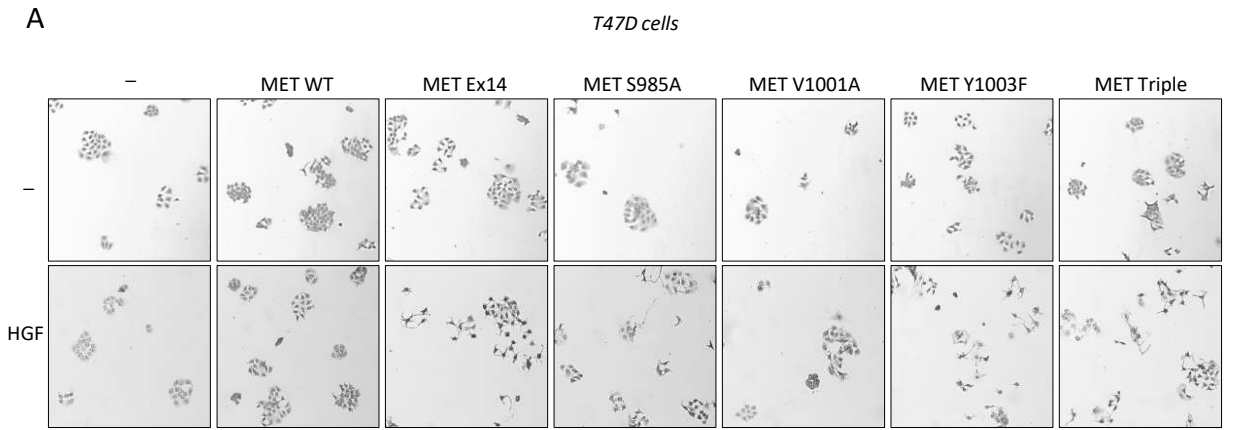


Figure 4

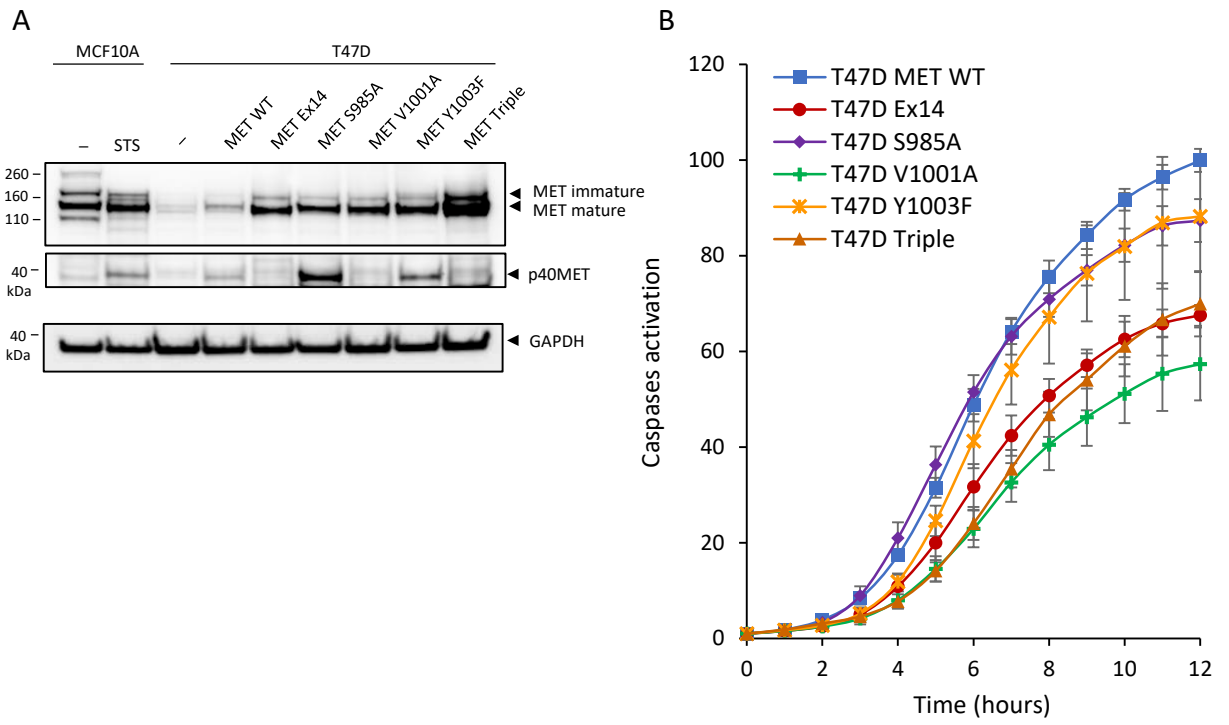


Figure 5

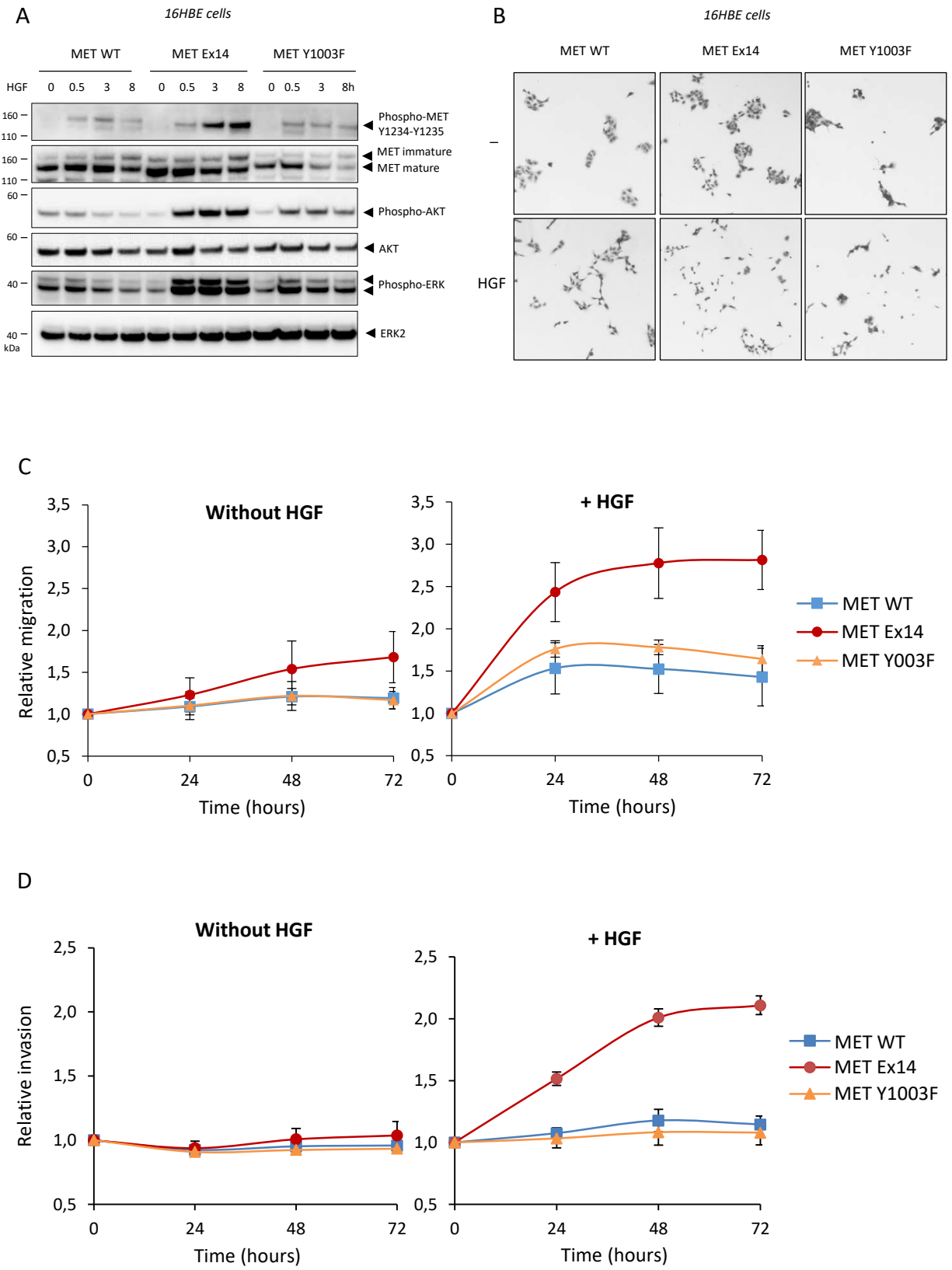
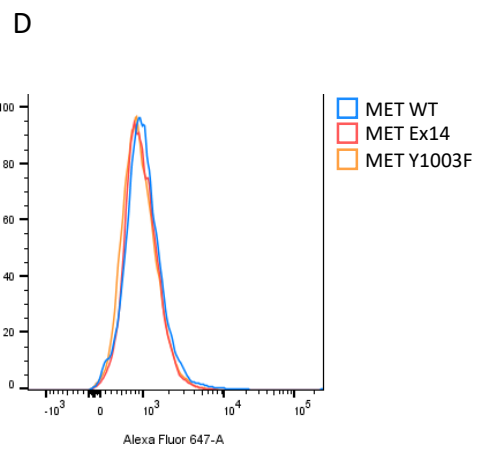
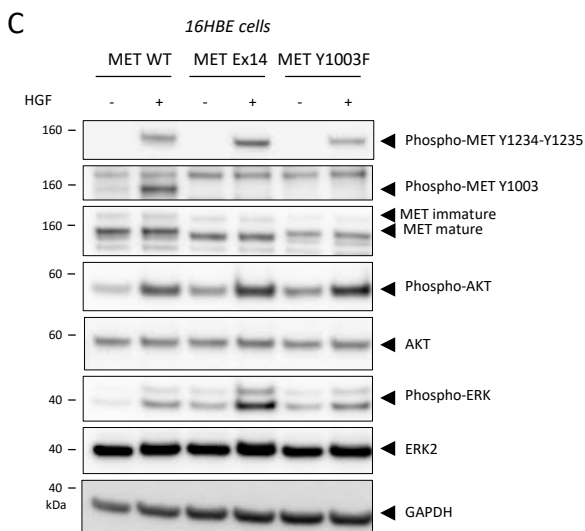
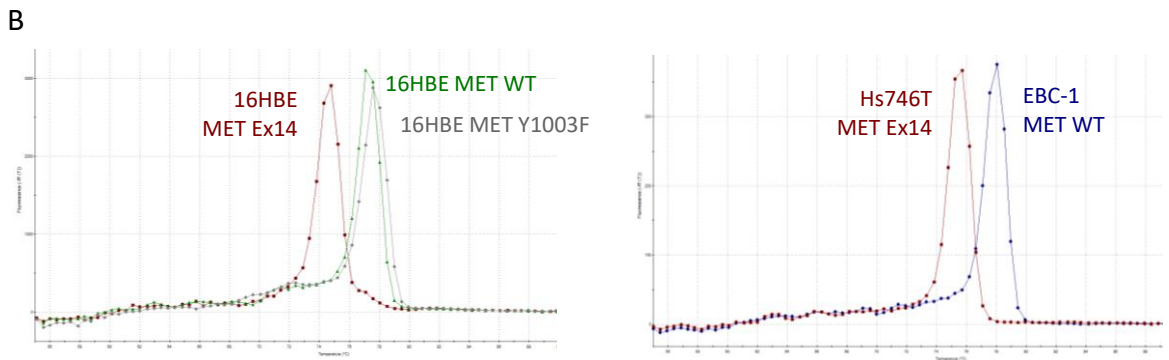
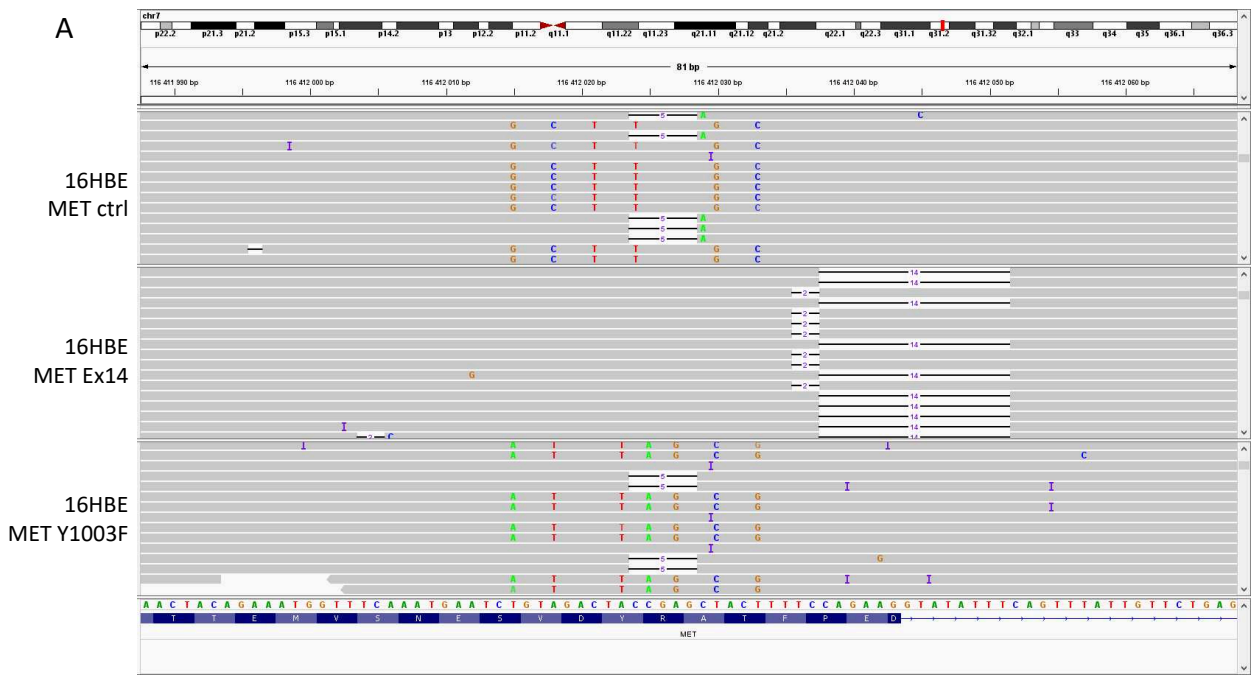
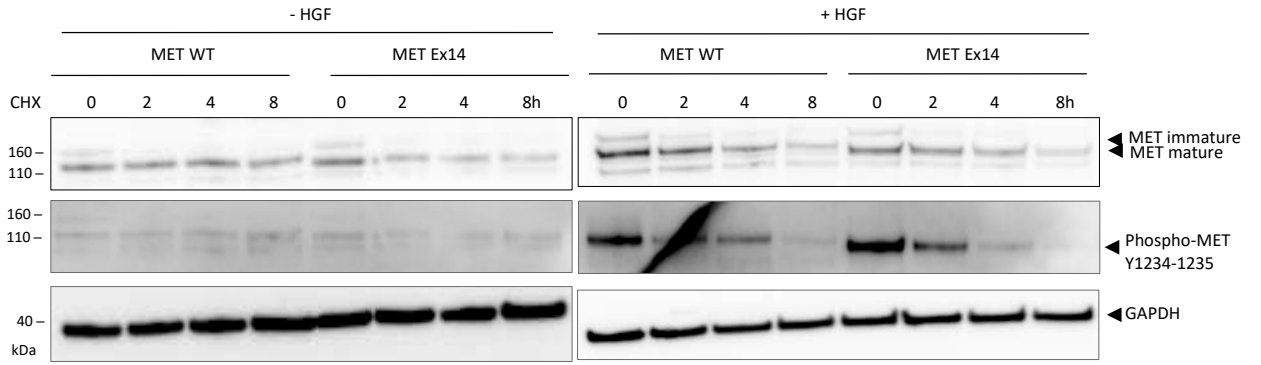


Figure 6



16HBE cells



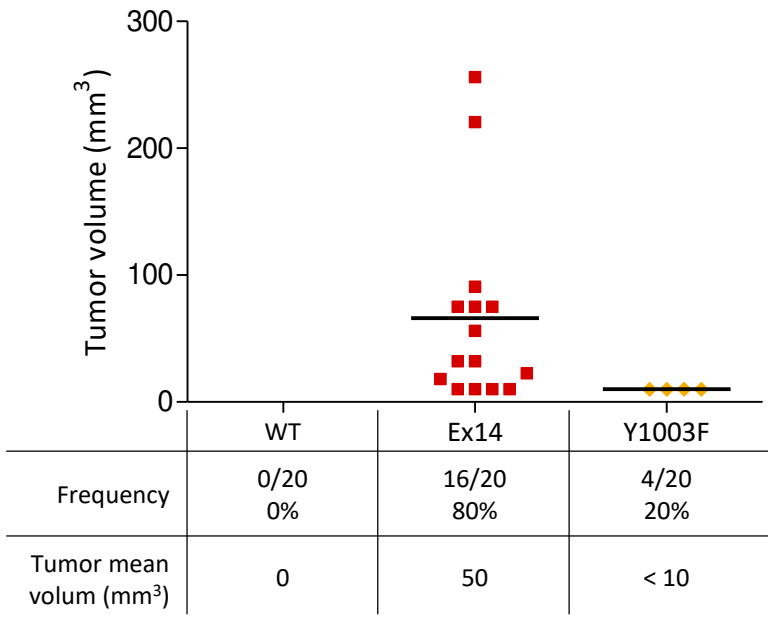


Figure 7

Discussion

I. Modèles cellulaires

Afin de mieux caractériser les mécanismes d'activation du récepteur MET ex14 et face à un manque évident de modèles adéquats, nous avons établi deux modèles cellulaires différents présentant chacun des avantages mais également des limites.

Lignées T47D par expression exogène

Dans un premier temps, nous avons mis en place des lignées exprimant de manière ectopique la version sauvage du récepteur MET, le récepteur dépourvu d'exon 14 ou muté sur chacun ou la totalité des sites régulateurs décrits au sein du domaine juxtamembranaire (S985A, V1001A, Y1003F). Pour cela, nous avons réalisé des transfections stables de ces différentes versions du récepteur dans la lignée épithéliale mammaire tumorale T47D puisque cette lignée cellulaire présente l'avantage rare de ne pas, ou très peu, exprimer le récepteur MET. Cette absence d'expression endogène a permis de réaliser une sélection des populations de cellules exprimant le récepteur par cytométrie en flux par l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire de MET. Puisque cette technique est relativement facile à mettre en place, nous avons ainsi pu établir jusqu'à six lignées isogéniques issues des T47D.

Bien qu'elles nous aient permis d'obtenir plusieurs réponses à nos hypothèses, ce modèle cellulaire présente différentes limites. D'abord, nous avons observé une phosphorylation basale de MET sur les résidus Y1234-Y1235 du domaine kinase et la stimulation du récepteur par l'HGF ne semble pas augmenter cette phosphorylation. L'expression exogène du récepteur pourrait mimer une surexpression à l'origine de cette phosphorylation basale. En revanche, la stimulation des cellules par l'HGF permet bien d'activer plusieurs voies de signalisations majeures telle que les voies PI3K-AKT et MAPK-ERK mais aussi d'induire différentes réponses biologiques telle que la migration. Il semblerait donc que la phosphorylation des résidus Y1234-Y1235 ne reflète pas l'activation complète du récepteur. Par ailleurs, l'expression protéique totale du récepteur dans la lignée T47D MET sauvage semble inférieure à celle dans les autres lignées T47D MET alors que l'expression membranaire du récepteur, détectée par cytométrie en flux, est supérieure dans la lignée T47D MET sauvage. Les causes à l'origine de ce phénomène sont encore inconnues pour nous. Nous avons établi une autre population de cellules T47D MET sauvage et testé plusieurs tampons de lyse protéique sans que cela ne permette d'améliorer l'expression protéique totale de MET. Ce fait aurait pu altérer nos résultats mais notre problématique initiale étant de comprendre les mécanismes d'activation du récepteur MET ex14, l'analyse des différents mutants a finalement toujours été réalisée en regard des réponses obtenues par les cellules exprimant le récepteur MET ex14.

Enfin, il est à noter que les cellules T47D sont porteuses d'une mutation de *PIK3CA* (c.3140 A>G, p.H1047R). Présente dans près de 15% des cancers du sein, cette mutation se situe dans le domaine kinase de la protéine et conduit à une augmentation de son activité (AACR Project GENIE Consortium, 2017; Isakoff et al., 2005). La présence de cette mutation n'est pas une limite pour notre étude car elle est présente dans toutes les lignées T47D MET mises en place et elle n'empêche pas le développement de plusieurs réponses biologiques induites par l'HGF. Néanmoins, la présence de cette altération n'a pas permis d'étudier l'implication des sites de régulation dans la formation de sphéroïdes puisqu'il semblerait que cette réponse biologique soit majoritairement dirigée par l'activité de PI3K dans ces lignées. En effet, la lignée T47D est capable de former spontanément des sphéroïdes et ce phénomène n'est pas augmenté lorsque les cellules expriment une version sauvage ou mutée du récepteur et sont stimulées ou non par de l'HGF. Lorsque les cellules sont traitées par le pictilisib, un inhibiteur de PI3K (GDC-0941), la formation de sphéroïdes est quasiment abolie et aucune différence n'est observée entre les différents mutants du récepteur (données non montrées). Cependant, nous avons su tirer parti de cette mutation en l'étudiant dans un contexte de co-altération de la voie PI3K associée au saut de l'exon 14 de MET (voir « Alterations in the PI3K pathway drive resistance to MET inhibitors in NSCLC harboring MET exon 14 skipping mutations », en annexe p. 91).

La limite majeure des lignées T47D est leur faible capacité à former des tumeurs *in vivo*. En effet, l'injection des différentes lignées T47D MET n'a permis le développement que de tumeurs de faibles volumes après plusieurs mois. En outre, la tumorigenèse observée ne semble pas dépendante de l'activité de MET puisque les tumeurs induites par les cellules T47D n'exprimant pas le récepteur sont en moyenne de la même taille que celles exprimant le récepteur sauvage ou muté. De plus, ce phénomène semble également dépendant de l'origine mammaire de ces lignées exprimant des récepteurs hormonaux. En effet, nous avons observé une plus grande fréquence de tumeurs chez les femelles par rapport aux mâles. L'étude de la tumorigenèse étant un point essentiel de notre étude, cette difficulté avec le modèle T47D nous a encouragés à développer un autre modèle cellulaire complémentaire.

Lignées 16HBE par CRISPR-Cas9

En parallèle de la mise en place des cellules T47D MET, nous avons d'abord établi une lignée épithéliale pulmonaire présentant un saut de l'exon 14 de MET à l'aide de la technologie CRISPR-Cas9. Puisque les premiers résultats obtenus avec les lignées T47D MET mettaient en lumière un rôle particulier du site Y1003 et que le développement de lignées par cette technique est plus fastidieux, nous avons ensuite souhaité introduire la mutation Y1003F par édition du génome. Nous avons choisi pour établir ce modèle la lignée épithéliale 16HBE. La mutation du gène *MET* endogène dans cette

lignée non tumorale présente l'avantage d'être plus proche des conditions physiologiques. Cet aspect est notamment représenté par le fait que seules les cellules 16HBE MET ex14 soient capables d'induire le développement de tumeurs par rapport aux 16HBE MET sauvage en xénotreffes murines.

C'est la première fois que l'équipe a utilisé cette technique pour établir des mutations par recombinaison homologue et nous avons pu apprendre auprès de Luca Grumolato la technique de CRISPR-barcoding (DC2N, Rouen). Ces lignées présentent cependant certaines limites également. En premier lieu, l'utilisation de la technologie CRISPR-Cas9 peut induire des effets non spécifiques, effets couramment appelés « off-target ». Bien que nous ayons réalisé une analyse par séquençage NGS ciblé des lignées afin de nous assurer que les oncogènes majoritairement impliqués dans les cancers pulmonaires n'aient pas été modifiés, nous ne pouvons pas assurer qu'il n'existe pas d'altérations dans d'autres régions du génome. Par ailleurs, ces analyses ont révélé que le saut de l'exon 14 sur le clone 16HBE ex14 établi était la conséquence d'une délétion sur le site d'épissage d'un des allèles de *MET* alors que l'autre allèle présente une délétion de deux nucléotides. La perte de ces deux nucléotides conduit à un décalage du cadre de lecture puis à l'apparition d'un codon stop prématuré. Au vue de l'ensemble des analyses que nous avons réalisé, il semblerait que ce codon stop provoque la perte d'expression de cet allèle du gène. La protéine MET détectée est alors la conséquence de l'expression d'une seule copie du gène *MET* muté conduisant au saut de l'exon 14. Pour l'établissement de la lignée 16HBE MET Y1003F, nous avons donc spécifiquement identifié un clone présentant la mutation d'intérêt sur un allèle alors que l'autre allèle est impacté par une délétion de 5 nucléotides aux mêmes conséquences que dans le clone 16HBE ex14. Enfin, pour pallier à l'ensemble de ces limites liées à la technologie CRISPR-Cas9, nous avons en parallèle établi un clone contrôle porteur d'une série de mutations silencieuses dans les mêmes conditions et en utilisant le même ARN guide que celui utilisé pour la mutation Y1003F. Ainsi, nous avons été attentifs à ce que la totalité des clones 16HBE muté sur *MET* utilisés présentent une expression de *MET* hémizygote et similaire entre eux en la validant par plusieurs techniques incluant la cytométrie en flux.

En conclusion, nous avons mis en place deux modèles cellulaires très différents de par leur origine cellulaire mais aussi par la technologie utilisée pour chacun. D'une part, nous avons établi des lignées d'origine mammaire tumorale exprimant stablement une version mutée sur chacun des sites de régulation décrits alors que d'autre part nous avons développé des clones d'origine pulmonaire non tumorale et modifiée à l'aide de la technologie CRISPR-Cas9. Chacun de ces modèles présente à la fois des avantages mais aussi des limites différentes compensées par leur complémentarité dans notre étude. Par sa plus grande facilité de mise en place, les lignées T47D MET nous ont permis d'étudier l'impact de l'ensemble des sites de régulation sur différentes réponses à l'HGF incluant une analyse transcriptomique et plusieurs réponses biologiques. Bien que nous ayons dû restreindre notre choix

de mutations introduites dans la lignée pulmonaire 16HBE, ce qui a pu être permis par les résultats obtenus avec le modèle T47D, nous avons démontré le potentiel tumorigénique plus fort du saut de l'exon 14 dépendant de l'HGF par rapport à la mutation Y1003F grâce à ce dernier modèle cellulaire.

II. Dépendance à l'HGF

La perte de l'exon 14 de MET est une altération originale vis-à-vis d'autres mutations de MET et des récepteurs tyrosine kinase en général. En effet, dans les cancers du rein en particulier, les mutations impliquées dans la tumorigenèse impactent le domaine kinase de MET et conduisent à leur activation constitutive. Dans le cancer du poumon, peu de mutations du domaine kinase sont observées. En revanche dans ce cancer, des amplifications géniques et des réarrangements chromosomiques de *MET* sont diagnostiqués mais ces altérations moléculaires conduisent encore à une activation du récepteur indépendamment de son ligand. La perte du domaine juxtamembranaire ne conduit pas à l'activation constitutive du récepteur puisque cette altération n'impacte pas directement le domaine kinase de MET et ne provoque pas d'autodimérisation du récepteur. Le domaine juxtamembranaire perdu comporte plusieurs sites de régulation et cette particularité marque une différence notable entre le saut de l'exon 14 et les autres altérations impactant *MET* dans les cancers. Par analogie simpliste, si des mutations du domaine kinase sont des accélérateurs continus de l'activité du récepteur, la perte du domaine juxtamembranaire correspondrait plutôt à un manque de systèmes de freinage. Dans ce contexte, nous montrons que l'activation du récepteur par l'HGF joue un rôle majeur dans les capacités transformantes du récepteur MET ex14.

Modèle murin

Dès 2006, plusieurs études montrent une activation prolongée du récepteur MET ex14 en réponse à l'HGF (Kong-Beltran et al., 2006; Lee et al., 2006; Togashi et al., 2015). Cependant, il n'a pas été démontré formellement que le potentiel transformant de MET ex14 soit complètement dépendant de l'HGF. Nous avons montré que la présence seule de la mutation peut augmenter la prolifération cellulaire et modifier le profil transcriptomique de cellules épithéliales pulmonaires. En revanche, la stimulation du récepteur MET ex14 par l'HGF est nécessaire pour induire des réponses plus complexes et intégratives telles que la survie sans ancrage ou la tumorigenèse *in vivo*.

Pour démontrer *in vivo* la dépendance de MET ex14 à l'HGF, il était nécessaire d'avoir un modèle murin adapté. Il est à noter que l'Hgf murin n'est pas capable d'activer le récepteur MET humain exprimé par les modèles cellulaires que nous avons développés. En revanche, l'HGF humain peut activer le récepteur Met murin. Or, l'expression d'*HGF* est essentielle lors de l'embryogenèse. Cette subtilité d'activation croisée inter-espèces a permis au laboratoire Jackson de développer un

modèle murin transgénique NSG (NOD.scid.IL2R^{0/c}) dans lequel le gène de l'*Hgf* murin a été remplacé par le gène de l'*HGF* humain. Les souris expriment alors exclusivement de l'HGF humain de manière physiologique, permettant ainsi d'assurer la viabilité des souris mais également d'activer le récepteur MET humain exprimé par les lignées xéno greffées. Le modèle NSG nous a ainsi permis de montrer que seules les cellules MET ex14 induisent la formation de tumeurs et que celles-ci étaient d'autant plus fréquentes et volumineuses dans les souris NSG KI-huHGF.

Bien que ce modèle soit informatif, je pense que d'autres modèles murins pourraient être développés pour comprendre le développement tumoral pulmonaire associé à MET ex14 en utilisant en particulier l'outil technologique CRISPR-Cas9. Une équipe américaine a généré une lignée murine dont l'expression de la nucléase Cas9 et de la protéine fluorescente EGFP sont sous le contrôle d'un système Cre-loxP (Platt et al., 2014). Par administration pulmonaire de particules virales délivrant les autres outils moléculaires nécessaires à l'édition du génome, les mutations d'intérêt peuvent être insérées directement dans quelques cellules du poumon mimant ainsi l'apparition spontanée de mutations potentiellement initiatrices de la tumorigenèse. Pour cela, des particules virales AAV (adeno-associated virus) contenant un vecteur codant pour des sgRNAs ciblant *Kras* et *Tp53*, l'ADN donneur support pour l'intégration de la mutation *Kras G12D* par recombinaison homologue ainsi qu'une cassette d'expression pour la recombinase Cre et la luciférase *Renilla* ont été générées (AAV9-KPL). Les particules AAV9-KPL ont ensuite été administrées par voie intratrachéale dans les poumons des souris Cas9 Cre-dépendant. L'expression du vecteur dans les cellules pulmonaires a ensuite pu être validée par mesure de l'activité luciférase en imagerie par luminescence. Plusieurs semaines plus tard, les poumons ont été récoltés pour être analysés par séquençage afin d'identifier la fréquence d'introduction des mutations. Après deux mois, tous les animaux ayant reçu l'AAV9-KPL ont développé des nodules pulmonaires alors qu'aucun nodule n'a été détecté dans les souris ayant reçu l'AAV9-contrôle. Les sections des tumeurs exprimant EGFP ont été ensuite réséquées puis séquencées. Les auteurs détectent alors la mutation *Kras G12V* et/ou des insertions-délétions impactant *Tp53* dans ces fractions tumorales à des taux variables selon les souris. La détection variable de ces mutations dans les tumeurs suggère qu'elles sont impliquées dans la tumorigenèse et révèlent une hétérogénéité à la fois intratumorale mais aussi entre les tumeurs proche de la réalité clinique.

Ce modèle murin semble donc pertinent pour l'étude de nombreuses altérations moléculaires dans le cancer du poumon puisqu'il peut s'adapter à n'importe quel oncogène. Par ailleurs, il présente l'avantage de modéliser le développement tumoral voire l'apparition de métastases à partir de quelques cellules mutées dans un environnement physiologique et dans un organisme immunocompétent. Le récepteur MET ex14 étant dépendant de l'HGF pour son activation, ce modèle murin serait tout à fait adapté pour étudier ses capacités transformantes dans un contexte

physiologique et en présence d'HGF endogène. Par ailleurs, les mutations de MET ex14 sont retrouvées associées à d'autres altérations oncogéniques dans une part non négligeable de patients. A l'instar de ce que l'équipe ayant développé le modèle a réalisé, il serait possible de combiner un saut de l'exon 14 de MET à d'autres co-altérations. Cependant, ce développement peut être plus long que dans des modèles plus classiques d'étude de la tumorigenèse tels que les xénogreffes. En outre, ce modèle pourrait être intéressant pour évaluer le bénéfice de nombreux traitements incluant les thérapies ciblées en permettant aussi d'étudier l'émergence de mécanismes de résistance en réalisant *a posteriori* un séquençage des tumeurs résistantes au traitement.

Impact clinique du rôle de l'HGF

Détection d'HGF intratumoral

Puisque nous avons confirmé l'importance de l'HGF dans les capacités transformantes de MET ex14 *in vitro* et *in vivo* en modèle murin, nous nous sommes interrogés sur les conséquences cliniques de cette dépendance à l'HGF. Pour commencer à étudier ce point, notre première question a été de savoir si les tumeurs MET ex14 pouvaient présenter une expression d'HGF particulière dans l'environnement tumoral ou pouvait être produit par les cellules tumorales elles-mêmes. Grâce à la cohorte de patients MET ex14 mise en place au CHU de Lille, nous avons pu analyser l'expression d'HGF au sein des tumeurs. Pour cela, nous avons souhaité réaliser cette détection par IHC afin d'identifier l'origine cellulaire de l'expression de l'HGF. La détection de l'HGF par cette technique permettrait également de la transposer à la routine clinique. Le service d'anatomopathologie du CHU de Lille a ainsi mis au point un marquage de l'HGF sur coupes tumorales et a pu tester 18 patients MET ex14. Parmi eux, un tiers présentait une expression d'HGF au sein des cellules tumorales elles-mêmes, un tiers ne montrait pas d'expression épithéliale d'HGF et un tiers des cas était considéré comme ininterprétable par invalidation des contrôles internes. Néanmoins, à ce jour nous n'avons pas pu déterminer la cause de cette expression anormale d'HGF par les cellules tumorales d'origine épithéliale. Cette expression peut être la conséquence directe d'une amplification du gène *HGF* et pourrait ainsi être constitutive mais elle pourrait être également liée à d'autres mécanismes inconnus de régulation de son expression. Nous souhaitons ainsi dans un premier temps réaliser une analyse de variations de copies du gène *HGF* par CGH et FISH afin d'identifier s'il s'agit ou non d'une amplification du gène selon les patients.

Quelles conséquences de cette expression ?

Par ailleurs, les conséquences fonctionnelles de l'expression d'HGF intratumorale des cellules MET ex14 ne sont pas encore connues et plusieurs pistes peuvent être évoquées. Des cas de co-expressions MET/HGF sont particulièrement retrouvés dans les gliomes. Il a notamment été montré

que les cellules de glioblastome HGF+ induisent le développement de tumeurs plus volumineuses en modèle murin et celles-ci présentent une phosphorylation basale de MET démontrant la mise en place d'une boucle autocrine d'activation (Lattera et al., 1997; Zhang et al., 2013). Dans notre étude, il serait donc intéressant d'évaluer l'activité de MET ex14 dans ces tumeurs pour affirmer qu'il s'agit d'une activation autocrine. Dans les gliomes, la production d'HGF autocrine est associée à une plus grande agressivité tumorale chez les patients (Koochekpour et al., 1997). De plus, le niveau d'expression d'HGF dans ce contexte est corrélé à une meilleure sensibilité à un inhibiteur de MET en modèles murins (Xie et al., 2012). Par ailleurs, il a été montré que le taux sérique d'HGF était plus élevé pour les patients atteints de mésothéliomes et carcinomes hépatiques et cette élévation est particulièrement défavorable pour le pronostic des patients atteints d'hépatocarcinomes (Jagadeeswaran et al., 2006; Vejchapipat et al., 2004).

Ces éléments renforcent l'idée qu'il serait intéressant d'étudier l'HGF, intratumoral voire sérique, sous l'angle d'un biomarqueur d'agressivité et/ou de réponses aux inhibiteurs de MET dans le cas des tumeurs MET ex14 pour améliorer la prise en charge de ces patients. Ce travail nécessiterait la mise en place de nouveaux modèles cellulaires co-exprimant MET ex14 et l'HGF, à partir de la lignée 16HBE MET ex14 par exemple, pour déterminer les conséquences fonctionnelles de la co-expression MET ex14/HGF. Par ailleurs, il serait intéressant d'approfondir les données issues de la cohorte de patients MET ex14 lilloise en cours d'élargissement national. Dans un premier temps, il faudrait tester plus de patients MET ex14 pour l'expression d'HGF intratumoral. Ensuite, nous pourrions analyser la phosphorylation du récepteur MET dans les tumeurs HGF+ pour affirmer la présence d'une boucle autocrine d'activation. Enfin, il serait intéressant d'étudier l'HGF comme potentiel marqueur d'agressivité tumorale et/ou de réponses aux traitements. Ces réponses nécessitent néanmoins l'inclusion de plus de patients et l'intégration de plus de données cliniques y compris leur statut d'HGF tumoral.

MET ex14 / HGF et potentiel métastatique

Enfin, certaines de nos données préliminaires semblent montrer que les cellules MET ex14 injectées dans le flanc des souris présentent un fort potentiel métastatique en induisant notamment le développement de métastases pulmonaires et ce phénomène pourrait être assez précoce lors du développement de la tumeur (données non montrées). Nous souhaitons également exploiter ce paramètre en s'interrogeant sur le rôle de l'HGF dans ce contexte. Nous avons montré que l'activation du récepteur MET ex14 par l'HGF favorise la surexpression de plusieurs MMPs, des protéases capables de dégrader la matrice extracellulaire et particulièrement impliquées dans les phénomènes d'invasion. Or, les capacités invasives sont importantes pour le développement de la tumeur primaire mais également dans les processus métastatiques. L'activité des protéases peut favoriser l'infiltration des

cellules au sein du stroma en dégradant plusieurs constituants de la matrice mais peut également provoquer la libération de facteurs de croissance stockés sous forme de réserve dans la matrice extracellulaire. L'HGF est notamment synthétisé puis sécrété dans l'espace extracellulaire sous la forme d'un précurseur inactif (pro-HGF) converti en forme mature active par clivages protéolytiques. Les protéases principalement impliquées dans la maturation de l'HGF sont l'HGF activator (HGF-A) et la matriptase, mais les MMPs peuvent également participer indirectement à ce processus. Il a notamment été montré que les protéases MT1-MMP (membrane-type I MMP) et MMP14 peuvent dégrader HAI-1 (HGF-A inhibitor), l'un des principaux inhibiteurs de HGF-A (Domoto et al., 2012; Hoshiko et al., 2013). La surexpression des MMPs induite par l'activation de MET par l'HGF, particulièrement dans le cas de MET ex14, pourrait alors favoriser la maturation et la biodisponibilité de l'HGF initialement stocké sous forme inactive dans l'espace extracellulaire. Dans ce contexte, les MMPs participeraient à l'entretien de l'activation du récepteur par sa propre signalisation et accentueraient localement les effets pro-invasifs associés au récepteur MET ex14.

Nous proposons même qu'il puisse exister un tropisme métastatique particulier des cellules MET ex14 et pouvant être potentiellement lié à la sécrétion d'HGF différent d'un organe à l'autre. En effet, certains organes tels que le foie expriment particulièrement l'HGF. Nous pouvons ainsi imaginer que les cellules tumorales MET ex14 subissent un chimiotactisme vers ces organes capables de créer une niche métastatique favorable à leur survie. De plus, une élévation du taux d'HGF sérique pourrait favoriser la résistance à l'anoïkis dans la circulation et ainsi promouvoir le processus métastatique. Si cette hypothèse s'avère vraie, l'HGF sérique pourrait alors être également un marqueur prédictif de l'évolution de la maladie. Une étude a déjà montré que l'HGF sérique pouvait être de mauvais pronostic dans les hépatocarcinomes (Vejchapipat et al., 2004). Pour réaliser une telle étude, il serait nécessaire de récolter le sérum des patients pour y doser ensuite l'HGF et analyser s'il existe une corrélation entre le taux détecté et l'évolution de la maladie. Le nombre de données nécessaire pour explorer cette hypothèse est élevé ce qui rend cette étude difficile à mettre à place. Cependant, une banque de collecte sérique est actuellement en cours de constitution pour les cancers du poumon au CHU de Lille (cohorte BioLung) ce qui permettrait à long terme de pouvoir explorer ces hypothèses.

L'ensemble de ces hypothèses laissent à imaginer la création d'un « score HGF » intratumoral et sérique comme potentiel outil diagnostique pertinent dans le cadre des tumeurs MET ex14, prédictif de l'agressivité tumorale, de son potentiel métastatique et de sa réponse aux inhibiteurs de MET. Les taux de réponse aux inhibiteurs de MET pour les patients MET ex14 restant inférieurs à ceux obtenus avec d'autres cibles telles que EGFR, l'apport de marqueurs supplémentaires comme l'expression d'HGF semble donc nécessaire pour une meilleure sélection des patients.

III. Des mystères non élucidés

Nous avons montré dans les T47D que la perte de l'exon 14 du récepteur MET conduit à une augmentation de l'activation des voies de signalisation induisant de plus fortes capacités migratoires en réponse à l'HGF de manière similaire à la perte du site Y1003. Ces résultats ont pu être confirmés partiellement dans les 16HBE MET ex14. Néanmoins, nous montrons que les cellules 16HBE MET Y1003F ont un potentiel tumorigénique *in vivo* nettement plus faible que les 16HBE MET ex14. Ce résultat est surprenant puisque l'origine des capacités transformantes du récepteur MET ex14 est le plus fréquemment résumée à la perte de sa liaison avec l'ubiquitine ligase CBL *via* le site Y1003.

L'étude de la mutation impactant le site S985 n'a pas permis d'apporter plus d'éléments de réponses. Alors que ce site est décrit pour induire l'inhibition de l'activité kinase du récepteur, nous aurions pu nous attendre à des réponses fortes associées à la perte de ce site. Cependant, les réponses obtenues sur la majorité des paramètres testés étaient souvent intermédiaires et modérées pour ce mutant. A ce jour, nous ne pouvons conclure définitivement sur la perte de ce site de régulation.

A ce jour, peu d'études ont comparées l'effet de la perte de l'exon 14 à la mutation seule des sites de régulation. En fait, deux résultats montrent que la réintroduction de l'exon 14 abolit les capacités transformantes de TPR-MET dépourvu de domaine juxtamembranaire (Lu et al., 2017; Vigna et al., 1999). Finalement, la mutation du site S985 ou Y1003 dans ces constructions ne permet pas de restaurer les capacités transformantes de TPR-MET. Ces résultats suggèrent donc indirectement l'implication d'autres systèmes de régulation perdus dans les capacités transformantes induites par le récepteur MET ex14.

En premier lieu, nous avons montré que la perte du fragment p40 MET pro-apoptotique, résumée par la mutation du site V1001, augmente les capacités de survie des cellules T47D MET ex14. Bien que nous ne sommes pas parvenus à montrer ce même effet dans les 16HBE MET ex14, ce résultat suggère néanmoins que le développement d'un potentiel transformant complet peut être la conséquence de la perte combinée d'au moins deux mécanismes de régulation du récepteur, impactant la migration mais également la survie cellulaire. Afin de déterminer si les sites de régulation perdus V1001 et Y1003 peuvent expliquer complètement les capacités tumorigéniques du récepteur MET ex14, il faudrait désormais établir une lignée 16HBE porteuse de mutations impactant V1001 et Y1003 et comparer son potentiel transformant *in vivo* aux cellules MET ex14.

Par ailleurs, il est possible que des mécanismes supplémentaires puissent conférer aux cellules MET ex14 un programme unique d'activation. Cette question est soutenue par le fait que des mutations ponctuelles impactant les sites de régulation ne sont que très rarement détectées, suggérant la présence de mécanismes additionnels qui participeraient au potentiel transformant du

récepteur MET dépourvu d'exon 14. Ainsi, je souhaiterais dans cette section proposer plusieurs pistes de réflexion pour mieux caractériser les mécanismes d'activation de MET ex14.

Un programme transcriptionnel unique ?

Dans notre projet, nous avons réalisé deux analyses transcriptomiques, l'une incluant l'ensemble des lignées T47D MET sauvage, ex14 ou muté sur chacun des sites de régulation et l'autre incluant les 16HBE MET contrôle et ex14. Les deux études ont été réalisées en condition de stimulation ou non par l'HGF. Nous avons fait le choix de nous concentrer sur la réponse à l'HGF dans un premier temps car peu de gènes étaient régulés différemment dans les lignées T47D MET en absence d'HGF. Cependant, lors de la réalisation de la seconde analyse incluant les lignées 16HBE, nous avons observé une différence de signature transcriptionnelle globale entre les lignées 16HBE contrôle et ex14 sans stimulation par l'HGF. Dans cette lignée, indépendamment de l'HGF, le saut de l'exon 14 pourrait réguler un ensemble de gènes spécifiques sans que nous ne soyons parvenus à les interpréter actuellement. Ce résultat est en accord avec nos autres données puisque nous avons également montré que dans ce modèle l'introduction de la mutation induisait une augmentation modeste de la prolifération alors que ce phénomène n'est pas observé dans les lignées T47D MET. Nous pourrions donc supposer que certains des gènes régulés spécifiquement par le récepteur MET ex14 en conditions basales dans les 16HBE soient impliqués dans le cycle cellulaire et nécessiteraient d'être plus amplement exploités.

Globalement, notre analyse transcriptomique dans les lignées T47D MET nous a permis de démontrer que les mutations Y1003F et ex14 de MET permettent la régulation de nombreux gènes en réponse à l'HGF et ces gènes sont associés aux « hallmarks » du cancer incluant l'invasion. Ces résultats ont ensuite pu être confirmés partiellement en comparant les signatures transcriptionnelles uniquement des cellules 16HBE contrôle et ex14 stimulées par l'HGF. Cette interprétation des résultats représente un choix d'analyse de notre part mais nous a permis de se concentrer sur la question initiale de notre projet qui était de comprendre l'implication des sites de régulation perdus dans les capacités transformantes du récepteur MET ex14.

Actuellement, bien que les résultats obtenus avec les deux modèles cellulaires le suggère, nous ne pouvons pas affirmer qu'il existe un programme transcriptionnel unique spécifiquement induit par le récepteur MET ex14, stimulé ou non par l'HGF. Les études transcriptomiques sont très riches et intéressantes et nécessitent du temps pour en extraire toutes les informations. Elles sont à mon sens « des pelotes de laine » complexes dont nous n'avons pas encore démêlé toutes les découvertes à faire. Il serait nécessaire d'approfondir ces analyses pour déterminer s'il existe des gènes spécifiquement régulés par MET ex14 en réponse ou non à l'HGF et s'ils sont en lien avec les sites de régulation perdus. Nous avons montré qu'il existait une forte réponse transcriptionnelle similaire en

réponse à l'HGF entre les T47D MET ex14 et Y1003F mais il existe également des gènes spécifiquement régulés par l'une ou l'autre des versions mutantes du récepteur. Nous ne sommes pas encore parvenus à interpréter ces gènes en leur donnant un sens « biologique » mais ce travail d'analyse est encore en cours. En associant les données obtenues avec les deux modèles cellulaires, nous pourrions mettre en évidence un programme unique d'activation du récepteur MET ex14 en identifiant par exemple des nœuds de régulation transcriptionnels clefs dans la tumorigenèse induite par le saut de l'exon 14.

La question de la stabilité

La dégradation est un processus important de régulation négative des récepteurs tyrosine kinase. Pour plusieurs RTKs dont MET, CBL joue un rôle majeur dans ce processus et le récepteur MET ex14 ne serait donc plus soumis à cette voie de dégradation. Malgré plusieurs études le démontrant dans la littérature, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence une augmentation significative du temps de demi-vie de MET ex14 dans nos modèles (Abella et al., 2005; Kong-Beltran et al., 2006; Peschard et al., 2001). Ces résultats sont cependant en accord avec les travaux de Lu et al. montrant un effet modeste du saut de l'exon 14 sur la stabilité du récepteur MET endogène dans une lignée pulmonaire (Lu et al., 2017).

Nous pouvons également nous demander si le récepteur MET ex14 peut être régulé par d'autres systèmes de dégradation ou quelles peuvent être les conséquences de la perte de CBL. En pistes de réflexion, nous pouvons en première intention rechercher des éléments de réponse parmi les résultats de transcriptomique. De manière intéressante, deux protéines impliquées dans les processus de dégradation, *FBXO2* et *LRIG1*, sont régulées négativement dans les 16HBE MET ex14 et ce, parmi les gènes les plus différentiellement exprimés entre les cellules 16HBE contrôle et MET ex14 sans HGF. *FBXO2* (F-box only protein 2) est une protéine appartenant au complexe SCF-E3 ubiquitine ligase impliquée dans la dégradation protéosomale (Skowyra et al., 1997). Ce complexe est particulièrement impliqué dans une voie de dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD) et cible les protéines présentant un mauvais repliement. Le lien avec le récepteur MET semble peu évident dans ce contexte. La protéine *LRIG1*, quant à elle, est déjà connue pour réguler le récepteur MET à la membrane et participe à une voie de dégradation non médiée par CBL et indépendant de l'activation du récepteur par l'HGF. Bien que moins décrit comme processus de dégradation par rapport à celui médié par CBL, *LRIG1* peut interagir avec MET et favoriser le recrutement du complexe *LRIG1*-MET aux vésicules lysosomales conduisant à la dégradation des deux partenaires (Lee et al., 2014; Shattuck et al., 2007). De manière inattendue, *LRIG1* apparaît être sous-exprimé à l'état basal dans les cellules 16HBE MET ex14 par rapport aux cellules MET contrôle. Malgré le fait que nous n'ayons pas pu aller plus loin, cette observation ouvre l'hypothèse que le récepteur MET ex14 puisse

réguler négativement un de ses propres systèmes de dégradation en plus de la perte de l'action de CBL. Cette piste pourrait être un mécanisme original et spécifique du récepteur MET ex14 mais nécessite une analyse approfondie en le comparant également à la mutation du site Y1003. L'expression de LRIG1 devrait alors être évaluée dans les cellules contrôle, MET ex14 et Y1003F. Il serait intéressant ensuite d'identifier s'il existe une colocalisation différente entre MET et LRIG1 en fonction des versions du récepteur exprimé.

Des localisations inattendues ?

Une autre piste intéressante pourrait être d'élargir notre vision à propos des conséquences de la perte de liaison de CBL au-delà de la dégradation. S'il est clairement établi que CBL favorise la dégradation de MET lors du processus d'internalisation du récepteur, son implication dans l'initiation de l'endocytose du récepteur reste encore discuté (Abella et al., 2005; Joffre et al., 2011). Il est donc possible que le récepteur MET ex14 soit internalisé mais ne soit pas soumis à la dégradation induite par CBL. Or, le récepteur MET est capable de poursuivre sa signalisation depuis les endosomes en activant notamment la voie ERK et STAT3 (Kermorgant and Parker, 2008). Il est à rappeler que les mutations M1268T et D1246N conduisant à l'activation constitutive du récepteur présentent un défaut de dégradation et s'accumulent dans des endosomes d'où ils continuent leur signalisation avant d'être recyclés à la membrane (Joffre et al., 2011). En conséquence de la perte des marques d'ubiquitination apposées par CBL, MET n'est plus ciblé par les composants de la machinerie lysosomale et pourrait ainsi persister sous forme endosomale et phosphorylé puis continuer à activer plusieurs voies de signalisation. Puisque la stimulation du récepteur MET ex14 conduit à une activation prolongée du récepteur lui-même mais aussi des voies de signalisation en aval, cette persistance sous forme endosomale pourrait expliquer cette activation maintenue dans le temps du récepteur et des voies de signalisation associées. Après stimulation par l'HGF, un suivi au cours du temps par co-marquages du récepteur MET phosphorylé et des vésicules d'endosomes (marqueur EEA1) permettrait d'établir si le récepteur MET ex14 persiste sous forme endosomale par rapport aux cellules MET sauvage.

Ce défaut d'adressage au lysosome ouvre plus largement à la question de la localisation de MET après sa stimulation. Si le récepteur MET ex14 présent dans les endosomes n'est pas dégradé, où va-t-il ensuite ? Plusieurs routes peuvent être prises à ce stade : 1) retourner à la membrane, à l'instar des mutations M1268T et D1246N qui provoquent un recyclage accru du récepteur ou 2) se localiser dans d'autres compartiments subcellulaires tels que le noyau.

Le récepteur MET sous forme pleine longueur a déjà été décrit dans le noyau, nous pouvons poser l'hypothèse que le récepteur MET ex14, ne pouvant être dégradé par la voie lysosomale médiée par CBL, favorise cette sublocalisation. Bien qu'il n'ait pas été particulièrement montré que des défauts

d'adressage de RTKs conduisent à une augmentation de ce phénomène, il a été montré que la translocation nucléaire du récepteur EGFR est augmentée dans les cellules tumorales, associée à un mauvais pronostic voire à une résistance à plusieurs traitements incluant les inhibiteurs d'EGFR (Brand et al., 2011). Les mécanismes de translocation nucléaire de MET forme pleine longueur sont peu décrits. En revanche, il a été montré que l'endocytose d'EGFR *via* des vésicules de clathrine permettait le trafic de ce récepteur jusqu'au compartiment nucléaire (Giri et al., 2005). Nous pouvons ainsi nous demander si le maintien du récepteur MET dans les endosomes peut aussi favoriser cette sublocalisation. Il a été montré que le récepteur MET nucléaire possède des capacités de transactivation similaires à un facteur de transcription et promouvoir l'invasion (Matteucci et al., 2009; Tey et al., 2017). L'augmentation de la présence de MET ex14 dans le noyau pourrait ainsi conduire à la régulation plus forte ou spécifique de certains gènes. Cette piste pourrait alors être exploitée et combinée à la poursuite des analyses transcriptomiques.

Une autre hypothèse concernant la localisation de MET dans le noyau impliquerait le récepteur MET clivé plutôt que sous forme pleine longueur depuis les endosomes. En effet, le récepteur MET est également retrouvé dans le noyau sous la forme d'un fragment (fragment nMET). Le fragment est détecté sous forme phosphorylée suggérant une activation préalable par l'HGF du récepteur avant sa génération et sa translocation au noyau (Kanteti et al., 2009). Les mécanismes de génération puis de translocation au noyau du fragment nMET ne sont pas encore bien décrits. Aucune séquence de localisation nucléaire (NLS) n'a été décrite au sein de la séquence de MET à ce jour, cependant, cette translocation serait dépendante de sa liaison avec GAB1 qui lui est porteur d'une séquence NLS (Gomes et al., 2008). En utilisant différentes constructions du récepteur, des travaux montrent que le domaine juxtamembranaire et l'extrémité carboxy-terminale de MET sont importants pour sa localisation nucléaire (Pozner-Moulis et al., 2006). La taille du fragment nucléaire détecté est discuté puisque certains auteurs décrivent un fragment d'environ 60 kDa alors que d'autres présentent un fragment de 48 kDa (Pozner-Moulis et al., 2006; Tey et al., 2017). Selon la taille réelle du fragment, il n'est pas impossible que le clivage permettant la génération du fragment nMET soit réalisé dans la région du domaine juxtamembranaire codé par l'exon 14. A partir de ces éléments et puisqu'il existe un certain nombre d'inconnus autour de la genèse du fragment nMET, nous pourrions supposer que la perte de l'exon 14 déstabilise la génération du fragment et/ou sa translocation nucléaire. De plus, les conséquences et le rôle de la présence de MET dans le noyau restent globalement peu connus. L'absence de MET dans le noyau pourrait induire finalement aussi une signature transcriptionnelle différente dans les cellules MET ex14.

Les deux hypothèses semblent opposées, l'une proposant une augmentation de MET dans le noyau alors que l'autre suppose une diminution. Cependant, les conséquences du MET nucléaire ne

sont pas encore toutes élucidées et il est encore moins connu s'il existe des conséquences différentes s'il s'agit de la forme pleine longueur ou du fragment de MET. Partant du fait qu'il existe un grand nombre d'inconnu autour de cette question, les deux hypothèses mériteraient toutes deux d'être exploitées.

Des partenaires inconnus ?

Le récepteur MET a été énormément décortiqué depuis plus de trente ans, cependant certaines connaissances sont encore manquantes à propos des interactions avec d'autres protéines et en particulier avec le domaine juxtamembranaire. A l'instar de CBL, la perte d'interaction au niveau du domaine juxtamembranaire avec d'autres partenaires régulateurs pourrait permettre de caractériser de nouveaux mécanismes à l'origine des capacités transformantes du récepteur MET ex14. Parmi les potentiels partenaires du domaine juxtamembranaire perdus, nous pouvons évoquer la piste des phosphatases. Ainsi, l'activation accrue et prolongée du récepteur MET ex14 pourrait être la conséquence de la perte de fixation d'une phosphatase. En effet, il a été montré que plusieurs phosphatases telles que PTP1B (Protein-tyrosine Phosphatase 1B) et TCPTP (T-cell Phosphatase) sont capables de se fixer au récepteur MET et de réguler négativement son activité kinase après stimulation par l'HGF (Sangwan et al., 2008b). Ces phosphatases peuvent se fixer aux tyrosines du domaine kinase et du domaine carboxy-terminal de MET. Cependant, il a été mis en évidence que la phosphatase PTP1B est également capable de lier le domaine juxtamembranaire du récepteur au niveau des résidus 995 à 1009 (Villa-Moruzzi et al., 1998). Or, le saut de l'exon 14 entraîne la perte de ces acides aminés. Le récepteur MET dépourvu d'exon 14, incapable de fixer cette phosphatase sur ce domaine, aurait alors une activité prolongée en réponse au ligand HGF. Une fois encore, cette piste nécessiterait une exploration spécifique. Dans le but de valider cette hypothèse, il serait nécessaire de mesurer l'activité phosphatase globale liée au récepteur MET sauvage et MET ex14 puis de valider la fixation de PTP1B au domaine juxtamembranaire de MET sauvage. Enfin, il serait intéressant d'évaluer si la répression génique de PTP1B dans les cellules MET sauvage permet d'induire une activité du récepteur similaire au récepteur MET ex14.

Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes d'activation du récepteur MET ex14, il serait intéressant d'identifier l'ensemble des partenaires du domaine juxtamembranaire. Pour cela, il faudrait adopter une vision large et la plus exhaustive possible en utilisant des techniques sans *a priori* telles que des techniques de double hybride ou d'interactome par spectrométrie de masse en comparant toujours la forme sauvage du récepteur MET au récepteur MET ex14 en présence ou non d'HGF.

IV. Conséquences sur la prise en charge thérapeutique

Une compréhension complète des mécanismes d'activation du récepteur MET ex14 est importante pour adapter au mieux la prise en charge des patients. En premier lieu, notre étude s'est concentrée sur l'implication des sites de régulation déjà décrits (S985, V1001, Y1003) et nous montrons finalement que la perte de chacun d'entre eux confère des capacités supplémentaires au récepteur MET. Bien que la perte de ces sites de régulation ait des conséquences différentes, qu'ils ne puissent résumer complètement les capacités transformantes de MET ex14 et que leur détection soit rare en routine, nos résultats suggèrent néanmoins que ces patients peuvent aussi être éligibles à des thérapies ciblant MET. Renforçant cet argument, une patiente âgée de 61 ans ayant développé un adénocarcinome avec une mutation Y1003S a présenté une remarquable régression tumorale sous crizotinib dès le premier mois de traitement et persistant jusqu'à dix mois (Miao and Xu, 2019).

A l'heure actuelle, les essais cliniques montrent une efficacité de réponse des inhibiteurs de MET pour environ la moitié des patients MET ex14. Ces résultats sont enthousiasmants puisqu'ils font entrer MET comme véritable cible dans le paysage thérapeutique des cancers. Cependant, ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus avec d'autres inhibiteurs de RTKs tels que l'EGFR. Il pourrait alors être nécessaire de développer d'autres marqueurs prédictifs de la réponse aux inhibiteurs autres que les mutations conduisant au saut de l'exon 14 seules. Nous avons confirmé que l'HGF était essentiel au développement complet des capacités transformantes du récepteur MET ex14 et il peut être exprimé par les cellules tumorales elles-mêmes. Comme évoqué précédemment, son expression tumorale pourrait être un marqueur de réponse aux inhibiteurs de MET.

En outre, les mutations MET ex14 présentent des co-altérations sur d'autres oncogènes chez une part de patients plus élevée que d'autres oncogènes mutés isolément tels que EGFR. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les conséquences des co-altérations associées à MET ex14. Au travers de nos travaux de groupe, nous avons déjà étudié au moins deux co-altérations différentes associées au récepteur MET ex14. Notre équipe a ainsi montré qu'une inhibition combinée de PI3K et MET est nécessaire pour réprimer efficacement la prolifération de cellules présentant un saut de l'exon 14 de MET associé à une altération de la voie PI3K/PTEN dans plusieurs modèles cellulaires (Jamme et al., 2020). En revanche, bien que des mutations de *KRAS* soient considérées comme mécanisme de résistance acquis, nous montrons que les tumeurs induites par les cellules A549 présentant une altération de *KRAS* et *MET* ex14 sont sensibles à un inhibiteur de MET en modèle murin. Dans le but de réaliser une analyse comparative des différentes co-altérations détectées en clinique, notre équipe développe actuellement, par CRISPR-Cas9, de nouveaux modèles cellulaires porteurs d'autres altérations à partir des 16HBE MET ex14. L'établissement de ces lignées co-altérées issues du même

modèle cellulaire permettra de comparer les différentes réponses aux inhibiteurs de MET et de déterminer s'il s'agit potentiellement de mutations à l'origine d'une résistance innée.

Dans l'histoire du ciblage de MET, une autre stratégie a été le développement d'anticorps bloquants l'interaction entre MET et l'HGF (onartuzumab par exemple) ou capables de séquestrer l'HGF (rilotumumab par exemple). Globalement, les essais cliniques évaluant ces anticorps dans un contexte de surexpression de MET n'ont pas démontré une efficacité suffisante pour les patients. Une des cause principale de ces échecs semble être une mauvaise sélection des patients basée uniquement sur la surexpression du récepteur par IHC, sans preuves de suractivation de MET ou de sa dépendance à l'HGF. Puisque l'activation du récepteur MET ex14 est dépendante de l'HGF, ces anticorps pourraient-ils être plus efficaces dans ce contexte ? Peut-on espérer une réhabilitation des anticorps bloquants pour lesquels MET ex14 semble être la cible idéale ? Nous pouvons ainsi nous demander si ces anticorps pourraient être plus efficaces que les inhibiteurs kinase de MET tout en étant moins toxiques. En injectant les cellules 16HBE MET ex14 dans les souris NSG KI-huHGF, l'efficacité des inhibiteurs de MET et de l'onartuzumab pourrait être comparée en évaluant la régression tumorale au cours du temps.

Enfin, l'utilisation des inhibiteurs kinase de MET en clinique est prometteuse dans le contexte de MET ex14 mais il ne faut pas oublier que la majorité des cas de cancers du poumon est encore traitée par des chimiothérapies conventionnelles. Dans notre étude, nous avons également montré que la perte du site de clivage par les caspases permettant la génération du fragment pro-apoptotique p40MET conduisait à une augmentation des capacités de survie des cellules MET ex14. Nous pouvons ainsi nous demander si la résistance à l'apoptose des cellules MET ex14 peut représenter un mécanisme de résistance aux chimiothérapies inductrices d'apoptose telles que les sels de platine utilisés couramment en clinique pour le cancer du poumon.

Conclusion

Les premières découvertes concernant l'implication du saut de l'exon 14 de MET dans la tumorigenèse ont été réalisées il y a déjà quinze ans, cependant c'est le séquençage d'environ 40 000 tumeurs effectué par Frampton *et al.* qui a permis de révéler l'importance des mutations MET ex14 dans les cancers et en particulier dans les cancers bronchiques. En effet, cette étude a montré que près de 3% des tumeurs pulmonaires présentaient un saut de l'exon 14. Les cancers de la sphère pulmonaire étant l'un des cancers les plus fréquents dans le monde avec une incidence d'environ 2 millions de cas par an, près de 60 000 patients par an pourraient être porteurs d'un saut de l'exon 14 de MET.

A partir de cette découverte, les études se sont multipliées comme en atteste l'augmentation exponentielle du nombre de publications répertoriées sur la base de données PubMed (Figure 16). Très rapidement, de nombreux centres de diagnostic moléculaire ont réalisé le dépistage des mutations conduisant au saut de l'exon 14 ce qui a permis en parallèle l'établissement de plusieurs essais cliniques multicentriques. Grâce à une grande efficacité de mise en place de ces essais, deux inhibiteurs de MET, le capmatinib et le tepotinib, ont déjà obtenu une autorisation réglementaire d'utilisation en 2020 aux Etats-Unis et au Japon respectivement.



Figure 16 : Représentation du nombre de publications incluant les mots clefs « MET ex14 », « MET exon 14 » ou « MET skipping » sur la base de données PubMed. (Recensement arrêté au 09 février 2021).

Malgré cette explosion d'études concernant MET ex14, celles-ci rapportent essentiellement des cas cliniques et la caractérisation des mécanismes d'activation du récepteur MET ex14 restait partielle. Ainsi, au cours de ma thèse, nous avons démontré formellement la dépendance du récepteur MET ex14 à son ligand l'HGF pour le développement complet de ses capacités transformantes. Par ailleurs, nous avons mis en évidence par IHC que certaines tumeurs MET ex14 expriment de l'HGF. Il reste cependant à établir les conséquences fonctionnelles de cette expression sur l'activité du récepteur MET ex14 et la manière dont elle peut influencer l'agressivité tumorale. Plus encore, l'impact de cette expression sur la réponse aux thérapies ciblant MET est inconnue. Dans ce contexte, la présence d'HGF intratumoral dans les tumeurs MET ex14 pourrait être envisagée comme biomarqueur pronostic. En outre, les anticorps bloquant l'interaction entre MET et HGF tels que l'onartuzumab et le

rilotuzumab n'ont pas permis l'obtention de résultats satisfaisants en essais cliniques incluant des patients surexprimant MET détecté par IHC. Cependant, l'activation du récepteur et sa dépendance à l'HGF n'étaient pas investiguées posant la question de l'addiction oncogénique de la voie HGF/MET pour ces patients. En revanche, puisque le récepteur MET ex14 est dépendant à l'HGF pour induire une addiction oncogénique, les anticorps bloquants pourraient être repositionnés dans ce contexte.

Par ailleurs, nous avons étudié l'impact de la perte isolée de chacun des sites de régulation décrits sur le domaine juxtamembranaire codé par l'exon 14. Les capacités transformantes du récepteur MET ex14 sont souvent résumées à la perte du site de liaison à CBL, Y1003, probablement car il s'agit du site de régulation sur le domaine juxtamembranaire le plus caractérisé. Cependant, des mutations du site Y1003 ne sont repertoriées que rarement par rapport aux mutations conduisant au saut de l'exon 14. De plus, nous montrons que la mutation seule du site Y1003 ne possède pas les mêmes capacités tumorigéniques que la perte complète de l'exon 14. Nos résultats suggèrent que les capacités du récepteur MET ex14 sont la conséquence de la perte combinée d'au moins deux mécanismes de régulation incluant le site Y1003 et la perte du fragment pro-apoptotique p40MET. Nous proposons qu'il peut exister d'autres mécanismes pouvant conférer au récepteur MET ex14 un programme d'activation unique. Parmi eux, nous pouvons imaginer que la perte de l'exon 14 conduit à une stabilité accrue du récepteur indépendante de CBL, une sublocalisation particulière ou la perte de partenaires du domaine juxtamembranaire non identifiés puissent être à l'origine de capacités spécifiques du récepteur MET ex14.

Au travers d'un travail collaboratif, nous avons répondu à un certain nombre de questions concernant MET ex14 en montrant que son oncogénicité est dépendante de l'HGF et de la perte d'au moins deux sites de régulation. Ces résultats soulignent le fait que les altérations MET ex14 sont différentes d'autres oncogènes « drivers » puisqu'elles ne conduisent pas à l'activation constitutive du récepteur. Les taux d'efficacité plus faibles des thérapies ciblant MET par rapport à d'autres oncogènes ciblés associés à nos données peuvent suggérer que le saut de l'exon 14 de MET confère des capacités oncogéniques moins définies que des mutations activatrices de la kinase par exemple car elles semblent plus dépendante de l'environnement tumoral. Il persiste encore plusieurs interrogations sur le rôle de l'HGF tumoral et sur l'existence d'un programme unique d'activation du récepteur MET ex14. Finalement, le récepteur MET ex14 semble ne pas avoir encore dévoilé tous ses secrets...

Annexes

Revue n°1 : MET cleavages

Proteolytic cleavages of MET: the divide-and-conquer strategy of a receptor tyrosine kinase

Marie Fernandes, Leslie Duplaquet and David Tulasne.

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

Publication BMB Reports – 2019

Revue

Invited Mini Review

Proteolytic cleavages of MET: the divide-and-conquer strategy of a receptor tyrosine kinase

Marie Fernandes[#], Leslie Duplaquet[#] & David Tulasne^{*}

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

Membrane-anchored full-length MET stimulated by its ligand HGF/SF induces various biological responses, including survival, growth, and invasion. This panel of responses, referred to as invasive growth, is required for embryogenesis and tissue regeneration in adults. On the contrary, MET deregulation is associated with tumorigenesis in many kinds of cancer. In addition to its well-documented ligand-stimulated downstream signaling, the receptor can be cleaved by proteases such as secretases, caspases, and calpains. These cleavages are involved either in MET receptor inactivation or, more interestingly, in generating active fragments that can modify cell fate. For instance, MET fragments can promote cell death or invasion. Given a large number of proteases capable of cleaving MET, this receptor appears as a prototype of proteolytic-cleavage-regulated receptor tyrosine kinase. In this review, we describe and discuss the mechanisms and consequences, both physiological and pathological, of MET proteolytic cleavages. [BMB Reports 2019; 52(4): 239-249]

INTRODUCTION

MET is a receptor tyrosine kinase (RTK) produced predominantly in cells of epithelial origin. It is activated by its stromal ligand, the hepatocyte growth factor (HGF), also called as scatter factor (1). HGF and MET are essential for embryonic development: their knockout affects epithelial organ, placenta, muscle, and neuron formation (2-5). In adults, the HGF-MET pair is involved in physiological processes such as epidermal healing and liver regeneration (6-8).

MET is synthesized as a precursor that matures through

proteolytic cleavage between amino acids 307 and 308 by furin. The cleavage leads to the formation of a heterodimeric receptor composed of an extracellular α subunit (50 kDa) linked via a disulfide bond to a single-pass transmembrane β subunit (145 kDa). The extracellular part of MET contains an N-terminal SEMA domain encompassing an α subunit and the first amino acids of the β subunit, followed by a plexin-semaphorin-integrin domain and four immunoglobulin-like domains.

The intracellular region of MET contains a juxtamembrane domain, the tyrosine kinase domain, and a C-terminal tail (9). The interaction of MET with its ligand favors receptor dimerization and autophosphorylation of two tyrosine residues present in the catalytic domain (Y1234 and Y1235). Subsequently, other tyrosine residues, located outside the kinase domain get phosphorylated, particularly tyrosine 1003 in the juxtamembrane domain and tyrosines 1349 and 1356 in the C-terminal tail (10, 11). The phosphorylated C-terminal residues allow recruitment of important effectors such as GAB1, GRB2, SHC, PI3K, SRC, STAT3, and PLC γ . This multi-substrate docking site plays a key role in MET-induced biological responses and its mutation in mice triggers phenotypes similar to those of MET-deficient mice (12).

In parallel, downregulation of MET receptor activity is an essential process which prevents receptor oversignaling. Interestingly, all the regulatory mechanisms evidenced so far are located in the juxtamembrane region of the cytoplasmic part of the receptor, encoded by exon 14. First, in response to HGF/SF, MET phosphorylation at tyrosine residue 1003 leads to recruitment of the ubiquitin ligase CBL, leading to ubiquitination and lysosomal degradation of the receptor (13). Second, ligand stimulation induces phosphorylation of serine residue 985, which is involved in downregulation of MET kinase activity (14).

Aberrant HGF-MET signaling is involved in tumorigenesis and metastasis (for review, see 15). In a significant number of human cancers, overexpression of the genes encoding HGF and MET causes either paracrine or autocrine activation of the receptor and is associated with poor prognosis (16-22). Massive synthesis of MET, leading to its ligand-independent activation is notably related to amplification of the MET gene, and the phenomenon was observed in a small percentage

*Corresponding author. Tel: +33-3-20-87-12-57; Fax: +33-3-20-87 11-11; E-mail: david.tulasne@ibl.cnrs.fr

[#]These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.4.024>

Received 9 January 2019

Keywords: Apoptosis, Calpain, Caspase, Hepatocyte growth factor, MET, Necrosis, Protease, Proteolytic cleavages, Receptor tyrosine kinase, Secretase

(about 1 to 5%) of gastric and lung cancers (23-25). Numerous MET mutations have been described in various cancer types, including renal and lung cancers (26). In renal cancers, MET mutations are located mainly in the kinase domain, causing constitutive kinase activity. In lung cancers, MET mutations affect the juxtamembrane domain in about 3% of patients (27). Notably, various mutations impair the splice acceptor and donor sites of exon 14, causing exon skipping and deletion of a large part of the juxtamembrane domain. Deletion of the juxtamembrane domain favors receptor activation by its ligand since this domain displays several negative regulatory sites (28).

PROTEOLYTIC CLEAVAGES OF MET

Secretase cleavages of MET: regulation of receptor half-life

The first MET fragments were detected in the early 1990s with monoclonal antibodies directed against the extracellular part of the MET β chain. These antibodies revealed in a culture supernatant an N-terminal fragment of about 90 kDa (MET-NTF) (29, 30). Later, the likely C-terminal counterpart

was described as an unstable 55kDa intracellular fragment (31). Actually, these fragments are generated by the first step of the proteolytic process called presenilin-regulated intramembrane proteolysis (PS-RIP). This process involves initial cleavage by membrane metalloproteases, causing MET to shed its extracellular domain at an unidentified cleavage site likely located near the transmembrane domain. This shedding seems to involve the ADAM metalloproteases 10 and 17, as shown by its inhibition through silencing of the corresponding genes (32, 33). This initial cleavage generates both, the N-terminal fragment MET-NTF (also called soluble MET, sMET), which is released into the extracellular space and the membrane-anchored C-terminal fragment MET-CTF (29-31, 34) (Fig. 1A). This proteolytic process is immediately followed by a second cleavage of MET-CTF by the γ -secretase complex, which has presenilin as the catalytic subunit and the generated remnant intracellular domain of MET (MET-ICD) is released into the cytosol. This fragment is extremely labile and is efficiently degraded by the proteasome (35). MET-CTF, which can escape γ -secretase cleavage, is also very labile, as it can be degraded directly via the lysosomal pathway (36) (Fig. 1A). Although

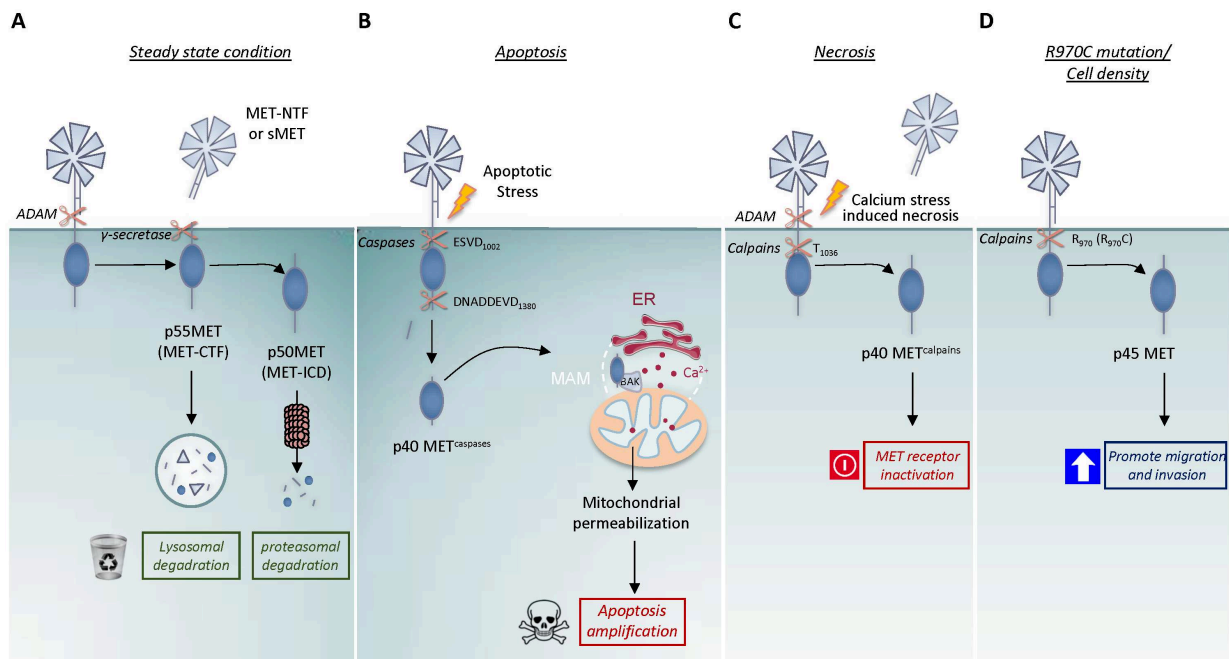


Fig. 1. The four described proteolytic cleavages of the MET receptor. (A) Presenilin-regulated intramembrane proteolysis (PS-RIP) of MET, involving sequential cleavage by ADAM metalloproteases and γ -secretase under steady-state conditions. These cleavages generate the extracellular fragment, MET-NTF (also named soluble MET, sMET) and the intracellular fragments, p55 MET (MET-CTF) and p50 MET (MET-ICD), degraded respectively by the lysosome and proteasome. This proteolytic process is involved in receptor half-life regulation. (B) Caspase cleavages of MET during apoptosis at the juxtamembrane ESVD₁₀₀₀ site and the C-terminal DNADDEVD₁₃₈₀ site, generating p40 MET^{caspase}. This fragment can promote mitochondrial permeabilization and amplifies cell death. (C) MET cleavages during calcium-stress-induced necrosis, involving the first proteolysis by PS-RIP and a second by calcium-regulated calpains at the T1036 site, generating the intracellular p40 MET^{calpain} fragment. (D) Calpain cleavage of MET promoted by high cell density and the R970C MET mutation. The generated intracellular p45 MET fragment can promote epithelial cell migration and invasion.

various agents such as phorbol esters and suramin can promote MET shedding, the process occurs basally under normal conditions. With an engineered uncleavable MET whose extracellular domain is replaced with an uncleavable sequence, it has been demonstrated that PS-RIP is involved in regulating the half-life of the receptor, thus preventing its membrane accumulation (35). Consistently, pharmacological inhibition of matrix metalloproteinases induces MET accumulation and potentiates the signaling response to HGF (37). PS-RIP is thus proposed to promote basal and weak degradation of mature MET under steady-state conditions (38).

While the C-terminal fragments, MET-CTF and MET-ICD are unstable, the released N-terminal counterpart, MET-NTF, is easily detectable in the culture medium of MET-expressing cell lines and in body fluids, including blood and urine (34, 39, 40). Interestingly MET-NTF, which contains the ligand-binding domain of MET, can interact with HGF, albeit with lower affinity than the full-length receptor (34). Recombinant MET-NTF has been used as a decoy against HGF: treatment with an excess of recombinant MET-NTF inhibits HGF-induced downstream signaling pathways (34, 41). The physiological action of MET-NTF is still unknown.

Caspase cleavages of MET: the receptor joins the dependence receptor family

Ligand-activated MET influences cell fate through activation of anti-apoptotic signaling. Conversely, the apoptotic process influences the fate of MET in the absence of ligand: a few hours after induction of apoptosis, the MET level decreases concomitantly with the appearance of a fragment of about 40 kDa, named p40 MET^{caspase}. Generation of this fragment results from sequential caspase cleavages at aspartic acid 1376 or 1380 of the C-terminal tail, within a duplicated DNAD₁₃₇₆DEV₁₃₈₀ consensus site (human sequence), and at aspartic acid 1002, in the ESVD₁₀₀₂ site of the juxtamembrane region (Fig. 1B). The C-terminal site has been found only in mammals and is duplicated in apes and human, whereas the

juxtamembrane site is highly conserved (Table 1). While juxtamembrane cleavage releases a MET receptor fragment into the cytosol, C-terminal cleavage removes only a few amino acids (14 in humans and 5 in mice). Importantly, these cleavages not only separate the extracellular ligand-binding domain from its intracellular kinase domain but also convert MET to a pro-apoptotic factor, as indicated by the fact that ectopic expression of p40 MET^{caspase} induces cell death concomitantly with caspase 3 activation (42). Although C-terminal cleavage removes only a few amino acids, it is required for the pro-apoptotic function of the fragment. Furthermore, though p40 MET^{caspase} contains the entire kinase domain, the corresponding catalytic activity is not required for the pro-apoptotic function of the fragment. This suggests that the pro-apoptotic function of MET involves mechanisms distinct from the well-known intracellular signaling pathways.

Interestingly, p40 MET^{caspase} has been found to localize to the interface between the endoplasmic reticulum (ER) and the mitochondria, called the mitochondria-associated ER membranes (MAMs) (Duplaquet *et al.*, *submitted*), suggesting an active role in mitochondria-dependent apoptosis. In fact, we have demonstrated that p40 MET^{caspase} amplifies apoptosis by inducing mitochondrial membrane permeabilization (MMP) (43). MMP is viewed as the point of no return in the initiation of the apoptotic process, as the mitochondria release multiple pro-apoptotic factors such as cytochrome C, involved in apoptosome formation. We have further demonstrated that p40MET promotes calcium exchange between the ER and the mitochondria, causing calcium overloading and ultimately leading to MMP (Duplaquet *et al.*, *submitted*) (Fig. 1B). This original process may involve the interaction of p40 MET^{caspase} with the pro-apoptotic BCL2-family protein Bak, itself is recently shown to be a regulator of calcium exchange between the ER and the mitochondria (44).

Functional implications of the MET caspase cleavages were first demonstrated in cell lines where MET silencing or mutation of the C-terminal caspase site was found to prevent

Table 1. Sequences of the juxtamembrane and C-terminal caspase sites of the MET receptor in different species

Species	UniProt database	Juxtamembrane sequence	C-terminal sequence
<i>Homo sapiens</i>	P08581	SVSPTEMVSNES VDY RATFPEDQ	LLSSE DNADDEVD TRPASFWETSstop
<i>Pan troglodytes</i>	Q2QLF1	SVSPTEMVSNES VDY RATFPEDQ	LLSSE DNADDEVD TRPASFWETSstop
<i>Canis familiaris</i>	Q75ZY9	SVSPTEMVSNES VDY RATFPEDQ	LLSSQ DNID GEGDTstop
<i>Sus scrofa</i>	Q2QLE0	SVSPTEMVSNES PVDY RATFPEDQ	LLSSQ DNVD GEGDTstop
<i>Rattus norvegicus</i>	P97523	SVSPTEMVSNES VDY RATFPEDQ	LLPSQ DNID GEANTstop
<i>Mus musculus</i>	P16056	SVSPTEMVSNES VDY RATFPEDQ	LLPSQ DNID GEGNTstop
<i>Xenopus laevis</i>	Q9W650	SISPTTEMVSNES VDY RSTVQEDP	LLSPEGNIEFSIDTstop
<i>Danio rerio</i>	Q64GK4	SVSPTEMVSHES VDY RTLLLEDQ	SLISSQSNLDRDstop

Amino-acid alignments of the juxtamembrane and C-terminal caspase sites of MET from the indicated species, extracted from UniProt data with the indicated accession number. The four amino acids of the consensus caspase sites are in blue and bold. The recruitment site of CBL (DYR) is underlined.

cell death induced by mild stress (43, 45). As a next step, to assess the physiological relevance of MET caspase cleavages, we generated knock-in mice where aspartate 1374 of the C-terminal cleavage site was replaced with glutamine. In addition to preventing C-terminal cleavage, this led to the generation of a non-apoptotic form of p40 MET. Co-treatment of knock-in mice with a FAS agonist (to induce hepatocyte cell death) and a MET tyrosine kinase inhibitor (to prevent HGF-MET-dependent survival) favors resistance of the hepatocytes to apoptosis. These data demonstrate the involvement of the pro-apoptotic action of MET in regulating the survival/apoptosis balance in an organism (Duplaquet et al., submitted).

Cleavage of human MET at the C-terminal double caspase site DNADDEVD generates a short peptide of about 10 amino acids. Interestingly, ectopic expression of this peptide can directly inhibit caspase activity, which in turn contributes to the survival of hepatocytes in cell culture and animal models and reinforces the anti-apoptotic function of the receptor (46). Apparently, it is suggested that C-terminal cleavage of MET may inhibit apoptosis, in contrast to the apoptosis-amplifying effect of p40MET. Because the two caspase cleavages of MET are sequential and the C-terminal cleavage occurs before juxtamembrane cleavage (45), we propose an integrated model. According to our model, in the early steps of apoptosis, the short caspase-generated C-terminal MET fragment inhibits caspase 3 activity and protects the cell from apoptosis. At this point, the MET receptor is still activatable by its ligand and potentially able to promote survival. At a later step of apoptosis, when caspase activation reaches a higher level, MET is cleaved at the juxtamembrane site, yielding a pro-apoptotic fragment capable of promoting mitochondrial permeabilization and at this stage, MET is no longer activatable by its ligand (47).

The view that MET exerts opposite responses in the presence and absence of its ligand is strengthened by the observation that MET tyrosine phosphorylation prevents caspase cleavage of MET. The ESVD₁₀₀₂ juxtamembrane cleavage site is followed by the phosphorylated Y1003 residue, known to be crucial for CBL recruitment. Residue D1002 belongs to the DYR site recognized by CBL (ESVD₁₀₀₂Y₁₀₀₃R) (48). Phosphorylation of the tyrosine residue prevents p40 MET cleavage by caspases (49). These data demonstrate that activation of MET by its ligand prevents deployment of its apoptotic capacity. The N-terminal counterpart of p40 MET, an approximately 100-kDa membrane-anchored fragment, can still bind HGF and may act as a decoy against HGF, thus also contributing to promoting cell death (50).

The pro-apoptotic function mediated by the MET receptor in the absence of its ligand (in contrast with its anti-apoptotic function in response to HGF/SF) is the hallmark of the dependence receptor family. Although a receptor is usually considered inactive until bound by its ligand, some receptors are known to induce cell death in the absence of ligand. Cells

expressing such receptors thus become dependent on the receptor-ligand for survival (51). This dependence phenomenon has been well described for several membrane receptors, including the TRKC, TRKA, KIT, RET, EPHA4, ALK, and IGF-1R receptor tyrosine kinases (52). For instance, TRKC, like MET, undergoes two caspase cleavages releasing a TRKC “killer fragment” (TRKC-KF), which localizes to the mitochondria and favors Bax activation via interaction with COBRA1, and promotes MMP, a mechanism reminiscent of p40 MET-induced apoptosis (53). TRC-KF also localizes to the nucleus, where it interacts with HEY1, a transcription factor involved in negative regulation of mouse double minute 2 (MDM2), an E3 ubiquitin ligase, which regulates p53 stability. Thus, TRKC-KF can also promote apoptosis via p53 stabilization (54). Interestingly, p40 MET can also localize to the nucleus, where one might hypothesize its interaction with transcriptional regulators.

Calcium-dependent calpain cleavages of MET: receptor inactivation during necrosis

Although necrosis was long viewed as accidental cell death, it is currently regarded as a programmed cell death mechanism, as certain pharmacological inhibitors and gene deletions can protect cells from this demise. Necrosis is a caspase- and ATP-independent cell death mechanism featuring early plasma membrane and organelle disruption. Many pathways can lead to cell necrosis, including calcium overload. This type of cell stress has been extensively described in the nervous system, where an increase in intracellular calcium results in neuronal injury and neurodegenerative disease. In many other cell types, calcium ionophores such as ionomycin can induce rapid necrosis. An increase in intracellular calcium triggers the activation of several proteases, including calpains and cathepsins (55-57).

We have demonstrated that calcium-stress-induced necrosis causes a substantial decrease in MET within minutes following treatment with a calcium ionophore. Consistently with this decrease, HGF stimulation can no longer trigger MET phosphorylation or activation of downstream signaling pathways. The observed MET degradation might thus prevent the cell protection resulting from ligand-dependent activation of MET. Rapid MET degradation is associated with detection of an extracellular and an intracellular fragment. The extracellular fragment (about 90 kDa) is generated as a consequence of MET cleavage by ADAM-family membrane metalloproteases, causing MET receptor shedding through a mechanism similar to the above-described PS-RIP (section 1). Consequently, an extracellular fragment containing the ligand-binding domain of MET is released into the extracellular space. This initial extracellular cleavage is followed by intracellular cleavage by γ -secretase, generating the labile MET-CTF fragment (about 50 kDa) (Fig. 1C) (59). Necrosis also induces the generation of a stable intracellular fragment of about 40 kDa. This fragment results from receptor cleavage by the calcium-dependent

calpain proteases activated during necrosis. Calpains are calcium-dependent proteases capable of cleaving multiple substrates and involved in regulating various cell processes, including migration, autophagy, apoptosis, and necrosis. Interestingly, the effector role of calpains during necrosis is reminiscent of the function of caspases during apoptosis. Caspases are directly involved in apoptotic morphological changes, while calpains cleave the cytoskeletal proteins such as spectrin and tubulin, thus favoring necrotic dismantling of cell structure (59-61). Calpain cleavage of MET occurs at residue T1036 in the juxtamembrane domain and generates a fragment close to the p40 MET^{caspase} fragment generated during apoptosis since only 34 residues separate it from the caspase site (D1002). Therefore, the fragment of about 40 kDa generated by calpains is called p40 MET^{calpain}. Despite the similarities, p40 MET^{calpain} conserves its C-terminal tail, as unlike p40 MET^{caspase}, it does not undergo C-terminal cleavage. Furthermore, in contrast to p40 MET^{caspase}, the reconstituted p40 MET^{calpain} fragment does not display apoptotic activity (Fig. 1C).

At first glance, the mechanism of MET degradation appears similar during apoptosis and calcium-stress-induced necrosis: in both the cases, it involves the generation of an intracellular fragment of about 40 kDa. In both the processes, the extracellular ligand-binding domain of MET is separated from the intracellular kinase domain, thus preventing survival. However, calcium-stress-induced necrosis triggers a more complex proteolytic process involving cleavage by membrane metalloproteases. The cleavages occurring during necrosis are quicker than caspase cleavages, leading to MET degradation within minutes of stress induction. In addition, while p40MET^{caspase} somewhat resembles p40MET^{calpain}, the two fragments appear functionally different: the former can favor cell death while the latter is unable to promote such a response.

The R970C mutation and high cell density favor calpain-dependent cleavages of MET

As reported previously, most of the proteolytic cleavages affecting MET occur in the juxtamembrane domain. In lung cancer, interestingly, somatic mutations of MET also affect the juxtamembrane domain. The first group of mutations impairs the splice acceptor and donor sites of exon 14, leading to exon skipping and deletion of a large part of the juxtamembrane domain. These mutations have been found in about 3% of NSCLCs and include various point mutations and deletions, all targeting the splice sites. Deletion of the juxtamembrane domain favors receptor activation by its ligand, as the deleted domain contains several negative regulatory sites (62). The second group of mutations affecting the juxtamembrane domain comprises point mutations, which cause amino acid substitutions within the domain, notably the R970C, P991S, and T992I substitutions (respectively R988C, P1009S, and T1010I in the long isoform of MET). The R970C variant, for

instance, is found in about 1% of patients (27). In contrast to mutations affecting splice sites or the kinase domain, it is unknown how these amino acid substitutions within the juxtamembrane domain functionally affect MET. While studies have demonstrated that they favor the growth of experimental tumors, they do not cause MET kinase activation (63-65). In addition, although these mutations were initially identified in lung tumors, recent studies have shown that they can be germline variants corresponding to polymorphisms (27, 65-67). Yet in the mouse strain SWRJ, the R968C MET variant (corresponding to the human R970C variant) favors the development of lung tumors, suggesting that it modifies MET activity through an unknown mechanism (68).

In stably transfected epithelial cells expressing a mutated form of MET, the juxtamembrane mutations R970C, P991S, and T992I have been found not to modify the known caspase- or presenilin-dependent intramembrane proteolyzes. However, when overexpressed, the R970C variant was found to cause generation of an as yet undescribed 45-kDa fragment (named p45 MET). This fragment was also found in confluent NCI-H1437 lung cancer cells carrying the R970C mutation, and to a lesser extent in confluent cells expressing WT MET, suggesting that the R970C mutation is not required but favors this cleavage. Calpain inhibitors were found to prevent p45 MET generation, suggesting the involvement of this protease family. The apparent molecular size of the p45 MET fragment is consistent with a juxtamembrane cleavage occurring near position 970, but it is difficult to predict the exact cleavage site, since no consensus calpain cleavage sites have been described (Fig. 1D). In contrast to cleavages occurring in the course of apoptosis or necrosis, which is accompanied by a decrease in full-length MET, calpain cleavage at the R970 site does not alter the level of full-length MET, thus suggesting that this proteolytic cleavage is not involved in downregulating the level of full-length receptor. Interestingly, ectopic expression of the reconstituted p45 MET in epithelial cell lines favors cell scattering and invasion, induced or not by HGF, indicating an active role of this fragment (69). As the R970C mutation promotes p45 MET fragment generation, this somatic mutation might be viewed as a novel type of activating mutation, creating an active fragment that promotes cell motility.

The molecular mechanism through which p45 MET promotes cell invasion remains elusive. Full-length MET promotes intracellular signaling through phosphorylation of its tyrosines involved notably in recruiting intracellular adaptors. In contrast, endogenous p45 MET does not display tyrosine phosphorylation, even following HGF/SF treatment, thus suggesting that it does not promote epithelial cell scattering through the same mechanisms as phosphorylated full-length MET.

Labile versus stable MET fragments

As presented above, MET undergoes distinct proteolytic cleavages leading to the generation of various intracellular

fragments defined as, the labile and stable ones. The labile fragments are p55 MET (MET-NTF) and p50 MET (MET-ICD), generated by the ADAM metalloproteases and γ -secretase during PS-RIP. Accordingly, these labile fragments are related to receptor degradation. The stable fragments are p45 MET, generated by calpain proteases, and p40 MET^{caspase} and p40 MET^{calpain} generated respectively by caspases and calcium-regulated calpain. MET fragment stability could thus be related to a short, 14-aa sequence (956-KKRKQIKDLGSELVR-970) of the juxtamembrane domain, present in p50 MET and absent in p45 MET (Fig. 2A and 2B).

At first glance, it seems that the labile fragments are associated with MET degradation since PS-RIP is involved in regulating the MET half-life under steady-state conditions. In contrast, the stable fragments might be associated with regulating biological responses, as demonstrated for the pro-invasive p45 MET fragment and the pro-apoptotic p40 MET^{caspase} fragment. The situation might be less clear-cut, as some intracellular domain fragments (ICD fragments) generated by PS-RIP can, in fact, translocate into the nucleus to regulate transcription, like ICD of ERBB4 (70). Interestingly, intracellular C-terminal fragments of MET fused to the Gal-4 DNA-binding domain have been shown to display transactivation properties, which is inhibited by YAP silencing (71). In addition, a recent study has mapped a nuclear localization signal to the juxtamembrane region of MET (H1068-H1079) and suggests that a MET fragment might act as a transcription regulator via a mechanism involving the transcriptional regulator YAP (72). The observed instability of

p50 MET (MET-ICD) should rule out its involvement in transcriptional regulation unless particular cellular conditions favor its stability. Inversely, the p40 MET^{calpain} fragment produced during necrosis is stable, although no biological activity has been associated with it. In particular, no cytotoxicity has been associated with its generation, in contrast to what might be expected of a fragment produced during necrosis.

MET CLEAVAGES AND CANCER

Because MET is a well-known oncogenic protein frequently activated in cancer, it has been proposed that MET cleavages might play a role in cell transformation. In this regard, the proteolytic cleavages of MET can be categorized into two groups: (i) cleavages that might promote cell transformation and (ii) cleavages that might prevent cell transformation, notably through MET inactivation. There is currently only limited experimental evidence to demonstrate an understanding of the involvement of MET cleavages in tumorigenesis; apparently, crucial *in vivo* studies are still required. On the other hand, proteolytic cleavages of MET have been exploited in developing potential therapeutic tools or strategies for inhibiting cell transformation and tumorigenesis.

Is calpain proteolysis of MET the missing link between MET cleavage and cancer?

Only one proteolytic cleavage of MET produces an intracellular fragment capable of triggering biological responses

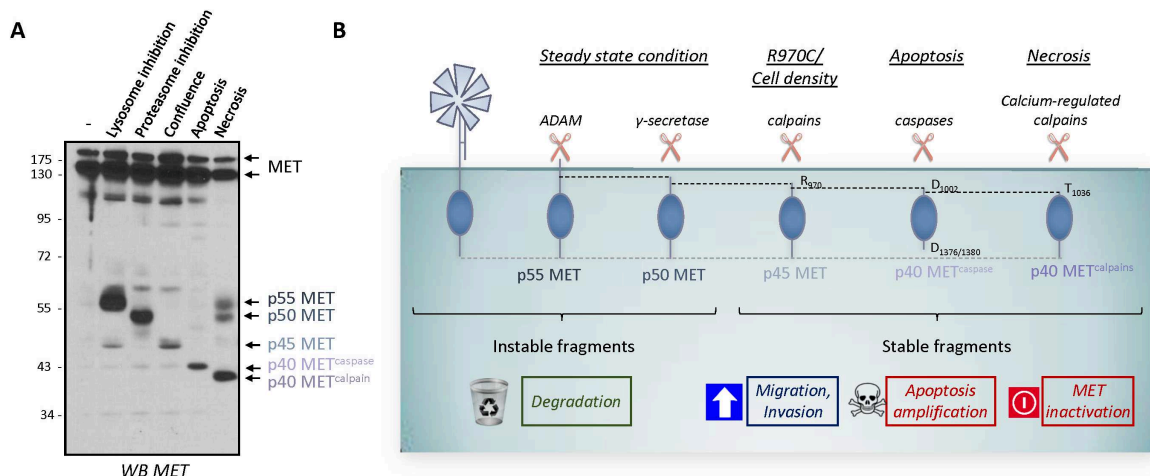


Fig. 2. Unstable and stable intracellular MET fragments produced by proteolytic cleavages. (A) MCF-10A cells were subjected to the following treatments: incubation with a lysosome inhibitor (5 nM bafilomycin for 5 h); incubation with a proteasome inhibitor (10 μ M lactacystin for 5 h); culturing to high density (confluence); incubation with an apoptosis inducer (1 μ M staurosporine for 6 h); and induction of necrosis (with 1 μ M ionomycin for 1 h). Cell lysates were analyzed by western blotting with an antibody directed against the kinase domain of human MET. Arrows indicate the positions of MET and of the different MET fragments, p55 MET, p50 MET, p45 MET, p40 MET^{caspase}, and p40 MET^{calpain} (see (58) for detailed experimental procedures). (B) Schematic representation of the known unstable and stable intracellular MET fragments generated by proteolytic cleavages.

consistent with cell transformation: calpain cleavage at residue R970 in the juxtamembrane domain which results in the generation of p45 MET. Ectopic expression of p45 MET promotes the motility and invasion by epithelial cells, the two effects known to favor tumorigenesis. In addition, p45 MET generation is favored by R970C mutations found at a low rate in lung cancers, suggesting a causative link between the proteolytic cleavage and cancer. Finally, high cell density favors p45 MET generation, consistently with an observed increase in calpain activity under such conditions (69). Altogether, this suggests that high cell density and R970C mutation could promote cell migration and invasion through MET cleavages, thus favoring the escape of tumor cells from a primary tumor. However, crucial experiments in animal models like a demonstration that ectopic expression of the p45 MET fragment or expression of the MET R970C variant favors tumor growth, or that patients harboring R970C produce more p45 MET fragments are necessitated.

How can caspase cleavages convert MET from an oncogene to a tumor suppressor?

Dependence receptors constitute what is now known as a large family of receptors sharing the same functional feature: the ability to promote survival in the presence of ligand and apoptosis in its absence. Some RTKs such as MET (42), TRKC (73), RET (74), and KIT (75) are dependence receptors. Interestingly, all these receptors were initially known as oncoproteins and were found capable of inducing tumorigenesis when overactivated by aberrant ligand stimulation, mutations, overexpression, or even chromosomal translocation. Yet their ability to induce cell death in the absence of ligand reflects an opposite action as tumor suppressors. For instance, TRKC downregulation, notably through promoter methylation, has been demonstrated in colon cancer. Furthermore, re-established TRKC expression in colorectal cancer cell lines is associated with tumor cell death and inhibition of tumor growth (76, 77).

Like most RTKs, MET is known mainly as an oncoprotein. Nevertheless, as a member of the dependence receptor family, it might also be expected to act as a tumor suppressor. High levels of some members of this family, such as TRKC, RET, and KIT, have been associated with a good prognosis; however, this is not the case with MET and there exist no reported data on molecular alterations leading to MET downregulation in cancer. Several studies show that MET overproduction occurs in cancers and is associated with poor prognosis (19, 78). Nevertheless, it is uncertain whether the tumorigenic potential of MET overactivation is solely due to kinase domain activity or if inhibition of the MET apoptotic capacity might also have an impact, as MET activation leads to inhibition of MET cleavage by caspases and of its ability to amplify apoptosis. We can thus propose that, although activation of MET pro-survival signaling is known to contribute to its oncogenic activity, loss of MET pro-apoptotic capacity might also be

crucial in unleashing the tumorigenic activity of this receptor.

Apparently, the COSMIC database (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) now lists ten mutations affecting MET caspase sites in various cancers, such as D1002N in colorectal cancer or D1380N in ovarian cancer. As each mutation has been recorded only once, it would seem that such mutations occur at a low rate. However, recently it has been shown that about 3% of NSCLCs display mutations affecting the splice site of MET exon 14, causing deletion of the juxtamembrane region, where a caspase cleavage site has been found (62). Thus, MET Δ exon14 mutants are virtually uncleavable by caspases and might contribute to tumorigenesis by promoting a stronger pro-survival response.

In vivo evidence is required to assess the pro-apoptotic role of MET in tumorigenesis. It could be interesting, to see if knock-in mice mutated at the MET caspase site develop spontaneous tumors with aging or whether their breeding with mice prone to spontaneous tumorigenesis increases penetrance or the number of tumors.

Using soluble MET for therapy and diagnosis

As described above, PS-RIP of MET generates an extracellular N-terminal fragment (MET-NTF or sMET). This fragment, comprising the ligand-binding domain, can bind to HGF and act as a decoy (34), as confirmed by the observation that an excess of engineered recombinant sMET can interfere with both HGF binding to MET and MET homodimerization. In addition, sMET can inhibit tumor cell proliferation and survival in a variety of human xenograft models (41), acting as a potential therapeutic tool through its decoy activity.

Another therapeutic strategy might be forced induction of MET PS-RIP, for instance in cancer cells overexpressing the receptor. This could lead both to a decreased level of MET and to the generation of the decoy sMET. Although no natural stimulation has been shown to induce PS-RIP, the monoclonal antibody DN30 developed by P. Comoglio's team promotes both ADAM (33, 79) and γ -secretase cleavages (35). This antibody, directed against the MET extracellular domain, can trigger strong degradation of the receptor, concomitantly with the generation of sMET in the extracellular medium and its unstable counterpart fragments inside the cell (35, 79). DN30 antibody has been shown to reduce tumor growth in animals xenografted with various tumor cells displaying constitutive MET activation, notably due to *MET* gene amplification. Extensive studies have been carried out with an aim to improve DN30 efficacy. Extensive research has notably focused on developing a monovalent version to prevent MET dimerization (80), increasing DN30 stability by molecular and chemical modifications (81, 82), and enhancing its delivery through gene (antibody coding sequence) transfer (83). Another elegant approach has been to combine the DN30 antibody with an altered sMET decoy unable to bind DN30 because of a point mutation in its DN30-binding domain. These molecules have been observed to cooperate in

restraining cancer cell invasion and experimental tumor growth (84). The DN30 antibody has also been coupled with positron emitters such as ^{89}Zr for positron emission tomography (PET). MET-expressing xenografted tumors as small as about 10 mg were readily visualized by immuno-PET using ^{89}Zr -DN30 (85).

As MET shedding through PS-RIP is constitutive, sMET generation seems proportional to the level of full-length MET in cells (34, 39). Also, because sMET is uncoupled from the cell plasma membrane, it is readily detectable in body fluids (34, 39, 40). It has therefore been proposed that MET measured in blood sample might be used as a diagnostic tool to assume the level of full-length MET in a tumor. In mice xenografted with human tumor cells, a direct correlation has been found between tumor volume and the concentration of human sMET in the blood (86). The concentration of soluble MET has also been measured in sera from one French and two Chinese cohorts of patients with non-small-cell lung cancer. In the two Chinese cohorts, the sMET level was found to increase with the level of full-length MET within the tumor, but in the French cohort, no correlation was found. It is worth noting that the patients of both the Chinese cohorts displayed a high EGFR mutation rate, as is usually found in the Asiatic population. In the study by Fu *et al.*, the selected patients harbored EGFR mutations and were treated with an EGFR inhibitor (87). In the study by Lv *et al.*, about a quarter of the NSCLC patients displayed EGFR mutations and received an EGFR inhibitor (88). In the patients of the French cohort, EGFR mutations were absent. Importantly, treatment is well known to influence the molecular profile of lung tumors. For instance, resistance to EGFR-targeting therapies has been linked to amplification of the MET gene, leading to its massive expression in about 20% of patients (89). Thus, the high level of sMET in the Chinese cohort could be due to MET gene amplification. Furthermore, in the study by Fu *et al.* (87), the tumor diameter was large in the patients showing the highest sMET levels, thus suggesting that large tumors may generate more sMET. Lastly, measuring sMET in the urine allows differentiation between patients with and without bladder cancer. Urinary sMET might thus be used as a bladder cancer biomarker (40).

CONCLUSION

The signal-transducing activity of RTKs, including MET, relies on stimulation by the ligand and activation of downstream signaling pathways. As it is clearly related to the tyrosine kinase domain, RTK cleavages are often considered anecdotal, and their possible biological action is neglected. However, for receptors that do not display kinase activity, signaling through proteolytic cleavage is the rule. In Notch signaling, for example, secretase cleavages allow generation of an intracellular fragment capable of transducing the information through its translocation into the nucleus, where it can

regulate transcriptional responses (90). In the case of MET, the role of cleavages first appeared restricted to receptor downregulation. The distribution of roles thus appeared to be: tyrosine kinase activity for signal transduction and proteolysis for receptor degradation. Recent findings, however, have highlighted a more complex situation: some MET fragments are active and can regulate invasion or the survival/apoptosis balance. Thus, MET cleavages seem more important than initially suspected, and may help to fully explain the wide range of biological responses regulated by MET. Interestingly, all the MET proteolytic cleavages described to date occur independently of ligand stimulation. This suggests a different distribution of roles, with tyrosine kinase activity regulating the ligand-dependent responses and proteolytic cleavages regulating the ligand-independent responses. Besides the possibility of discovering novel proteolytic cleavages, the current challenge is to completely understand the biological consequences of the MET cleavages already described. For instance, an issue likely to be important in pathological situations such as cancer is: how do MET intracellular fragments, including p45 MET, promote epithelial cell invasion? It is intriguing to propose that such fragments might translocate into the nucleus to regulate transcriptional responses, as in the case of prototypical cleaved receptors such as Notch.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the CNRS, the Institut Pasteur de Lille, and INSERM, and by grants from the "Cancéropôle Nord-Ouest", the "Agence Nationale de la Recherche; Metropolis project", the "Ligue Contre le Cancer, Comité Nord", the "Institut National du Cancer" and "Ecole Doctorale Biologie Santé".

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflicting interests.

REFERENCES

1. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E and Vande Woude GF (2003) Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 915-925
2. 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
3. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S et al (1995) Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373, 699-702
4. Uehara Y, Minowa O, Mori C et al (1995) Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 373, 702-705
5. Maina F, Hilton MC, Ponzetto C, Davies AM and Klein R

- (1997) Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes Dev* 11, 3341-3350
6. Chmielowiec J, Borowiak M, Morkel M et al (2007) c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol* 177, 151-162
 7. Borowiak M, Garratt AN, Wustefeld T, Strehle M, Trautwein C and Birchmeier C (2004) Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10608-10613
 8. Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA and Thorgeirsson SS (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
 9. Schiering N, Knapp S, Marconi M et al (2003) Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the hepatocyte growth factor receptor c-Met and its complex with the microbial alkaloid K-252a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12654-12659
 10. Longati P, Bardelli A, Ponzetto C, Naldini L and Comoglio PM (1994) Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene* 9, 49-57
 11. Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z et al (1994) A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 77, 261-271
 12. Maina F, Casagrande F, Audero E et al (1996) Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell* 87, 531-542
 13. Peschard P, Fournier TM, Lamorte L et al (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
 14. Hashigasako A, Machide M, Nakamura T and Matsumoto K (2004) Bi-directional regulation of Ser-985 phosphorylation of c-met via protein kinase C and protein phosphatase 2A involves c-Met activation and cellular responsiveness to hepatocyte growth factor. *J Biol Chem* 279, 26445-26452
 15. Duplaquet L, Kherrouche Z, Baldacci S et al (2018) The multiple paths towards MET receptor addiction in cancer. *Oncogene* 37, 3200-3215
 16. Olivero M, Rizzo M, Madeddu R et al (1996) Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 74, 1862-1868
 17. Ichimura E, Maeshima A, Nakajima T and Nakamura T (1996) 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* 87, 1063-1069
 18. Wislez M, Rabbe N and Marchal J (2003) Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: role in tumor progression and death. *Cancer Res* 63, 1405-1412
 19. Park S, Choi YL, Sung CO et al (2012) High MET copy number and MET overexpression: poor outcome in non-small cell lung cancer patients. *Histol Histopathol* 27, 197-207
 20. Koochekpour S, Jeffers M, Rulong S, et al (1997) Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res* 57, 5391-5398
 21. Ferracini R, Di Renzo MF, Scotlandi K et al (1995) The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit. *Oncogene* 10, 739-749
 22. Tuck AB, Park M, Sterns EE, Boag A and Elliott BE (1996) Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma. *Am J Pathol* 148, 225-232
 23. Ponzetto C, Giordano S, Peverali F et al (1991) c-met is amplified but not mutated in a cell line with an activated met tyrosine kinase. *Oncogene* 6, 553-559
 24. Watermann I, Schmitt B and Stellmacher F (2015) Improved diagnostics targeting c-MET in non-small cell lung cancer: expression, amplification and activation? *Diagn Pathol* 10, 130
 25. Yang Y, Wu N, Shen J et al (2016) MET overexpression and amplification define a distinct molecular subgroup for targeted therapies in gastric cancer. *Gastric Cancer* 19, 778-788
 26. Sattler M, Reddy MM, Hasina R, Gangadhar T and Salgia R (2011) The role of the c-Met pathway in lung cancer and the potential for targeted therapy. *Ther Adv Med Oncol* 3, 171-184
 27. Krishnaswamy S, Kanteti R, Duke-Cohan JS et al (2009) Ethnic differences and functional analysis of MET mutations in lung cancer. *Clin Cancer Res* 15, 5714-5723
 28. Baldacci S, Mazieres J, Tomasini P et al (2017) Outcome of EGFR-mutated NSCLC patients with MET-driven resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncotarget* 8, 105103-105114
 29. Prat M, Crepaldi T, Gandino L, Giordano S, Longati P and Comoglio P (1991) C-terminal truncated forms of Met, the hepatocyte growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 11, 5954-5962
 30. Galvani AP, Cristiani C, Carpinelli P, Landonio A and Bertolero F (1995) Suramin modulates cellular levels of hepatocyte growth factor receptor by inducing shedding of a soluble form. *Biochem Pharmacol* 50, 959-966
 31. Jeffers M, Taylor GA, Weidner KM, Omura S and Vande-Woude GF (1997) Degradation of the Met tyrosine kinase receptor by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol* 17, 799-808
 32. Kopitz C, Gerg M, Bandapalli OR et al (2007) Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling. *Cancer Res* 67, 8615-8623
 33. Scheltemer F, Kobuch J, Moss ML et al (2010) A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) mediates DN30 antibody-induced shedding of the met surface receptor. *J Biol Chem* 285, 26335-26340
 34. Wajih N, Walter J and Sane DC (2002) Vascular origin of a soluble truncated form of the hepatocyte growth factor receptor (c-met). *Circ Res* 90, 46-52
 35. Foveau B, Ancot F and Leroy C (2009) Downregulation of the Met Receptor Tyrosine Kinase by Presenilin-dependent Regulated Intramembrane Proteolysis. *Mol Biol Cell* 20, 2494-2506

36. Ancot F, Leroy C, Muharram G et al (2012) Shedding-Generated Met Receptor Fragments can be Routed to Either the Proteasomal or the Lysosomal Degradation Pathway. *Traffic* 13, 1261-1272
37. Miller MA, Meyer AS and Beste MT (2013) ADAM-10 and -17 regulate endometriotic cell migration via concerted ligand and receptor shedding feedback on kinase signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E2074-2083
38. Trusolino L, Bertotti A and Comoglio PM (2010) MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 834-848
39. Copin MC, Lesaffre M, Berbon M 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
40. McNeil BK, Sorbellini M and Grubb RL 3rd et al (2014) Preliminary evaluation of urinary soluble Met as a biomarker for urothelial carcinoma of the bladder. *J Transl Med* 12, 199
41. Michieli P, Mazzone M, Basilico C et al (2004) Targeting the tumor and its microenvironment by a dual-function decoy Met receptor. *Cancer Cell* 6, 61-73
42. Tulasne D, Deheuninck J, Lourenco FC et al (2004) Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage. *Mol Cell Biol* 24, 10328-10339
43. Lefebvre J, Muharram G, Leroy C 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
44. Mebratu YA, Leyva-Baca I and Wathelet MG (2017) Bik reduces hyperplastic cells by increasing Bak and activating DAPK1 to juxtapose ER and mitochondria. *Nat Commun* 8, 803
45. Foveau B, Leroy C, Ancot F et al (2007) Amplification of apoptosis through sequential caspase cleavage of the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ* 14, 752-764
46. Ma J, Zou C and Guo L (2013) A novel death defying domain in met entraps the active site of caspase-3 and blocks apoptosis in hepatocytes. *Hepatology* 59, 2010-2021
47. Furlan A and Tulasne D (2013) How does met regulate the survival/apoptosis balance? *Hepatology* 60, 1108-1109
48. 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
49. Deheuninck J, Goormachtigh G and Foveau B (2009) Phosphorylation of the MET receptor on juxtamembrane tyrosine residue 1001 inhibits its caspase-dependent cleavage. *Cell Signal* 21, 1455-1463
50. Deheuninck J, Foveau B, Goormachtigh G et al (2008) Caspase cleavage of the MET receptor generates an HGF interfering fragment. *Biochem Biophys Res Commun* 367, 573-577
51. Bredesen DE, Mehlen P and Rabizadeh S (2005) Receptors that mediate cellular dependence. *Cell Death Differ* 12, 1031-1043
52. Negulescu AM and Mehlen P (2018) Dependence receptors - the dark side awakens. *FEBS J* 285, 3909-3924
53. Ichim G, Genevois AL, Menard M et al (2013) The Dependence Receptor TrkC Triggers Mitochondria-Dependent Apoptosis upon Cobra-1 Recruitment. *Mol Cell* 51, 632-646
54. Menard M, Costechareyre C, Ichim G et al (2018) Hey1- and p53-dependent TrkC proapoptotic activity controls neuroblastoma growth. *PLoS Biol* 16, e2002912
55. Halestrap AP (2010) A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans* 38, 841-860
56. Francis RJ, Kotecha S and Hallett MB (2013) Ca²⁺ activation of cytosolic calpain induces the transition from apoptosis to necrosis in neutrophils with externalized phosphatidylserine. *J Leukoc Biol* 93, 95-100
57. Yun B, Lee H, Ghosh M et al (2014) Serine hydrolase inhibitors block necrotic cell death by preventing calcium overload of the mitochondria and permeability transition pore formation. *J Biol Chem* 289, 1491-1504
58. Montagne R, Berbon M, Doublet L et al (2015) Necrosis- and apoptosis-related Met cleavages have divergent functional consequences. *Cell Death Dis* 6, e1769
59. Billger M, Wallin M and Karlsson JO (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
60. Czogalla A and Sikorski AF (2005) Spectrin and calpain: a 'target' and a 'sniper' in the pathology of neuronal cells. *Cell Mol Life Sci* 62, 1913-1924
61. Kelly BL, Vassar R and Ferreira A (2005) Beta-amyloid-induced dynamin 1 depletion in hippocampal neurons. A potential mechanism for early cognitive decline in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 280, 31746-31753
62. Cortot AB, Kherrouche Z, Descarpentries C et al (2017) Exon 14 deleted MET receptor as a new biomarker and target in cancers. *J Natl Cancer Inst* 109
63. Lee JH, Han SU, Cho H et al (2009) A novel germ line juxtamembrane Met mutation in human gastric cancer. *Oncogene* 19, 4947-4953
64. Ma PC, Kijima T, Maulik G et al (2003) c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer Res* 63, 6272-6281
65. Tyner JW, Fletcher LB, Wang EQ et al (2010) MET receptor sequence variants R970C and T992I lack transforming capacity. *Cancer Res* 70, 6233-6237
66. Shieh JM, Tang YA, Yang TH et al (2013) Lack of association of C-Met-N375S sequence variant with lung cancer susceptibility and prognosis. *Int J Med Sci* 10, 988-994
67. Boland JM, Jang JS, Li J 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
68. Zaffaroni D, Spinola M, Galvan A et al (2005) Met proto-oncogene juxtamembrane rare variations in mouse and humans: differential effects of Arg and Cys alleles on mouse lung tumorigenesis. *Oncogene* 24, 1084-1090
69. Montagne R, Baranzelli A, Muharram G et al (2017) MET

- receptor variant R970C favors calpain-dependent generation of a fragment promoting epithelial cell scattering. *Oncotarget* 8, 11268-11283
70. Merilahti JAM and Elenius K (2019) Gamma-secretase-dependent signaling of receptor tyrosine kinases. *Oncogene* 38, 151-163
 71. Matteucci E, Bendinelli P and Desiderio MA (2009) Nuclear localization of active HGF receptor Met in aggressive MDA-MB231 breast carcinoma cells. *Carcinogenesis* 30, 937-945
 72. Chaudhary SC, Cho MG, Nguyen TT, Park KS, Kwon MH and Lee JH (2014) A putative pH-dependent nuclear localization signal in the juxtamembrane region of c-Met. *Exp Mol Med* 46, e119
 73. Tauszig-Delamasure S, Yu LY, Cabrera JR et al (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
 74. Bordeaux MC, Forcet C, Granger L et al (2000) The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. *EMBO J* 19, 4056-4063
 75. Wang H, Boussouar A, Mazelin L et al (2018) The Proto-oncogene c-Kit Inhibits Tumor Growth by Behaving as a Dependence Receptor. *Mol Cell* 72, 413-425 e415
 76. Genevois AL, Ichim G, Coissieux MM et al (2013) Dependence receptor TrkC is a putative colon cancer tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 3017-3022
 77. Luo Y, Kaz AM, Kanngurn S et al (2013) NTRK3 is a potential tumor suppressor gene commonly inactivated by epigenetic mechanisms in colorectal cancer. *PLoS Genet* 9, e1003552
 78. De Oliveira AT, Matos D, Logullo AF et al (2009) MET Is highly expressed in advanced stages of colorectal cancer and indicates worse prognosis and mortality. *Anticancer Res* 29, 4807-4811
 79. Petrelli A, Circosta P, Granziero L et al (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
 80. Pacchiana G, Chiriaco C, Stella MC et al (2010) Monovalency unleashes the full therapeutic potential of the DN-30 anti-Met antibody. *J Biol Chem* 285, 36149-36157
 81. Cignetto S, Modica C, Chiriaco C et al (2016) Dual Constant Domain-Fab: A novel strategy to improve half-life and potency of a Met therapeutic antibody. *Mol Oncol* 10, 938-948
 82. Vigna E, Chiriaco C, Cignetto S et al (2015) Inhibition of ligand-independent constitutive activation of the Met oncogenic receptor by the engineered chemically-modified antibody DN30. *Mol Oncol* 9, 1760-1772
 83. Vigna E, Pacchiana G, Chiriaco C et al (2014) Targeted therapy by gene transfer of a monovalent antibody fragment against the Met oncogenic receptor. *J Mol Med (Berl)* 92, 65-76
 84. Basilico C, Modica C, Maione F, Vigna E and Comoglio PM (2018) Targeting the MET oncogene by concomitant inhibition of receptor and ligand via an antibody-"decoy" strategy. *Int J Cancer* [Epub ahead of print]
 85. Perk LR, Stigter-van Walsum M, Visser GW et al (2008) Quantitative PET imaging of Met-expressing human cancer xenografts with 89Zr-labelled monoclonal antibody DN30. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35, 1857-1867
 86. Athauda G, Giubellino A, Coleman JA et al (2006) c-Met ectodomain shedding rate correlates with malignant potential. *Clin Cancer Res* 12(14 Pt 1), 4154-4162
 87. Fu L, Guo W, Liu B et al (2013) Shedding of c-Met ectodomain correlates with c-Met expression in non-small cell lung cancer. *Biomarkers* 18, 126-135
 88. Lv H, Shan B, Tian Z, Li Y, Zhang Y and Wen S (2015) Soluble c-Met is a reliable and sensitive marker to detect c-Met expression level in lung cancer. *Biomed Res Int* 2015, 626578
 89. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T et al (2007) MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316, 1039-1043
 90. Siebel C and Lendahl U (2017) Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiol Rev* 97, 1235-1294

Revue n°2 : MET receptor in resistance to targeted therapies

When the MET receptor kicks in to resist targeted therapies

Marie Fernandes¹, Philippe Jamme¹, Alexis B Cortot^{1,2}, Zoulika Kherrouche¹ and David Tulasne¹.

¹ Univ. Lille, CNRS, Inserm, Institut Pasteur de Lille, CHU Lille, UMR9020-U1277 - CANTHER – Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France.

² Univ. Lille, Thoracic Oncology Department, CHU Lille, F-59000, France

Soumis

Revue

When the MET receptor kicks in to resist targeted therapies

Marie Fernandes¹, Philippe Jamme¹, Alexis B Cortot^{1,2}, Zoulika Kherrouche¹, David Tulasne¹

¹ Univ. Lille, CNRS, Inserm, Institut Pasteur de Lille, CHU Lille, UMR9020-U1277 - CANTHER - Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

² Univ. Lille, Thoracic Oncology Department, CHU Lille, F-59000, France

Correspondence to: david.tulasne@ibl.cnrs.fr

Abstract

Although targeted therapies have increased the life expectancy of patients with druggable molecular alterations directly involved in tumor development, the efficacy of these therapies is limited by acquired resistances leading to treatment failure. Most targeted therapies, including ones exploiting therapeutic antibodies and kinase inhibitors, are directed against receptor tyrosine kinases (RTKs) or major signaling hubs. Resistances to these therapies arise when inhibition of these targets is bypassed through activation of alternative signaling pathways. In recent years, activation of the receptor tyrosine kinase MET has been shown to promote resistance to various targeted therapies. This casts MET as important actor in resistance. In this review, we describe how the MET receptor triggers resistance to targeted therapies against RTKs such as EGFR, VEGFR, and HER2 and against signaling hubs such as BRAF. We also describe how MET can be its own resistance factor, as illustrated by on-target resistance of lung tumors harboring activating mutations causing MET exon 14 skipping. Interestingly, investigation of all these situations reveals functional physiological relationships between MET and the target of the therapy to which the cancer becomes resistant, suggesting that resistance stems from preexisting mechanisms. Identification of MET as a resistance factor opens the way to co-treatment strategies that are being tested in current clinical trials.

Targeted therapies and the inevitable associated resistances

Detection and characterization of genetic alterations in cancers, supported mainly by improved genome sequencing, have led to the discovery of activated oncogenes directly associated with tumorigenesis. These notably include genes encoding actors of signaling pathways, such as receptor tyrosine kinases (RTKs), and signaling hubs such as KRAS, BRAF, and PI3K. Importantly, some tumors depend on a single deregulated oncogene for their growth and/or survival. This dependence, called oncogene addiction, explains the efficacy of targeted therapies. The first example of this was activation of the BCR-ABL gene in chronic myelogenous leukemia, and therapies targeting the ABL kinase have led to strong clinical responses (1). Since then, many other targeted therapies have proved effective as long as the cancer cells depend on the targeted oncogene. Examples include antagonist monoclonal antibodies against HER2 or VEGFR, tyrosine kinase inhibitors (TKIs) against EGFR, HER2, or VEGFR, and inhibitors of the BRAF kinase. Such targeted therapies have increased the life expectancy of patients suffering from cancers such as lung cancer, breast cancer, and melanoma (2), provided the tumor is clearly oncogene-addicted.

Despite these encouraging results, the therapeutic efficacy of such inhibitors is limited by the systematic appearance, after weeks or months of treatment, of acquired resistances leading to treatment failure. Many studies have aimed to identify resistance mechanisms in cell models of resistance or by genome resequencing of the relapse tumors. Because most targeted therapies are directed against RTKs and signaling kinases, the first main mechanism of resistance involves activation of alternative signaling pathways that bypass driver inhibition. An example of this resistance mechanism, called off-target resistance, is the case of lung tumors harboring an activating EGFR mutation and treated with an EGFR TKI: 10 to 20% of patients treated with a first-generation EGFR TKI display EGFR-inhibition-bypassing *MET* gene amplification (3). The second main mechanism of resistance described is modification of the target itself by additional molecular alterations which abolish the efficacy of a targeted therapy. This resistance mechanism, called on-target resistance, is also found in lung tumors harboring an activating EGFR mutation: in about 50% of patients treated with a first-generation EGFR TKI, there appears an additional EGFR mutation at residue T790, which leads to resistance by interfering with TKI binding (4).

In recent years, the receptor tyrosine kinase MET has emerged as an important actor in resistance to various targeted therapies. In this review, we describe how the MET receptor triggers resistance of various cancers to therapies targeting RTKs such as EGFR, VEGFR, and HER2 or signaling hubs such as BRAF. In physiological situations, interestingly, functional relationships have been described between MET and the bypassed target, suggesting that resistance stems from preexisting mechanisms. We also describe the recently observed on-target resistance of lung tumors harboring activating mutations causing MET exon 14 skipping. MET can thus become its own resistance factor.

Presentation of the MET receptor

MET is an RTK produced predominantly in cells of epithelial origin. It is activated by its stromal ligand, hepatocyte growth factor (HGF), also called scatter factor(5). *HGF* and *MET* are essential to embryonic development, since knockout of either one affects formation of the epithelial organs, placenta, muscles, and neurons (6–9). Conditional *MET* knockout in the lung has demonstrated the involvement of MET in alveolar development (10). In adults, the HGF-MET pair is involved in physiological processes such as epidermal healing and liver regeneration (11–13).

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 tail (14). MET interaction with its ligand favors its dimerization and autophosphorylation of two tyrosine residues in 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 (15,16). 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 mice (17). 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 (18).

Resistance to EGFR TKIs: the prototype of resistance involving MET

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) belongs to the HER family and is known to be deregulated in various cancers. In Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC), mutations affecting the kinase domain of EGFR and inducing constitutive activation of this receptor are found in 10-40% of cases. MET and EGFR have been shown to activate similar downstream pathways, notably the MAPK and PI3K pathways (19). Thus, inhibition of one of these two receptors can be compensated by activation of the other. Direct crosstalk between MET and EGFR has also been evidenced. It was first shown that EGFR ligands such as TGF α and EGF activate MET through EGFR-MET heterodimerization and that EGFR and MET co-immunoprecipitate in tumor cells overexpressing EGFR (20,21). Ligand-independent activation of MET by EGFR has also been demonstrated, in work highlighting the role of GPCR (G-protein coupled receptors) in MET transactivation in human carcinoma cells (22). Inversely, HGF has been found to induce transcription of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor (HB-EGF), a ligand of EGFR (23). MET can also activate EGFR indirectly, through activation of SRC, which in turn activates

EGFR (24) (Figure 1A). In addition, MET and HER family members often appear to be co-expressed in tumors (25,26). EGFR variants such as vIII EGFR have been found to induce MET activation in glioblastomas (27).

The involvement of MET in resistance to EGFR-targeted therapies was first observed in EGFR-mutated NSCLC. In this type of cancer, MET activation through *MET* gene amplification acts as a bypass pathway leading to resistance to EGFR TKIs (3): *MET* amplification causes HER3 transactivation, which in turn induces activation of the PI3K pathway. In this setting, cell proliferation can be abolished only when an EGFR TKI and a MET TKI are combined. Importantly, although the resistance due to *MET* amplification was first observed in preclinical models, it has now been confirmed by molecular analysis of paired tumor samples obtained before and after exposure to an EGFR TKI. MET amplification is found in 5 to 22% of samples showing acquired resistance to a first- or second-generation EGFR TKI (3,28,29) (Figure 1B). Variations in MET amplification rates in the various series of post-progression tumor samples may be due, in part, to the lack of a consensual definition and technique for detection of *MET* amplification (30). Interestingly, clones displaying MET amplification can be detected, at a very low rate, before any treatment with an EGFR TKI. This suggests that these clones are selected under therapeutic pressure (31). Additionally, *MET* amplification can occasionally but rarely occur together with another mechanism of resistance to EGFR TKIs, such as the EGFR T790M mutation (32). Importantly, *MET* amplification is also a mechanism of resistance to osimertinib, a third-generation EGFR TKI designed to target even T790M-bearing EGFR. This is true both when osimertinib is used after failure of a first EGFR TKI (14% in (33); 22% in (33); 10% in (34)) and when it is used as first-line treatment (15% in (35) (Figure 1B). In colorectal cancer, *MET* amplification is responsible for primary and acquired resistance to monoclonal antibodies against EGFR. In patients whose tumors initially respond to cetuximab or panitumumab and later progress without any evidence of a KRAS mutation, MET amplification may be a frequent mechanism of resistance (36) (Figure 1B). Preclinical data suggest that MET inhibitors may be effective in this situation.

In addition to conferring resistance to EGFR TKIs, *MET* amplification promotes an aggressive phenotype in EGFR-mutated cells: increased cell proliferation, anchorage-independent growth, and migration, leading to an increased capacity to metastasize (37). Patients displaying *MET* amplification as a mechanism of resistance to EGFR TKIs are more prone to develop new metastases and to have a shorter time on treatment (37,38).

In addition to *MET* amplification, other MET activation mechanisms have been implicated in resistance to EGFR-targeted therapies. In both EGFR-mutated and EGFR-wild-type cell lines, the MET ligand HGF has been shown to induce resistance to EGFR inhibitors, including anti-EGFR antibodies and EGFR TKIs (39,40) (Figure 1B). On a larger scale, HGF can promote resistance to several targeted therapies in models of oncogene addiction, including EGFR- and BRAF-mutated cells (41). *In vitro*, HGF

causes activation of the PI3K-AKT pathway via GAB1-1, without recruitment of HER3 (31,39). Transient exposure to HGF is sufficient to promote clonal expansion of *MET*-amplified clones among EGFR-mutated cells (31). In a study where tumor samples were obtained from patients with EGFR-mutated NSCLC after tumor progression on an EGFR TKI, 61% of the samples displayed elevated levels of HGF (42). Patients showing tumor progression on an EGFR TKI showed higher serum levels of HGF than patients with no progression, and elevated serum HGF levels were significantly associated with shorter progression-free and overall survival (43). HGF-induced resistance to EGFR inhibitors could be overcome with mTOR inhibitors (44) or by combining an EGFR TKI with either an anti-angiogenic agent (45) or a PI3K inhibitor (46).

Lastly, *MET* mutations have also been implicated in acquired resistance to EGFR TKIs in EGFR-mutated NSCLC. Suzawa et al. report the case of an EGFR-mutated NSCLC patient who, at the time of progression on erlotinib, had developed both a T790M EGFR mutation and a *MET* mutation leading to exon 14 skipping (*MET*ex14 mutatio), and was later stabilized with a combination of osimertinib and the *MET* TKI crizotinib (47). Furthermore, *MET* kinase mutations have been proposed as a potential mechanism of acquired resistance to EGFR TKIs in EGFR-mutated NSCLC (48).

Several clinical studies have evaluated the combined use of an EGFR TKI and a *MET* TKI in patients with *MET*-induced resistance to EGFR inhibitors, mostly in EGFR-mutated NSCLC (Table 1 and Figure 1C). *MET*-dependent resistance was variously defined in these different studies, according to different criteria (gene copy number (GCN) gain or the ratio of *MET* GCN to centromeres) and thresholds. Combining osimertinib with the specific *MET* TKI savolitinib, in patients with *MET* amplification defined as $GCN \geq 5$ or $ratio \geq 2$, yielded an objective response rate of 30% in those who had been treated previously with osimertinib and 64-67% in those who had been treated previously with a first- or second-generation EGFR TKI (49). In a randomized phase II study, a combination of gefitinib and tepotinib, a *MET*-specific TKI, was evaluated in *MET*-altered, EGFR-mutated NSCLC patients having acquired resistance to an EGFR TKI. In patients with high *MET* overexpression or *MET* amplification (defined as $GCN \geq 5$ or $ratio \geq 2$), PFS and OS were longer with gefitinib and tepotinib than with chemotherapy (*MET* immunohistochemistry score 3+). In *MET*-amplified patients, the median OS was 37.3 months for patients treated with gefitinib and tepotinib, as compared to 13.1 months in those treated with chemotherapy (50). In another study, evaluating the combination of gefitinib and capmatinib in patients with tumors progressing on EGFR TKIs, the authors found antitumor activity to depend on the level of *MET* amplification (51). Other agents such as amivantanab (JNJ-61186372), a bispecific monoclonal antibody targeting both EGFR and *MET*, have shown encouraging results in *MET*-deregulated NSCLC, in both *in vivo* and clinical studies (52,53).

Resistance to anti-angiogenic VEGF and VEGFR inhibitors

Angiogenesis, which ensures oxygenation and nutrient uptake, is required for tumor growth. Therefore, investigators have developed therapies targeting angiogenic factors such as VEGFR1 and its ligand the VEGF. Since 2005, the FDA has approved this type of therapy for gastrointestinal stromal tumors, advanced renal cell carcinoma (RCC), thyroid carcinoma, hepatocellular carcinoma (HCC), and lung cancer (54). The agents used include TKIs against VEGFR (e.g. sorafenib, sunitinib, pazopanib, vandetanib) and monoclonal antibodies such as bevacizumab and ramucirumab (directed against VEGF and VEGFR2, respectively).

Unfortunately, resistances to these inhibitors also arise. They seem due, in part, to adaptive responses induced by intratumoral hypoxia resulting from treatment with antiangiogenic compounds. MET receptor involvement in the adaptive response to hypoxia was highlighted in the early 2000's: hypoxia-induced factor 1 (HIF1a) promotes MET expression leading to increased survival, migration, and angiogenesis (55). Resistance to VEGF/VEGFR inhibitors is thus proposed to involve the MET receptor as a consequence of targeted-therapy-induced hypoxia. Furthermore, MET and VEGFR2 have been found to interact directly. This interaction is involved in activated-VEGFR-mediated downregulation of MET phosphorylation through increased association of PTP1B phosphatase with MET. Hence, VEGFR2 inhibition by the anti-VEGF bevacizumab restores MET phosphorylation (56) (Figure 1A). This finding makes MET one of the main suspects in resistance to VEGF/VEGFR inhibitors.

Meanwhile, many TKIs targeting two or more RTK-family members have been developed. Cabozantinib, among others, belongs to this multikinase inhibitor family. Its targets notably include VEGFR and MET (57). Such inhibitors have been used in both preclinical models and patients to evidence the involvement of MET in resistance to VEGFR inhibition. They constitute promising tools for treating resistant patients.

Especially for metastatic RCC, antiangiogenic therapy is a major treatment modality. Unfortunately, about 20% of patients are refractory to this approach, and a large majority of remaining patients develop resistance and thus treatment failure (58). Interestingly, patient treatment with the VEGFR TKI sunitinib appears associated with increased MET phosphorylation without any concomitant increase in MET expression. In RCC cell lines, chronic sunitinib treatment also leads to MET activation, associated with increased motility and invasion. In a mouse model, both co-treatment of tumor xenografts with a VEGFR-targeting and a MET-targeting TKI and treatment with cabozantinib, which targets both, prevented growth of sunitinib-resistant tumors. This confirms the involvement of MET activation in resistance (59,60) (Figure 1B).

In HCC, the VEGFR inhibitor sorafenib, which also inhibits PDGF-R, c-KIF, RAF-1, and B-RAF, has been approved for first-line treatment (61) (Table 1). For patients, however, the survival benefit of sorafenib treatment is limited. Preclinical testing in animal models has revealed that the initial

decrease in angiogenesis under VEGFR inhibition is followed by rapid revascularization, associated with a more invasive and metastatic behavior (62). Similarly, although mice xenografted with hepatocellular carcinoma cells show inhibition of tumor growth when treated with a VEGF antagonist antibody, this effect is concomitant with increased metastasis (63). It is associated with an increase in both HIF1a and MET expression, suggesting that the hypoxia associated with VEGF-targeting therapy promotes MET expression. The involvement of the MET receptor in this resistance was evidenced by the efficacy of co-treatment with an anti-VEGF Ab and a MET TKI, which prevents both tumor growth and metastasis. Interestingly, the multikinase inhibitor NZ001 under development, which inhibits both VEGFR2 and MET, induces a similar response (63). Unfortunately, the results of the first study of combination treatment with axitinib (a selective inhibitor of VEGFR 1-3) and crizotinib failed to demonstrate a clinical benefit for patients with advanced RCC, with or without prior systemic therapy (64).

In NSCLC, bevacizumab is currently the only antiangiogenic agent approved for first-line treatment. Yet the clinical benefits of anti-VEGF therapy for NSCLC are modest, giving rise to both intrinsic and eventually acquired resistances (65). In preclinical models, xenograft tumors derived from NSCLC cell lines showed, upon treatment with various VEGFR TKIs, acquired resistance associated with increased HGF and MET expression leading to phosphorylation of the receptor. Ectopic expression of HGF in NSCLC cell lines reproduced this resistance, and co-treatment with VEGFR and MET TKIs overcame it, confirming the potential role of HGF in causing resistance. Interestingly, retrospective analysis of plasmas from NSCLC patients enrolled in clinical trials evaluating the efficacy of the VEGFR TKI vandetanib revealed an association between elevated circulating levels of HGF and poor prognosis (66).

In neuroblastoma, likewise, MET activation by its high-affinity ligand may be a resistance mechanism, as the IGR-N91 neuroblastoma cell line, resistant to the VEGFR TKI axitinib, displays elevated levels of HGF and of the phosphorylated form of MET. In addition, treating the parental cell line with HGF triggers resistance to axitinib. Consistently with these observations, the growth of tumors derived from these neuroblastoma cell lines was inhibited by co-treatment with the VEGFR- and MET-targeting TKI cabozantinib, this effect being associated with decreased angiogenesis and increased apoptosis (67).

Following the positive results from the phase 3 METEOR trial (68) (Table 1), the multikinase TKI cabozantinib was approved by the FDA in 2016, first for treatment of patients with advanced RCC having received prior anti-angiogenic therapy and the following year for first-line treatment. It is unclear, however, whether the efficacy of cabozantinib is due to its ability to prevent the appearance of resistance mechanisms involving interplay between VEGFR and MET or to other causes.

Resistance to anti-HER2 in breast cancer

The HER2 receptor is overexpressed in approximately 15% to 30% of invasive human breast cancers and also in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinomas. This overexpression is associated with reduced disease-free and overall survival. HER2+ breast tumors generally display constitutive tyrosine phosphorylation in the kinase domain, signalling pathway activation, and a high rate of cell growth (69).

The development of anti-HER2 agents such as monoclonal antibodies against HER2 (trastuzumab), tyrosine kinase inhibitors (lapatinib, afatinib, dacomitinib able to inhibit HER-family RTKs), and an antibody-cytotoxic agent conjugate (trastuzumab emtastine) has dramatically improved breast cancer patient care. Yet in the majority of patients, tumor progression is observed in the year after initiation of trastuzumab treatment (70). Mechanisms of resistance to anti-HER2 agents are wide-ranging. Resistance can be associated with loss of the targeted HER2 receptor through either decreased receptor expression, masking of its extracellular domain by coupling with other membrane proteins, or shedding of the trastuzumab target domain through the action of proteases (69). Furthermore, one frequently observes alterations in signalling pathways downstream of HER2, such as activating mutations in PI3K/AKT/mTOR pathway members (71) or constitutive activation of the tyrosine kinase SRC, a main partner for the majority of RTKs (72).

The involvement of the MET receptor in resistance to anti-HER2 treatments was evidenced by transcriptomic analysis of a HER2-positive breast cancer cohort (Figure 1B). Interestingly, tumors resistant to anti-HER2 treatments showed higher MET expression than responsive ones (25). *MET* amplification is observed in approximately one-fourth of HER2+ breast cancer cases and is associated with a higher risk of trastuzumab therapy failure (73). Similarly, HER2+ gastric cancer studies also revealed *MET* amplification as a mechanism of resistance to the pan-HER inhibitor afatinib (74,75). Consistently with these clinical observations, trastuzumab treatment of HER2-positive breast cancer cell lines led to increased MET expression, involved in the observed acquired resistance (25).

Interestingly, the interplay between HER2 and MET is key to explaining how MET - particularly its overexpression - promotes resistance to HER2 inhibition. Indeed, trastuzumab efficiently inhibits HER2 homodimerization but not HER2 heterodimerization with other RTKs. Yet, the MET receptor is able to dimerize with HER2, and this interaction is not inhibited by trastuzumab. Consequently, the HER2/MET interaction leads to cross-activation of the two receptors and to induction of both RTK downstream signaling pathways (76) (Figure 1A). This co-activation triggers synergistic action promoting cell invasion in epithelial cell models (77).

HGF overexpression, like that of MET and like amplification of the *MET* gene, has also been detected in resistant tumors (25) and can be associated with trastuzumab failure (73). HGF can also be

considered a biomarker of response to anti-HER2 treatment. In HER2+ metastatic gastric cancers, Takashi et al. evidenced a significant association between a low serum level of HGF at trastuzumab pretreatment and a positive response, a high level being a factor of poor prognosis (78). Furthermore, an increased serum level of HGF, as compared to pretreatment, was observed in cases of trastuzumab failure, suggesting that serum HGF could be used as a tracker of the response to trastuzumab.

In the light of MET involvement in resistance to HER2 inhibition, strategies combining MET TKI treatment with HER2 inhibition by an antibody or a TKI were first evaluated in cell models. Shattuck et al. found MET inhibition to restore sensitivity to trastuzumab treatment in HER2+ breast cancer cell lines (25). Similarly, in *HER2*-amplified gastric cancer cell lines rendered resistant to afatinib by *MET* amplification, co-therapy against HER2 and MET was found to inhibit tumor growth (79). A combination of lapatinib and foretinib (a multikinase inhibitor of MET and VEGFR) was likewise found to reverse resistance to lapatinib, i.e. to restore inhibition of the growth of experimental tumors derived from esophageal adenocarcinoma cells overexpressing both HER2 and MET (80). These data support the relevance of developing anti-MET strategies to fight resistance to therapies targeting HER2 (Table 1). Unfortunately, the phase I study (NCT01121575) that investigated the effect of combining dacomitinib, a pan-HER inhibitor, with crizotinib in patients with advanced NSCLC showed limited antitumor activity and substantial toxicity (81).

Resistance to BRAF inhibitors in melanoma and anaplastic thyroid carcinoma

More than half of metastatic melanomas display BRAF-activating mutations, mainly BRAF-V600E, leading to constitutive activation of the downstream MEK-ERK signaling pathway (82). These patients can be treated with a combination including a BRAF inhibitor (BRAFi) such as vemurafenib, the first drug approved for BRAF-mutant cancer. Such treatments have proved effective in about 50% of patients, but various innate and acquired resistances can lead to treatment failure (83,84). Characterizing the underlying resistance mechanisms is thus important, and many have been described, including reactivation of the MAPK signaling pathway and upregulation of PI3K-AKT-mTOR or growth factor receptors (85).

The involvement of HGF/MET signaling in resistance to BRAF inhibitors was first described in two back-to-back papers published in Nature in 2012. The objective of both studies was to investigate, in a large panel of cell lines with various oncogene addictions, whether sensitivity to targeted therapies could be overcome either by co-culturing with stromal cells (86) or by adding various RTK ligands (41). Both studies revealed HGF as an effective inducer of resistance to BRAFi in melanoma cell lines expressing the BRAF-V600E oncogene (Figure 2B): under treatment with BRAFi, HGF prevented the death of these cells by restoring sustained activation of the MEK-ERK and PI3K-AKT downstream

signaling pathways. The MET TKI crizotinib was able to prevent this response. This demonstrates that the observed HGF-induced resistance was dependent on MET receptor activation.

HGF expression analysis in a cohort of patients with BRAF-V600E melanoma revealed expression of this growth factor in the tumor-associated stroma of a large majority of patients. Furthermore, treatment with BRAFi increased this stromal HGF expression as compared to the pre-treatment situation (86). Also, an increase in circulating HGF in BRAF-mutant melanoma patients was associated with shorter progression-free and overall survival (41).

Besides resistances involving HGF expression, an activating BRAF mutation (G469A) was recently found to coexist with *MET* gene amplification in a patient-derived xenograft from a liver metastasis of a cancer of unknown primary site. Although *MET* gene amplification usually leads to constitutive MET activation, the receptor was found, unexpectedly, to be inactivated. Its activation was rescued upon BRAF inhibition. This suggests an interplay between these two oncogenes (87), a view supported mechanistically by the fact that BRAF signaling inhibits the PP2A phosphatase known to dephosphorylate Ser985 of MET. Since Ser985 phosphorylation inhibits MET kinase activity, BRAF activation leads to inhibition of MET activity, and the *MET* gene amplification remains functionally dormant. Treatment with a BRAF inhibitor reactivates this alteration, causing resistance to this targeted therapy (Figure 2A). Although this elegant mechanism was discovered in a patient-derived melanoma-cell line, it must be confirmed in other patients. On the basis of all these data, phase I clinical trials are ongoing to evaluate the use of MET TKIs and BRAF inhibitors in advanced BRAF-mutated cancers, including melanomas (Table 1).

In anaplastic thyroid carcinoma (ATC), BRAF-V600E is again the most common oncogenic driver, often associated with a TP53 alteration (88). A recent clinical trial of vemurafenib treatment for ATC showed significant responses, but these were followed by resistance (89). To investigate the underlying resistance mechanisms, an *in vivo* mouse model of ATC was developed, based on both thyroid-specific TP53 inactivation and doxycycline-dependent BRAF-V600E expression (90). Dox withdrawal induced complete tumor regression, followed by high-rate recurrence. This system thus constitutes an elegant *in vivo* model of resistance. Analysis of tumors resistant to BRAF blockade revealed focal amplification of chromosome 6, causing both MET and HGF overexpression in the affected region. The involvement of MET activation in the resistance process was then demonstrated in the model by effective inhibition of tumor growth by MET inhibitors, including crizotinib (90). In thyroid cancer cell lines carrying the BRAF-V600E mutation, acquired resistance was likewise associated with *MET* gene amplification leading to reactivation of the PI3K/AKT signaling pathway (91). Further study is required, however, to confirm the existence of this resistance mechanism in human BRAF-mutant thyroid cancers treated with vemurafenib.

In metastatic colorectal cancer, BRAF mutations are found in about 10% of patients. Yet in a phase II clinical trial, selective BRAF inhibitors such as vemurafenib showed only a minimal effect against *BRAF*-mutant CRC (92). This inefficacy as compared to the results obtained in melanoma patients appeared associated with reactivation of EGFR signaling (93). This led to evaluating, in clinical trials, co-treatment with BRAFi and EGFR-antagonist antibodies (94). In the context of these co-treatments, novel mechanisms of resistance were revealed, including amplification or mutation of *KRAS* and also *MET* amplification. Pietrantonio *et al.* report that a patient co-treated with the anti-EGFR antibody panitumumab and the BRAFi vemurafenib displayed disease progression after an initial response. This resistance to targeted co-treatment was associated with *MET* gene amplification, a mechanism already observed in colorectal cancers treated with EGFR TKIs (36). In the same study, interestingly, *MET* overexpression in colorectal cancer cells was found to cause resistance to BRAF and EGFR inhibition. Subsequent co-treatment of the patient with vemurafenib and the *MET* TKI crizotinib proved effective, reducing the colorectal tumor and liver metastases. This confirmed *MET* gene amplification as a resistance mechanism in this context (95). As previously mentioned, this observation has to be confirmed in other patients in order to assess how widespread this mechanism is.

On-target resistance in METexon14 NSCLC patients

Although *MET* is known to be deregulated in many cancers and has been identified as a driver oncogene in several well-characterized situations (see (96) for a review), it was not until this year that the clinical use of *MET*-targeting therapies was approved for treatment of NSCLC (97,98).

Novel *MET*-gene alterations, called METex14 mutations, have recently been found in about 3% of profiled lung tumors (99,100). All these alterations affect splice sites of *MET* exon 14 and lead to in-frame exon 14 skipping and subsequent deletion of the regulatory juxtamembrane domain of *MET* (18). The juxtamembrane domain contains several negative regulatory sites, including the ligand-dependent phosphorylated tyrosine residue 1003. This residue can recruit the E3 ubiquitin ligase CBL (Casitas B-lineage Lymphoma) involved in *MET* ubiquitination, a molecular mechanism underlying intracellular RTK trafficking (101).

Importantly, objective responses to several *MET*-targeting TKIs have been observed in NSCLC patients harboring METex14 mutations. This was the case, for instance, in two phase II trials: VISION (which evaluated tepotinib) and GEOMETRY (which evaluated capmatinib). In these trials, about half of the patients with METex14 mutations showed an objective response, and the median duration of the response exceeded 11 months (98,102). While most cases of METex14-harboring NSCLC are still treated by conventional chemotherapies, these results have led the Japanese Ministry of Health to approve tepotinib for the treatment of unresectable, advanced, or recurrent NSCLC with METex14 alterations. In the US, tepotinib treatment has received breakthrough therapy designation. Capmatinib

has been approved by the FDA for adult patients with metastatic NSCLC whose tumors have a mutation leading to MET exon 14 skipping.

Thus, in the last few years, various MET TKIs (crizotinib, glesatinib, capmatinib, tepotinib) have been used and have shown efficacy in clinical trials or as off-label treatments for NSCLC patients with oncogenesis-driving METex14 (97,98). Yet after initial responses and as expected for targeted therapies, resistances leading inexorably to relapses have systematically been observed. Many resistance mechanisms have been described, mostly involving activation of the usual suspects such as other RTKs or downstream signaling hubs (103,104). Some resistances, however, are due to on-target mutations, essentially in the MET kinase domain, which abolish TKI-exerted inhibition of the kinase. In the context of this review we can thus state that MET resists its own targeting.

To date, seven mutations have been clinically described, after treatment with a MET TKI, in patients harboring METex14 mutations: H1067, H1112, G1181, L1213, F1218, D1246, and Y1248 (105–115). These mutations usually emerge after only a few months of treatment with crizotinib, glesatinib, or capmatinib (Table 2 and Figure 3A). The presence of multiple mutations in the kinase domain has also been observed (105,111,113,114,116). For example, D1246N/H has been found with Y1248H (106) and G1181R can be present with L1213V, D1246H/N, and Y1248H/S (113) in the patient's circulating DNA. This suggests the existence of multiple resistance mechanisms associated with tumor heterogeneity.

In the recent study of Recondo *et al.*, among 20 METex14-mutation-harboring patients who experienced resistance to a MET TKI, 7 (35%) displayed on-target resistances due to MET mutations, the other resistances being off-target ones due to KRAS activation or to unknown mechanisms. Interestingly, one resistant tumor displayed strong *METex14* gene amplification. This amplification, classified also as an on-target resistance mechanism, suggests that high METex14 expression could overcome TKI inhibition (113).

Most of the MET mutations recently found to be associated with resistance to TKIs were already known as MET-activating mutations, notably in renal cancer (117–120). Detection of these mutations in tumors suggests that they may play a direct role in resistance through ligand-independent MET activation.

Resistance to MET TKIs has also been investigated in cell models expressing METex14 and/or displaying METex14 oncogene dependence. In Ba/F3 cells engineered to depend, for their growth, on ectopic expression of an oncogene rather than on a cytokine, 12 MET resistance mutations were revealed, including five at residues previously spotted in patients (G1181, L1213, F1218, D1246 and Y1248) (121). Interestingly, mutations at positions 1246 and 1248 were involved in resistance to type I TKIs, which bind the active form of MET, while mutations at 1213 and 1218 were involved in resistance to type II TKIs, which bind the inactive form. This study thus suggests that the contribution of specific

mutations to resistance may depend on the type of TKI (121). These data are also in agreement with the view that a conformational change induced by a particular mutation in the kinase domain may interfere with binding of particular MET TKIs. For instance, the resistance mutations at positions 1181 and 1248 are consistent with steric hindrance of crizotinib binding (crizotinib being a type I TKI), while the resistance mutations at positions 1213 and 1218 are consistent with steric hindrance of binding of merestinib, a type II TKI (Figure 3B). Interestingly, MET variants with resistance mutations against type I TKIs were found to be sensitive to type II inhibitors, and vice versa (121). This suggests that resistance might be overcome through the complementary activity of type I and II MET TKIs. Similar results were obtained in NIH3T3 cells, where expression of a MET variant displaying both an exon 14 deletion and a D1246N or Y1248C mutation was found to drive resistance to type I but not type II inhibitors (107). In the same publication, the authors report a patient with a METex14 mutation who displayed resistance to crizotinib, associated with the presence, in cfDNA, of the following additional MET mutations: D1246N, Y1248H/S, and G1181R. On the basis of results obtained in cell models, treatment was switched from the type I inhibitor crizotinib to the type II inhibitor glesatinib. This led to regression of some metastatic localizations, with disappearance of the Y1248H/S mutation from the cfDNA. This disappearance was concomitant, however, with the appearance of an L1213V mutation (107), identified in a study by Fujino et al (121) as a mutation leading to resistance to type II TKIs.

On-target resistance has also been described in the context of *MET* gene amplification. A case report describes a patient with an initial EGFR-activating mutation who developed primary resistance to an EGFR TKI through *MET* gene amplification (122). Co-treatment with an EGFR TKI and the MET TKI savolitinib led to a dramatic clinical response. After several months of co-treatment, however, the patient experienced a relapse associated with detection of an additional MET D1246V mutation, previously described as an activating mutation (123). In the same study, interestingly, the authors demonstrated with reconstituted MET mutations in cell lines that the D1246V mutant is resistant to type I TKIs, including savolitinib, but not to type II MET inhibitors. This finding led to adapting the treatment. The patient then received co-treatment with an EGFR TKI and cabozantinib, a type II MET TKI, to which the progressive lung disease responded dramatically (122).

Taken together, case reports and cell-based resistance assays allow proposing a flowchart for sequential treatment of METex14 lung cancer patients. Mutations causing resistance to type I TKIs, including at least the D1246H/N and Y1248H/N/S/C mutations, can be overcome with type II MET TKIs. Conversely, mutations causing resistance to type II TKIs, including at least the L1213F and F1218I mutations, can be overcome with type I TKIs (Figure 4).

Conclusion and prospects

A review of the literature identifies MET activation as an effective mechanism of resistance to targeted therapies against several RTKs. MET is notably involved in resistance to EGFR, HER2, and VEGFR targeting. In these three cases, the resistance can be qualified as a substitution resistance, since MET can replace another RTK. One would think that the substitution “works” because of major similarities between the downstream signaling pathways of MET and of the replaced RTK. Yet when MET replaces EGFR in the context of resistance to an EGFR TKI, only a subset of signaling pathways seems involved in the resistance. First, in cell models of oncogene addiction, specific targeting of either MET or EGFR with a TKI led to similarly altered phosphoprotein profiles and to largely common transcriptomic modifications. Reductions in the phosphoproteome were mainly dependent on RAS and PI3K, suggesting that the MET and EGFR oncogene addictions involve similar signaling hubs restricted to a few pathways (124). The central role of RAS and PI3K signaling in resistance was latter demonstrated by the fact that mutations in and amplification of *KRAS* and *PI3K* are widespread mechanisms of resistance to both EGFR and MET TKIs (125). Because most RTKs can activate RAS and/or PI3K signaling, RTKs might be expected to replace each other.

Resistance through substitution also seems supported by preexisting functional relationships between RTKs, including their heterodimerization, cross-activation, and negative feedback loops. This is exemplified by the interplay between VEGFR and MET. The MET receptor participates in the adaptive response to hypoxia, since MET, like VEGFR, is an angiogenic receptor. Thus, hypoxia due to VEGFR inhibition leads to MET re-expression, which in turn supports resistance (55). Furthermore, as activated VEGFR negatively regulates MET phosphorylation through the phosphatase PTP1B, MET is directly activated upon VEGFR inhibition (56). Thus, resistance mechanisms appear to rely both on similarities in RTK signaling and on preexisting functional relationships between RTKs. These observations suggest that acquired resistance may arise not only through random phenomena but also through oriented processes. First, resistance can emerge through selection of the molecular alteration that is most appropriate for effective substitution. Second, resistance can be initiated by breaking of a negative feedback loop by the targeted therapy, leading to direct activation of the resistance factor.

The second main mechanism of resistance involving MET is exemplified by resistance to BRAF inhibitors in melanoma and thyroid carcinoma. In these cancers, MET activation through gene amplification can bypass inhibition of BRAF. This mechanism is thus called bypass resistance. Interestingly, as in the case of substitution resistance, the existence of a functional relationship between BRAF and MET may favor establishment of the resistance: BRAF-inhibitor-triggered disruption of the negative feedback exerted by BRAF on MET through PP2A promotes MET activation.

For all substitution and bypass resistances involving MET, the existence of powerful MET TKIs opens the way to potential co-treatments. In resistant cell lines and experimental animal

tumorigenesis, co-targeting of MET and of a second oncogenic RTK (VEGFR, EGFR, or HER2) has proven effective. Multiple trials are in progress to investigate co-targeting with two inhibitors (TKIs, antibodies) or with multitarget agents, and results are pending (Table 1). Interestingly, some clinical trials are specifically designed to evaluate co-treatment efficacy in the expected resistance situation. For example, several clinical trials are evaluating EGFR/MET TKI co-treatment as a way to counter resistance associated with *MET* gene amplification. One should note, however, that co-treatment studies considering molecular MET alterations as stratifiers remain the exception. Hence, should these trials fail to demonstrate any efficacy of the co-treatment, this will not mean that the tested combination is not effective in the few patients who develop a particular resistance mechanism. It is also important to mention the possibility of targeting two receptors with a single compound such as cabozantinib, a TKI that inhibits both VEGFR and MET, and the bispecific antibodies which target both EGFR and MET (52,126). Many clinical trials are in progress to evaluate such treatments, especially for cabozantinib.

The third mechanism of resistance involving MET is its own molecular alteration as a consequence of targeted therapy against MET. Such on-target resistance has been observed in the context of METex14 mutations in lung cancer: resistance arises through additional *MET* mutations within the kinase domain. In this situation, the mutation interferes directly with TKI-MET binding. Because type I and type II MET inhibitors bind, respectively, to either the active or the inactive kinase domain, different MET mutations occur according to the type of treatment. In several patient cases, these observations have led to proposing a sequence of treatments to overcome resistance (107,122). These case reports open the way to possible adaptation of MET-targeting therapies according to the type of on-target resistance (Figure 4).

Basic knowledge of RTKs, accumulated from their discovery in the early 80's, has led to the development of targeted therapies which have profoundly changed the treatment of eligible patients. Much has notably been learned about the complex mechanisms which underlie RTK activation and downstream signal transduction. In parallel with improvements in targeted therapy, the focus of scientific research on RTKs in general and on the MET receptor in particular has shifted gradually from basic studies to applied research, on the false premise that RTK signaling is sufficiently well known, since RTK targeting is effective. Yet the emergence of resistances has revealed how shaky that premise is. It now appears that most resistances are based on preexisting functional links between target and resistance factor. Hence, extensive functional data are needed to fully understand resistance mechanisms. This includes - but is not limited to - the study of RTK co-receptors, of signaling hubs shared by RTKs, and of negative feedback loops between RTKs and actors of the signaling pathways. Constant cross feeding between basic and clinical research will thus be required to meet future challenges imposed by resistance to targeted therapies.

References:

1. 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.
2. Giovannetti E, Rodriguez JA. Targeted therapies in cancer: where are we going? *Cancer Drug Resistance*. 2018;1:82–6.
3. 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 (New York, NY)*. 2007;316:1039–43.
4. Kwak EL, Sordella R, Bell DW, Godin-Heymann N, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:7665–70.
5. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:915–25.
6. Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*. 1995;376:768-71.
7. Maina F, Hilton MC, Ponzetto C, Davies AM, Klein R. Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes Dev*. 1997;11:3341-50.
8. 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.
9. 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;373:702–5.
10. Calvi C, Podowski M, Lopez-Mercado A, Metzger S, Misono K, Malinina A, et al. Hepatocyte growth factor, a determinant of airspace homeostasis in the murine lung. *PLoS genetics*. 2013;9:e1003228.
11. 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;101:10608–13.
12. Chmielowiec J, Borowiak M, Morkel M, Stradal T, Munz B, Werner S, et al. c-Met is essential for wound healing in the skin. *The Journal of cell biology*. 2007;177:151–62.
13. 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;101:4477–82.
14. 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;100:12654–9.
15. 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.
 16. Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, et al. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell*. 1994;77:261–71.
 17. 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;87:531–42.
 18. 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.
 19. Wagner JP, Wolf-Yadlin A, Sevecka M, Grenier JK, Root DE, Lauffenburger DA, et al. Receptor tyrosine kinases fall into distinct classes based on their inferred signaling networks. *Sci Signal*. 2013;6:ra58.
 20. Jo M, Stolz DB, Esplen JE, Dorko K, Michalopoulos GK, Strom SC. Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells. *J Biol Chem*. 2000;275:8806–11.
 21. Werbin JL, Avendaño MS, Becker V, Jungmann R, Yin P, Danuser G, et al. Multiplexed Exchange-PAINT imaging reveals ligand-dependent EGFR and Met interactions in the plasma membrane. *Sci Rep*. 2017;7:12150.
 22. Fischer OM, Giordano S, Comoglio PM, Ullrich A. Reactive oxygen species mediate Met receptor transactivation by G protein-coupled receptors and the epidermal growth factor receptor in human carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2004;279:28970–8.
 23. Reznik TE, Sang Y, Ma Y, Abounader R, Rosen EM, Xia S, et al. Transcription-dependent epidermal growth factor receptor activation by hepatocyte growth factor. *Mol Cancer Res*. 2008;6:139–50.
 24. Mueller KL, Hunter LA, Ethier SP, Boerner JL. Met and c-Src cooperate to compensate for loss of epidermal growth factor receptor kinase activity in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2008;68:3314–22.
 25. Shattuck DL, Miller JK, Carraway KL, Sweeney C. Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer research*. 2008;68:1471–7.
 26. Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, Watanabe A, Tatsumi M, Yamashita J, et al. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer*. 1999;85:1894–902.
 27. Huang PH, Mukasa A, Bonavia R, Flynn RA, Brewer ZE, Cavenee WK, et al. Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:12867–72.

28. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med*. 2011;3:75ra26.
29. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res*. 2013;19:2240–7.
30. Camidge DR, Davies KD. MET Copy Number as a Secondary Driver of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in EGFR-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2019;37:855–7.
31. Turke AB, Zejnullahu K, Wu YL, Song Y, Dias-Santagata D, Lifshits E, et al. Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer cell*. 2010;17:77–88.
32. Baldacci S, Mazieres J, Tomasini P, Girard N, Guisier F, Audigier-Valette C, et al. Outcome of EGFR-mutated NSCLC patients with MET-driven resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncotarget*. 2017;8:105103–14.
33. Le X, Puri S, Negrao MV, Nilsson MB, Robichaux J, Boyle T, et al. Landscape of EGFR-Dependent and -Independent Resistance Mechanisms to Osimertinib and Continuation Therapy Beyond Progression in EGFR-Mutant NSCLC. *Clin Cancer Res*. 2018;24:6195–203.
34. Oxnard GR, Hu Y, Mileham KF, Husain H, Costa DB, Tracy P, et al. Assessment of Resistance Mechanisms and Clinical Implications in Patients With EGFR T790M-Positive Lung Cancer and Acquired Resistance to Osimertinib. *JAMA Oncol*. 2018;4:1527–34.
35. Ramalingam SS, Cheng Y, Zhou C, Ohe Y, Imamura F, Cho BC, et al. Mechanisms of acquired resistance to first-line osimertinib: Preliminary data from the phase III FLAURA study. *Annals of Oncology*. Elsevier; 2018;29:viii740.
36. 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;3:658–73.
37. Baldacci S, Kherrouche Z, Cockenpot V, Stoven L, Copin MC, Werkmeister E, et al. MET amplification increases the metastatic spread of EGFR-mutated NSCLC. *Lung Cancer*. 2018;125:57–67.
38. Lai GGY, Lim TH, Lim J, Liew PJR, Kwang XL, Nahar R, et al. Clonal MET Amplification as a Determinant of Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in Epidermal Growth Factor Receptor-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2019;37:876–84.
39. Yano S, Wang W, Li Q, Matsumoto K, Sakurama H, Nakamura T, et al. Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer research*. 2008;68:9479–87.
40. Yamada T, Takeuchi S, Kita K, Bando H, Nakamura T, Matsumoto K, et al. Hepatocyte growth factor induces resistance to anti-epidermal growth factor receptor antibody in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2012;7:272–80.
41. Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, et al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature*. 2012;487:505–9.

42. Yano S, Yamada T, Takeuchi S, Tachibana K, Minami Y, Yatabe Y, et al. Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. *J Thorac Oncol.* 2011;6:2011–7.
43. Kasahara K, Arao T, Sakai K, Matsumoto K, Sakai A, Kimura H, et al. Impact of serum hepatocyte growth factor on treatment response to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with non-small cell lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2010;16:4616–24.
44. Ishikawa D, Takeuchi S, Nakagawa T, Sano T, Nakade J, Nanjo S, et al. mTOR inhibitors control the growth of EGFR mutant lung cancer even after acquiring resistance by HGF. *PLoS One.* 2013;8:e62104.
45. Takeuchi S, Wang W, Li Q, Yamada T, Kita K, Donev IS, et al. Dual inhibition of Met kinase and angiogenesis to overcome HGF-induced EGFR-TKI resistance in EGFR mutant lung cancer. *Am J Pathol.* 2012;181:1034–43.
46. Donev IS, Wang W, Yamada T, Li Q, Takeuchi S, Matsumoto K, et al. Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17:2260–9.
47. Suzawa K, Offin M, Schoenfeld AJ, Plodkowski AJ, Odintsov I, Lu D, et al. Acquired MET Exon 14 Alteration Drives Secondary Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor in EGFR-Mutated Lung Cancer. *JCO Precis Oncol.* 2019;3.
48. Schoenfeld AJ, Chan JM, Kubota D, Sato H, Rizvi H, Daneshbod Y, et al. Tumor Analyses Reveal Squamous Transformation and Off-Target Alterations As Early Resistance Mechanisms to First-line Osimertinib in EGFR-Mutant Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2020;26:2654–63.
49. Sequist LV, Han J-Y, Ahn M-J, Cho BC, Yu H, Kim S-W, et al. Osimertinib plus savolitinib in patients with EGFR mutation-positive, MET-amplified, non-small-cell lung cancer after progression on EGFR tyrosine kinase inhibitors: interim results from a multicentre, open-label, phase 1b study. *Lancet Oncol.* 2020;21:373–86.
50. Wu Y-L, Cheng Y, Zhou J, Lu S, Zhang Y, Zhao J, et al. Tepotinib plus gefitinib in patients with EGFR-mutant non-small-cell lung cancer with MET overexpression or MET amplification and acquired resistance to previous EGFR inhibitor (INSIGHT study): an open-label, phase 1b/2, multicentre, randomised trial. *Lancet Respir Med.* 2020;8:1132–43.
51. Wu Y-L, Zhang L, Kim D-W, Liu X, Lee DH, Yang JC-H, et al. Phase Ib/II Study of Capmatinib (INC280) Plus Gefitinib After Failure of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Inhibitor Therapy in Patients With EGFR-Mutated, MET Factor-Dysregulated Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2018;36:3101–9.
52. Moores SL, Chiu ML, Bushey BS, Chevalier K, Luistro L, Dorn K, et al. A Novel Bispecific Antibody Targeting EGFR and cMet Is Effective against EGFR Inhibitor-Resistant Lung Tumors. *Cancer Res.* 2016;76:3942–53.
53. Haura EB, Cho BC, Lee JS, Han J-Y, Lee KH, Sanborn RE, et al. JNJ-61186372 (JNJ-372), an EGFR-cMet bispecific antibody, in EGFR-driven advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *JCO. American Society of Clinical Oncology;* 2019;37:9009–9009.

54. Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2008;8:579–91.
55. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer cell*. 2003;3:347–61.
56. Lu KV, Chang JP, Parachoniak CA, Pandika MM, Aghi MK, Meyronet D, et al. VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex. *Cancer cell*. 2012;22:21–35.
57. Sennino B, Ishiguro-Oonuma T, Wei Y, Naylor RM, Williamson CW, Bhagwandin V, et al. Suppression of tumor invasion and metastasis by concurrent inhibition of c-Met and VEGF signaling in pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Discov*. 2012;2:270–87.
58. Griffioen AW, Mans LA, de Graaf AMA, Nowak-Sliwinska P, de Hoog C, de Jong TAM, et al. Rapid angiogenesis onset after discontinuation of sunitinib treatment of renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res*. 2012;18:3961–71.
59. Ciamporcero E, Miles KM, Adelaiye R, Ramakrishnan S, Shen L, Ku S, et al. Combination strategy targeting VEGF and HGF/c-met in human renal cell carcinoma models. *Molecular cancer therapeutics*. 2015;14:101–10.
60. Zhou L, Liu XD, Sun M, Zhang X, German P, Bai S, et al. Targeting MET and AXL overcomes resistance to sunitinib therapy in renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2016;35:2687–97.
61. Bruix J, Raoul JL, Sherman M, Mazzaferro V, Bolondi L, Craxi A, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: subanalyses of a phase III trial. *Journal of hepatology*. 2012;57:821–9.
62. Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vinals F, et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer cell*. 2009;15:220–31.
63. Zhang Y, Gao X, Zhu Y, Kadel D, Sun H, Chen J, et al. The dual blockade of MET and VEGFR2 signaling demonstrates pronounced inhibition on tumor growth and metastasis of hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37:93.
64. Michaelson MD, Gupta S, Agarwal N, Szmulewitz R, Powles T, Pili R, et al. A Phase Ib Study of Axitinib in Combination with Crizotinib in Patients with Metastatic Renal Cell Cancer or Other Advanced Solid Tumors. *Oncologist*. 2019;24:1151-e817.
65. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2006;355:2542–50.
66. Cascone T, Xu L, Lin HY, Liu W, Tran HT, Liu Y, et al. The HGF/c-MET Pathway Is a Driver and Biomarker of VEGFR-inhibitor Resistance and Vascular Remodeling in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23:5489–501.
67. Daudigeos-Dubus E, Le Dret L, Bawa O, Opolon P, Vievard A, Villa I, et al. Dual inhibition using cabozantinib overcomes HGF/MET signaling mediated resistance to pan-VEGFR inhibition in orthotopic and metastatic neuroblastoma tumors. *International journal of oncology*. 2017;50:203–11.

68. Choueiri TK, Escudier B, Powles T, Tannir NM, Mainwaring PN, Rini BI, et al. Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*. 2016;17:917–27.
69. Vernieri C, Milano M, Brambilla M, Mennitto A, Maggi C, Cona MS, et al. Resistance mechanisms to anti-HER2 therapies in HER2-positive breast cancer: Current knowledge, new research directions and therapeutic perspectives. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2019;139:53–66.
70. Nahta R, Esteva FJ. Trastuzumab: triumphs and tribulations. *Oncogene*. 2007;26:3637–43.
71. Loibl S, Majewski I, Guarneri V, Nekljudova V, Holmes E, Bria E, et al. PIK3CA mutations are associated with reduced pathological complete response rates in primary HER2-positive breast cancer: pooled analysis of 967 patients from five prospective trials investigating lapatinib and trastuzumab. *Ann Oncol*. 2016;27:1519–25.
72. Zhang S, Huang WC, Li P, Guo H, Poh SB, Brady SW, et al. Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nature medicine*. 2011;17:461–9.
73. Minuti G, Cappuzzo F, Duchnowska R, Jassem J, Fabi A, O'Brien T, et al. Increased MET and HGF gene copy numbers are associated with trastuzumab failure in HER2-positive metastatic breast cancer. *British journal of cancer*. 2012;107:793–9.
74. Sanchez-Vega F, Hechtman JF, Castel P, Ku GY, Tuvy Y, Won H, et al. EGFR and MET Amplifications Determine Response to HER2 Inhibition in ERBB2-Amplified Esophagogastric Cancer. *Cancer Discov*. 2019;9:199–209.
75. Yoshioka T, Shien K, Takeda T, Takahashi Y, Kurihara E, Ogoshi Y, et al. Acquired resistance mechanisms to afatinib in HER2-amplified gastric cancer cells. *Cancer Sci*. 2019;110:2549–57.
76. Agarwal S, Zerillo C, Kolmakova J, Christensen JG, Harris LN, Rimm DL, et al. Association of constitutively activated hepatocyte growth factor receptor (Met) with resistance to a dual EGFR/Her2 inhibitor in non-small-cell lung cancer cells. *British journal of cancer*. 2009;100:941–9.
77. Khoury H, Naujokas MA, Zuo D, Sangwan V, Frigault MM, Petkiewicz S, et al. HGF converts ErbB2/Neu epithelial morphogenesis to cell invasion. *Molecular biology of the cell*. 2005;16:550–61.
78. Takahashi N, Furuta K, Taniguchi H, Sasaki Y, Shoji H, Honma Y, et al. Serum level of hepatocyte growth factor is a novel marker of predicting the outcome and resistance to the treatment with trastuzumab in HER2-positive patients with metastatic gastric cancer. *Oncotarget*. 2016;7:4925–38.
79. Yoshioka T, Shien K, Takeda T, Takahashi Y, Kurihara E, Ogoshi Y, et al. Acquired resistance mechanisms to afatinib in HER2-amplified gastric cancer cells. *Cancer science*. 2019;110:2549–57.
80. Hassan MS, Williams F, Awasthi N, Schwarz MA, Schwarz RE, Li J, et al. Combination effect of lapatinib with foretinib in HER2 and MET co-activated experimental esophageal adenocarcinoma. *Scientific reports*. 2019;9:17608.

81. Jänne PA, Shaw AT, Camidge DR, Giaccone G, Shreeve SM, Tang Y, et al. Combined Pan-HER and ALK/ROS1/MET Inhibition with Dacomitinib and Crizotinib in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Results of a Phase I Study. *J Thorac Oncol*. 2016;11:737–47.
82. Cancer Genome Atlas Network. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015;161:1681–96.
83. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England journal of medicine*. 2011;364:2507–16.
84. Rizos H, Menzies AM, Pupo GM, Carlino MS, Fung C, Hyman J, et al. BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: spectrum and clinical impact. *Clin Cancer Res*. 2014;20:1965–77.
85. Obaid NM, Bedard K, Huang WY. Strategies for Overcoming Resistance in Tumours Harboring BRAF Mutations. *International journal of molecular sciences*. 2017;18.
86. Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*. 2012;487:500–4.
87. Virzi AR, Gentile A, Benvenuti S, Comoglio PM. Reviving oncogenic addiction to MET bypassed by BRAF (G469A) mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018;115:10058–63.
88. Landa I, Ibrahimasic T, Boucai L, Sinha R, Knauf JA, Shah RH, et al. Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126:1052–66.
89. Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V, Faris JE, Chau I, Blay JY, et al. Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations. *The New England journal of medicine*. 2015;373:726–36.
90. Knauf JA, Lockett KA, Chen K-Y, Voza F, Socci ND, Ghossein R, et al. Hgf/Met activation mediates resistance to BRAF inhibition in murine anaplastic thyroid cancers. *J Clin Invest*. 2018;128:4086–97.
91. Byeon HK, Na HJ, Yang YJ, Kwon HJ, Chang JW, Ban MJ, et al. c-Met-mediated reactivation of PI3K/AKT signaling contributes to insensitivity of BRAF(V600E) mutant thyroid cancer to BRAF inhibition. *Mol Carcinog*. 2016;55:1678–87.
92. Kopetz S, Desai J, Chan E, Hecht JR, O'Dwyer PJ, Maru D, et al. Phase II Pilot Study of Vemurafenib in Patients With Metastatic BRAF-Mutated Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33:4032–8.
93. Corcoran RB, Ebi H, Turke AB, Coffee EM, Nishino M, Cogdill AP, et al. EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib. *Cancer Discov*. 2012;2:227–35.
94. Yaeger R, Cercek A, O'Reilly EM, Reidy DL, Kemeny N, Wolinsky T, et al. Pilot Trial of Combined BRAF and EGFR Inhibition in BRAF Mutant Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2015;21:1313–20.

95. Pietrantonio F, Oddo D, Gloghini A, Valtorta E, Berenato R, Barault L, et al. MET-Driven Resistance to Dual EGFR and BRAF Blockade May Be Overcome by Switching from EGFR to MET Inhibition in BRAF-Mutated Colorectal Cancer. *Cancer Discov.* 2016;6:963–71.
96. Duplaquet L, Kherrouche Z, Baldacci S, Jamme P, Cortot AB, Copin MC, et al. The multiple paths towards MET receptor addiction in cancer. *Oncogene.* 2018;37:3200–15.
97. Drilon A, Clark JW, Weiss J, Ou S-HI, Camidge DR, Solomon BJ, et al. Antitumor activity of crizotinib in lung cancers harboring a MET exon 14 alteration. *Nat Med.* 2020;26:47–51.
98. Paik PK, Felip E, Veillon R, Sakai H, Cortot AB, Garassino MC, et al. Tepotinib in Non-Small-Cell Lung Cancer with MET Exon 14 Skipping Mutations. *The New England journal of medicine.* 2020;
99. Descarpentries C, Lepretre F, Escande F, Kherrouche Z, Figeac M, Sebda S, et al. Optimization of Routine Testing for MET Exon 14 Splice Site Mutations in NSCLC Patients. *J Thorac Oncol.* 2018;13:1873–83.
100. The cancer genome atlas research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.* 2014;511:543–50.
101. 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. *Molecular cell.* 2001;8:995-1004.
102. Wolf J, Seto T, Han J-Y, Reguart N, Garon EB, Groen HJM, et al. Capmatinib in MET Exon 14-Mutated or MET-Amplified Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2020;383:944–57.
103. Jamme P, Fernandes M, Copin M-C, Descarpentries C, Escande F, Morabito A, et al. Alterations in the PI3K Pathway Drive Resistance to MET Inhibitors in NSCLC Harboring MET Exon 14 Skipping Mutations. *Journal of Thoracic Oncology.* 2020;15:741–51.
104. Suzawa K, Offin M, Lu D, Kurzatkowski C, Vojnic M, Smith RS, et al. Activation of KRAS Mediates Resistance to Targeted Therapy in MET Exon 14-mutant Non-small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2019;25:1248–60.
105. Awad MM, Bahcall M, Sholl LM, Wilson FH, Paweletz C, Capelletti M, et al. Mechanisms of acquired resistance to MET tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in MET exon 14 (METex14) mutant non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Clinical Oncology.* American Society of Clinical Oncology; 2018;36:9069–9069.
106. Dong H-J, Li P, Wu C-L, Zhou X-Y, Lu H-J, Zhou T. Response and acquired resistance to crizotinib in Chinese patients with lung adenocarcinomas harboring MET Exon 14 splicing alternations. *Lung Cancer.* 2016;102:118–21.
107. Engstrom LD, Aranda R, Lee M, Tovar EA, Essenburg CJ, Madaj Z, et al. Glesatinib Exhibits Antitumor Activity in Lung Cancer Models and Patients Harboring MET Exon 14 Mutations and Overcomes Mutation-mediated Resistance to Type I MET Inhibitors in Nonclinical Models. *Clin Cancer Res.* 2017;23:6661–72.
108. Guo R, Offin M, Brannon AR, Chow A, Delasos L, Somwar R, et al. MET inhibitor resistance in patients with MET exon 14-altered lung cancers. *Journal of Clinical Oncology.* American Society of Clinical Oncology; 2019;37:9006.

109. Heist RS, Sequist L V., Borger D, Gainor JF, Arellano RS, Le LP, et al. Acquired Resistance to Crizotinib in NSCLC with MET Exon 14 Skipping. *Journal of Thoracic Oncology*. 2016;11:1242–5.
110. Jin W, Shan B, Liu H, Zhou S, Li W, Pan J, et al. Acquired Mechanism of Crizotinib Resistance in NSCLC with MET Exon 14 Skipping. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. Elsevier; 2019;14:e137–9.
111. Li A-N, Yang J, Zhang X-C, Zhang Z, Su J, Gou L-Y, et al. Acquired MET Y1248H and D1246N mutations mediate resistance to MET inhibitors in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 2017;clincanres.3273.2016.
112. Ou S-HI, 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. *Journal of Thoracic Oncology*. 2017;12:137–40.
113. Recondo G, Bahcall M, Spurr LF, Che J, Ricciuti B, Leonardi GC, et al. Molecular Mechanisms of Acquired Resistance to MET Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients with MET Exon 14-Mutant NSCLC. *Clin Cancer Res*. 2020;26:2615–25.
114. Rotow JK, Gui P, Wu W, Raymond VM, Lanman RB, Kaye FJ, et al. Co-occurring genetic alterations in the RAS pathway promote resistance to MET inhibitor treatment in non-small cell lung cancer with a MET exon 14 skipping mutation. *bioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory; 2018;374181.
115. Zhang Y, Yin J, Peng F. Acquired resistance to crizotinib in advanced lung adenocarcinoma with MET exon 14 skipping. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. Elsevier; 2017;113:69–71.
116. 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;102:118–21.
117. Jeffers M, Fiscella M, Webb CP, Anver M, Koochekpour S, Vande Woude GF. The mutationally activated Met receptor mediates motility and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:14417–22.
118. Jeffers MF, Vande Woude GF. Activating mutations in the Met receptor overcome the requirement for autophosphorylation of tyrosines crucial for wild type signaling. *Oncogene*. 1999;18:5120–5.
119. Maritano D, Accornero P, Bonifaci N, Ponzetto C. Two mutations affecting conserved residues in the Met receptor operate via different mechanisms. *Oncogene*. 2000;19:1354–61.
120. 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. *Nature genetics*. 1997;16:68-73.
121. Fujino T, Kobayashi Y, Suda K, Koga T, Nishino M, Ohara S, et al. Sensitivity and Resistance of MET Exon 14 Mutations in Lung Cancer to Eight MET Tyrosine Kinase Inhibitors In Vitro. *Journal of Thoracic Oncology*. 2019;14:1753–65.
122. 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;6:1334–41.

123. 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;94:11445–50.
124. Bertotti A, Burbridge MF, Gastaldi S, Galimi F, Torti D, Medico E, et al. Only a subset of Met-activated pathways are required to sustain oncogene addiction. *Science signaling*. 2009;2:ra80.
125. Cortot AB, Janne PA. Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *Eur Respir Rev*. 2014;23:356–66.
126. Patnaik A, Gordon M, Tsai F, Papadopoulos KP, Rasco D, Beeram M, et al. A phase I study of LY3164530, a bispecific antibody targeting MET and EGFR, in patients with advanced or metastatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2018;82:407–18.
127. Sehnal D, Rose AS, Koča J, Burley SK, Velankar S. Mol*: towards a common library and tools for web molecular graphics. *Proceedings of the Workshop on Molecular Graphics and Visual Analysis of Molecular Data*. Goslar, DEU: Eurographics Association; 2018. page 29–33.
128. Flaifel A, Xie W, Braun DA, Ficial M, Bakouny Z, Nassar AH, et al. PD-L1 Expression and Clinical Outcomes to Cabozantinib, Everolimus, and Sunitinib in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma: Analysis of the Randomized Clinical Trials METEOR and CABOSUN. *Clin Cancer Res*. 2019;25:6080–8.
129. Escudier B, Powles T, Motzer RJ, Olencki T, Arén Frontera O, Oudard S, et al. Cabozantinib, a New Standard of Care for Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma and Bone Metastases? Subgroup Analysis of the METEOR Trial. *J Clin Oncol*. 2018;36:765–72.
130. Wakelee H, Zvirbule Z, De Braud F, Kingsley CD, Mekhail T, Lowe T, et al. Efficacy and Safety of Onartuzumab in Combination With First-Line Bevacizumab- or Pemetrexed-Based Chemotherapy Regimens in Advanced Non-Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. 2017;18:50–9.
131. Chia SK, Ellard SL, Mates M, Welch S, Mihalcioiu C, Miller WH, et al. A phase-I study of lapatinib in combination with foretinib, a c-MET, AXL and vascular endothelial growth factor receptor inhibitor, in human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2)-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2017;19:54.
132. Leone JP, Duda DG, Hu J, Barry WT, Trippa L, Gerstner ER, et al. A phase II study of cabozantinib alone or in combination with trastuzumab in breast cancer patients with brain metastases. *Breast Cancer Res Treat*. 2020;179:113–23.
133. Sequist LV, von Pawel J, Garmey EG, Akerley WL, Brugger W, Ferrari D, et al. Randomized phase II study of erlotinib plus tivantinib versus erlotinib plus placebo in previously treated non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29:3307–15.
134. 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;33:2667–74.

135. Shitara K, Yamazaki K, Tsushima T, Naito T, Matsubara N, Watanabe M, et al. Phase I trial of the MET inhibitor tepotinib in Japanese patients with solid tumors. *Jpn J Clin Oncol*. 2020;50:859–66.
136. Leighl NB, Tsao M-S, Liu G, Tu D, Ho C, Shepherd FA, et al. A phase I study of foretinib plus erlotinib in patients with previously treated advanced non-small cell lung cancer: Canadian cancer trials group IND.196. *Oncotarget*. 2017;8:69651–62.
137. 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;35:412–20.
138. Van Cutsem E, Eng C, Nowara E, Swieboda-Sadlej A, Tebbutt NC, Mitchell E, et al. Randomized phase Ib/II trial of rilotumumab or ganitumab with panitumumab versus panitumumab alone in patients with wild-type KRAS metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;20:4240–50.
139. Tan E-H, Lim W-T, Ahn M-J, Ng Q-S, Ahn JS, Shao-Weng Tan D, et al. Phase 1b Trial of Ficlatusumab, a Humanized Hepatocyte Growth Factor Inhibitory Monoclonal Antibody, in Combination With Gefitinib in Asian Patients With NSCLC. *Clin Pharmacol Drug Dev*. 2018;7:532–42.

Figure comments

Figure 1: Resistance mechanisms involving the MET receptor and main therapeutic strategies.

Illustrations summarizing examples of physiological interplay (A), the corresponding resistance mechanisms (B), and the main treatment strategies evaluated in clinical trials for countering resistances due to EGFR/MET, VEGFR/MET, and HER2/MET interplay. Hepatocellular Carcinoma=HCC; Renal Cell Carcinoma=RCC

Figure 2: Resistance mechanisms involving MET receptor and main therapeutic strategies in melanoma.

Illustrations summarizing examples of physiological interplay (A), the corresponding resistance mechanisms (B), and the main treatment strategies evaluated in clinical trials for countering resistances due to BRAF/MET interplay in melanoma.

Figure 3: On-target resistance to MET TKIs in NSCLC displaying MET exon14 skipping.

(A) Illustration of MET WT and MET exon 14, with the positions of the on-target resistance mutations that appear within the kinase domain upon treatment with MET TKIs. (B) 3D structure images of the active form of MET kinase in a complex with the type I inhibitor crizotinib (DOI: 10.2210/pdb2WGJ/pdb) (C) 3D structure images of the inactive form in a complex with the type II inhibitor merestinib (DOI: 10.2210/pdb4EEV/pdb). The images created with Mol*, an online software of the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (127). The position of the DFG motif of the ATP pocket in the in or out conformation is colored in yellow, residue G1181 in blue, Y1248 in red, L1213 in pink, and F1218 in green.

Figure 4: Flowchart for potential sequential treatments of METex14 lung cancer patients.

Results of case reports and cell-based resistance assays have led to proposing a flowchart for sequential treatment of METex14 lung cancer patients with either type I or type II MET TKIs.

Table 1: Clinical trials evaluating multitarget agents or treatment combinations. Overview of the clinical trials registered at ClinicalTrial.gov (November 2020) evaluating the safety and/or efficacy of EGFR, HER2, VEGFR, or BRAF inhibitors (TKIs or antagonist monoclonal antibodies) in combination with MET or HGF inhibitors (TKIs or antagonist monoclonal antibodies). For each clinical trial, the identifier number, acronym, phase, main indications, and published references are indicated. Abbreviations: Renal Cell Carcinoma=RCC; Hepatocellular Carcinoma=HCC; Non-Small Cell Lung Cancer=NSCLC; Colorectal Cancer=CC; Head and neck squamous cell carcinoma=HNSCC; Pancreatic Adenocarcinoma=PA; Squamous Cell Carcinoma=SCC; Urothelial Cancer=UC, Chemotherapy=Chemo.; Metastatic or metastasis=Meta.; Amplification= amplif.; Mutated=Mut.; Progression=progres.; Resistant=Resist.; Positive=pos.

	HGF/MET inhibitor	combined with	Target of TKI (inib) or Antibody (mab)	Identifier	Acronym	Phase	Indication	Ref.	
VEGFR/ MET	Cabozantinib		MET/ VEGFR2/ Ret/ Kit / Flt-1,3,4/ Tie2/ AXL TKI	NCT03541902	CABOSUN	II	Metas. RCC	(128)	
				NCT01755195		II	Soft Tissue Sarcomas		
				NCT04134390	CABOMAYOR	II	Metas. RCC		
				NCT03425201	NICARAGUA	I/II	with Niraparib Advanced UC		
				NCT04116541	MegaMOST	II	Malignant Solid Tumor		
				NCT04316182	ACTION	II	HCC		
		Onartuzumab	Sorafenib	anti-MET + VEGFR TKI	NCT01897038		I	Advanced HCC	
		Onartuzumab	Bevacizumab	anti-MET + anti-VEGF	NCT01496742		II	NSCLC	(130)
	pan-HER	Crizotinib	Dacomitinib	MET/ ALK/ ROS TKI+ pan-HER TKI	NCT01121575		I	NSCLC	(81)
		Foretinib	Lapatinib	MET/ VEGFR2 TKI + pan-HER TKI	NCT01138384		II	Metas. Breast Cancer	(131)
	HER 2	Cabozantinib	Trastuzumab	MET/AXL/VEGFR2 TKI + anti-HER2	NCT02260531		II	Breast Cancer (Brain Metas.)	(132)
EGFR/ MET			anti-MET/EGFR bispe.Ab	LY3164530		I	Neoplasms/ Neoplasm Metas.	(126)	
			anti-MET/EGFR Ab	EMB-01		I/II	Advanced/ Metas. Solid Tumors		
		Emibetuzumab	Erlotinib	anti-MET + EGFR TKI	NCT01900652	Chime	II	NSCLC	
		Savolitinib	Osimertinib	MET TKI + EGFR TKI	NCT03778229	SAVANNAH	II	EGFRm+/MET+ NSCLC after Osimertinib	(133)
					NCT03944772	ORCHARD	II	Advanced NSCLC after Osimertinib	
		Tivantinib	Erlotinib	MET TKI + EGFR TKI	NCT01244191	MARQUEE	III	NSCLC	(134)
			Cetuximab	MET TKI + anti-EGFR	NCT01892527		II	EGFR Resist/MET High; Metas. CC	
		Glumetinib	Osimertinib	MET TKI + EGFR TKI	NCT04338243		I/II	Metas. T790M negative and MET amplif. NSCLC	
		Capmatinib		MET TKI + EGFR TKI	Gefitinib		II	EGFR mut.,METamplif. NSCLC after EGFRi	
					Erlotinib		I	EGFR Mutated, MET positive NSCLC	
					Nazartinib		I/II	EGFR-mutant NSCLC	
					NCT03333343		I	EGFR-mutant NSCLC	
			Cetuximab	MET TKI + anti-EGFR	NCT02205398		I	MET pos.; metas. RCC/HNSCC after Cetuxima	
EGFR/ MET	Cabozantinib	Erlotinib	MET TKI + EGFR TKI	NCT03213626		II	EGFR + MET Expressiong metas. PA		
	Tepotinib		MET TKI+ EGFR TKI	Gefitinib		II	NSCLC	(50,135)	
				Osimertinib		II	Osimertinib Relapsed MET-Amplif NSCLC		
				Cetuximab		II	Colorectal Neoplasms		
	Foretinib	Erlotinib	Multitarget MET TKI + EGFR TKI	NCT01068587		I/II	Advanced or metastatic NSCLC	(136)	
	Onartuzumab	Erlotinib	anti-MET + EGFR TKI	NCT01887886		III	EGFR Mutated, MET pos. NSCLC	(137)	
	Amivantamab		anti-MET/EGFR bispe.Ab + EGFR TKI	NCT04487080	MARIPOSA	III	EGFR-Mutated NSCLC		
				NCT02609776	CHRYSALIS	I	AdvancedNSCLC		
				NCT04077463		I	Advanced NSCLC		
	Golvatinib	Cetuximab	anti-MET + anti-EGFR	NCT01332266		I/II	SCC of the Head and Neck		
	Rilotumumab	Panitumumab	anti-HGF + anti-EGFR	NCT00788957		I/II	Metastatic CC	(138)	
Ficlatuzumab		anti-HGF + EGFR TKI	Gefitinib		I/II	NSCLC	(139)		
			Erlotinib		II	NSCLC			
BRAF	Crizotinib	Vemurafenib	MET/ ALK/ ROS TKI + B-Raf inhibitor	NCT01531361		I	Advanced cancers with BRAF Muta.		
	Cabozantinib	Vemurafenib	Multitarget MET TKI + B-Raf inhibitor	NCT01835184		I	Solid tumors or melanoma		
	Golvatinib	Sorafenib	MET/ VEGFR TKI + Multitarget TKI Raf-1/ B-Raf / VEGFR-2, 3...	NCT01271504		I/II	HCC		

(128);(68) (129); (64); (130); (81); (131); (132); (126); (133); (134); (50) (135); (136); (137); (138); (139)

Table 2: Acquired MET mutations after MET TKI in METex14 NSCLC, review of clinical data. This table compiles the data available from recent publications describing MET kinase mutations identified in METex14 patients treated with the indicated MET TKI. Site and type of the collected samples before and after resistance are indicated. Abbreviation: Circulating free DNA=cfDNA

Ref.	Sample type before resistance	TKI	Sample site at resistance	MET mutation post TKI
(106)	cfDNA	Crizotinib	cfDNA	D1246N; D1246H; Y1248H
(109)	Tumor	Crizotinib	Metastasis Liver	D1246N
(115)	Tumor	Crizotinib	cfDNA	G1181R; D1246H; D1246A; Y1248H
(107)	Tumor	Crizotinib	Tumor + cfDNA	D1246N, Y1248H/S, G1181R, (+ glesatinib→L1213V)
(110)	Tumor + cfDNA	Crizotinib	cfDNA	D1246N
(108)	-	Crizotinib	-	D1246N
(105)	-	Crizotinib	Tumor + cfDNA	Y1248H; D1246N; D1246S
	-	Glesatinib	cfDNA	D1246N; G1181R; L1213V
	-	Glesatinib	Tumor + cfDNA	H1067Y; L1213V; L1213F
	-	Crizotinib	cfDNA	D1246N
(114)	cfDNA	Crizotinib	cfDNA	Y1248S; F1218I
	cfDNA	Crizotinib	cfDNA	Y1248H; D1248N
	cfDNA	Crizotinib	cfDNA	L1213V
	cfDNA	Crizotinib	cfDNA	D1246H
(113)	Tumor biopsy	Glesatinib	Tumor + cfDNA	H1112Y; L1213V
	Tumor biopsy	Crizotinib	Tumor + cfDNA	G1181R; L1213V; D1246H/N; Y1248H/S
	Tumor biopsy	Crizotinib	Tumor	D1246H
	Tumor biopsy	Crizotinib	cfDNA	D1246N
	Tumor biopsy	Capmatinib	Tumor + cfDNA	D1246N
	Tumor biopsy	Crizotinib	Tumor + cfDNA	Y1248C
	Tumor biopsy	Glesatinib-Crizotinib	Tumor	MET Amplification

(106); (109); (115); (107); (110); (108); (105); (114); (113)

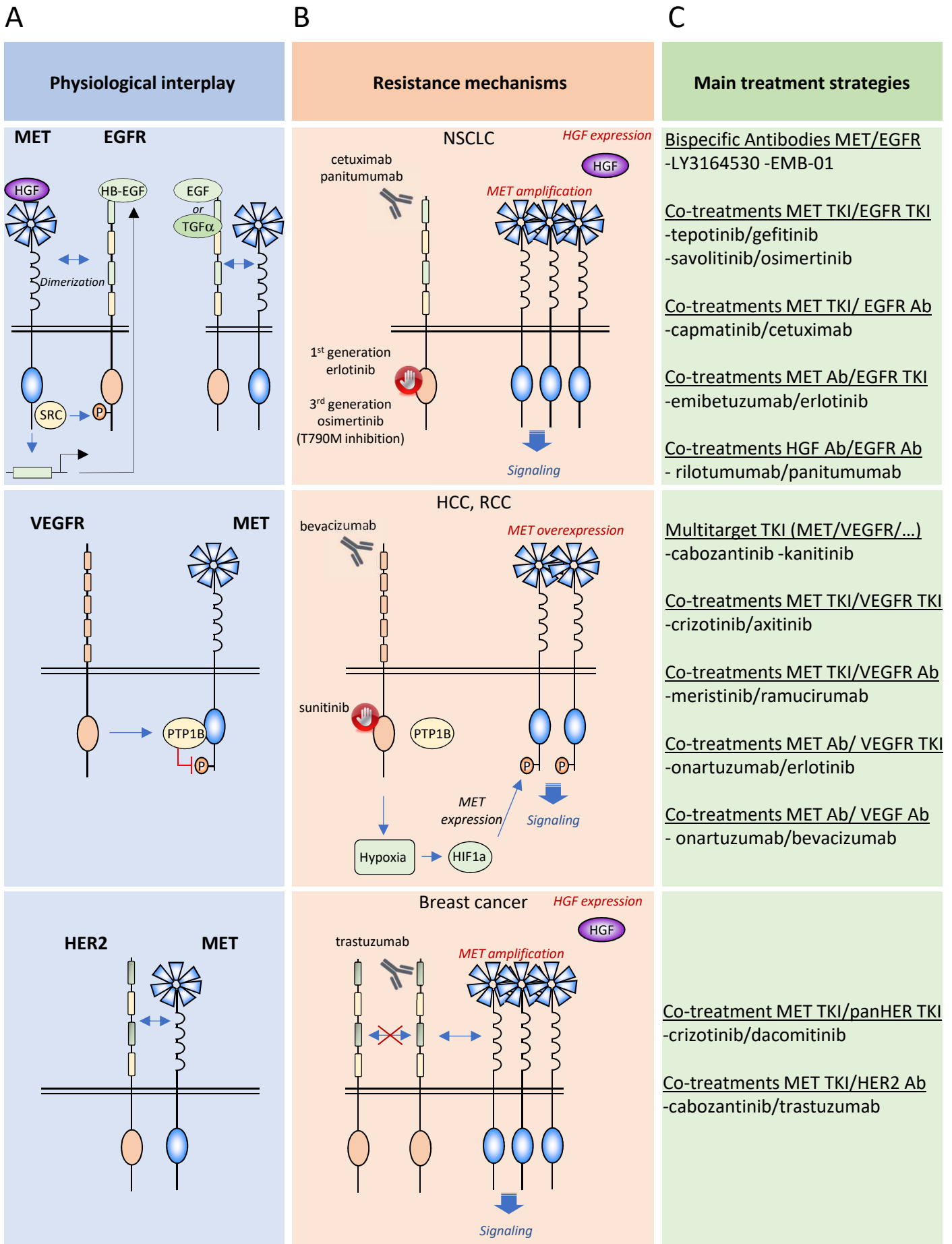


Figure 1

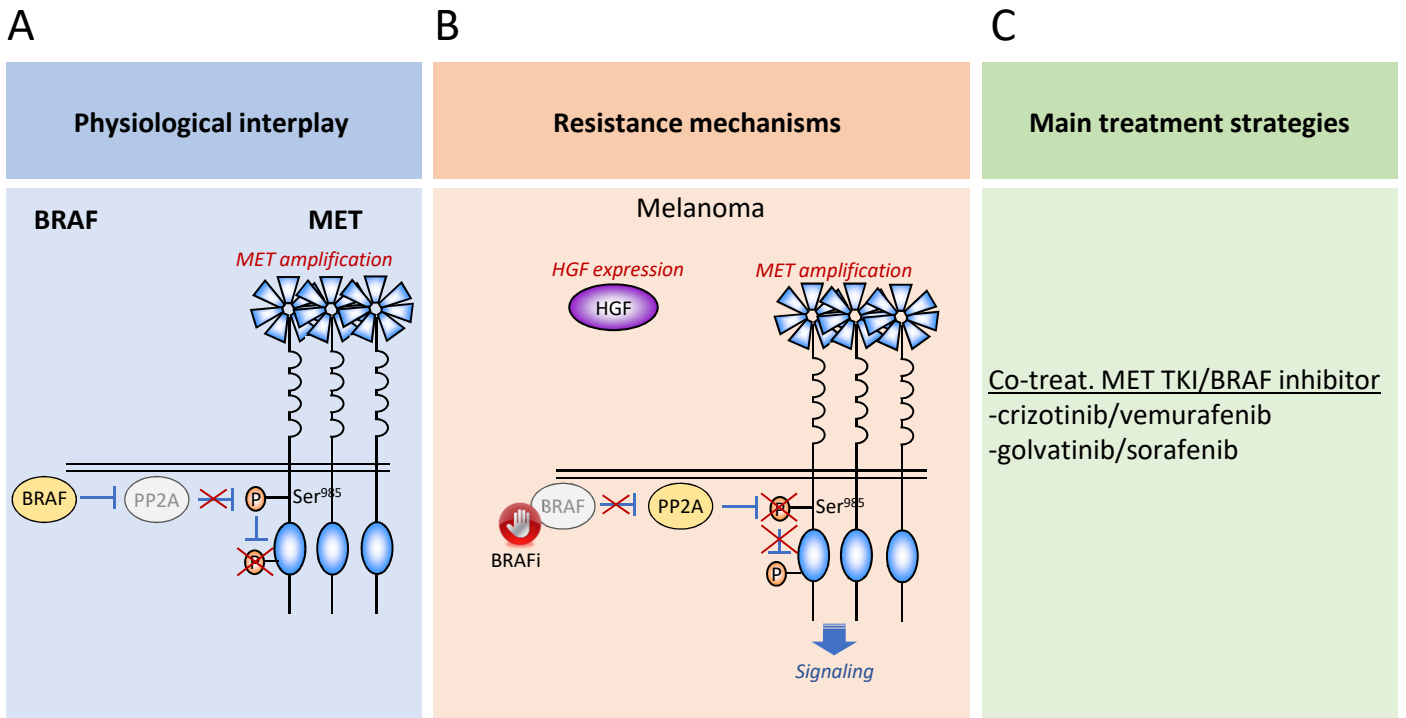
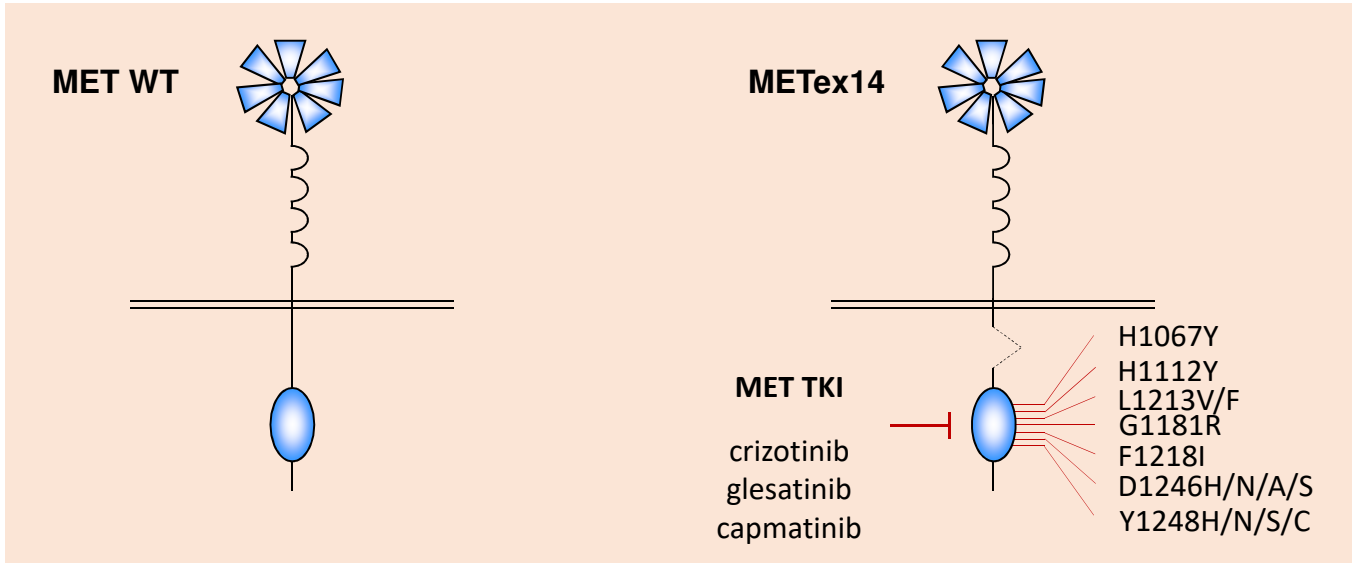


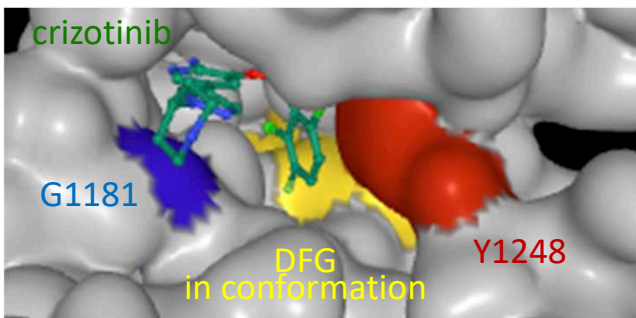
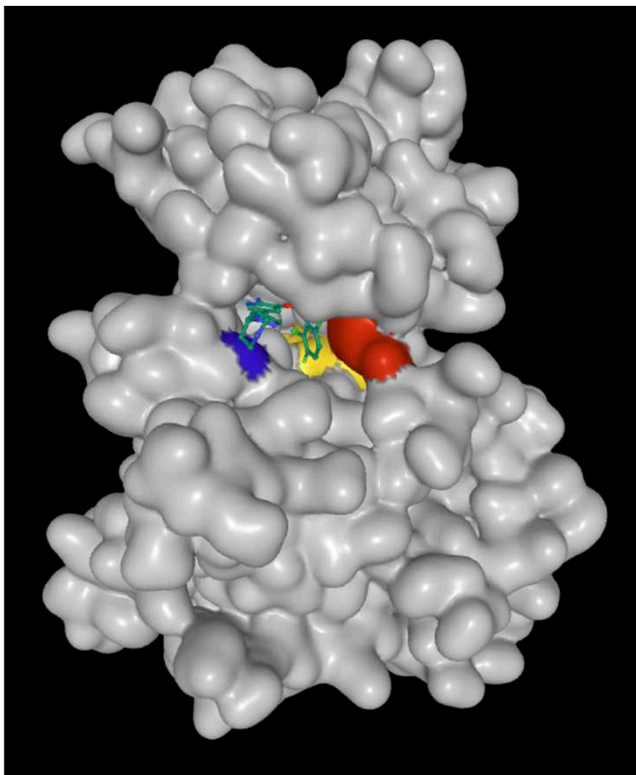
Figure 2

A



B

Active MET kinase
with crizotinib type I inhibitor



C

Inactive MET kinase
with merestinib type II inhibitor

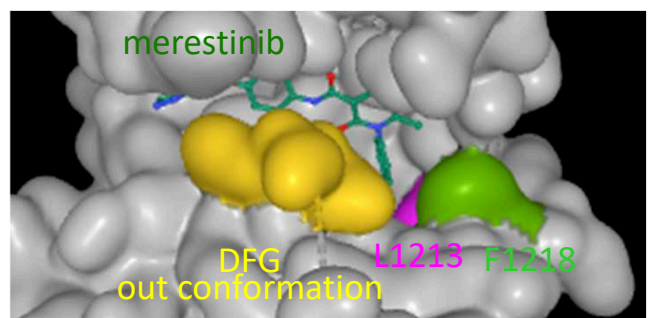
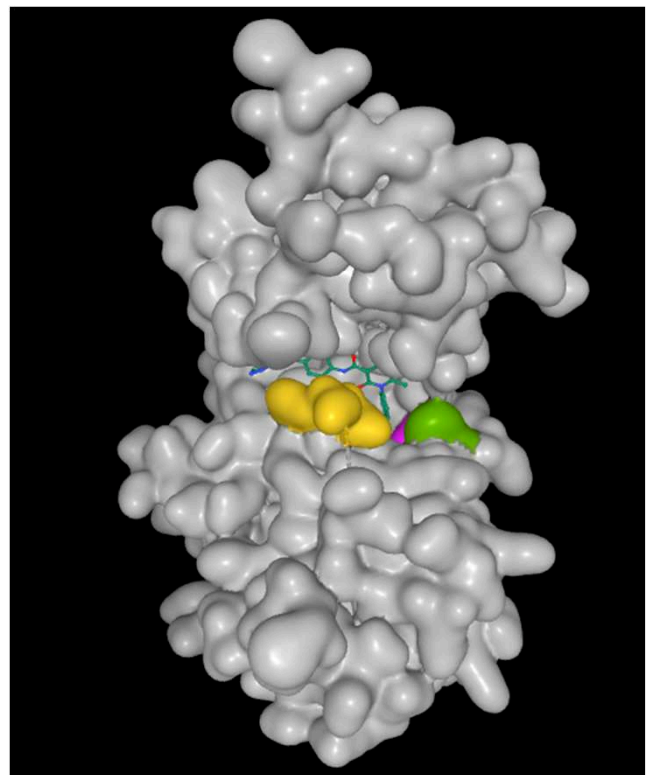


Figure 3

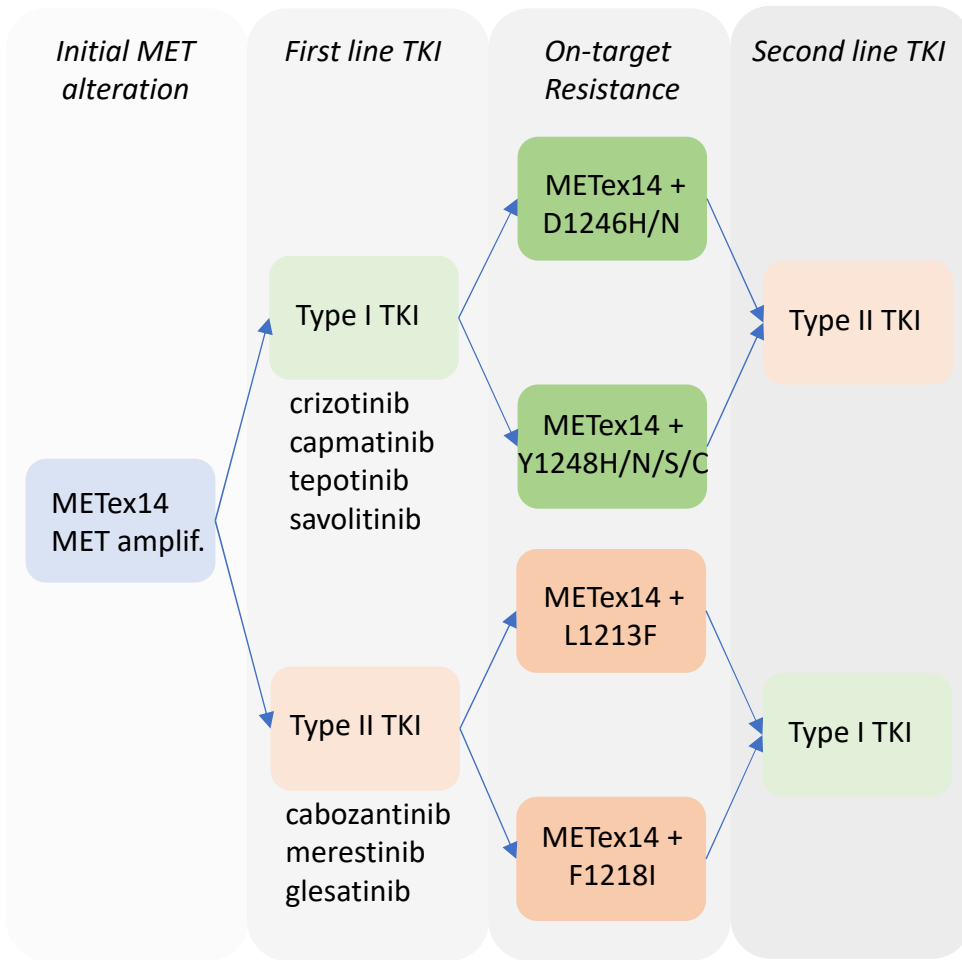


Figure 4

Article original : PI3K alterations drive resistance to MET TKIs

Alterations in the PI3K pathway drive resistance to MET inhibitors in NSCLC harboring MET exon 14 skipping mutations.

Philippe Jamme¹, Marie Fernandes¹, Marie-Christine Copin^{1,2}, Clotilde Descarpentries³, Fabienne Escande³, Angela Morabito¹, Valérie Grégoire², Matthieu Jamme⁴, Simon Baldacci⁵, David Tulasne¹, Zoulika Kherrouche¹, Alexis B. Cortot^{1,5}.

¹ University of Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020 - UMR-S 1277 - Canther – Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, Lille, France

² Pathology Department, CHU Lille, University of Lille, Lille, France

³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Hormonology Metabolism Nutrition Oncology, CHU Lille, University of Lille, Lille, France

⁴ INSERM U-1018, CESP, Team 5 (EpReC, Renal and Cardiovascular Epidemiology), UVSQ, Villejuif, France

⁵ Thoracic Oncology Department, CHU Lille, University of Lille, Lille, France

Publication Journal of Thoracic Oncology - 2020

Alterations in the PI3K Pathway Drive Resistance to MET Inhibitors in NSCLC Harboring MET Exon 14 Skipping Mutations



Philippe Jamme, MD, MSc,^a Marie Fernandes, MSc,^a
Marie-Christine Copin, MD, PhD,^{a,b} Clotilde Descarpentries, MD,^c
Fabienne Escande, MD, PhD,^c Angela Morabito, PhD,^a Valérie Grégoire, PhD,^b
Matthieu Jamme, MD,^d Simon Baldacci, MD, PhD,^e David Tulasne, PhD,^a
Zoulika Kherrouche, PhD,^a Alexis B. Cortot, MD, PhD^{a,e,*}

^aUniversity of Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020 - UMR-S 1277 - Canther - Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, Lille, France

^bPathology Department, CHU Lille, University of Lille, Lille, France

^cDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Hormonology Metabolism Nutrition Oncology, CHU Lille, University of Lille, Lille, France

^dINSERM U-1018, CESP, Team 5 (EpReC, Renal and Cardiovascular Epidemiology), UVSQ, Villejuif, France

^eThoracic Oncology Department, CHU Lille, University of Lille, Lille, France

Received 29 September 2019; revised 23 January 2020; accepted 26 January 2020

Available online - 10 March 2020

ABSTRACT

Hepatocyte growth factor receptor (MET) tyrosine kinase inhibitors (MET TKIs) have been found to have efficacy against advanced NSCLC with mutations causing MET exon 14 skipping (*METex14* mutations), but primary resistance seems frequent, as response rates are lower than those for targeted TKIs of other oncogene-addicted NSCLCs. Given the known interplay between MET and phosphoinositide 3-kinases (PI3K), we hypothesized that in *METex14* NSCLC, PI3K pathway alterations might contribute to primary resistance to MET TKIs. We reviewed clinical data from 65 patients with *METex14* NSCLC, assessing PI3K pathway alterations by targeted next-generation sequencing (mutations) and immunohistochemistry (loss of phosphatase and tensin homolog [PTEN]). Using a cell line derived from a patient with primary resistance to a MET TKI and cell lines harboring both a *METex14* mutation and a PI3K pathway alteration, we assessed sensitivity to MET TKIs used alone or with a PI3K inhibitor and investigated relevant signaling pathways. We found a phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha (*PIK3CA*) mutation in two of 65 samples (3%) and loss of PTEN in six of 26 samples (23%). All three of the MET TKI-treated patients with a PI3K pathway alteration had been found to have progressive disease at first assessment. Likewise, MET TKIs had no effect on the proliferation of *METex14*-mutated cell lines with a PI3K pathway alteration, including the PTEN-lacking patient-derived cell line. Treatment

combining a MET TKI with a PI3K inhibitor caused inhibition of both PI3K and MAPK signaling and restored sensitivity to MET TKIs. PI3K pathway alterations are common in *METex14* NSCLC and may confer primary resistance to MET TKIs. In preclinical models, PI3K inhibition restores sensitivity to MET TKIs.

© 2020 International Association for the Study of Lung Cancer. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: TKI; Resistance; MET; PI3K; NSCLC

*Corresponding author.

Disclosure: Pr. Cortot participated in advisory boards or received honoraria from AstraZeneca, Bristol-Myers Squibb, Merck & Co., Pfizer, Roche, Novartis, and Takeda, and received grants paid to his institution from Novartis and Merck. Dr. Jamme reports nonfinancial support from Chugai Pharma, Roche, and Bristol-Myers Squibb, and personal fees from Boehringer Ingelheim, outside of the submitted work. Dr. Baldacci reports personal fees and nonfinancial support from Lilly, GlaxoSmithKline, Roche, Pfizer, and a grant from the Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique, outside of the submitted work. Pr. Copin participates in advisory boards for Pfizer and Roche. Dr. Descarpentries reports personal fees and nonfinancial support from AstraZeneca, Novartis Pharma S.A.S., Roche S.A.S., Boehringer Ingelheim France, and Pfizer, outside of the submitted work. The remaining authors declare no conflict of interest.

Address for correspondence: Alexis B. Cortot, MD, PhD, Hôpital Calm-ette, CHU Lille, Boulevard du Professeur Leclercq, 59037 Lille, France. E-mail: alexis.cortot@chru-lille.fr

© 2020 International Association for the Study of Lung Cancer. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

ISSN: 1556-0864

<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.01.027>

Introduction

Splice site mutations located in the regions flanking exon 14 of the hepatocyte growth factor receptor (*MET*) oncogene (*METex14*) have been reported in 3% of patients with NSCLC.^{1,2} Elderly persons and smokers constitute a larger proportion of patients harboring these mutations than those with alterations affecting other key oncogene drivers, such as epidermal growth factor receptor (*EGFR*) or anaplastic lymphoma kinase (*ALK*).³ *MET* exon 14 skipping, which causes the absence of the *MET* juxtamembrane domain (containing several negative regulation sites), leads to increased *MET* receptor stability and activation.⁴ This activation results in recruitment of effector proteins, such as GRB2-associated-binding protein 1 (*GAB1*), growth factor receptor-bound protein 2 (*GRB2*), Src homology 2 domain-containing (*SHC*), signal transducer and activator of transcription (*STAT*), and phosphoinositide 3-kinase (*PI3K*), leading to activation of downstream signaling pathways, including the *PI3K*, mitogen-activated protein kinase (*MAPK*), and Janus kinase (*JAK*)-*STAT* pathways.^{4,5} As *METex14* mutations can confer sensitivity to *MET* inhibition, several clinical trials have evaluated *MET* tyrosine kinase inhibitors (*TKIs*) in *METex14* NSCLC. Reported objective response rates (*ORRs*) range from 32% to 67.9%.⁶⁻⁹ These results are somewhat lower than those observed with targeted therapies for other oncogene-addicted NSCLCs, such as *EGFR*-mutated or *ALK*-rearranged NSCLC. This may be due to a higher frequency of primary resistance mechanisms in *METex14* NSCLC, including concurrent molecular alterations.

The *PI3K* signaling pathway is involved in several cell functions induced by activation of the *MET* receptor, including cell migration and survival.¹⁰ The *MET* receptor interacts with class I *PI3K* isoforms directly through their *SH2* domain and indirectly through activation of *GAB1*, focal adhesion kinase (*FAK*), and *RAS*.¹⁰ *PI3K* promotes phosphorylation of phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (*PIP2*) to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (*PIP3*), favoring plasma membrane recruitment of the *PDK1* kinase, leading notably to *AKT* phosphorylation. The phosphatase and tensin homolog (*PTEN*), in contrast, causes *PIP3* dephosphorylation and thus acts as the main regulator of the *PI3K* pathway. The *PI3K* pathway is frequently dysregulated in NSCLC. Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha (*PIK3CA*) and *AKT1* mutations are found in 4.1% to 5.2%¹¹⁻¹³ and 0.2% to 1.9%¹⁴⁻¹⁶ of lung cancers, respectively, and loss of *PTEN* has been reported in 24% of NSCLC. Several articles report the role of *PI3K* pathway alterations in resistance to cancer therapy, including *TKI* treatment.^{17,18} Given the role of the *MET* receptor in direct activation of the *PI3K* pathway, we

hypothesized that alterations in this pathway might contribute to the resistance of *METex14* NSCLC to *MET* inhibitors.

Results

PI3K Pathway Alterations Are Common in *METex14* NSCLC

Considering the involvement of the *PI3K* pathway in resistance to *TKIs* in several oncogene-addicted cancer models, we focused retrospectively on *PI3K* pathway alterations in a multicentric cohort of patients with NSCLC whose tumors displayed *METex14* mutations. All tumor samples were obtained at diagnosis, before any systemic treatment. Screening for mutations had been done using the *CLAPv1* optimized next-generation sequencing (*NGS*) panel combined with fragment length analysis, as previously described.² All these mutations were previously described or predicted to induce *MET* exon 14 skipping (Supplementary Table 1). The median age was 75.0 years (range 49–88 y); there were as many men as women (49%) and as many smokers as never smokers (55%). Most patients had been diagnosed at an advanced stage (67%). A total of 17 of them had received a *MET* *TKI*, either off-label or as part of a clinical trial (Fig. 1A).

The *METex14* mutations detected in this cohort were of the following types: deletions in 30 patients (46%), substitutions in 28 patients (42%), and indels in seven patients (12%). A total of 39 samples had been tested for *MET* gene amplification by fluorescence in situ hybridization, of which five (13%) were positive: one with low amplification (*MET/CEP7* ratio 1.8), one with intermediate amplification (*MET/CEP7* ratio 3.2), and three with high amplification (clusters in 53%–78% of tumor cells) (Supplementary Table 1).

Samples from all 65 patients had been tested for *PI3K* pathway alterations (*PIK3CA*, *AKT*, and *PTEN* mutations) by targeted *NGS*, revealing two *PIK3CA* mutations (3%) (Fig. 1B) but no *AKT* or *PTEN* mutation. We further evaluated *PTEN* expression by immunohistochemistry (*IHC*) performed on 26 available tumor samples (Supplementary Table 3). This revealed six samples (23%) with total loss of *PTEN* expression (Fig. 1C) (Supplementary Fig. 1).

In addition, the observed mutations included 15 tumor protein 53 (*TP53*) mutations (27%), two *KRAS* mutations (G13C), one *NRAS* mutation (Q61L), one *EGFR* mutation (V774M), and one *SMA*- and *MAD*-related protein 4 (*SMAD4*) mutation (D351N) (Supplementary Table 1). Overall, six of the 26 samples tested by both *NGS* and *PTEN* *IHC* (23%) displayed a *PI3K* pathway alteration. This makes the *PI3K* pathway one of the most altered pathways in *METex14* NSCLC.

Patients With METex14 With Concurrent Alterations in the PI3K Pathway Display Primary Resistance to MET TKIs

To determine whether PI3K pathway alterations might affect sensitivity to MET inhibition, we analyzed responses to treatment in 17 patients with METex14 NSCLC having received a MET TKI.

Tumor samples from three of these patients seemed, on the basis of either NGS or PTEN IHC, to have an impaired PI3K pathway (Fig. 1D).

In 14 patients, no alteration of the PI3K pathway was detected. This means that NGS revealed no PIK3CA, AKT, or PTEN mutation and that the corresponding tumor samples were either PTEN positive (four samples) or had not been analyzed by PTEN IHC (10 samples). Of these 14 patients, nine displayed an ORR (64%), one achieved disease stability for 6 months, and four had progressive disease at first assessment. Although none of these last four harbored a PIK3CA mutation, one of them, identified as PTEN positive, harbored an EGFR V774M mutation likely to explain primary resistance to MET TKI. The PTEN status of the other three was not available. The three patients positive for PTEN but with no EGFR, KRAS, or TP53 mutation all responded to MET TKI treatment.

In contrast, all three patients with an impaired PI3K pathway, including one with a PIK3CA mutation and two with total loss of PTEN expression, were found to have progressive disease at first radiological assessment (Fig. 1D and E). The clinical courses of these three patients are detailed in the subsequent texts.

Patient CHUL#11, who harbored a c.3082+1G>T MET mutation, was a 49-year-old former-smoker woman diagnosed with stage IV NSCLC. She received first-line platinum-based chemotherapy, but progression was observed after four cycles of treatment. The patient then received a MET TKI as part of a clinical trial. The treatment was stopped at first radiological assessment because of rapid disease progression (Fig. 1E). The patient further received an anti-programmed cell death protein 1 agent followed by a new course of chemotherapy with no efficacy. She died 9 months after the diagnosis. PTEN IHC performed on a right cervical lymph node obtained before treatment with the MET TKI revealed loss of PTEN expression (Fig. 1C).

Patient CHUL#18, who harbored a c.3067_3082+1delinsC MET mutation, was a 75-year-old woman diagnosed with advanced adenocarcinoma. She received six cycles of platinum-based chemotherapy with maintenance pemetrexed for 1 year. She then received a MET TKI as part of a clinical trial. The treatment was stopped at first radiological assessment because of new bone and adrenal gland metastases (Fig. 1E). The patient

died three months later. PTEN IHC performed on a pre-treatment bronchial biopsy specimen revealed loss of PTEN expression (Supplementary Fig. 1).

Patient CHUL#20, who harbored a c.3082+1G>A MET mutation, was a 75-year-old woman diagnosed with metastatic pulmonary sarcomatoid carcinoma. The patient was not eligible for chemotherapy and therefore received a MET TKI as first-line therapy. The treatment was stopped at first radiological assessment because of lymph node progression (Fig. 1E). The patient died within 2 weeks after discontinuing the treatment. Targeted NGS performed on the lung tumor revealed an activating PIK3CA mutation (N1044K).

These three cases suggest that in patients with METex14 NSCLC, alterations in the PI3K pathway are associated with primary resistance to MET TKIs.

PTEN Loss Is Associated With Sustained Activation of the PI3K Pathway and Resistance to MET TKIs in METex14 Cancer Cells

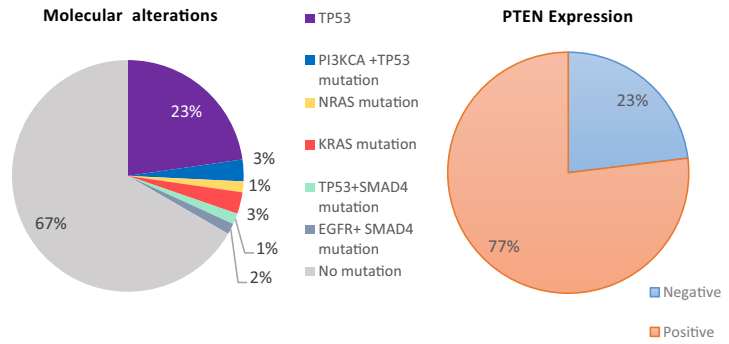
To decipher the role of PI3K pathway alterations in resistance to MET TKIs, we derived a cell line from a pleural effusion sample from patient CHUL#11, collected at progression on third-line therapy. The tumor sample from this patient harbored a METex14 mutation and displayed no PTEN expression detectable by IHC (Fig. 1C). Targeted NGS confirmed the presence of METex14 mutation c.3082+1G>T in this cell line (named ZORG), identical to that found in the patient tumor sample. As expected, the mutation leads to exon 14 skipping, as validated by fluorescence reverse-transcriptase polymerase chain reaction with primers located in MET exons 13 and 15. As shown in Figure 2A, the amplicon amplified from ZORG cells migrated as expected to 128 base pair, as observed with cell lines known to harbor METex14 mutations (Hs746T and H596). The amplicons from MET wild-type cell lines (A549, PC9, and GTL16) migrated to 286 base pair. In addition, the dissociation temperature of the amplicon from ZORG cells (74.8°C) was in agreement with that of MET lacking exon 14. Finally, Western blotting revealed a lack of PTEN in ZORG cells (Fig. 2B).

MET expression and downstream signaling in ZORG cells stimulated or not by the MET ligand hepatocyte growth factor (HGF) were investigated by Western blotting. As illustrated in Figure 2C, unstimulated METex14 and ERK displayed no phosphorylation, whereas HGF stimulation induced MET phosphorylation and subsequent activation of ERK. In contrast, as an expected consequence of PTEN loss, AKT was activated by its ligand even in the absence of MET activation. Stimulation by HGF led to overactivation of the PI3K

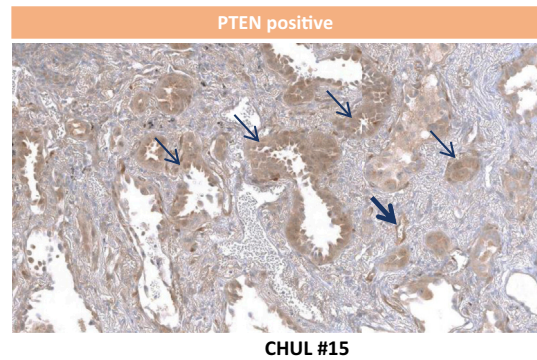
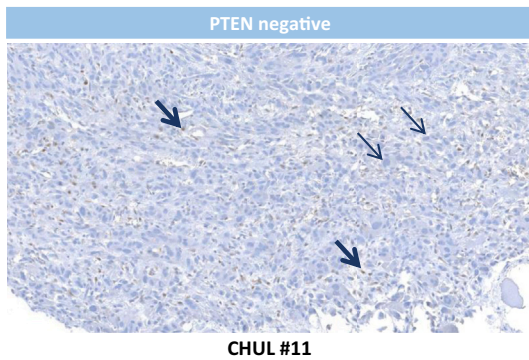
A

	n = 65
Age, median (years) (range)	75 (49-88)
Male	33 (51%)
Female	32 (49%)
Adenocarcinoma	53 (80%)
Pulmonary sarcomatoid carcinoma	3 (6%)
Pleomorphic carcinoma	1 (2%)
Other	8 (12%)
Stage at diagnosis	n=64
Stage I-III	21 (33%)
Stage IV	43 (67%)
Tabac status	n=64
Current Smokers	4 (6%)
Former Smokers	25 (39%)
Never Smokers	35 (55%)
Treatment received (advanced stage)	n=36
Chemotherapy	23 (64%)
MET TKI	17 (47%)
Immunotherapy	9 (25%)

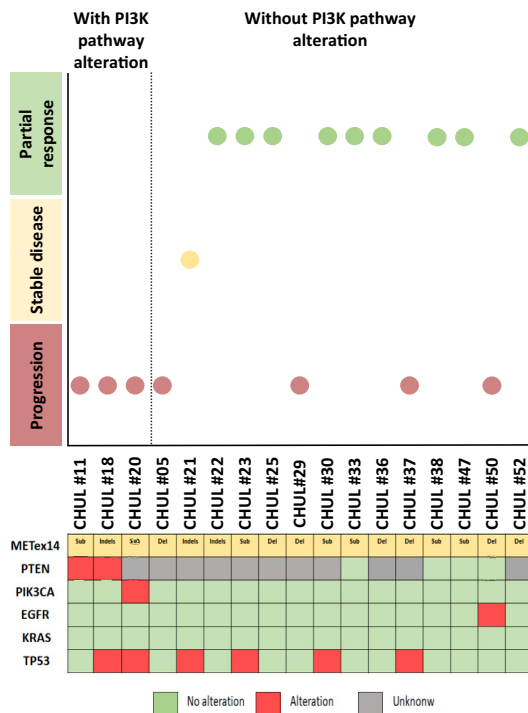
B



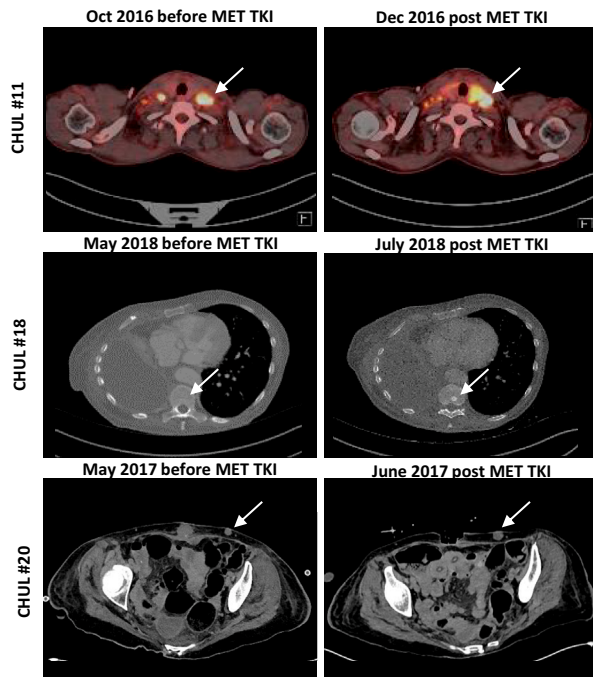
C



D



E



pathway. All further experiments were performed under HGF supplementation.

The sensitivity of ZORG cells to MET TKIs was then analyzed in viability assays using methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT). Four MET TKIs (type I inhibitors crizotinib, capmatinib, and tepotinib and type II inhibitor foretinib) were tested at increasing doses. The viability of ZORG cells was practically unaffected by capmatinib or tepotinib at doses as high as 10 μM . Crizotinib (a multitarget inhibitor of MET, ROS, and ALK) and foretinib displayed low viability-reducing activity on ZORG cells, with a half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) above 1 μM after a 72-hour exposure to the drug. By comparison, all four TKIs reduced the viability of Hs746T cells, known to harbor both *METex14* mutation and amplification, with an IC_{50} below 0.1 μM (Fig. 2D).

Investigation of signaling pathways by Western blotting revealed that all four MET TKIs inhibit MET phosphorylation in both ZORG and Hs746T cells. MET TKIs nearly abolished both AKT and ERK phosphorylation in Hs746T cells, but they had little effect in the ZORG cells (Fig. 2E). Overall, these results suggest that PTEN loss is associated with resistance to type I and type II MET TKIs in *METex14* cells through sustained activation of the PI3K pathway.

Inhibition of PI3K Restores Sensitivity to MET TKIs in *METex14* Cells Exhibiting PTEN Loss

To further establish the role of PI3K pathway alterations in resistance to MET TKIs, we tested whether PI3K inhibition might restore sensitivity of ZORG cells to MET TKIs. Proliferation of ZORG cells was unaffected by treatment with capmatinib, one of the most selective and potent MET TKIs,¹⁹ and was only slightly slowed down by GDC0941, a specific inhibitor of PI3K α and δ (Fig. 3A). When these two inhibitors were combined, however, proliferation of ZORG cells was significantly reduced ($p < 0.0001$). The same inhibitor combination had no effect on cell lines with no MET alteration, such as A549 (*KRAS* G12S mutation) ($p = 0.33$; NS) and PC9 (EGFR E746-A750 deletion) ($p = 0.79$; NS). For the ZORG cells, the IC_{50} for capmatinib shifted from over 10 μM , when

the inhibitor was used alone, to 0.034 μM , when it was used in combination with GDC0941 (1 μM) (Fig. 3B).

Analysis of the downstream signaling pathway revealed that addition of capmatinib or GDC0941 alone only slightly reduced the phosphorylation levels of ERK and AKT, whereas combination of both inhibitors fully abolished AKT activation and drastically inhibited ERK activation (Fig. 3C). Overall, these results reveal that the ZORG cells, which display both a *METex14* mutation and PTEN loss, rely on both the PI3K and MET pathways for cell growth, and that combining a MET inhibitor with a PI3K inhibitor is required to achieve cell growth arrest.

Inhibition of PI3K Restores Sensitivity to MET TKIs in *METex14* Cells Displaying a PIK3CA Mutation

Given the action of the PI3K-MET inhibitor combination on *METex14* cells with concurrent PTEN loss, we investigated whether the same is true when PI3K activation is due to a *PIK3CA* mutation. For this, we used the lung adenocarcinoma cell line H596, known to harbor the activating E545K *PIK3CA* mutation along with a *METex14* mutation.

We first confirmed in a viability assay that H596 cells are resistant to crizotinib, as previously revealed,⁵ and to the MET TKIs capmatinib, tepotinib, and foretinib (Fig. 4A). We then studied the effect of MET and PI3K inhibitors, added alone or in combination, on cell growth. Like that of the ZORG cells, H596 cell proliferation was unaffected by capmatinib alone. It was slowed down in the presence of GDC0941 alone. In the presence of combination of both inhibitors, full cell growth arrest was achieved (Fig. 4B).

Signaling pathway analysis revealed only a slight effect of capmatinib on AKT and ERK activation. When the MET and PI3K inhibitors were combined, both phospho-AKT and phospho-ERK levels decreased markedly (Fig. 4C). For the H596 cells, the IC_{50} for capmatinib shifted from over 10 μM , when the inhibitor was used alone, to 0.06 μM , when it was used in combination with GDC0941 (Fig. 4D). Taken together, these results

Figure 1. Alterations in the phosphoinositide 3-kinases (PI3K) pathway are common in *METex14* NSCLC. (A) Baseline characteristics of and treatments received by the patients with an advanced *METex14* NSCLC. (B) Pie charts displaying the frequencies (%) of alterations of the examined genes in the cohort ($n = 65$) and phosphatase and tensin homolog (PTEN) expression within each tumor sample tested by immunohistochemistry ($n = 19$). (C) Left panel (PTEN negative) displays undetectable PTEN in cancer cells of tumor specimen from patient CHUL#11. Right panel (PTEN positive) displays expression of PTEN in cancer cells of tumor specimen from patient CHUL#15. Thin arrows indicate cancer cells, and large arrows indicate endothelial or immune cells (internal positive control). (D) Schematic presentation of patients based on the response to hepatocyte growth factor receptor (MET) tyrosine kinase inhibitor (TKI) treatment and to the presence or absence of a PI3K pathway alteration ($n = 17$). Del, deletion; indel, insertion-deletion; sub, substitution (E) Computed tomography scans of CHUL#11, revealing multiple lymph node metastases at baseline (upper left) and progression after 2 months of MET TKI treatment (upper right). Scans of CHUL#18, revealing emergence of bone metastases after 2 months of MET TKI treatment (middle right panel). Lower abdomen scans of CHUL#20, revealing lymph node metastases at baseline (lower left), which significantly increased after 1 month of MET TKI treatment (lower right panel).

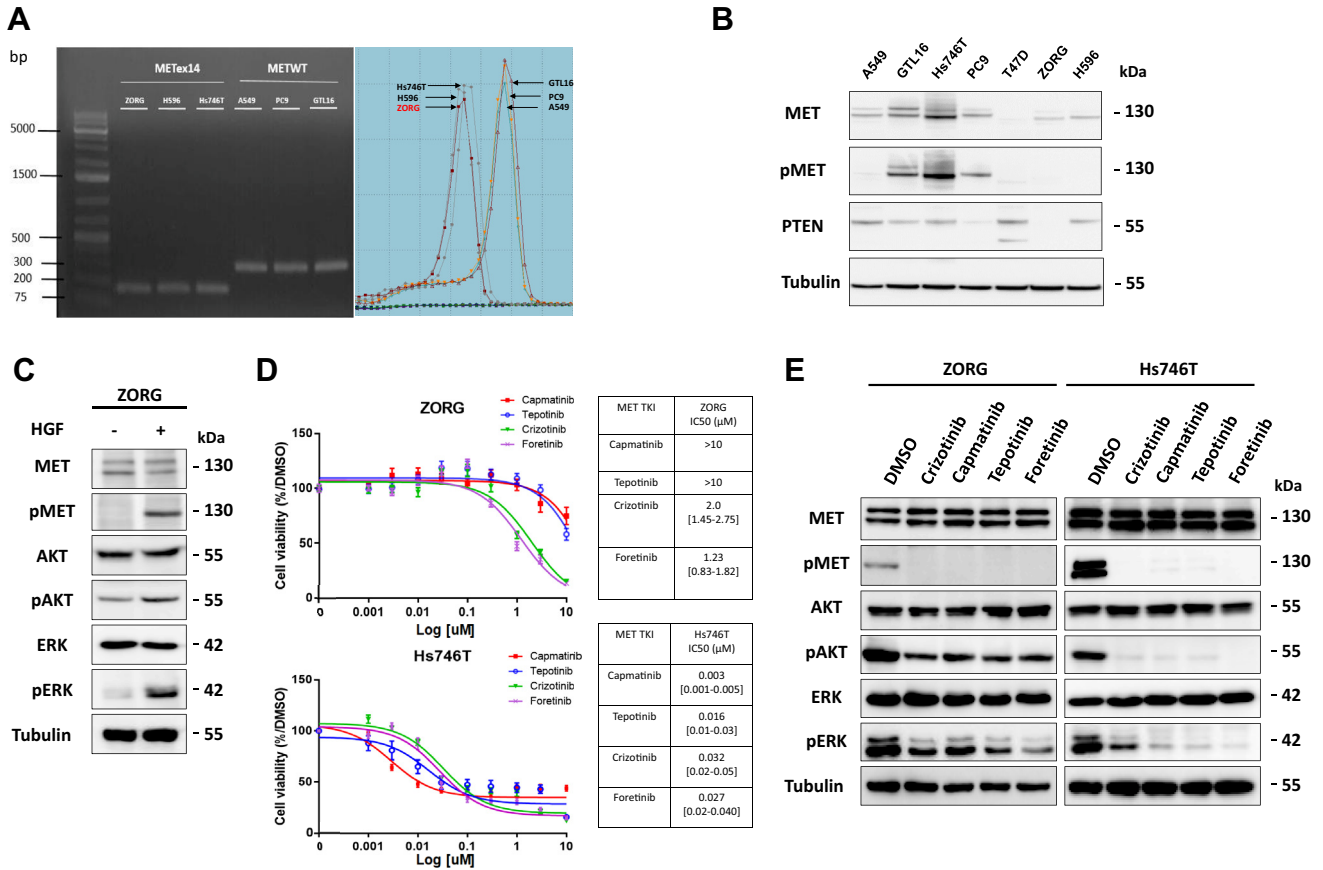


Figure 2. Patient CHUL#11-derived cell line with phosphatase and tensin homolog loss reveals sustained activation of the phosphoinositide 3-kinases (PI3K) pathway and resistance to hepatocyte growth factor receptor (MET) tyrosine kinase inhibitor (TKI). (A) Melting curve analysis of MET splicing isoforms and agarose gel electrophoresis of the amplicons generated by fluorescence reverse-transcription polymerase chain reaction. cDNA from cell lines expressing a characterized MET exon 14 skipping alteration (Hs746T, H596) or a wild-type MET (A549, PC9, GTL16) were used as controls. (B) Immunoblots for ZORG cells versus phosphatase and tensin homolog-expressing cell lines. Tubulin was used as a loading control. (C) ZORG cells were serum-starved for 24 hours and stimulated or not for 30 minutes with 50 ng/mL hepatocyte growth factor. Cells were harvested and subjected to Western blotting with the indicated antibodies. (D) The viability of ZORG cells in response to MET TKIs was assessed by methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT) assay after 72 hours of treatment. The sensitive Hs746T cell line was used as control. Results are presented as means \pm SEM of at least three independent experiments. (E) Serum-starved ZORG and Hs746T cells were treated for 30 minutes with each MET TKI or dimethylsulfoxide (DMSO) at 1 μ M in the presence of hepatocyte growth factor. Expression and activation of MET and its related signaling pathways were investigated by Western blotting. bp; base pair.

establish that the inhibition of both MET and PI3K is required to achieve full cell growth arrest and to suppress activation of the PI3K and MAPK pathways in *METex14* cells harboring a concurrent *PIK3CA* mutation.

METex14 Mutations Contribute to Resistance to PI3K Inhibition in *PIK3CA*-Mutated Cells

Because PI3K pathway alterations confer resistance to MET TKIs in *METex14* cells, we investigated whether *METex14* mutations might similarly confer resistance to a PI3K inhibitor in *PIK3CA*-mutated cells.

For this purpose, we chose the epithelial cell line T47D, harboring a H1047F-activating *PIK3CA* mutation and expressing low levels of endogenous MET. To

observe the specific effect of *METex14* on the biological responses of such cells, we created the T47DMETex14 cell line by stable transfection with a vector expressing a mutant MET (*METex14*, c. 2887_3028del).

First, we confirmed the presence of the exogenous *METex14* in the T47DMETex14 cells and its absence in the parental T47D cells (Supplementary Fig. 2A). We then evaluated the sensitivity of these cells to MET TKIs. We found both T47D and T47DMETex14 cells to be resistant to all tested MET TKIs (Supplementary Fig. 2B).

We further studied the effect of MET and PI3K inhibitors, alone and in combination, on cell proliferation. In T47D cells, we found GDC0941 alone to suppress cell growth. Adding capmatinib had no additional impact.

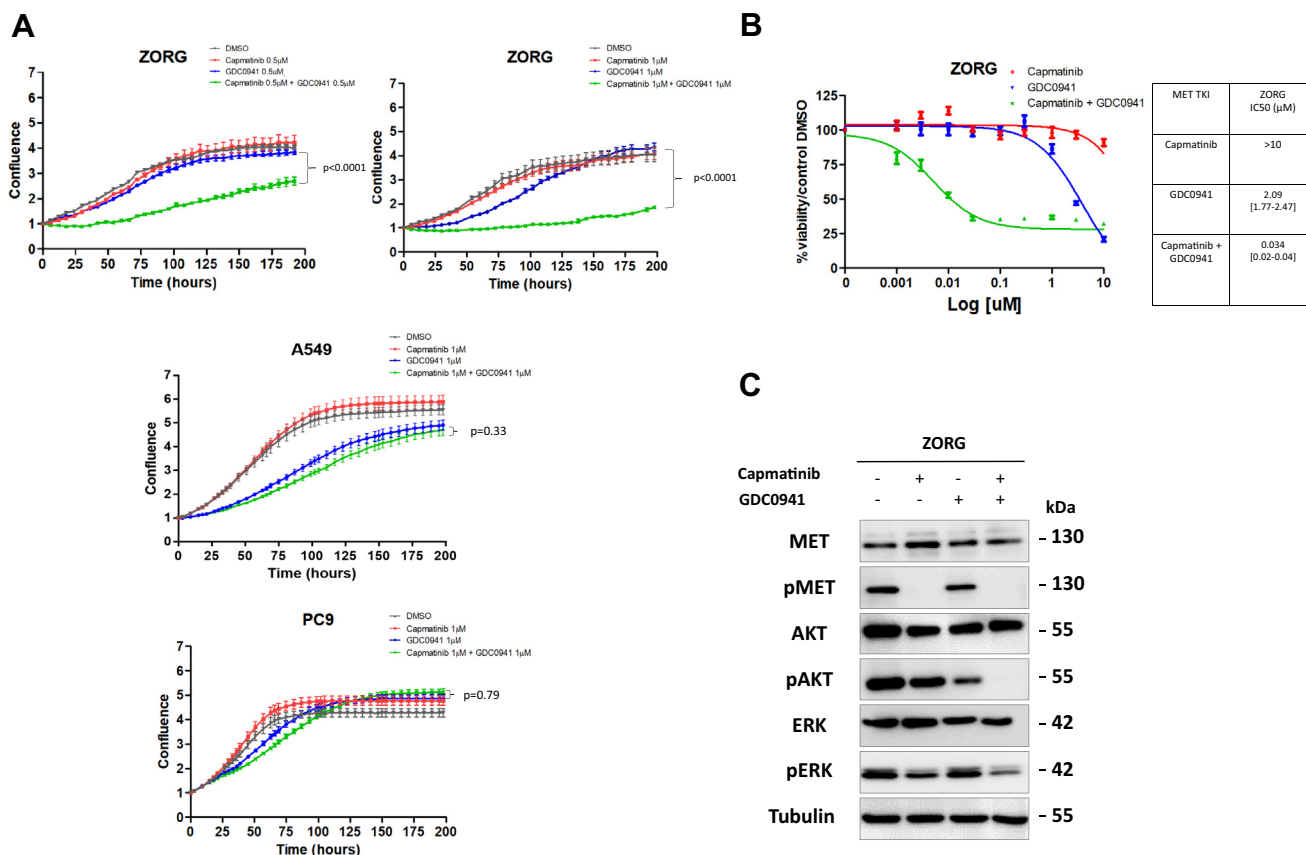


Figure 3. Phosphoinositide 3-kinases (PI3K) inhibition restores sensitivity to hepatocyte growth factor receptor (MET) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in ZORG, a *METex14* cell line with phosphatase and tensin homolog loss. (A) Proliferation of ZORG cells treated with a MET TKI (capmatinib) at 0.5 or 1 μM , a PI3K α/δ inhibitor at 0.5 or 1 μM (GDC0941), or both (each at 0.5 or 1 μM) plus hepatocyte growth factor at 20 ng/ml. IncuCyte confluence measurements were performed every 4 hours for 196 hours. Results are presented as means \pm SEM of three independent experiments. Statistical significance was calculated with the Wilcoxon test. (B) Dose-response curve of ZORG cells treated for 3 days with capmatinib, GDC0941, or both and assessed by methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT) assay. (C) ZORG cells were serum-starved for 24 hours and treated for 30 minutes with dimethylsulfoxide (DMSO), 1 μM capmatinib, 1 μM GDC0941, or capmatinib plus GDC0941 (at 1 μM each) and hepatocyte growth factor at 50 ng/mL. Western blot analyses with the indicated antibodies were performed on cell lysates. Tubulin was used as loading control.

Proliferation of these cells thus seems to depend strictly on the PI3K pathway (Fig. 5A). In contrast, treating T47DMET $_{ex14}$ cells with GDC0941 only slowed down cell growth. Capmatinib alone slightly increased cell growth. To achieve full cell growth arrest, combining GDC0941 with capmatinib was required. This suggests that proliferation of these cells relies on both the PI3K and MET pathways.

Analysis of the signaling pathways revealed that PI3K activation depends partly on MET activation in T47DMET $_{ex14}$ cells but not in T47D cells. ERK activation was found to depend strictly on MET activation. It proved necessary to combine MET and PI3K inhibitors to fully inhibit both AKT and ERK activation (Fig. 5B). For the T47DMET $_{ex14}$ cells, the IC₅₀ for capmatinib shifted from over 10 μM , when the inhibitor was used alone, to 0.007 μM , when it was used in combination with GDC0941 (Fig. 5C).

Taken together, these results reveal that *METex14* can induce MET addiction even in the presence of a concurrent oncogene mutation, such as a *PIK3CA* mutation, and that this leads to resistance to a MET or PI3K inhibitor used alone. Combined inhibition thus seems required in the case of concurrent alterations activating MET and a second signaling pathway.

Discussion

METex14 mutations define a new subgroup of patients with NSCLC who may benefit from targeted therapies against MET. Several MET TKIs have been found to have efficacy in ongoing clinical trials for patients with *METex14* NSCLC, with 32% to 67.9% ORR and a 7.3- to 10.8-month median progression-free survival.⁶⁻⁹ Yet, the observed ORR is lower than that for TKI treatment of EGFR-mutated or ALK-rearranged NSCLC, usually found to be 70% to 80%. Accordingly, the proportion of patients with *METex14*

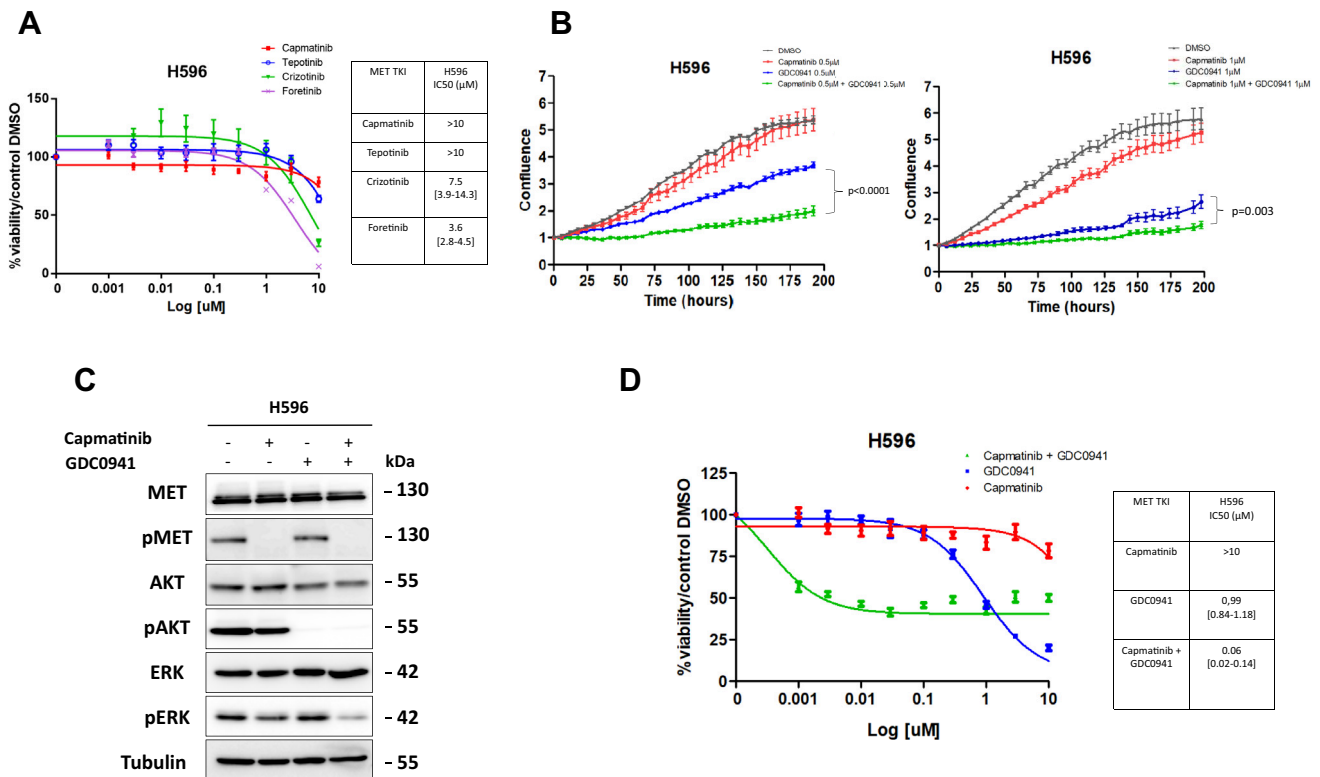


Figure 4. Inhibition of phosphoinositide 3-kinases (PI3K) restores sensitivity to a hepatocyte growth factor receptor (MET) tyrosine kinase inhibitor (TKI) in a *METex14* cell line with a *PIK3CA* mutation. (A) Viability curves of H596 cells treated with increasing doses of MET TKI. Viability was assessed by methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT) assay. IC₅₀ values were calculated with GraphPad Prism version 5.01, as the means of three independent experiments. (B) IncuCyte analysis of proliferation measured as confluence per well of H596 cells treated with dimethylsulfoxide (DMSO), capmatinib, GDC0941, or capmatinib plus GDC0941 (each at 0.5 or 1 μM) and hepatocyte growth factor at 20 ng/ml. Results are presented as means ± SEM of three independent experiments. Statistical significance was calculated with the Wilcoxon test. (C) MET expression and downstream signaling were investigated in H596 cell line by Western blotting. For 30 minutes before lysis, serum-starved cells were treated with each inhibitor alone and with both combined. (D) Dose-response curve of H596 cells treated for 3 days with capmatinib, GDC0941, or both and assessed by MTT assay.

NSCLC having progressive disease as best response to MET TKIs ranged up to 32%,⁶⁻⁹ suggesting that these cancers are not driven by MET-dependent mechanisms only.

Primary resistance of oncogene-addicted cancers to targeted therapies may have several causes, including concurrent genomic alterations.²⁰ In this study, based on a cohort of 65 patients with *METex14* NSCLC, we find that alterations in the PI3K pathway, including PTEN loss and *PIK3CA* mutations, are common and can be associated with resistance to MET TKIs. We confirm here, using a patient-derived cell line combining *METex14* mutation with PTEN loss, that PI3K pathway alterations confer resistance to type I and type II MET TKIs. Importantly, we found that adding a PI3K inhibitor to the treatment can restore the sensitivity of these cells to the MET TKI. Similar results are obtained with *METex14* cells harboring a concurrent *PIK3CA* mutation. Overall, our data suggest that alteration of the PI3K pathway is one of the main mechanisms of primary resistance to MET TKIs in *METex14* NSCLC.

The most common PI3K pathway alteration observed in our cohort was PTEN loss. PTEN loss has been reported in 8% to 42.4% of patients with NSCLC, but previous studies have included different populations and used various thresholds for PTEN expression (stained cells 0%,²¹ <10%,²² or <50% of all cancer cells²³). The frequency of PTEN loss in oncogene-addicted NSCLC is poorly known. PTEN mutations have been reported in 5% of EGFR-mutated NSCLC,²⁴ and homozygous deletion of PTEN has been reported in one of 24 patients with EGFR-mutated NSCLC.²⁵ The wide diversity of genetic and epigenetic alterations affecting PTEN makes it hard to get a comprehensive molecular profile of the *PTEN* gene. This explains why IHC has emerged as an attractive and reliable technique for detecting PTEN loss. Like Soria et al.,²¹ we have chosen to define PTEN loss as the total absence of PTEN expression (0% stained cells). Using this criterion, we found a 23% rate of PTEN loss. One should note that as IHC misses PTEN mutations leading to loss of function without loss of expression, the

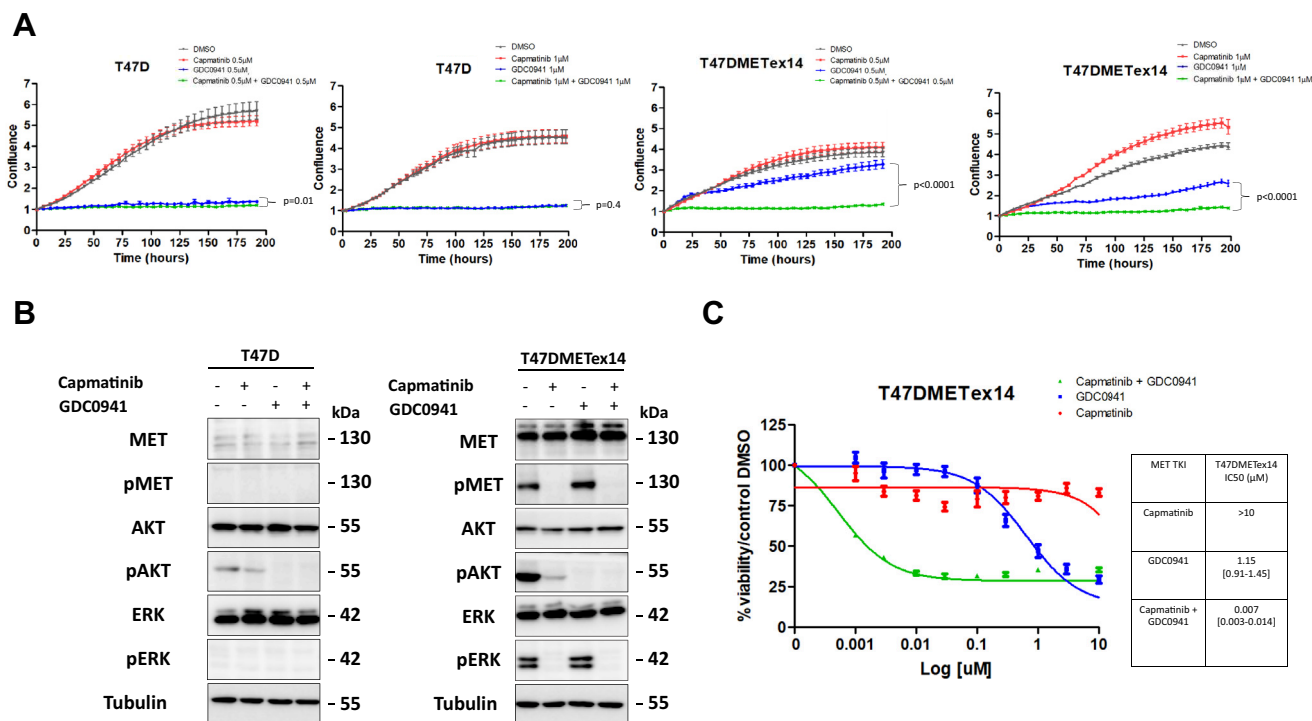


Figure 5. Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha (*PIK3CA*) mutations contribute to hepatocyte growth factor receptor (MET) inhibitor resistance in *METex14* cells. (A) IncuCyte analysis of proliferation, measured as confluence per well, of T47D parental cells versus T47DMETex14 cells treated with imethylsulfoxide (DMSO), capmatinib, GDC0941, or capmatinib plus GDC0941 (at 0.5 or 1 μ M each) and hepatocyte growth factor at 20 ng/mL. Results are presented as means \pm SEM of three independent experiments. Statistical significance was calculated with the Wilcoxon test. (B) MET expression and downstream signaling were investigated in T47D and T47DMETex14 cell lines by Western blotting. For 30 minutes before lysis, serum-starved cells were treated with each inhibitor alone and with both combined. (C) Dose-response curve of T47DMETex14 cells treated for 3 days with capmatinib, GDC0941, or both and assessed by methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT) assay.

rate of true PTEN loss may be underestimated in our cohort. The functional consequences of PTEN loss on responses to TKIs in oncogene-addicted cancers are still largely unknown.²⁶ In patients with EGFR-mutated NSCLC, PTEN expression is associated with prolonged survival.²⁷ In *METex14* NSCLC, the impact of PTEN loss has never been addressed so far. Our results strongly suggest that PTEN loss contributes to resistance to MET TKIs in *METex14* cancer cells through sustained activation of the PI3K pathway.

PIK3CA mutations are found in 4% to 5% of NSCLCs¹¹⁻¹³ and can occur concurrently with other oncogenic drivers, such as EGFR and KRAS.²⁸ EGFR-mutated NSCLC is the only oncogene-addicted NSCLC in which the impact of *PIK3CA* mutations on responses to TKIs has been studied, and results remain controversial. Preclinical data suggest that the *PIK3CA* mutation E545K decreases sensitivity of EGFR-mutated cells to EGFR TKIs.²⁹ Moreover, *PIK3CA* mutations were initially proposed as an acquired mechanism of resistance to EGFR TKI in patients with EGFR-mutated NSCLC³⁰ and were recently found in 3% of patients showing disease progression after first-line osimertinib.³¹ Yet, recent

findings indicate that the *PIK3CA* mutation rate in patients with EGFR-mutated NSCLC is similar whether the patients have been treated with EGFR TKIs or not.³² This suggests a limited role of *PIK3CA* mutations in resistance to EGFR TKIs. For patients with EGFR-mutated NSCLC, Eng et al.³³ report worse overall survival in the presence than in the absence of a concurrent *PIK3CA* mutation, but these authors observed no significant difference in ORR or time to progression in patients on EGFR TKIs. Our present findings suggest that alterations in the PI3K pathway may be associated with resistance to MET TKIs, because all the patients with *METex14* NSCLC whose tumors harbored such an alteration displayed disease progression as best response on MET TKIs. The view that alterations of the PI3K pathway are involved in resistance to MET TKIs is further validated by our results obtained with cell lines, including a patient-derived cell line.

Besides the PI3K pathway alterations, other concurrent molecular alterations have been described in *METex14* NSCLC, including *KRAS* mutation and amplification, murine double minute 2 (*MDM2*) amplification, murine double minute 2 (*TP53*) mutation, and *EGFR*

mutation. Frampton et al.³⁴ and Awad et al.³ found a concurrent alteration in 100 of 114 (88%) and 26 of 28 (92%) *METex14* samples, respectively. This high frequency of concurrent molecular aberrations may reflect the higher rate of smokers and elderly among patients with *METex14* NSCLC than those with EGFR-mutated or ALK-rearranged NSCLC. Interestingly, concurrent alterations may also impair the response to MET TKIs. Recently, *KRAS* mutations were found in 4.4% of patients with *METex14* NSCLC, and most of these mutations were identified before any treatment with MET TKI.³⁵ Amplification of wild-type *KRAS* has also been described in patients with *METex14* NSCLC as a mechanism of primary and acquired resistance.^{35,36} Thus, extensive molecular profiling of *METex14* tumors seems important in identifying patients who may benefit from MET TKIs, and this profiling should include screening for PTEN loss and *PIK3CA* mutations.

We find here that a combination of MET and PI3K inhibitors can inhibit the proliferation of cells harboring a *METex14* mutation and a concurrent *PIK3CA* mutation or PTEN loss. As *PIK3CA* mutations and PTEN loss lead to activation of the PI3K pathway, these results suggest that PI3K pathway alterations cause resistance to MET TKIs. Interestingly, Bahcall et al.³⁶ have found that the same combination can inhibit tumor growth in *METex14* tumors with concurrent wild-type *KRAS* amplification. Taken together, these results strongly suggest that a combination of MET and PI3K inhibitors might overcome several mechanisms of resistance to MET TKIs in *METex14* NSCLC. So far, in the clinical setting, the use of panPI3K inhibitors, either alone or in combination, has been hindered by safety issues.³⁷ A phase I study evaluating a combination of capmatinib and buparlisib in adult patients with recurrent glioblastoma was discontinued because of poor tolerance.³⁸ Yet, more selective drugs have recently been developed and might offer a better safety profile with promising activity. This would pave the way for future combinations.

In conclusion, although *METex14* mutations are associated with efficacy of MET TKIs in a number of patients, concurrent alterations can frequently occur and may impair the response to MET inhibition. Our results suggest that the PI3K pathway alterations are common and should be screened to identify patients most likely to benefit from MET TKIs. Combining MET and PI3K inhibitors could overcome resistances owing to PI3K pathway alterations.

Acknowledgments

This work received French financial support from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut Pasteur de Lille, the INSERM, the University of Lille, the

Cancéropôle Nord-Ouest, (n°54551) the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE17-0020-05), and the Groupe Pasteur Mutualité. The authors thank Laurence Stechly for assistance in the screening of tumor samples by next-generation sequencing. The authors thank the Microscopy-Imaging-Cytometry Facility of the Bio-Imaging Center Lille Nord-de-France for access to instruments and technical advice.

Supplementary Data

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of the *Journal of Thoracic Oncology* at www.jto.org and at <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.01.027>.

References

1. Salgia R. MET in lung cancer: biomarker selection based on scientific rationale. *Mol Cancer Ther*. 2017;16:555-565.
2. Descarpentries C, Leprêtre F, Escande F, et al. Optimization of routine testing for MET exon 14 splice site mutations in NSCLC patients. *J Thorac Oncol*. 2018;13:1873-1883.
3. Awad MM, Oxnard GR, Jackman DM, 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*. 2016;34:721-730.
4. 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;109:djw262.
5. Liu X, Jia Y, Stoopler MB, et al. Next-generation sequencing of pulmonary sarcomatoid carcinoma reveals high frequency of actionable MET gene mutations. *J Clin Oncol*. 2016;34:794-802.
6. Drilon A, Clark J, Weiss J, et al. OA12.02 updated anti-tumor activity of crizotinib in patients with MET exon 14-altered advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2018;13(10 suppl):S348.
7. Wolf J, Seto T, Han J-Y, et al. Results of the GEOMETRY mono-1 phase II study for evaluation of the MET inhibitor capmatinib (INC280) in patients (pts) with METΔex14 mutated advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol*. 2018;29(suppl 8):viii741-viii742.
8. Felip E, Horn L, Patel JD, et al. Tepotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring MET exon 14-skipping mutations: phase II trial. *J Clin Oncol*. 2018;36(suppl 15):9016-9016.
9. Moro-Sibilot D, Cozic N, Pélou M, et al. OA12.03 activity of crizotinib in MET or ROS1 positive (+) NSCLC: results of the AcSé trial. *J Thorac Oncol*. 2018;13(suppl):S348.
10. Hervieu A, Kermorgant S. The role of PI3K in Met driven cancer: a recap. *Front Mol Biosci*. 2018;5:86.
11. Yamamoto H, Shigematsu H, Nomura M, et al. PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers. *Cancer Res*. 2008;68:6913-6921.
12. Ludovini V, Bianconi F, Pistola L, et al. Phosphoinositide-3-kinase catalytic alpha and KRAS mutations are

- important predictors of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011;6:707-715.
13. Jing C, Mao X, Wang Z, et al. Next-generation sequencing-based detection of EGFR, KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA, Her-2 and TP53 mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Mol Med Rep.* 2018;18:2191-2197.
 14. Malanga D, Scrima M, De Marco C, et al. Activating E17K mutation in the gene encoding the protein kinase AKT in a subset of squamous cell carcinoma of the lung. *Cell Cycle.* 2008;7:665-669.
 15. Do H, Solomon B, Mitchell PL, Fox SB, Dobrovic A. Detection of the transforming AKT1 mutation E17K in non-small cell lung cancer by high resolution melting. *BMC Res Notes.* 2008;1:14.
 16. Bleeker FE, Felicioni L, Buttitta F, et al. AKT1E17K in human solid tumours. *Oncogene.* 2008;27:5648-5650.
 17. Liu Q, Yu S, Zhao W, Qin S, Chu Q, Wu K. EGFR-TKIs resistance via EGFR-independent signaling pathways. *Mol Cancer.* 2018;17:53.
 18. Pons-Tostivint E, Thibault B, Guillermet-Guibert J. Targeting PI3K signaling in combination cancer therapy. *Trends Cancer.* 2017;3:454-469.
 19. Baltschukat S, Schacher Engstler B, Huang A, et al. Capmatinib (INC280) is active against models of non-small cell lung cancer and other cancer types with defined mechanisms of MET activation. *Clin Cancer Res.* 2019;25:3164-3175.
 20. Neel DS, Bivona TG. Resistance is futile: overcoming resistance to targeted therapies in lung adenocarcinoma. *NPJ Precis Oncol.* 2017;1:3.
 21. Soria JC, Lee HY, Lee JI, et al. Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin Cancer Res.* 2002;8:1178-1184.
 22. Aisner DL, Sholl LM, Berry LD, et al. The impact of smoking and TP53 mutations in lung adenocarcinoma patients with targetable mutations—the Lung Cancer Mutation Consortium (LCMC2). *Clin Cancer Res.* 2018;24:1038-1047.
 23. Yoo SB, Xu X, Lee HJ, et al. Loss of PTEN expression is an independent poor prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Korean J Pathol.* 2011;45:329-335.
 24. VanderLaan PA, Rangachari D, Mockus SM, et al. Mutations in TP53, PIK3CA, PTEN and other genes in EGFR mutated lung cancers: correlation with clinical outcomes. *Lung Cancer.* 2017;106:17-21.
 25. Sos ML, Koker M, Weir BA, et al. PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer Res.* 2009;69:3256-3261.
 26. Takeda H, Takigawa N, Ohashi K, et al. Vandetanib is effective in EGFR-mutant lung cancer cells with PTEN deficiency. *Exp Cell Res.* 2013;319:417-423.
 27. Endoh H, Yatabe Y, Kosaka T, Kuwano H, Mitsudomi T. PTEN and PIK3CA expression is associated with prolonged survival after gefitinib treatment in EGFR-mutated lung cancer patients. *J Thorac Oncol.* 2006;1:629-634.
 28. Scheffler M, Bos M, Gardizi M, et al. PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies. *Oncotarget.* 2015;6:1315-1326.
 29. Engelman JA, Mukohara T, Zejnullahu K, et al. Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. *J Clin Invest.* 2006;116:2695-2706.
 30. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med.* 2011;3:75ra26.
 31. Ramalingam SS, Cheng Y, Zhou C, et al. LBA50Mechanisms of acquired resistance to first-line osimertinib: preliminary data from the phase III FLAURA study. *Ann Oncol.* 2018;29(suppl 8):LBA50.
 32. Wu SG, Chang YL, Yu CJ, Yang PC, Shih JY. The role of PIK3CA mutations among lung adenocarcinoma patients with primary and acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibition. *Sci Rep.* 2016;6:35249.
 33. Eng J, Woo KM, Sima CS, et al. Impact of concurrent PIK3CA mutations on response to EGFR tyrosine kinase inhibition in EGFR-mutant lung cancers and on prognosis in oncogene-driven lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol.* 2015;10:1713-1719.
 34. Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, et al. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov.* 2015;5:850-859.
 35. Suzawa K, Offin M, Lu D, et al. Activation of KRAS mediates resistance to targeted therapy in MET exon 14 mutant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2018;25:1248-1260.
 36. Bahcall M, Awad MM, Sholl LM, et al. Amplification of wild type KRAS imparts resistance to crizotinib in MET exon 14 mutant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2018;24:5963-5976.
 37. Juric D, Rodon J, Taberero J, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase α -selective inhibition with alpelisib (BYL719) in PIK3CA-altered solid tumors: results from the first-in-human study. *J Clin Oncol.* 2018;36:1291-1299.
 38. van den Bent M, Azaro A, Vos F, et al. A phase Ib/II, open-label, multicenter study of INC280 (capmatinib) alone and in combination with buparlisib (BKM120) in adult patients with recurrent glioblastoma. *J Neurooncol.* 2020;146:79-89.

Références

AACR Project GENIE Consortium (2017). AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. *Cancer Discov.* *7*, 818–831.

Abella, J.V., Peschard, P., Naujokas, M.A., Lin, T., Saucier, C., Urbe, S., and Park, M. (2005). Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor Ubiquitination Suppresses Transformation and Is Required for Hrs Phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 9632–9645.

Abella, J.V., Parachoniak, C.A., Sangwan, V., and Park, M. (2010). Dorsal ruffle microdomains potentiate Met receptor tyrosine kinase signaling and down-regulation. *J. Biol. Chem.* *285*, 24956–24967.

Abounader, R., Ranganathan, S., Lal, B., Fielding, K., Book, A., Dietz, H., Burger, P., and Laterra, J. (1999). 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.* *91*, 1548–1556.

Abounader, R., Lal, B., Luddy, C., Koe, G., Davidson, B., Rosen, E.M., and Laterra, J. (2002). In vivo targeting of SF/HGF and c-met expression via U1snRNA/ribozymes inhibits glioma growth and angiogenesis and promotes apoptosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *16*, 108–110.

Agarwal, S., Zerillo, C., Kolmakova, J., Christensen, J.G., Harris, L.N., Rimm, D.L., DiGiovanna, M.P., and Stern, D.F. (2009). Association of constitutively activated hepatocyte growth factor receptor (Met) with resistance to a dual EGFR/Her2 inhibitor in non-small-cell lung cancer cells. *Br. J. Cancer* *100*, 941–949.

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.

Awad, M.M., Oxnard, G.R., Jackman, D.M., Savukoski, D.O., Hall, D., Shivdasani, P., Heng, J.C., Dahlberg, S.E., Jänne, P.A., Verma, S., et al. (2016). MET Exon 14 Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer Are Associated With Advanced Age and Stage-Dependent MET Genomic Amplification and c-Met Overexpression. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *34*, 721–730.

Awad, M.M., Leonardi, G.C., Kravets, S., Dahlberg, S.E., Drilon, A.E., Noonan, S., Camidge, D.R., Ou, S.-H.I., Costa, D.B., Gadgeel, S.M., et al. (2017). Impact of MET inhibitors on survival among patients (pts) with MET exon 14 mutant (METdel14) non-small cell lung cancer (NSCLC). *J. Clin. Oncol.* *35*, 8511–8511.

Awad, M.M., Bahcall, M., Sholl, L.M., Wilson, F.H., Paweletz, C., Capelletti, M., Leonardi, G.C., Watanabe, M., Baba, H., Chambers, E.S., et al. (2018). Mechanisms of acquired resistance to MET tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in MET exon 14 (METex14) mutant non-small cell lung cancer (NSCLC). *J. Clin. Oncol.* *36*, 9069–9069.

Bahcall, M., Awad, M.M., Sholl, L.M., Wilson, F.H., Xu, M., Wang, S., Palakurthi, S., Choi, J., Ivanova, E.V., Leonardi, G.C., et al. (2018). Amplification of Wild-type KRAS Imparts Resistance to

Crizotinib in MET Exon 14 Mutant Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 24, 5963–5976.

Baldacci, S., Figeac, M., Antoine, M., Descarpentries, C., Kherrouche, Z., Jamme, P., Copin, M.-C., Tulasne, D., Nanni, I., Beau-Faller, M., et al. (2020). High MET Overexpression Does Not Predict the presence of MET exon 14 Splice Mutations in NSCLC: Results From the IFCT PREDICT.amm study. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 15, 120–124.

Baltschukat, S., Engstler, B.S., Huang, A., Hao, H.-X., Tam, A., Wang, H.Q., Liang, J., DiMare, M.T., Bhang, H.-E.C., Wang, Y., et al. (2019). Capmatinib (INC280) Is Active Against Models of Non-Small Cell Lung Cancer and Other Cancer Types with Defined Mechanisms of MET Activation. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 25, 3164–3175.

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., Ponzetto, C., and Comoglio, P.M. (1994). Identification of functional domains in the hepatocyte growth factor and its receptor by molecular engineering. *J. Biotechnol.* 37, 109–122.

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.

Barlesi, F., Mazieres, J., Merlio, J.-P., Debieuvre, D., Mosser, J., Lena, H., Ouafik, L., Besse, B., Rouquette, I., Westeel, V., et al. (2016). Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *The Lancet* 387, 1415–1426.

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.

Bladt, F., Faden, B., Friese-Hamim, M., Knuehl, C., Wilm, C., Fittschen, C., Grädler, U., Meyring, M., Dorsch, D., Jaehrling, F., et al. (2013). EMD 1214063 and EMD 1204831 constitute a new class of potent and highly selective c-Met inhibitors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 2941–2951.

Blanc-Durand, F., Alameddine, R., Iafrate, A.J., Tran-Thanh, D., Lo, Y.-C., Blais, N., Routy, B., Tehfé, M., Leduc, C., Romeo, P., et al. (2020). Tepotinib Efficacy in a Patient with Non-Small Cell Lung Cancer with Brain Metastasis Harboring an HLA-DRB1-MET Gene Fusion (*Oncologist*).

Bleeker, F.E., Felicioni, L., Buttitta, F., Lamba, S., Cardone, L., Rodolfo, M., Scarpa, A., Leenstra, S., Frattini, M., Barbareschi, M., et al. (2008). AKT1 E17K in human solid tumours. *Oncogene* 27, 5648–5650.

Boccaccio, C., Gaudino, G., Gambarotta, G., Galimi, F., and Comoglio, P.M. (1994). Hepatocyte growth factor (HGF) receptor expression is inducible and is part of the delayed-early response to HGF. *J. Biol. Chem.* 269, 12846–12851.

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.

Boon, E.M.J., van der Neut, R., van de Wetering, M., Clevers, H., and Pals, S.T. (2002). Wnt signaling regulates expression of the receptor tyrosine kinase met in colorectal cancer. *Cancer Res.* *62*, 5126–5128.

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., Faletto, 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.

Brand, T.M., Iida, M., Li, C., and Wheeler, D.L. (2011). The Nuclear Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Network and its Role in Cancer. *Discov. Med.* *12*, 419–432.

Brockmann, M.A., Papadimitriou, A., Brandt, M., Fillbrandt, R., Westphal, M., and Lamszus, K. (2003). Inhibition of intracerebral glioblastoma growth by local treatment with the scatter factor/hepatocyte growth factor-antagonist NK4. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *9*, 4578–4585.

Bruno, R., Lupi, C., Landi, L., Ali, G., Sensi, E., Proietti, A., Giannini, R., Condello, V., Denaro, M., Giordano, M., et al. (2017). MET exon 14 mutations in advanced lung adenocarcinoma: Frequency and coexisting alterations. *J. Clin. Oncol.* *35*, e20656–e20656.

Burel-Vandenbos, F., Ngo-Mai, M., Dadone, B., Di Mauro, I., Gimet, S., Saada-Bouazid, 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.

Cao, B., Su, Y., Oskarsson, M., Zhao, P., Kort, E.J., Fisher, R.J., Wang, L.M., and Vande Woude, G.F. (2001). Neutralizing monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) display antitumor activity in animal models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 7443–7448.

Carter, S., Urbé, S., and Clague, M.J. (2004). The met receptor degradation pathway: requirement for Lys48-linked polyubiquitin independent of proteasome activity. *J. Biol. Chem.* *279*, 52835–52839.

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.

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.

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.

Chu, Q.S. (2020). Targeting non-small cell lung cancer: driver mutation beyond epidermal growth factor mutation and anaplastic lymphoma kinase fusion. *Ther. Adv. Med. Oncol.* *12*, 175883591989575.

Clavé, S., Dalmases, A., Longarón, R., Pijuan, L., Casadevall, D., Taus, Á., Albanell, J., Espinet, B., Arriola, E., Bellosillo, B., et al. (2017). P1.02-048 MET Exon 14 Skipping Mutations and Gene Amplifications Are Not Simultaneous Events in NSCLC: Topic: Driver Genes in NSCLC, Resistance, and Other. *J. Thorac. Oncol.* *12*, S516–S517.

Conrotto, P., Corso, S., Gamberini, S., Comoglio, P.M., and Giordano, S. (2004). Interplay between scatter factor receptors and B plexins controls invasive growth. *Oncogene* *23*, 5131–5137.

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.

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 Amst. Neth.* *101*, 59–67.

Dagogo-Jack, I., Yoda, S., Lennerz, J.K., Langenbucher, A., Lin, J.J., Rooney, M., Prutisto-Chang, K., Oh, A., Adams, N.A., Yeap, B.Y., et al. (2020). MET Alterations are a Recurring and Actionable Resistance Mechanism in ALK-Positive Lung Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *26*, 2535–2545.

D’Arcangelo, M., Tassinari, D., Marinis, F.D., Delmonte, A., Galetta, D., Cecere, F., Pilotto, S., Zanelli, F., Bonanno, L., Landi, L., et al. (2019). P2.01-15 Phase II Single Arm Study of CABozantinib in Non-Small Cell Lung Cancer Patients with MET Deregulation (CABinMET). *J. Thorac. Oncol.* *14*, S644.

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*).

Davies, K.D., Lomboy, A., Lawrence, C.A., Yourshaw, M., Bocsi, G.T., Camidge, D.R., and Aisner, D.L. (2019). DNA-Based versus RNA-Based Detection of MET Exon 14 Skipping Events in Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* *14*, 737–741.

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.

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 NSCLC Patients. *J. Thorac. Oncol.* *13*, 1873–1883.

Domoto, T., Takino, T., Guo, L., and Sato, H. (2012). Cleavage of hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 by membrane-type MMP-1 activates matriptase. *Cancer Sci.* *103*, 448–454.

Drilon, A., Clark, J.W., Weiss, J., Ou, S.-H.I., Camidge, D.R., Solomon, B.J., Otterson, G.A., Villaruz, L.C., Riely, G.J., Heist, R.S., et al. (2020). Antitumor activity of crizotinib in lung cancers harboring a MET exon 14 alteration. *Nat. Med.* *26*, 47–51.

Dumortier, M., Ladam, F., Damour, I., Vacher, S., Bièche, I., Marchand, N., de Launoit, Y., Tulasne, D., and Chotteau-Lelièvre, A. (2018). ETV4 transcription factor and MMP13 metalloprotease are interplaying actors of breast tumorigenesis. *Breast Cancer Res.* *20*, 73.

Duplaquet, L., Leroy, C., Vincent, A., Paget, S., Lefebvre, J., Vanden Abeele, F., Lancel, S., Giffard, F., Paumelle, R., Bidaux, G., et al. (2020). Control of cell death/survival balance by the MET dependence receptor. *ELife* *9*.

Ebert, M., Yokoyama, M., Friess, H., Büchler, M.W., and Korc, M. (1994). Coexpression of the c-met proto-oncogene and hepatocyte growth factor in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* *54*, 5775–5778.

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.

Engstrom, L.D., Aranda, R., Lee, M., Tovar, E.A., Essenburg, C.J., Madaj, Z., Chiang, H., Briere, D., Hallin, J., Lopez-Casas, P.P., et al. (2017). Glesatinib Exhibits Antitumor Activity in Lung Cancer Models and Patients Harboring MET Exon 14 Mutations and Overcomes Mutation-mediated Resistance to Type I MET Inhibitors in Nonclinical Models. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *23*, 6661–6672.

Epstein, J.A., Shapiro, D.N., Cheng, J., Lam, P.Y., and Maas, R.L. (1996). Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 4213–4218.

Fan, G., Zhang, S., Gao, Y., Greer, P.A., and Tonks, N.K. (2016). HGF-independent regulation of MET and GAB1 by nonreceptor tyrosine kinase FER potentiates metastasis in ovarian cancer. *Genes Dev.* *30*, 1542–1557.

Fan, S., Gao, M., Meng, Q., Laterra, J.J., Symons, M.H., Coniglio, S., Pestell, R.G., Goldberg, I.D., and Rosen, E.M. (2005). Role of NF- κ B signaling in hepatocyte growth factor/scatter factor-mediated cell protection. *Oncogene* *24*, 1749–1766.

Fan, Y., Arechederra, M., Richelme, S., Daian, F., Novello, C., Calderaro, J., Di Tommaso, L., Morcrette, G., Rebouissou, S., Donadon, M., et al. (2017). A phosphokinome-based screen uncovers new drug synergies for cancer driven by liver-specific gain of nononcogenic receptor tyrosine kinases. *Hepatol. Baltim. Md* *66*, 1644–1661.

Fay, R., Gut, M., and Holland, J.P. (2019). Photoradiosynthesis of ⁶⁸Ga-Labeled HBED-CC-Azepin-MetMAb for Immuno-PET of c-MET Receptors. *Bioconjug. Chem.* *30*, 1814–1820.

FDA, C. for D.E. and (2020). FDA grants accelerated approval to capmatinib for metastatic non-small cell lung cancer. FDA.

Fixman, E.D., Fournier, T.M., Kamikura, D.M., Naujokas, M.A., and Park, M. (1996). Pathways downstream of Shc and Grb2 are required for cell transformation by the tpr-Met oncoprotein. *J. Biol. Chem.* *271*, 13116–13122.

Follenzi, A., Bakovic, S., Gual, P., Stella, M.C., Longati, P., and Comoglio, P.M. (2000). Cross-talk between the proto-oncogenes Met and Ron. *Oncogene* *19*, 3041–3049.

Foveau, B., Leroy, C., Ancot, F., Deheuninck, J., Ji, Z., Fafeur, V., and Tulasne, D. (2006). 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.

Fujino, T., Kobayashi, Y., Suda, K., Koga, T., Nishino, M., Ohara, S., Chiba, M., Shimoji, M., Tomizawa, K., Takemoto, T., et al. (2019). Sensitivity and Resistance of MET Exon 14 Mutations in Lung Cancer to Eight MET Tyrosine Kinase Inhibitors In Vitro. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* *14*, 1753–1765.

Fujiwara, K., Nagoshi, S., Ohno, A., Hirata, K., Ohta, Y., Mochida, S., Tomiya, T., Higashio, K., and Kurokawa, K. (1993). Stimulation of liver growth by exogenous human hepatocyte growth factor in normal and partially hepatectomized rats. *Hepatology. Baltim. Md* *18*, 1443–1449.

Gambarotta, G., Boccaccio, C., Giordano, S., Andö, M., Stella, M.C., and Comoglio, P.M. (1996). Ets up-regulates MET transcription. *Oncogene* *13*, 1911–1917.

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.

Gherardi, E., Youles, M.E., Miguel, R.N., Blundell, T.L., Iamele, 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., Öfverstedt, 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.

Giordano, S., Ponzetto, C., Di Renzo, M.F., Cooper, C.S., and Comoglio, P.M. (1989). Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein. *Nature* *339*, 155–156.

Giordano, S., Maffe, A., Williams, T.A., Artigiani, S., Gual, P., Bardelli, A., Basilico, C., Michieli, P., and Comoglio, P.M. (2000). Different point mutations in the met oncogene elicit distinct biological properties. *FASEB J.* *14*, 399–406.

Giordano, S., Corso, S., Conrotto, P., Artigiani, S., Gilestro, G., Barberis, D., Tamagnone, L., and Comoglio, P.M. (2002). The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. *Nat. Cell Biol.* *4*, 720–724.

Giri, D.K., Ali-Seyed, M., Li, L.-Y., Lee, D.-F., Ling, P., Bartholomeusz, G., Wang, S.-C., and Hung, M.-C. (2005). Endosomal Transport of ErbB-2: Mechanism for Nuclear Entry of the Cell Surface Receptor. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 11005–11018.

Gomes, D.A., Rodrigues, M.A., Leite, M.F., Gomez, M.V., Varnai, P., Balla, T., Bennett, A.M., and Nathanson, M.H. (2008). c-Met Must Translocate to the Nucleus to Initiate Calcium Signals. *J. Biol. Chem.* *283*, 4344–4351.

Guo, A., Villén, J., Kornhauser, J., Lee, K.A., Stokes, M.P., Rikova, K., Possemato, A., Nardone, J., Innocenti, G., Wetzel, R., et al. (2008). Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 692–697.

Guo, R., Offin, M., Brannon, A.R., Chang, J., Chow, A., Delasos, L., Girshman, J., Wilkins, O., McCarthy, C.G., Makhnin, A., et al. (2020). MET Exon 14-altered Lung Cancers and MET Inhibitor Resistance. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*

Hammond, D.E., Urbé, S., Vande Woude, G.F., and Clague, M.J. (2001). Down-regulation of MET, the receptor for hepatocyte growth factor. *Oncogene* *20*, 2761–2770.

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.

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.

Hoshiko, S., Kawaguchi, M., Fukushima, T., Haruyama, Y., Yorita, K., Tanaka, H., Seiki, M., Inatsu, H., Kitamura, K., and Kataoka, H. (2013). Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 is a suppressor of intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* *73*, 2659–2670.

Hubbard, S.R. (1999). Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *71*, 343–358.

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.

Huse, M., and Kuriyan, J. (2002). The Conformational Plasticity of Protein Kinases. *Cell* *109*, 275–282.

Ichimura, E., Maeshima, A., Nakajima, T., and Nakamura, T. (1996). Expression of c-met/HGF receptor in human non-small cell lung carcinomas in vitro and in vivo and its prognostic significance. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 87, 1063–1069.

Isakoff, S.J., Engelman, J.A., Irie, H.Y., Luo, J., Brachmann, S.M., Pearline, R.V., Cantley, L.C., and Brugge, J.S. (2005). Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 65, 10992–11000.

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. *Dev. Camb. Engl.* 136, 337–345.

Itoh, H., Naganuma, S., Takeda, N., Miyata, S., Uchinokura, S., Fukushima, T., Uchiyama, S., Tanaka, H., Nagaike, K., Shimomura, T., et al. (2004). Regeneration of injured intestinal mucosa is impaired in hepatocyte growth factor activator-deficient mice. *Gastroenterology* 127, 1423–1435.

Jagadeeswaran, R., Ma, P.C., Seiwert, T.Y., Jagadeeswaran, S., Zumba, O., Nallasura, V., Ahmed, S., Filiberti, R., Paganuzzi, M., Puntoni, R., et al. (2006). Functional Analysis of c-Met/Hepatocyte Growth Factor Pathway in Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer Res.* 66, 352–361.

Jagoda, E.M., Lang, L., Bhadrasetty, V., Histed, S., Williams, M., Kramer-Marek, G., Mena, E., Rosenblum, L., Marik, J., Tinianow, J.N., et al. (2012). Immuno-PET of the hepatocyte growth factor receptor Met using the 1-armed antibody onartuzumab. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 53, 1592–1600.

Jamme, P., Fernandes, M., Copin, M.-C., Descarpentries, C., Escande, F., Morabito, A., Grégoire, V., Jamme, M., Baldacci, S., Tulasne, D., et al. (2020). Alterations in the PI3K Pathway Drive Resistance to MET Inhibitors in NSCLC Harboring MET Exon 14 Skipping Mutations. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 15, 741–751.

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.

Jiang, Y., Xu, W., Lu, J., He, F., and Yang, X. (2001). Invasiveness of hepatocellular carcinoma cell lines: contribution of hepatocyte growth factor, c-met, and transcription factor Ets-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 1123–1130.

Jo, M., Stolz, D.B., Esplen, J.E., Dorko, K., Michalopoulos, G.K., and Strom, S.C. (2000). Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells. *J. Biol. Chem.* 275, 8806–8811.

Joffre, 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.

Kanteti, R., Nallasura, V., Loganathan, S., Tretiakova, M., Kroll, T., Krishnaswamy, S., Faoro, L., Cagle, P., Husain, A.N., Vokes, E.E., et al. (2009). PAX5 is expressed in small-cell lung cancer and positively regulates c-Met transcription. *Lab. Invest.* 89, 301–314.

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. (2003). Protein kinase C controls microtubule-based traffic but not proteasomal degradation of c-Met. *J. Biol. Chem.* 278, 28921–28929.

Kermorgant, S., Zicha, D., and Parker, P.J. (2004). PKC controls HGF-dependent c-Met traffic, signalling and cell migration. *EMBO J.* 23, 3721–3734.

Kherrouche, Z., Monte, D., Werkmeister, E., Stoven, L., De Launoit, Y., Cortot, A.B., Tulasne, D., and Chotteau-Lelievre, A. (2015). PEA3 transcription factors are downstream effectors of Met signaling involved in migration and invasiveness of Met-addicted tumor cells. *Mol. Oncol.* 9, 1852–1867.

Kim, K.J., Wang, L., Su, Y.-C., Gillespie, G.Y., Salhotra, A., Lal, B., and Laterra, J. (2006). Systemic anti-hepatocyte growth factor monoclonal antibody therapy induces the regression of intracranial glioma xenografts. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 1292–1298.

Kiss, A., Wang, N.J., Xie, J.P., and Thorgeirsson, S.S. (1997). Analysis of transforming growth factor (TGF)-alpha/epidermal growth factor receptor, hepatocyte growth factor/c-met, TGF-beta receptor type II, and p53 expression in human hepatocellular carcinomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 3, 1059–1066.

Klempner, S.J., Borghei, A., Hakimian, B., Ali, S.M., and Ou, S.-H.I. (2017). Intracranial Activity of Cabozantinib in MET Exon 14-Positive NSCLC with Brain Metastases. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 12, 152–156.

Klingler, S., Fay, R., and Holland, J.P. (2020). Light-Induced Radiosynthesis of ⁸⁹Zr-DFO-Azepin-Onartuzumab for Imaging the Hepatocyte Growth Factor Receptor. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 61, 1072–1078.

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, L.R., Mohamed Salleh, N.A.B., Ong, R.W., Tan, T.Z., Syn, N.L., Goh, R.M., Fhu, C.W., Tan, D.S.W., Iyer, N.G., Kannan, S., et al. (2020). A common MET polymorphism harnesses HER2 signaling to drive aggressive squamous cell carcinoma. *Nat. Commun.* 11, 1556.

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 Woude, G.F.V. (1997). Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res.* 57, 5391–5398.

Kopitz, C., Gerg, M., Bandapalli, O.R., Ister, D., Pennington, C.J., Hauser, S., Flechsig, C., Krell, H.-W., Antolovic, D., Brew, K., et al. (2007). Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 Promotes Liver Metastasis by Induction of Hepatocyte Growth Factor Signaling. *Cancer Res.* 67, 8615–8623.

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.

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. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 5714–5723.

Kulas, D.T., Goldstein, B.J., and Mooney, R.A. (1996). The transmembrane protein-tyrosine phosphatase LAR modulates signaling by multiple receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* *271*, 748–754.

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.

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. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 11144–11158.

Lamszus, K., Schmidt, N.O., Jin, L., Laterra, 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.

Landi, L., Chiari, R., Tiseo, M., D'Incà, F., Dazzi, C., Chella, A., Delmonte, A., Bonanno, L., Giannarelli, D., Cortinovis, D.L., et al. (2019). Crizotinib in MET-Deregulated or ROS1-Rearranged Pretreated Non-Small Cell Lung Cancer (METROS): A Phase II, Prospective, Multicenter, Two-Arms Trial. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *25*, 7312–7319.

Laterra, J., Rosen, E., Nam, M., Ranganathan, S., Fielding, K., and Johnston, P. (1997). Scatter factor/hepatocyte growth factor expression enhances human glioblastoma tumorigenicity and growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *235*, 743–747.

Lee, C.C., and Yamada, K. (1994). Identification of a novel type of alternative splicing of a Tyrosine Kinase Receptor. *J. Biol. Chem.* *269*, 19457–19461.

Lee, G.D., Lee, S.E., Oh, D.-Y., Yu, D.-B., Jeong, H.M., Kim, J., Hong, S., Jung, H.S., Oh, E., Song, J.-Y., et al. (2017). MET Exon 14 Skipping Mutations in Lung Adenocarcinoma: Clinicopathologic Implications and Prognostic Values. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* *12*, 1233–1246.

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 Woude, G.F.V. (2006). An alternatively spliced form of Met receptor is tumorigenic. *Exp. Mol. Med.* *38*, 565–573.

Lee, J.M., Kim, B., Lee, S.B., Jeong, Y., Oh, Y.M., Song, Y.-J., Jung, S., Choi, J., Lee, S., Cheong, K.H., et al. (2014). Cbl-independent degradation of Met: ways to avoid agonism of bivalent Met-targeting antibody. *Oncogene* *33*, 34–43.

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.

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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 4803–4810.

Leprieur, E.G., Fallet, V., Cadranet, J., and Wislez, M. (2016). *Spotlight on crizotinib in the first-line treatment of ALK-positive advanced non-small-cell lung cancer: patients selection and perspectives* (Dove Press).

Li, N., Lorinczi, M., Ireton, K., and Elferink, L.A. (2007). Specific Grb2-mediated Interactions Regulate Clathrin-dependent Endocytosis of the cMet-tyrosine Kinase. *J. Biol. Chem.* *282*, 16764–16775.

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.

Liang, T.J., Reid, A.E., Xavier, R., Cardiff, R.D., and Wang, T.C. (1996). Transgenic expression of tpr-met oncogene leads to development of mammary hyperplasia and tumors. *J. Clin. Invest.* *97*, 2872–2877.

Lietha, D., Chirgadze, D.Y., Mulloy, B., Blundell, T.L., and Gherardi, E. (2001). Crystal structures of NK1-heparin complexes reveal the basis for NK1 activity and enable engineering of potent agonists of the MET receptor. *EMBO J.* *20*, 5543–5555.

Lindroos, P.M., Zarnegar, R., and Michalopoulos, G.K. (1991). Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology* *13*, 743–750.

Liu, Y. (1999). Hepatocyte growth factor promotes renal epithelial cell survival by dual mechanisms. *Am. J. Physiol.* *277*, F624–633.

Liu, Q., Yu, S., Zhao, W., Qin, S., Chu, Q., and Wu, K. (2018). EGFR-TKIs resistance via EGFR-independent signaling pathways. *Mol. Cancer* *17*, 53.

Liu, X., Wang, Q., Yang, G., Marando, C., Koblisch, H.K., Hall, L.M., Fridman, J.S., Behshad, E., Wynn, R., Li, Y., et al. (2011). A novel kinase inhibitor, INCB28060, blocks c-MET-dependent signaling, neoplastic activities, and cross-talk with EGFR and HER-3. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *17*, 7127–7138.

Lokker, N.A., Presta, L.G., and Godowski, P.J. (1994). Mutational analysis and molecular modeling of the N-terminal kringle-containing domain of hepatocyte growth factor identifies amino acid side chains important for interaction with the c-Met receptor. *Protein Eng.* *7*, 895–903.

Loriaux, M.M., Levine, R.L., Tyner, J.W., Fröhling, S., Scholl, C., Stoffregen, E.P., Wernig, G., Erickson, H., Eide, C.A., Berger, R., et al. (2008). High-throughput sequence analysis of the tyrosine kinome in acute myeloid leukemia. *Blood* *111*, 4788–4796.

Lu, K.V., Chang, J.P., Parachoniak, C.A., Pandika, M.M., Aghi, M.K., Meyronet, D., Isachenko, N., Fouse, S.D., Phillips, J.J., Cheresch, D.A., et al. (2012). VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex. *Cancer Cell* 22, 21–35.

Lu, S., Fang, J., Li, X., Cao, L., Zhou, J., Guo, Q., Liang, Z., Cheng, Y., Jiang, L., Yang, N., et al. (2020). Phase II study of savolitinib in patients (pts) with pulmonary sarcomatoid carcinoma (PSC) and other types of non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring MET exon 14 skipping mutations (METex14+). *J. Clin. Oncol.* 38, 9519–9519.

Lu, X., Peled, N., Greer, J., Wu, W., Choi, P., Berger, A.H., Wong, S., Jen, K.-Y., Seo, Y., Hann, B., et al. (2017). *MET* Exon 14 Mutation Encodes an Actionable Therapeutic Target in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Res.* 77, 4498–4505.

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.

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.

Lyon, M., Deakin, J.A., Lietha, D., Gherardi, E., and Gallagher, J.T. (2004). The interactions of hepatocyte growth factor/scatter factor and its NK1 and NK2 variants with glycosaminoglycans using a modified gel mobility shift assay. Elucidation of the minimal size of binding and activatory oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 279, 43560–43567.

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). 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. (2003a). c-MET Mutational Analysis in Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* 63, 6272–6281.

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

Ma, P.C., Jagadeeswaran, R., Jagadeesh, S., Tretiakova, M.S., Nallasura, V., Fox, E.A., Hansen, M., Schaefer, E., Naoki, K., Lader, A., et al. (2005). Functional Expression and Mutations of c-Met and Its Therapeutic Inhibition with SU11274 and Small Interfering RNA in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* 65, 1479–1488.

Machide, M., Hashigasako, A., Matsumoto, K., and Nakamura, T. (2006). Contact Inhibition of Hepatocyte Growth Regulated by Functional Association of the c-Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor and LAR Protein-tyrosine Phosphatase. *J. Biol. Chem.* 281, 8765–8772.

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.

Malanga, D., Scrima, M., Marco, C.D., Fabiani, F., Rosa, N.D., Gisi, S. de, Malara, N., Savino, R., Rocco, G., Chiappetta, G., et al. (2008). Activating E17K mutation in the gene encoding the protein kinase AKT in a subset of squamous cell carcinoma of the lung. *Cell Cycle* 7, 665–669.

Marchand-Adam, S., Fabre, A., Mailleux, A.A., Marchal, J., Quesnel, C., Kataoka, H., Aubier, M., Dehoux, M., Soler, P., and Crestani, B. (2006). Defect of pro-hepatocyte growth factor activation by fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *174*, 58–66.

Martens, T., Schmidt, N.-O., Eckerich, C., Fillbrandt, R., Merchant, M., Schwall, R., Westphal, M., and Lamszus, K. (2006). A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 6144–6152.

Matteucci, E., Bendinelli, P., and Desiderio, M.A. (2009). Nuclear localization of active HGF receptor Met in aggressive MDA-MB231 breast carcinoma cells. *Carcinogenesis* *30*, 937–945.

Mazzotta, M., Filetti, M., Rossi, A., Roberto, M., Occhipinti, M., Pernazza, A., Di Napoli, A., Scarpino, S., Vecchione, A., Giusti, R., et al. (2020). Is there a place for crizotinib in c-MET alterations? A case of efficacy in ALK positive NSCLC patient with secondary c-MET amplification. *Ann. Oncol.* *31*, 440–441.

McNeil, B.K., Sorbellini, M., Grubb, R.L., Apolo, A., Cecchi, F., Athauda, G., Cohen, B., Giubellino, A., Simpson, H., Agarwal, P.K., et al. (2014). Preliminary evaluation of urinary soluble Met as a biomarker for urothelial carcinoma of the bladder. *J. Transl. Med.* *12*, 199.

Mebratu, Y.A., Leyva-Baca, I., Wathélet, M.G., Lacey, N., Chand, H.S., Choi, A.M.K., and Tesfaiji, Y. (2017). Bik reduces hyperplastic cells by increasing Bak and activating DAPK1 to juxtapose ER and mitochondria. *Nat. Commun.* *8*, 803.

Mendenhall, M.A., and Goldman, J.W. (2015). MET-Mutated NSCLC with Major Response to Crizotinib. *J. Thorac. Oncol.* *10*, e33–e34.

Merck Global (2019). Merck Global.

Miao, Y.L., and Xu, Q.Q. (2019). MET Y1003S point mutation shows sensitivity to crizotinib in a patient with lung adenocarcinoma. *Lung Cancer Amst. Neth.* *130*, 84–86.

Michieli, P., Basilico, C., Pennacchietti, S., Maffè, A., Tamagnone, L., Giordano, S., Bardelli, A., and Comoglio, P.M. (1999). Mutant Met-mediated transformation is ligand-dependent and can be inhibited by HGF antagonists. *Oncogene* *18*, 5221–5231.

Miller, M.A., Meyer, A.S., Beste, M.T., Lasisi, Z., Reddy, S., Jeng, K.W., Chen, C.-H., Han, J., Isaacson, K., Griffith, L.G., et al. (2013). ADAM-10 and -17 regulate endometriotic cell migration via concerted ligand and receptor shedding feedback on kinase signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E2074-2083.

Minuti, G., Cappuzzo, F., Duchnowska, R., Jassem, J., Fabi, A., O'Brien, T., Mendoza, A.D., Landi, L., Biernat, W., Czartoryska-Arlukowicz, B., et al. (2012). Increased MET and HGF gene copy numbers are associated with trastuzumab failure in HER2-positive metastatic breast cancer. *Br. J. Cancer* *107*, 793–799.

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., Vinchent, 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.

Moore, S.L., Chiu, M.L., Bushey, B.S., Chevalier, K., Luistro, L., Dorn, K., Brezski, R.J., Haytko, P., Kelly, T., Wu, S.-J., et al. (2016). A Novel Bispecific Antibody Targeting EGFR and cMet Is Effective against EGFR Inhibitor-Resistant Lung Tumors. *Cancer Res.* 76, 3942–3953.

Moumen, A., Patané, S., Porras, A., Dono, R., and Maina, F. (2007). Met acts on Mdm2 via mTOR to signal cell survival during development. *Dev. Camb. Engl.* 134, 1443–1451.

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, Y., Matsubara, D., Goto, A., Ota, S., Sachiko, O., Ishikawa, S., Aburatani, H., Miyazawa, K., Fukayama, M., and Niki, T. (2008). Constitutive activation of c-Met is correlated with c-Met overexpression and dependent on cell–matrix adhesion in lung adenocarcinoma cell lines. *Cancer Sci.* 99, 14–22.

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.

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.

Nelson, A.W., Schrock, A.B., Pavlick, D.C., Ali, S.M., Atkinson, E.C., and Chachoua, A. (2019). Novel SPECC1L-MET Fusion Detected in Circulating Tumor DNA in a Patient with Lung Adenocarcinoma following Treatment with Erlotinib and Osimertinib (*J Thorac Oncol*).

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. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 11, 1293–1304.

O'Brien, O., Wright, M.C., O'Brien, C., Geoghegan, O., Leonard, N., Nicholson, S., Cuffe, S., Fabre, A., Jochum, W., Joerger, M., et al. (2019). Cost-Efficient and Easy to Perform PCR-Based Assay to Identify Met Exon 14 Skipping in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Samples. *Diagnostics* 9, 13.

Olivero, M., Rizzo, M., Madeddu, R., Casadio, C., Pennacchietti, S., Nicotra, M.R., Prat, M., Maggi, G., Arena, N., Natali, P.G., et al. (1996). Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas. *Br. J. Cancer* 74, 1862–1868.

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.

Osaki, M., Miyata, H., Hayashi, A., Gomyo, Y., Tatebe, S., and Ito, H. (1996). Lack of rearranged Tpr-met mRNA expression in human gastric cancer cell lines and gastric mucosa and carcinoma. *Anticancer Res.* 16, 2881–2884.

Ozaki, I., Mizuta, T., Zhao, G., Yotsumoto, H., Hara, T., Kajihara, S., Hisatomi, A., Sakai, T., and Yamamoto, K. (2000). Involvement of the Ets-1 gene in overexpression of matrilysin in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* *60*, 6519–6525.

Paik, P.K., Felip, E., Veillon, R., Sakai, H., Cortot, A.B., Garassino, M.C., Mazieres, J., Viteri, S., Senellart, H., Van Meerbeeck, J., et al. (2020). Tepotinib in Non-Small-Cell Lung Cancer with MET Exon 14 Skipping Mutations. *N. Engl. J. Med.* *383*, 931–943.

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.

Pap, M., and Cooper, G.M. (1998). Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Cell Survival Pathway. *J. Biol. Chem.* *273*, 19929–19932.

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.

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.

Patanè, S., Avnet, S., Coltella, N., Costa, B., Sponza, S., Olivero, M., Vigna, E., Naldini, L., Baldini, N., Ferracini, R., et al. (2006). MET overexpression turns human primary osteoblasts into osteosarcomas. *Cancer Res.* *66*, 4750–4757.

Paumelle, R., Tulashe, D., Kherrouche, Z., Plaza, S., Leroy, C., Reveneau, S., Vandebunder, B., and Fafeur, V. (2002). Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Oncogene* *21*, 2309–2319.

Pelicci, G., Giordano, S., Zhen, Z., Salcini, A.E., Lanfrancone, L., Bardelli, A., Panayotou, G., Waterfield, M.D., Ponzetto, C., and Pelicci, 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., Fournier, T.M., Lamorte, L., Naujokas, M.A., Band, H., Langdon, W.Y., and Park, M. (2001). Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol. Cell* *8*, 995–1004.

Peschard, P., Ishiyama, N., Lin, T., Lipkowitz, S., and Park, M. (2004). A Conserved DpYR Motif in the Juxtamembrane Domain of the Met Receptor Family Forms an Atypical c-Cbl/Cbl-b Tyrosine Kinase Binding Domain Binding Site Required for Suppression of Oncogenic Activation. *J. Biol. Chem.* *279*, 29565–29571.

Petrelli, A., Gilestro, G.F., Lanzardo, S., Comoglio, P.M., Migone, N., and Giordano, S. (2002). The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* *416*, 187–190.

Pfizer (2018). Pfizer's XALKORI® (crizotinib).

Pilotto, S., Gkoutakos, A., Carbognin, L., Scarpa, A., Tortora, G., and Bria, E. (2017). MET exon 14 juxtamembrane splicing mutations: clinical and therapeutical perspectives for cancer therapy. *Ann. Transl. Med.* 5.

Platt, R.J., Chen, S., Zhou, Y., Yim, M.J., Swiech, L., Kempton, H.R., Dahlman, J.E., Parnas, O., Eisenhaure, T.M., Jovanovic, M., et al. (2014). CRISPR-Cas9 Knockin Mice for Genome Editing and Cancer Modeling. *Cell* 159, 440–455.

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.

Popsueva, A., Poteryaev, D., Arighi, E., Meng, X., Angers-Loustau, A., Kaplan, D., Saarma, M., and Sariola, H. (2003). GDNF promotes tubulogenesis of GFRalpha1-expressing MDCK cells by Src-mediated phosphorylation of Met receptor tyrosine kinase. *J. Cell Biol.* 161, 119–129.

Pozner-Moulis, S., Pappas, D.J., and Rimm, D.L. (2006). Met, the Hepatocyte Growth Factor Receptor, Localizes to the Nucleus in Cells at Low Density. *Cancer Res.* 66, 7976–7982.

Prat, M., Crepaldi, T., Gandino, L., Giordano, S., Longati, P., and Comoglio, P. (1991). C-terminal truncated forms of Met, the hepatocyte growth factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5954–5962.

Project ICGCPT (2016). Recurrent MET fusion genes represent a drug target in pediatric glioblastoma (Nat Med).

Pyo, J.-S., Kang, G., Cho, W.J., and Choi, S.B. (2016a). Clinicopathological significance and concordance analysis of c-MET immunohistochemistry in non-small cell lung cancers: A meta-analysis. *Pathol. Res. Pract.* 212, 710–716.

Pyo, J.-S., Kang, G., and Cho, H. (2016b). Clinicopathological Significance and Diagnostic Accuracy of c-MET Expression by Immunohistochemistry in Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *J. Gastric Cancer* 16, 141–151.

Raghav, K., Morris, V., Tang, C., Morelli, P., Amin, H.M., Chen, K., Manyam, G.C., Broom, B., Overman, M.J., Shaw, K., et al. (2016). MET amplification in metastatic colorectal cancer: an acquired response to EGFR inhibition, not a de novo phenomenon. *Oncotarget* 7, 54627–54631.

Recondo, G., Bahcall, M., Spurr, L.F., Che, J., Ricciuti, B., Leonardi, G.C., Lo, Y.-C., Li, Y.Y., Lamberti, G., Nguyen, T., et al. (2020). Molecular Mechanisms of Acquired Resistance to MET Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients with MET Exon 14-Mutant NSCLC. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 26, 2615–2625.

Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., and Buckingham, M. (2004). Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development. *Genes Dev.* 18, 1088–1105.

Rodrigues, G.A., and Park, M. (1993). Dimerization mediated through a leucine zipper activates the oncogenic potential of the met receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 13, 6711–6722.

Rong, S., Segal, S., Anver, M., Resau, J.H., and Vande Woude, G.F. (1994). Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 4731–4735.

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.

Rosen, E.M., Lattera, 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.

Rossi, G., Cavazza, A., Marchioni, A., Longo, L., Migaldi, M., Sartori, G., Bigiani, N., Schirosi, L., Casali, C., Morandi, U., et al. (2005). Role of chemotherapy and the receptor tyrosine kinases KIT, PDGFRalpha, PDGFRbeta, and Met in large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 8774–8785.

Rotow, J.K., Gui, P., Wu, W., Raymond, V.M., Lanman, R.B., Kaye, F.J., Peled, N., Fece de la Cruz, F., Nades, B., Corcoran, R.B., et al. (2020). Co-occurring Alterations in the RAS-MAPK Pathway Limit Response to MET Inhibitor Treatment in MET Exon 14 Skipping Mutation-Positive Lung Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 26, 439–449.

Rubin, J.S., Day, R.M., Breckenridge, D., Atabey, N., Taylor, W.G., Stahl, S.J., Wingfield, P.T., Kaufman, J.D., Schwall, R., and Bottaro, D.P. (2001). Dissociation of heparan sulfate and receptor binding domains of hepatocyte growth factor reveals that heparan sulfate-c-met interaction facilitates signaling. *J. Biol. Chem.* 276, 32977–32983.

Saitoh, K., Takahashi, H., Sawada, N., and Parsons, P.G. (1994). Detection of the c-met proto-oncogene product in normal skin and tumours of melanocytic origin. *J. Pathol.* 174, 191–199.

Sangwan, V., Paliouras, G.N., Abella, J.V., Dubé, N., Monast, A., Tremblay, M.L., and Park, M. (2008a). 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., Paliouras, G.N., Abella, J.V., Dubé, N., Monast, A., Tremblay, M.L., and Park, M. (2008b). 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.

Schiering, N., Knapp, S., Marconi, M., Flocco, M.M., Cui, J., Perego, R., Rusconi, L., and Cristiani, C. (2003). Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the hepatocyte growth factor receptor c-Met and its complex with the microbial alkaloid K-252a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12654–12659.

Schlessinger, J., and Lemmon, M.A. (2003). SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2003, RE12.

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.

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

Schöffski, P., Gordon, M., Smith, D.C., Kurzrock, R., Daud, A., Vogelzang, N.J., Lee, Y., Scheffold, C., and Shapiro, G.I. (2017). Phase II randomised discontinuation trial of cabozantinib in patients with advanced solid tumours. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *86*, 296–304.

Schrock, A.B., Frampton, G.M., Suh, J., Chalmers, Z.R., Rosenzweig, M., Erlich, R.L., Halmos, B., Goldman, J., Forde, P., Leuenerger, K., et al. (2016). Characterization of 298 Patients with Lung Cancer Harboring MET Exon 14 Skipping Alterations. *J. Thorac. Oncol.* *11*, 1493–1502.

Schuller, A.G., Barry, E.R., Jones, R.D.O., Henry, R.E., Frigault, M.M., Beran, G., Linsenmayer, D., Hattersley, M., Smith, A., Wilson, J., et al. (2015). The MET Inhibitor AZD6094 (Savolitinib, HMPL-504) Induces Regression in Papillary Renal Cell Carcinoma Patient-Derived Xenograft Models. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *21*, 2811–2819.

Shah, M.A., Cho, J.-Y., Tan, I.B., Tebbutt, N.C., Yen, C.-J., Kang, A., Shames, D.S., Bu, L., and Kang, Y.-K. (2016). A Randomized Phase II Study of FOLFOX With or Without the MET Inhibitor Onartuzumab in Advanced Adenocarcinoma of the Stomach and Gastroesophageal Junction. *The Oncologist* *21*, 1085–1090.

Shattuck, D.L., Miller, J.K., Laederich, M., Funes, M., Petersen, H., Carraway, K.L., and Sweeney, C. (2007). LRIG1 is a novel negative regulator of the Met receptor and opposes Met and Her2 synergy. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 1934–1946.

Shattuck, D.L., Miller, J.K., Carraway, K.L., and Sweeney, C. (2008). Met Receptor Contributes to Trastuzumab Resistance of Her2-Overexpressing Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* *68*, 1471–1477.

Siegfried, J.M., Weissfeld, L.A., Luketich, J.D., Weyant, R.J., Gubish, C.T., and Landreneau, R.J. (1998). The clinical significance of hepatocyte growth factor for non-small cell lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.* *66*, 1915–1918.

Simonneau, C., Bérénice Leclercq, Mougel, A., Adriaenssens, E., Paquet, C., Raibaut, L., Ollivier, N., Drobecq, H., Marcoux, J., Cianféroni, S., et al. (2015). Semi-synthesis of a HGF/SF kringle one (K1) domain scaffold generates a potent in vivo MET receptor agonist †Electronic supplementary information (ESI) available: Descriptions of reagents, antibodies, immunoblotting, MTT assay, scattering assay, morphogenesis assay and statistical analysis. See DOI: 10.1039/c4sc03856h Click here for additional data file. *Chem. Sci.* *6*, 2110–2121.

Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (1997). F-Box Proteins Are Receptors that Recruit Phosphorylated Substrates to the SCF Ubiquitin-Ligase Complex. *Cell* *91*, 209–219.

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. (2006a). 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.

Smolen, G.A., Muir, B., Mohapatra, G., Barmettler, A., Kim, W.J., Rivera, M.N., Haserlat, S.M., Okimoto, R.A., Kwak, E., Dahiya, S., et al. (2006b). Frequent met oncogene amplification in a Brca1/Trp53 mouse model of mammary tumorigenesis. *Cancer Res.* *66*, 3452–3455.

Soman, N.R., Correa, P., Ruiz, B.A., and Wogan, G.N. (1991). The TPR-MET oncogenic rearrangement is present and expressed in human gastric carcinoma and precursor lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 4892–4896.

Spigel, D.R., Ervin, T.J., Ramlau, R.A., Daniel, D.B., Goldschmidt, J.H., Blumenschein, G.R., Krzakowski, M.J., Robinet, G., Godbert, B., Barlesi, F., et al. (2013). Randomized phase II trial of Onartuzumab in combination with erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *31*, 4105–4114.

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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *35*, 412–420.

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.

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.

Suzawa, K., Offin, M., Lu, D., Kurzatkowski, C., Vojnic, M., Smith, R.S., Sabari, J.K., Tai, H., Mattar, M., Khodos, I., et al. (2019). Activation of KRAS Mediates Resistance to Targeted Therapy in MET Exon 14–mutant Non–small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* *25*, 1248–1260.

Swiercz, J.M., Worzfeld, T., and Offermanns, S. (2008). ErbB-2 and Met Reciprocally Regulate Cellular Signaling via Plexin-B1. *J. Biol. Chem.* *283*, 1893–1901.

Takayama, H., LaRochelle, W.J., Sharp, R., Otsuka, T., Kriebel, P., Anver, M., Aaronson, S.A., and Merlino, G. (1997). Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 701–706.

Tey, S.K., Tse, E.Y.T., Mao, X., Ko, F.C.F., Wong, A.S.T., Lo, R.C.-L., Ng, I.O.-L., and Yam, J.W.P. (2017). Nuclear Met promotes hepatocellular carcinoma tumorigenesis and metastasis by upregulation of TAK1 and activation of NF- κ B pathway. *Cancer Lett.* *411*, 150–161.

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.

Tong, J.H., Yeung, S.F., Chan, A.W.H., Chung, L.Y., Chau, S.L., Lung, R.W.M., Tong, C.Y., Chow, C., Tin, E.K.Y., Yu, Y.H., et al. (2016). MET Amplification and Exon 14 Splice Site Mutation Define Unique Molecular Subgroups of Non-Small Cell Lung Carcinoma with Poor Prognosis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *22*, 3048–3056.

Tovar, E.A., and Graveel, C.R. (2017). MET in human cancer: germline and somatic mutations. *Ann. Transl. Med.* *5*, 205–205.

Tulasne, D., Deheuninck, J., Lourenço, 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.

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.

Varkaris, A., Gaur, S., Parikh, N.U., Song, J.H., Dayyani, F., Jin, J.-K., Logothetis, C.J., and Gallick, G.E. (2013). Ligand-independent Activation of MET Through IGF-1/IGF-1R Signaling. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *133*, 1536–1546.

Veenstra, C., Pérez-Tenorio, G., Stelling, A., Karlsson, E., Mirwani, S.M., Nordensköljd, B., Fornander, T., and Stål, O. (2016). Met and its ligand HGF are associated with clinical outcome in breast cancer. *Oncotarget* *7*, 37145–37159.

Vejchapipat, P., Tangkijvanich, P., Theamboonlers, A., Chongsrisawat, V., Chittmittrapap, S., and Poovorawan, Y. (2004). Association between serum hepatocyte growth factor and survival in untreated hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol.* *39*, 1182–1188.

Vigna, E., Gramaglia, D., Longati, P., Bardelli, A., and Comoglio, P.M. (1999). Loss of the exon encoding the juxtamembrane domain is essential for the oncogenic activation of TPR-MET. *Oncogene* *18*.

Villa-Moruzzi, E., Puntoni, F., Bardelli, A., Vigna, E., Rosa, S.D., and Comoglio, P.M. (1998). Protein tyrosine phosphatase PTP-S binds to the juxtamembrane region of the hepatocyte growth factor receptor Met. *Biochem. J.* *336*, 235–239.

Wagner, J.P., Wolf-Yadlin, A., Sevecka, M., Grenier, J.K., Root, D.E., Lauffenburger, D.A., and MacBeath, G. (2013). Receptor tyrosine kinases fall into distinct classes based on their inferred signaling networks. *Sci. Signal.* *6*, ra58.

Wajih, N., Walter, J., and Sane, D.C. (2002). Vascular Origin of a Soluble Truncated Form of the Hepatocyte Growth Factor Receptor (c-met). *Circ. Res.* *90*, 46–52.

Wang, J., Goetsch, L., Tucker, L., Zhang, Q., Gonzalez, A., Vaidya, K.S., Oleksijew, A., Boghaert, E., Song, M., Sokolova, I., et al. (2016). Anti-c-Met monoclonal antibody ABT-700 breaks oncogene addiction in tumors with MET amplification. *BMC Cancer* *16*, 105.

Wang, J., Anderson, M.G., Oleksijew, A., Vaidya, K.S., Boghaert, E.R., Tucker, L., Zhang, Q., Han, E.K., Palma, J.P., Naumovski, L., et al. (2017). ABBV-399, a c-Met Antibody-Drug Conjugate that Targets Both MET-Amplified and c-Met-Overexpressing Tumors, Irrespective of MET Pathway Dependence. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *23*, 992–1000.

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., Kobayashi, R., and Bishop, J.M. (1996). Cellular adherence elicits ligand-independent activation of the Met cell-surface receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 8425–8430.

Wang, R., Ferrell, L.D., Faouzi, S., Maher, J.J., and Bishop, J.M. (2001). Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice. *J. Cell Biol.* *153*, 1023–1034.

Wang, S.X.Y., Zhang, B.M., Wakelee, H.A., Koontz, M.Z., Pan, M., Diehn, M., Kunder, C.A., and Neal, J.W. (2019). Case series of MET exon 14 skipping mutation-positive non-small-cell lung cancers with response to crizotinib and cabozantinib. *Anticancer. Drugs* *30*, 537–541.

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–e31.

Waqar, S.N., Redman, M.W., Arnold, S.M., Hirsch, F.R., Mack, P.C., Schwartz, L.H., Gandara, D.R., Stinchcombe, T.E., Leighl, N.B., Ramalingam, S.S., et al. (2020). A Phase II Study of Telisotuzumab Vedotin in Patients With c-MET-positive Stage IV or Recurrent Squamous Cell Lung Cancer (LUNG-MAP Sub-study S1400K, NCT03574753). *Clin. Lung Cancer*.

Watabe, T., Yoshida, K., Shindoh, M., Kaya, M., Fujikawa, K., Sato, H., Seiki, M., Ishii, S., and Fujinaga, K. (1998). The Ets-1 and Ets-2 transcription factors activate the promoters for invasion-associated urokinase and collagenase genes in response to epidermal growth factor. *Int. J. Cancer* *77*, 128–137.

Weidner, K.M., Arakaki, N., Hartmann, G., Vandekerckhove, J., Weingart, S., Rieder, H., Fonatsch, C., Tsubouchi, H., Hishida, T., Daikuhara, Y., et al. (1991). Evidence for the Identity of Human Scatter Factor and Human Hepatocyte Growth Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 7001–7005.

Weidner, K.M., Sachs, M., Riethmacher, D., and Birchmeier, W. (1995). Mutation of juxtamembrane tyrosine residue 1001 suppresses loss-of-function mutations of the met receptor in epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 2597–2601.

Weidner, K.M., Di Cesare, S., Sachs, M., Brinkmann, V., Behrens, J., and Birchmeier, W. (1996). Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature* *384*, 173–176.

Werbin, J.L., Avendaño, M.S., Becker, V., Jungmann, R., Yin, P., Danuser, G., and Sorger, P.K. (2017). Multiplexed Exchange-PAINT imaging reveals ligand-dependent EGFR and Met interactions in the plasma membrane. *Sci. Rep.* *7*, 12150.

Westermarck, J., Seth, A., and Kähäri, V.M. (1997). Differential regulation of interstitial collagenase (MMP-1) gene expression by ETS transcription factors. *Oncogene* *14*, 2651–2660.

Wolf, J., Seto, T., Han, J.-Y., Reguart, N., Garon, E.B., Groen, H.J.M., Tan, D.S.W., Hida, T., de Jonge, M., Orlov, S.V., et al. (2020). Capmatinib in MET Exon 14-Mutated or MET-Amplified Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* *383*, 944–957.

Wolf, W., Baik, C., Heist, R., Neal, J., Mansfield, A., and Buettner, R. (2018). Natural history, treatment (Tx) patterns, and outcomes in MET dysregulated non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (Pts). Present. EORTCAACRNCI Symp. ENA *Dublin, Ireland*.

Wu, Y., Cheng, Y., Zhou, J., Lu, S., Zhang, Y., Zhao, J., Kim, D., Soo, R., Kim, S., Pan, H., et al. (2019). MA09.09 Long-Term Outcomes to Tepotinib Plus Gefitinib in Patients with EGFR-Mutant NSCLC and MET Dysregulation: 18-Month Follow-Up. *J. Thorac. Oncol.* *14*, S284.

Wu, Y.-L., Zhang, L., Kim, D.-W., Liu, X., Lee, D.H., Yang, J.C.-H., Ahn, M.-J., Vansteenkiste, J.F., Su, W.-C., Felip, E., et al. (2018). Phase Ib/II Study of Capmatinib (INC280) Plus Gefitinib After Failure of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Inhibitor Therapy in Patients With EGFR-Mutated, MET Factor-Dysregulated Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *36*, 3101–3109.

Xie, Q., Bradley, R., Kang, L., Koeman, J., Ascierto, M.L., Worschech, A., De Giorgi, V., Wang, E., Kefene, L., Su, Y., et al. (2012). Hepatocyte growth factor (HGF) autocrine activation predicts sensitivity to MET inhibition in glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 570–575.

Xie, Y., Lu, W., Liu, S., Yang, Q., Carver, B.S., Li, E., Wang, Y., Fazli, L., Gleave, M., and Chen, Z. (2014). Crosstalk between nuclear MET and SOX9/ β -catenin correlates with castration-resistant prostate cancer. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *28*, 1629–1639.

Xie, Y., Fan, H., Lu, W., Yang, Q., Nurkesh, A., Yeleussizov, T., Maipas, A., Lu, J., Manarbek, L., Chen, Z., et al. (2019). Nuclear MET requires ARF and is inhibited by carbon nanodots through binding to phospho-tyrosine in prostate cancer. *Oncogene* *38*, 2967–2983.

Xu, Y., Xia, W., Baker, D., Zhou, J., Cha, H.C., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2011). Receptor-type protein tyrosine phosphatase beta (RPTP-beta) directly dephosphorylates and regulates hepatocyte growth factor receptor (HGFR/Met) function. *J. Biol. Chem.* *286*, 15980–15988.

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 N. Y. N* *14*, 1015–1022.

Yakes, F.M., Chen, J., Tan, J., Yamaguchi, K., Shi, Y., Yu, P., Qian, F., Chu, F., Bentzien, F., Cancilla, B., et al. (2011). Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. *Mol. Cancer Ther.* *10*, 2298–2308.

Yamamoto, H., Shigematsu, H., Nomura, M., Lockwood, W.W., Sato, M., Okumura, N., Soh, J., Suzuki, M., Wistuba, I.I., Fong, K.M., et al. (2008). PIK3CA Mutations and Copy Number Gains in Human Lung Cancers. *Cancer Res.* *68*, 6913–6921.

Yamashita, J., Ogawa, M., Yamashita, S., Nomura, K., Kuramoto, M., Saishoji, T., and Shin, S. (1994). Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer. *Cancer Res.* *54*, 1630–1633.

Yanagita, K., Nagaike, M., Ishibashi, H., Niho, Y., Matsumoto, K., and Nakamura, T. (1992). Lung may have an endocrine function producing hepatocyte growth factor in response to injury of distal organs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *182*, 802–809.

Yang, C.-Y., Wang, L., Sun, X., Tang, M., Quan, H.-T., Zhang, L.-S., Lou, L.-G., and Gou, S.-H. (2019). SHR-A1403, a novel c-Met antibody-drug conjugate, exerts encouraging anti-tumor activity in c-Met-overexpressing models. *Acta Pharmacol. Sin.* *40*, 971–979.

Yang, Y., Wang, Y., Zeng, X., Ma, X., Zhao, Y., Qiao, J., Cao, B., Li, Y., Ji, L., and Wang, Y. (2012). Self-control of HGF regulation on human trophoblast cell invasion via enhancing c-Met receptor shedding by ADAM10 and ADAM17. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *97*, E1390-1401.

Ye, M., Hu, D., Tu, L., Zhou, X., Lu, F., Wen, B., Wu, W., Lin, Y., Zhou, Z., and Qu, J. (2008). Involvement of PI3K/Akt Signaling Pathway in Hepatocyte Growth Factor–Induced Migration of Uveal Melanoma Cells. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* *49*, 497.

Yeh, I., Botton, T., Talevich, E., Shain, A.H., Sparatta, A.J., de la Fourchardiere, 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).

Yin, X., Zhang, T., Su, X., Ji, Y., Ye, P., Fu, H., Fan, S., Shen, Y., Gavine, P.R., and Gu, Y. (2015). Relationships between Chromosome 7 Gain, MET Gene Copy Number Increase and MET Protein Overexpression in Chinese Papillary Renal Cell Carcinoma Patients. *PLoS One* *10*, e0143468.

Yu, J., Miehke, S., Ebert, M.P., Hoffmann, J., Breidert, M., Alpen, B., Starzynska, T., Stolte Prof, M., Malfertheiner, P., and Bayerdörffer, E. (2000). Frequency of TPR-MET rearrangement in patients with gastric carcinoma and in first-degree relatives. *Cancer* *88*, 1801–1806.

Zaffaroni, D., Spinola, M., Galvan, A., Falvella, F.S., Pazzaglia, S., Saran, A., Mancuso, M.T., Galbiati, F., Pignatiello, C., Cabrera, W., et al. (2005). Met proto-oncogene juxtamembrane rare variations in mouse and humans: differential effects of Arg and Cys alleles on mouse lung tumorigenesis. *Oncogene* *24*, 1084–1090.

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. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 1433–1444.

Zhang, Y.-W., Wang, L.-M., Jove, R., and Vande Woude, G.F. (2002). Requirement of Stat3 signaling for HGF/SF-Met mediated tumorigenesis. *Oncogene* *21*, 217–226.

Zhao, X., Weir, B.A., LaFramboise, T., Lin, M., Beroukhi, R., Garraway, L., Beheshti, J., Lee, J.C., Naoki, K., Richards, W.G., et al. (2005). Homozygous deletions and chromosome amplifications in human lung carcinomas revealed by single nucleotide polymorphism array analysis. *Cancer Res.* *65*, 5561–5570.

Zhu, Y., Wang, W., Song, Z., Zhang, Q., Xu, C., Chen, G., Zhuang, W., Lv, T., and Song, Y. (2018). MET-UBE2H Fusion as a Novel Mechanism of Acquired EGFR Resistance in Lung Adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol.* *13*, e202–e204.

Zhuang, Z., Park, W.-S., Pack, S., Schmidt, L., Vortmeyer, A.O., Pak, E., Pham, T., Weil, R.J., Candidus, S., Lubensky, I.A., et al. (1999). Trisomy 7-Harboring Non-Random Duplication of the Mutant MET Allele in Hereditary Papillary Renal Carcinomas. *J. Urol.* *162*, 638–638.