

Université de Montréal

**Rôle de HCaRG/COMMD5 dans le carcinome à cellules rénales :  
une histoire de transition.**

**par Thomas Verissimo**

Programme de sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Doctorat en sciences biomédicales  
option médecine expérimentale

Mars 2019

©, Thomas Verissimo, 2019

## Résumé

Dans les années 2000, la Dre Johanne Tremblay et son équipe identifient un gène régulé négativement par le calcium extracellulaire dans les glandes parathyroïdiennes de rat hypertendu (SHR). Initialement nommé *Hypertension-related calcium regulated gene* (HCaRG), puis *COMM domain-containing 5* (COMMD5), ce gène codant pour une petite protéine de 24,67 kDa fait partie d'une famille de 10 protéines ayant une structure carboxy-terminale homologue nommée domaine COMM. De nombreux rôles ont été associés à cette famille de protéines et l'analyse expressionnelle dans différents types de cancers montre une modulation, laissant penser qu'elles auraient un rôle oncogénique ou suppresseur de tumeurs. Les études ont démontré que COMMD5 entraîne une maturation des jonctions cellulaires, une diminution de la prolifération et favorise la migration cellulaire. La surexpression de COMMD5 dans les tubules proximaux de rein accélère la réparation suite à un dommage aigu en limitant d'une part la prolifération tout en favorisant la migration et la re-différenciation cellulaire. Partant de ces observations, nous avons focalisé nos études sur le développement du carcinome à cellules rénales, une pathologie affectant 300 000 personnes chaque année dans le monde.

L'hypothèse que nous avons émise était que COMMD5 puisse potentiellement jouer un rôle anti-oncogénique dans le cancer du rein en contrôlant la prolifération et la différenciation cellulaires. Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons étudié le rôle de COMMD5 dans le maintien de l'intégrité épithéliale des cellules *via la* régulation de la

transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et le contrôle du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR).

Nos résultats ont démontré que COMMD5 est diminuée dans les carcinomes rénaux et est corrélée avec la survie des patients. La présence du facteur de transcription induit par l'hypoxie  $1\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ), exprimé dans la majorité des tumeurs solides rénales a induit une diminution de COMMD5. La perte de COMMD5 dans les cellules de tubules proximaux de reins humains (HK-2) a favorisé la dé-différenciation et la tumorigénicité des cellules, médiées par l'activation de la transition épithélio-mésenchymateuse. De plus, cette perte de COMMD5 a entraîné également une réorganisation du cytosquelette d'actine ayant pour conséquence la dérégulation endosomale du récepteur de l'EGF et favorisant une activation prolongée. Dans les carcinomes rénaux, la surexpression de COMMD5 a diminué la prolifération cellulaire suivie d'une re-différenciation grâce à deux mécanismes. D'une part, COMMD5 a régulé négativement la protéine HIF1 $\alpha$ , induisant ainsi une transition mésenchymo-épithéliale (MET), tout en séquestrant le facteur de transcription SNAIL dans le cytoplasme. D'autre part, COMMD5 contrôle négativement l'expression transcriptionnelle des récepteurs ErbB par une hyperméthylation de leurs promoteurs.

Dans son ensemble, les résultats innovant de cette thèse démontrent que COMMD5 est un gène ayant des caractéristiques anti-oncogéniques en contrôlant la différenciation cellulaire *via* le mécanisme de transition épithélio-mésenchymateux et la régulation de l'expression des récepteurs ErbB.

**Mots-clés : Carcinome rénal, COMMD5, transition épithélio-mésenchymateuse, ErbB, trafic endosomal**

## Summary

In the 2000s, Dr. Johanne Tremblay and her team identified a gene that was negatively regulated by extracellular calcium in hypertensive rat parathyroid glands. Originally named *Hypertension-related calcium regulated gene* (HCaRG) and renamed *COMM Domain-containing 5* (COMMD5), this gene encoding a small protein of 24.67 kDa is part of a family of 10 proteins sharing a homologous structure in the carboxy-terminal position named COMM domain. Many roles have been associated and expressional analysis of different types of cancer shows a modulation suggesting that they have an oncogenic or tumor suppressor roles. Studies have shown that COMMD5 induces maturation of the cell junctions, decreased cell proliferation and promotes migration. The overexpression of COMMD5 in the renal proximal tubules accelerates repair by promoting cell proliferation and ultimately induces cell migration and redifferentiation after acute injury. Based on these observations, we focused on the development of renal cell carcinoma, a disease affecting 300,000 people each year worldwide.

Our hypothesis is that COMMD5 plays a tumor suppressor role in kidney cancer by controlling cell proliferation and differentiation. To test our hypothesis, we investigated the role of COMMD5 in maintaining the epithelial integrity of cells through the regulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT) and the control of epidermal growth factor receptors (EGFR).

The results showed that COMMD5 is decreased in kidney carcinomas resulting of a great negative indicator of the survival prognostic. The presence of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ), expressed in the majority of solid tumors, leads to a decrease of COMMD5 in the

proximal tubule cells (HK-2). Inhibition of COMMD5 promotes dedifferentiation and tumorigenicity of cells mediated by epithelial to mesenchymal transition. The loss of COMMD5 induces a reorganization of the actin cytoskeleton resulting in endosomal dysregulation of the EGFR receptor and promoting its activation.

In renal cell carcinoma, COMMD5 overexpression decreases cell proliferation and induces their redifferentiation by two mechanisms: firstly, COMMD5 induces an inhibition of the HIF1 $\alpha$  protein expression resulting in a mesenchymal to epithelial transition and sequesters the SNAIL transcription factor in the cytoplasm; secondly, COMMD5 negatively regulates the transcriptional expression of the ErbB receptors.

Taken together, these results of this thesis show that COMMD5 is a gene showing tumor suppressor characteristics by controlling cellular differentiation and by regulating the expression of ErbB receptors.

**Keywords: Renal cell carcinoma, COMMD5, epithelial to mesenchymal transition, EGFR, endosomal trafficking**

## Table des matières

Résumé .....	i
Summary .....	iv
Liste des tableaux .....	xviii
Liste des abréviations.....	xx
Remerciements.....	xxv
Chapitre 1 : Introduction .....	1
A - Genèse de COMMD5, la découverte de HCaRG.....	2
B - Découverte des autres protéines composant la famille des COMMD.....	4
1 - <i>Identification des protéines de la famille</i> .....	4
2 - <i>Nomenclature et composition de cette nouvelle famille</i> .....	4
C - Les protéines de la famille des COMMD .....	6
1 - <i>Expression</i> .....	6
2 - <i>Interactions</i> .....	8
D - Les différents rôles biologiques des protéines COMMD .....	10
1 - <i>Contrôle de l'homéostasie</i> .....	10
a - Régulation de l'excrétion du cuivre.....	10
b - Régulation du sodium .....	12
2 - <i>Régulation de la voie de signalisation NF-κB</i> .....	15
a - Rôle inhibiteur de la voie de signalisation NF-κB.....	15

b - Rôle activateur de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B.....	17
<b>3 - Implication dans le trafic vésiculaire.....</b>	<b>19</b>
<b>4 - Rôle dans le cancer .....</b>	<b>23</b>
a - Expression des membres de la famille des COMMD dans le cancer .....	23
b - Effet suppresseur de tumeurs .....	23
c - Effet oncogénique .....	25
<b>E - Fonctions de COMMD5 .....</b>	<b>25</b>
<b>1 - Régulation de la prolifération cellulaire.....</b>	<b>26</b>
<b>2 - Migration cellulaire.....</b>	<b>27</b>
<b>3 - Différenciation cellulaire .....</b>	<b>28</b>
<b>4 - Accélération de la réparation rénale.....</b>	<b>29</b>
<b>F - Le rein .....</b>	<b>32</b>
<b>1 - Anatomie du rein .....</b>	<b>32</b>
<b>2 - Les diverses fonctions rénales.....</b>	<b>35</b>
<b>3 - Le cancer du rein .....</b>	<b>36</b>
a - Incidence et facteurs de risque.....	36
b - Caractéristiques .....	37
c - Stades et traitements .....	40
<b>G - La transition épithélio-mésenchymateuse et la progression tumorale.....</b>	<b>42</b>
<b>1 - Définition.....</b>	<b>42</b>



2 - Mécanisme de transition épithélio-mésenchymateuse .....	43
3 - Rôle de l'EMT dans la progression tumorale.....	48
H - Le récepteur EGFR et le carcinome à cellules rénales .....	49
1 - Caractéristiques .....	49
2 - Ligands, activation et signalisation.....	49
3 - EGFR et le cancer .....	50
I - Mise en contexte du projet de recherche .....	52
Chapitre II : L'inhibition de HCaRG/COMMD5 induite par l'hypoxie favorise la dé-différenciation cellulaire par l'intermédiaire du processus d'EMT .....	55
A - Introduction.....	57
B - Matériels et Méthodes .....	60
1 - Réactifs, cellules et tumeurs .....	60
2 - Chambre hypoxique .....	60
3 - Immuno-buvardage de type Western blots .....	61
4 - RT-qPCR.....	61
5 - Transfection des Si ARN.....	62
6 - Microscopie confocale.....	62
7 - Analyses statistiques.....	63
C - Résultats .....	64
1 - L'expression de COMMD5 est diminuée dans les carcinomes de reins humains.....	64

<b>2 - L'hypoxie entraine une diminution de l'expression de COMMD5.....</b>	<b>66</b>
<b>3 - La perte de COMMD5 entraîne une dé-différenciation des cellules épithéliales HK-2 ainsi qu'une augmentation des marqueurs de l'EMT.....</b>	<b>70</b>
<b>D - Conclusions.....</b>	<b>75</b>
<b>E - Conclusions schématisées.....</b>	<b>76</b>
<b>F - Annexes.....</b>	<b>76</b>
<b>Chapitre III : La surexpression de COMMD5 induit une re-différenciation des cellules cancéreuses rénales et inhibe l'invasion cellulaire via le processus de la MET.....</b>	<b>78</b>
<b>A - Introduction.....</b>	<b>80</b>
<b>B - Matériels et Méthodes.....</b>	<b>82</b>
<b>1 - Réactifs, cellules.....</b>	<b>82</b>
<b>2 - Tumeurs In vivo.....</b>	<b>82</b>
<b>3 - Test d'invasion.....</b>	<b>83</b>
<b>4 - Compartimentalisation cellulaire.....</b>	<b>83</b>
<b>5 - Immuno-buvarpage de type Western blots.....</b>	<b>83</b>
<b>6 - RT-qPCR.....</b>	<b>84</b>
<b>7 - Microscopie confocale.....</b>	<b>85</b>
<b>8 - Pull down assay.....</b>	<b>85</b>
<b>9 - Test de dégradation de la gélatinase.....</b>	<b>86</b>
<b>10 - Analyses statistiques.....</b>	<b>86</b>
<b>C - Résultats.....</b>	<b>88</b>

<i>1 - La surexpression de COMMD5 dans les carcinomes de reins permet une re-différenciation cellulaire .....</i>	<i>88</i>
<i>2 - COMMD5 entraine une diminution de l'expression de SNAIL via l'inhibition de HIF1<math>\alpha</math> .....</i>	<i>90</i>
<i>3 - COMMD5 inhibe l'expression de SNAIL par la régulation négative de HIF1<math>\alpha</math> .....</i>	<i>93</i>
<i>4 - COMMD5 inhibe la translocation nucléaire de SNAIL.....</i>	<i>97</i>
<i>5 - COMMD5 inhibe l'invasion des cellules de carcinomes rénaux.....</i>	<i>100</i>
<b>D - Conclusions.....</b>	<b>103</b>
<b>E - Conclusions schématisées .....</b>	<b>104</b>
<b>F - Annexes .....</b>	<b>105</b>
<b>Chapitre IV : HCaRG/COMMD5 inhibits ErbB receptor-driven renal cell carcinoma.....</b>	<b>106</b>
<b>A - Résumé de l'article.....</b>	<b>107</b>
<b>B - Article .....</b>	<b>110</b>
<i>1 - Abstract.....</i>	<i>111</i>
<i>2 - Introduction.....</i>	<i>112</i>
<i>3 - Results.....</i>	<i>114</i>
<i>4 - Discussion.....</i>	<i>122</i>
<i>5 - Materials and methods .....</i>	<i>127</i>
<i>6 - Acknowledgments and funding .....</i>	<i>135</i>
<i>7 - Conflicts of interest .....</i>	<i>135</i>
<i>8 - References.....</i>	<i>136</i>

<b>9 - Figure legends .....</b>	<b>141</b>
<b>10 - Supplementary figure legends .....</b>	<b>156</b>
<b>C - Conclusion de l'article.....</b>	<b>164</b>
<b>Chapitre V : COMMD5/HCaRG hooks endosomes on cytoskeleton and coordinates EGFR trafficking .....</b>	<b>165</b>
<b>A - Résumé de l'article.....</b>	<b>166</b>
<b>B - Article .....</b>	<b>168</b>
<b>1 - Abstract.....</b>	<b>169</b>
<b>2 - Introduction.....</b>	<b>170</b>
<b>3 - Results.....</b>	<b>172</b>
<b>4 - Discussion.....</b>	<b>182</b>
<b>5 - Acknowledgements.....</b>	<b>188</b>
<b>6 - Author contributions.....</b>	<b>189</b>
<b>7 - Declaration of interest .....</b>	<b>189</b>
<b>8 - References.....</b>	<b>190</b>
<b>9 - Method details .....</b>	<b>194</b>
<b>10 - Supplemental experimental procedures.....</b>	<b>213</b>
<b>11 - Supplemental movie titles and legends.....</b>	<b>231</b>
<b>C - Conclusion de l'article.....</b>	<b>241</b>
<b>Chapitre VI : Discussion .....</b>	<b>242</b>

A - COMMD5 est sous-exprimée dans les carcinomes de rein.....	243
B - La rétrorégulation de COMMD5 et du facteur de transcription HIF1 $\alpha$ .....	244
C - COMMD5 contrôle le récepteur EGFR selon deux mécanismes différents.....	246
D - COMMD5 est un élément crucial dans le maintien de la différenciation cellulaire et dans l'inhibition de la progression tumorale .....	249
E - Impact clinique de COMMD5 dans le traitement du carcinome à cellules rénales .....	250
Chapitre VII : Conclusions et perspectives .....	252
Bibliographie .....	257
Chapitre VIII : Annexe - Role of HCaRG/COMMD5 in tumor suppression and cell differentiation and its subtelomeric position to chromosome 8: Coincidence or consequence?.....	276
A - Résumé de la revue .....	277
B - Revue.....	279
1 - <i>Abstract</i> .....	280
2 - <i>COMMDs proteins and cancer</i> .....	281
3 - <i>The unique COMMD5 subtelomeric position</i> .....	283
4 - <i>Chromosome 8q24.3 alterations and cancer susceptibility</i> .....	284
5 - <i>Is COMMD5 role in cell differentiation and cancer associated to telomeric length?</i> .....	287
6 - <i>COMMD5 loss and cellular senescence</i> .....	288
7 - <i>Conclusion</i> .....	291
C - Conclusion de la revue.....	309

## Liste des figures

### Chapitre I :

Figure 1 : Identification de la séquence d'ADN complémentaire de HCaRG (Adapté de Solban et coll, 2000) .....	3
Figure 2 : Expression des niveaux d'ARN messagers des COMMD dans différents organes.....	7
Figure 3 : Régulation de l'homéostasie du cuivre et du sodium par les protéines COMMD.....	14
Figure 4 : Régulation de la voie NF- $\kappa$ B par les protéines COMMD (Adapté de Esposito et coll, 2015).....	18
Figure 5 : Régulation du trafic vésiculaire par les protéines COMMD. ....	19
Figure 6 : Accélération de la réparation rénale par COMMD5 .....	31
Figure 7 : Structure anatomique du néphron.....	34
Figure 8 : Histologie des différents sous-types de carcinomes à cellules rénales (Adapté de Muglia et coll, 2015).....	39
Figure 9 : La stadification du carcinome rénal (Adapté de Hsieh et coll, 2017).....	41
Figure 10 : Les différents inducteurs de la transition épithélio-mésenchymateuse (Adapté de Lamouille et coll, 2014).....	43
Figure 11 : Le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (Adapté de Vergara et coll, 2016) .....	44
Figure 12 : Schéma des différentes études permettant de comprendre le rôle de COMMD5 dans le cancer du rein .....	54

### Chapitre II :

Figure 1 : Expression de COMMD5 dans les carcinomes de reins humains.....	65
---	----

Figure 2 : L'hypoxie induit une diminution de l'expression de COMMD5 dans les cellules HK-2.....	68
Figure 3 : Dé-différenciation des cellules HK-2 après exposition au CoCl <sub>2</sub> . .....	69
Figure 4 : L'inhibition de COMMD5 induit une dé-différenciation des cellules HK-2 .....	72
Figure 5 : L'inhibition de COMMD5 augmente l'expression des marqueurs de l'invasion et l'angiogénèse dans les cellules HK-2. ....	73
Figure 6 : L'inhibition de COMMD5 induit une augmentation de l'expression des facteurs de transcription impliqués dans l'EMT dans les cellules HK-2 .....	74
Figure 7 : Schéma bilan .....	76
 Chapitre III :	
Figure 1 : La surexpression de COMMD5 dans les cellules RENCA induit une re-différenciation cellulaire.....	89
Figure 2 : Diminution de l'expression de SNAIL dans les cellules RENCA surexprimant COMMD5....	91
Figure 3 : Diminution de l'expression de SNAIL dans les tumeurs rénales de souris surexprimant COMMD5.....	92
Figure 4 : COMMD5 ne favorise pas la dégradation de SNAIL par le protéasome .....	95
Figure 5 : COMMD5 entraîne une régulation négative de SNAIL par l'inhibition de HIF1 $\alpha$ .....	96
Figure 6 : COMMD5 inhibe la translocation nucléaire de SNAIL.....	99
Figure 7 : COMMD5 inhibe les métalloprotéases MMP2 et MMP9 dans les cellules RENCA .....	101
Figure 8 : La surexpression de COMMD5 inhibe l'invasion.....	102
Figure 9 : Schéma du mécanisme d'inhibition de SNAIL par COMMD5 via HIF1 $\alpha$ et d'induction de la MET dans les cellules RENCA .....	104

**Chapitre IV :**

**Figure 1 : HCaRG facilitates differentiation of Renca cells and inhibits cell-cycle progression..... 149**

**Figure 2 : HCaRG induces autophagic cell death distinct from apoptosis or necroptosis in Renca cells..... 150**

**Figure 3 : HCaRG inhibits tumor growth in a mouse homograft RCC model ..... 151**

**Figure 4 : HCaRG suppresses EGFR and ErbB3 by enhancing their promoter methylation..... 152**

**Figure 5 : HCaRG fosters CpG island hyper-methylation of EGFR and ErbB3 promoters..... 153**

**Figure 6 : HCaRG is less expressed in human ccRCCs than in normal renal tubules..... 154**

**Figure 7 : Scheme depicting the suppressive role of HCaRG in tumorigenic pathways of RCC..... 155**

**Figure S1 : HCaRG overexpression delays cell-cycle progression in B16-F10 cells ..... 160**

**Figure S2 : HCaRG induces cell death with autophagy distinct from apoptosis in B16-F10 cells ..... 160**

**Figure S3 : HCaRG inhibits the MAPK and PI3K/AKT signaling pathways in B16-F10 cells ..... 161**

**Figure S4 : HCaRG increases overactivation of autophagy in multinucleated giant cells ..... 162**

**Figure S5 : HCaRG and COMMD1 expression in Renca cell lines ..... 163**

**Chapitre V :**

**Figure 1 : COMMD5 is localized on early and recycling endosomes ..... 224**

**Figure 2 : COMMD5 coordinates trafficking of EGFR-containing endosomes ..... 225**

**Figure 3 : COMMD5 silencing induced a major re-organization of cytoskeleton..... 226**

**Figure 4 : COMMD5 regulates cytoskeletal changes via interaction with actin proteins and facilitates endosome scission and transport..... 227**

**Figure 5 : COMMD5 drives long-range endosome movement by its direct binding to tubulin ..... 228**



Figure 6 : Disorganization of actin and tubulin cytoskeleton by COMMD5 silencing abolishes directional cell migration .....	229
Figure 7 : Schematic representation of the role of COMMD5 in endosomal trafficking .....	230
Figure S1 : Effect of COMMD5 or COMMD1 depletion on receptor protein expression. Related to Figure 2.....	236
Figure S2 : Impact of COMMD5 silencing on cell morphology, viability and proliferation. Related to Figure 3.....	237
Figure S3 : COMMD5 depletion impaired transferrin recycling. Related to Figure 4.....	238
Figure S4 : COMMD5 associates to microtubules. Related to Figure 5.....	239
Figure S5 : Interaction of COMMD5 and COMMD1 on endosomes. Related to Figure 5.....	240
<b>Chapitre VII :</b>	
Figure : schéma bilan .....	256
<b>Annexe :</b>	
Figure 1 : Associated studies to tumor suppressor or oncogenic properties of COMMD proteins.....	303
Figure 2 : Chromosomal location of the human COMMD family members .....	304
Figure 3 : Genetic alterations and tissue expression profile of the COMMD protein family and their association to different types of carcinoma .....	305
Figure 4 : Analysis of mRNA expression profiles derived from PC-3 prostate cancer cells in the presence of exogenous human telomerase reverse transcriptase (hTERT) .....	306

**Figure 5 : Loss of COMMD5 leads to important morphological changes including cytoskeleton organization .....307**

**Figure 6 : Proposed model suggesting that COMMD5 expression balances epithelial vs mesenchymal state .....308**

## Liste des tableaux

### Chapitre I

Tableau I : Caractéristiques des membres de la famille COMMD.....5

Tableau II : Interactions protéine-protéine des membres de la famille COMMD.....9

Tableau III : Liste des facteurs de transcription impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse .....47

### Chapitre II

Tableau I : Liste des anticorps primaires et secondaires.....77

Tableau II : Liste des séquences d'amorces sens et antisens .....77

### Chapitre III

Tableau I : Liste des anticorps primaires et secondaires..... 104

Tableau II : Liste des amorces sens et antisens ..... 104

### Chapitre IV

Table I : Serum VEGF concentration at day 28 (pg/ml) ..... 147

Table II : Cell-cycle analysis by DNA content in Renca cells ..... 147

Table III : Clinicopathological features of the 117 ccRCCs patients and their correlations with HCaRG expression in normal RPTs..... 148

Table IV : Primers for MassARRAY quantitative methylation analysis (S1)..... 159

### Chapitre V

Table I : Summary of yeast two-hybrid screening.  
Related to Figure 4..... 234

**Table II : Cloning primers for pull-down assay and Co-IPs.**  
**Related to Figure 4 and 5 (S3)..... 235**

**Table III : RT-qPCR primers used in this study.**  
**Related to Figure 2 (S2) ..... 235**

## Liste des abréviations

**A** : Ampère

**ADAM** : A Disintegrin and Metalloprotease protein

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNc** : ADN complémentaire

**AREG** : Amphiregulin

**ARNm** : ARN messenger

**AT1R** : Récepteur de type 1 de l'angiotensine II

**ATOX1** : Antioxydant 1 copper chaperone

**ATP7A** : ATPase copper transporting alpha

**ATP7B** : ATPase copper transporting beta

**BSA** : Albumine de sérum de boeuf

**BTC** : Betacelluline

**CCC** : COMMD/CCDC22/CCDC93

**CCDC22** : Coiled-coil domain containing 22

**CCDC93** : Coiled-coil domain containing 93

**ccRCC** : Cellule claire de carcinome à cellules rénales

**CCS** : Copper chaperone for superoxide dismutase

**CDH1** : Cadherin 1

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone

**CoCl<sub>2</sub>** : Chlorure de cobalt

**COMM** : Copper metabolism gene MURR1

**COMMD** : COMM domain-containing

**CTR1** : Copper transport protein 1

**CYP27B1** : 25-Hydroxyvitamin D3 1-alpha-hydroxylase

**CXCR4** : Récepteur membranaire de la protéine CXCL12

**DMEM** : Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium

**DSCR3** : Down syndrome critical region gene 3

**ECL** : Électrochimiluminescence

**EGF** : Facteur de croissance épidermique

**EGFR** : récepteur du facteur de croissance épidermique

**EMT** : transition épithélio-mésenchymateuse

**ENaC** : canal épithélial sodique

**EP** : endosome précoce

**EPGN** : Épigène

**EPO** : érythropoïétine

**EREG** : Épiréguline

**FBS** : sérum de veau foetal

**FGF** : Facteurs de croissance des fibroblastes

**HBEGF** : Facteur de croissance de type EGF se liant à l'héparine

**HCaRG** : Hypertension-related, calcium-regulated gene

**HDAC1** : Histone désacétylase 1

**HDAC2** : Histone désacétylase 2

**HGF** : Facteur de croissance des hépatocytes

**HIF1** : Facteur inductible par l'hypoxie 1-alpha

**HK-2** : Cellules de tubules proximaux de reins humains

**HRE** : Élément de réponse à l'hypoxie

**IKK** : IκB kinase

**IL-1** : Interleukine 1

**IL-6** : Interleukine 6

**IL-8** : Interleukine 8

**IMC** : Indice de masse corporel

**kDa** : Kilo Dalton

**KO** : Knock Out

**LDL** : Lipoprotéine de basse densité

**LOX** : Lysyl oxidase

**LPS** : Lipopolysaccharides

**LT-β** : Lymphotoxine beta

**MAPK** : Mitogen-activated protein kinases

**MET** : Transition mésoenchymo-épithéliale

**MMP2** : Métalloprotéase 2

**MMP9** : Métalloprotéase 9

**MP** : Membrane plasmique

**mTOR** : Mechanistic target of rapamycin

**Murr1** : Mouse U2af1-rs1 région 1

**NF- $\kappa$ B** : Facteur de transcription nucléaire  $\kappa$ B

**NICD** : Notch Intra Cellular Domain

**NIK** : NF- $\kappa$ B inducing kinase

**NLS** : Signal de localisation nucléaire

**O<sub>2</sub>** : Dioxygène

**Pb** : paire de base

**PBS** : Tampon phosphate saline

**PHD-2** : prolyl hydroxylase domain protein 2

**Pi3K** : Phosphoinositide 3-kinase

**PTEN** : Phosphatase and tensin homolog

**PTH** : Hormone parathyroïdienne

**RCC** : Carcinome à cellules rénales

**rLDL** : récepteur aux lipoprotéines de basse densité

**RPMI 1640** : Roswell Park Memorial Institute medium 1640

**Si ARN** : Petits ARN interférents

**SHR** : rat spontanément hypertendu

**TAP-TAG** : Purification par immunoprécipitation

**TGF $\beta$**  : Facteur de croissance transformant beta

**TKI** : Inhibiteur tyrosine kinase



**TNF $\alpha$**  : Facteur de nécrose tumorale alpha

**TTBS** : Tampon saline tween tris

**V** : Volt

**VEGF** : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

**VHL** : Von Hippel-Lindau

**VPS29** : Vacuolar protein sorting 29 homolog

**ZO-1** : Tight junction protein 1

## Remerciements

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, la Dre Johanne Tremblay pour avoir répondu à mon courriel il y a quatre ans et m'avoir intégré dans son équipe. Je la remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné l'opportunité de mener mon projet dans les meilleures conditions possible. Je tiens également à remercier le Dr Pavel Hamet pour sa participation à ce projet.

Je souhaite notamment remercier le Dr John S.D. Chan pour avoir accepté de me superviser durant cette dernière année. Je remercie également la Dre Shao-Ling Zhang ainsi que l'ensemble du labo pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée dans ce projet.

Je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont poussé dans cette aventure et tout particulièrement Suzanne Cossette pour son aide dans ce projet. Merci de m'avoir transmis une partie de votre savoir. Merci d'avoir toujours été là pendant ces quatre ans.

Je remercie également la Dre Carole Champion, qui a toujours été présente pour m'aider, pour me questionner, m'orienter et pour son expertise. Je tiens aussi à remercier le Dr Kossay Zaoui pour sa générosité, son support et ses connaissances.

Je n'oublie pas mes amis, avec qui des liens se sont tissés durant ces quatre ans. Merci à vous.

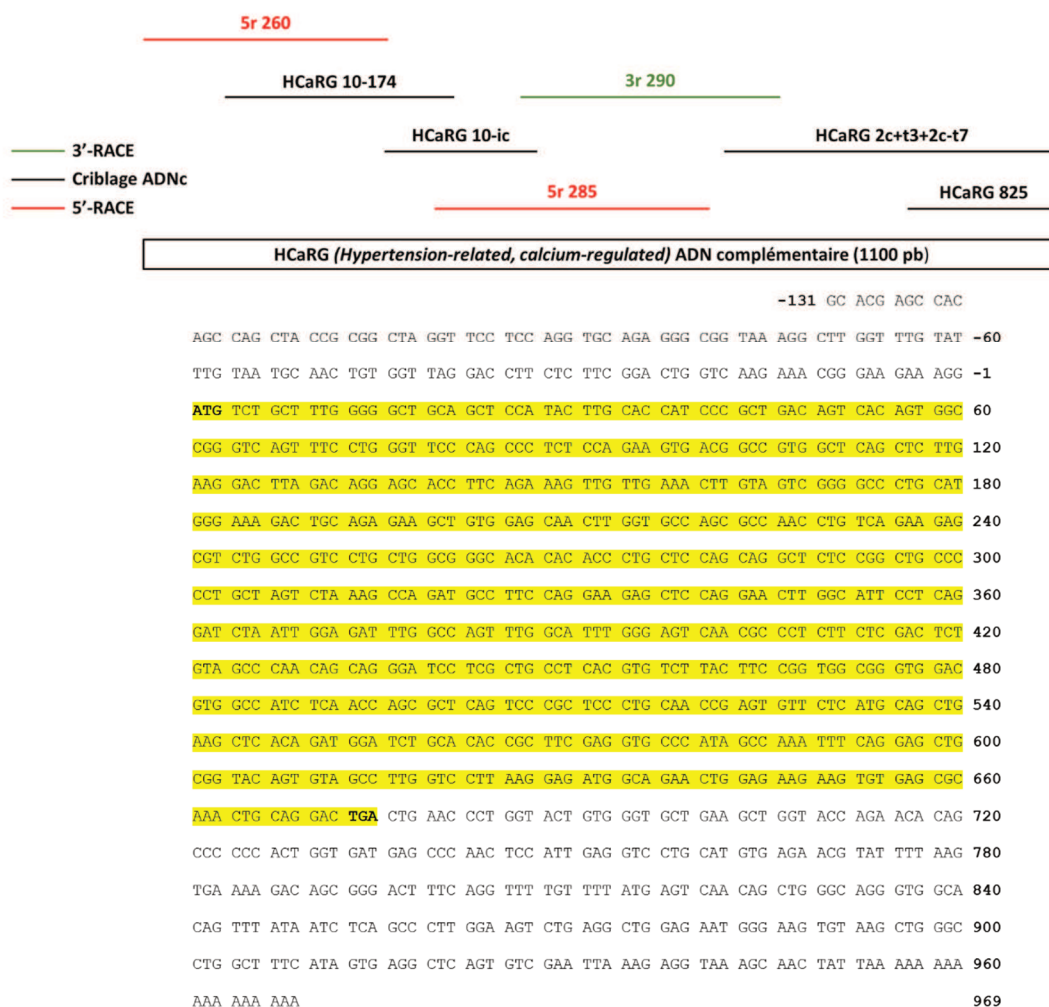
Enfin, je remercie celle qui est à l'origine de cette aventure, Coralie, merci de m'avoir supporté et accompagné pendant cette thèse. Merci d'avoir toujours été là. Pour finir, je remercie mes parents, ma famille, mes frères pour m'avoir motivé et encouragé, merci à vous.

## **Chapitre 1 : Introduction**

## A - Genèse de COMMD5, la découverte de HCaRG

Au début des années 2000, la Dre Johanne Tremblay et son équipe identifient un gène régulé négativement par le calcium extracellulaire dans les glandes parathyroïdiennes de rats spontanément hypertendus (SHR)<sup>(1)</sup>. En utilisant la technique du 3'-RACE, un premier fragment de 700 paires de bases (pb) a été isolé et puis séquencé. Le criblage d'une banque d'ADN complémentaires (ADNc) générée à partir d'extrait d'ARN de cellules de glandes parathyroïdiennes cultivées dans un milieu pauvre en calcium, a permis d'identifier quatre autres fragments (*HCaRG 2c+t3+2c-t7*, *HCaRG 825*, *HCaRG 10-ic* et *HCaRG 10-174*). Enfin, par l'intermédiaire de la technique du 5'-RACE, deux autres fragments (*5r285* et *5r260*) ont été identifiés. En tout, sept fragments se chevauchant ont été isolés, permettant ainsi de reconstituer un ADNc de 1100 pb (**Figure 1**). L'analyse de cette séquence a montré un cadre de lecture ouvert de 224 codons, commençant par le codon d'initiation ATG (Méthionine) et finissant par le codon stop TGA (**Figure 1**). L'équipe du Dre Tremblay nomma ce gène HCaRG pour « *Hypertension-related, calcium-regulated gene* » en référence à sa capacité à être régulé négativement par le calcium extracellulaire. La protéine intracellulaire codée par ce nouveau gène possède un poids moléculaire de 24,67 kDa et l'examen structurel indique un contenu en hélice  $\alpha$  de 67 % ainsi que quatre motifs « leucine zipper ». Pour la première fois en 2002, en utilisant la technique du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), le gène HCaRG a été localisé sur le chromosome 7 (7q34) du rat (*Rattus norvegicus*; NM\_139108.2)<sup>(2)</sup>, puis, par analyse *in silico*, dans la région subtélomérique du chromosome 8 (8q24.3) humain (*Homo sapiens*; NM\_014066.3)<sup>(2)</sup>. Par

homologie, le gène HCaRG a été localisé sur le chromosome 15 (D3 15.36.28cm) de la souris (*Mus musculus*; NM\_025536.2)<sup>(2)</sup>.



**Figure 1 : Identification de la séquence d'ADN complémentaire de HCaRG.**

Le fragment initial 3r 290 a été identifié par la technique du 3'-RACE, puis les fragments HCaRG 10-174, HCaRG 10-ic, HCaRG 2c+t3+2c-t7 et HCaRG 825 par criblage d'une banque d'ADNc de cellules de glandes parathyroïdiennes de rat SHR. Les fragments 5r 260 et 5r 285 ont été identifiés par la technique du 5'-RACE. En jaune correspond la séquence codante de HCaRG commençant par un codon ATG et finissant par un codon TGA. (Adapté de Solban et coll, 2000)<sup>(1)</sup>

## **B - Découverte des autres protéines composant la famille des COMMD**

### **1 - Identification des protéines de la famille**

En 1997, le gène Murr1 (*mouse U2af1-rs1 région 1*) a été découvert sur le chromosome 11 de la souris par le Dr Nabetani et coll<sup>(3)</sup>. Ce n'est que plus tard en 2005, qu'au cours d'une étude portant sur la protéine Murr1, le Docteur Ezra Burstein et son équipe identifient un ensemble de 10 protéines présentant une forte homologie<sup>(4)</sup>. Dans un premier temps, en utilisant une méthode de purification par immunoprécipitation TAP-TAG (*tandem affinity purification*), ils découvrent trois protéines interagissant avec Murr1<sup>(4)</sup>. Après avoir identifié et caractérisé ces trois protéines présentant une homologie avec Murr1, une analyse *in silico* est réalisée permettant ainsi d'y associer six protéines supplémentaires<sup>(4)</sup>. L'analyse de la séquence a permis de caractériser un groupe de 10 protéines comportant une région de 70 à 85 acides aminés fortement homologue en position carboxy-terminale<sup>(4)</sup>. Cette région particulièrement riche en leucines fut nommée domaine COMM (*Copper metabolism gene MURR1*) en référence aux propriétés régulatrices du cuivre de la protéine MURR1<sup>(4)</sup>.

### **2 - Nomenclature et composition de cette nouvelle famille**

Initialement découvertes à partir de la protéine Murr1, il fut décidé en 2005 de renommer l'ensemble de ces 10 protéines. L'appellation initiale de Murr1 ne pouvant pas s'appliquer aux autres protéines, en concertation avec le comité HUGO, le terme COMMD (*COMM domain-containing*) fut choisi en référence au domaine COMM. L'ordre d'attribution numérogique se base alors sur le degré de similarité à la protéine Murr1 ou COMMD1<sup>(4)</sup>.

La famille des COMMD se compose de 10 protéines allant de COMMD1 à COMMD10. De longueur variable, comprise entre 85 acides aminés pour COMMD6 et 224 acides aminés pour COMMD5, toutes les protéines présentent sensiblement la même structure<sup>(5)</sup>. En effet, elles se composent de deux parties distinctes : en position amino-terminale, une partie variable plus ou moins longue suivie, en position carboxy-terminale, d'une séquence homologue d'environ 70 à 85 acides aminés (**Tableau I**). Parmi toutes ces protéines, seule COMMD6 diffère en ne se composant uniquement que d'un domaine COMM.

**Tableau I : Caractéristiques des membres de la famille COMMD.**

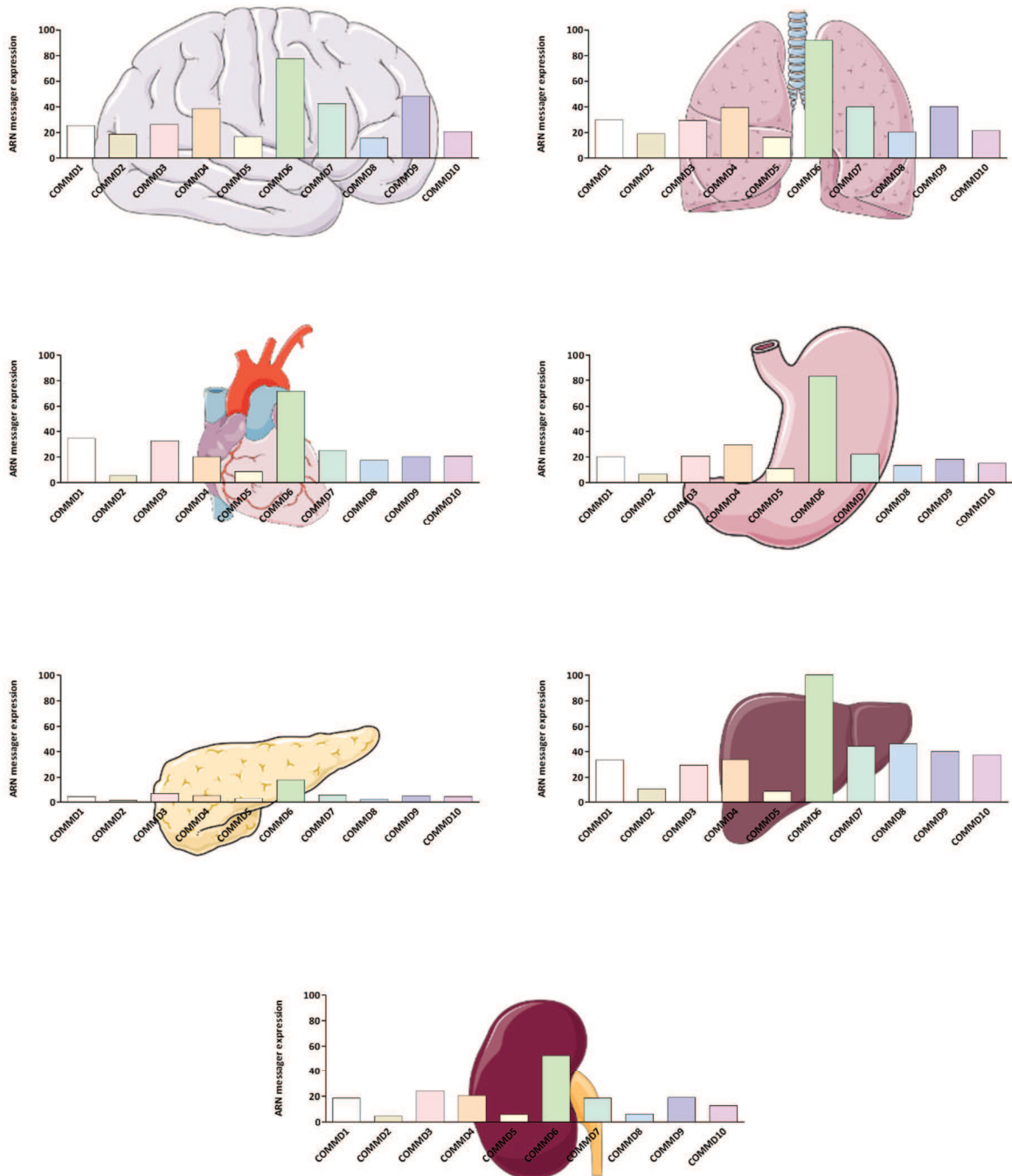
	Alias	Localisation	Nombre d'exons	Longueur de la séquence protéique (AA)	Poids moléculaire de la protéine (kDa)
<b>COMMD1</b>	Murr1 C2orf5	Chromosome 2 (2p15)	7	190	21,178
<b>COMMD2</b>		Chromosome 3 (3q25.1)	5	199	22,745
<b>COMMD3</b>	BUP C10orf8	Chromosome 10 (20p12.2)	8	195	22,151
<b>COMMD4</b>		Chromosome 15 (15q24.2)	10	199	21,764
<b>COMMD5</b>	HCaRG HT002	Chromosome 8 (8q24.3)	6	224	24,670
<b>COMMD6</b>	Acrg	Chromosome 13 (13q22.2)	6	85	9,638
<b>COMMD7</b>	C20orf92	Chromosome 20 (20q11.21)	10	200	22,540
<b>COMMD8</b>		Chromosome 4 (4p12)	5	183	21,090
<b>COMMD9</b>	HSPC166 C11orf55	Chromosome 11 (11p13)	7	198	21,819
<b>COMMD10</b>	PTD002	Chromosome 5 (5q23.1)	23	202	22,966

## C - Les protéines de la famille des COMMD

### 1 - Expression

Au cours de l'évolution, les protéines COMMD sont restées très conservées et leurs traces génétiques sont retrouvées dans un large éventail d'organismes multicellulaires<sup>(5)</sup>. Chez les mammifères par exemple, on observe environ 90 % d'homologie par rapport à la séquence humaine<sup>(5)</sup>. Il en est de même chez le poisson-zèbre, où il existe entre 70 % à 88 % d'homologie par rapport à l'humain<sup>(5)</sup>. D'après la base de données *HPA dataset* ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)) regroupant 64 lignées cellulaires et 37 tissus différents, la quantification des niveaux d'expressions des ARN messagers (ARNm) montre que les COMMD sont largement exprimées dans l'ensemble des tissus humains et plus particulièrement COMMD6, qui se trouve être la plus exprimée dans tous les organes. *A contrario*, COMMD2 et COMMD5 semblent présenter des niveaux d'expressions beaucoup plus faibles que tous les autres COMMD. Parmi les organes analysés, le pancréas présente des niveaux d'ARNm très inférieurs au regard des autres organes (**Figure 2**). Aucune étude cependant n'a été réalisée afin d'expliquer les raisons de ces faibles niveaux d'expressions dans le pancréas. Les études chez la souris ont montré que le Knock-Out (KO) de certaines protéines COMMD dont COMMD1, COMMD6, COMMD9 et COMMD10 entraîne un arrêt du développement embryonnaire, suggérant ainsi un rôle indispensable de ces protéines dans l'organisme<sup>(6), (7), (8)</sup>.





**Figure 2 : Expression des niveaux d'ARN messagers des COMMD dans différents organes.**

Les données graphiques ont été obtenues à partir de la base de données *HPA RNA-seq* ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)). Les ARNm des différents COMMD ont été extraits à partir de 64 lignées cellulaires et 37 tissus différents. Les résultats représentent les expressions dans le cerveau, le poumon, le cœur, l'estomac, le pancréas, le foie et le rein. Les données sont exprimées en « transcrit par million ».

## **2 - Interactions**

Depuis le début des études portant sur les protéines COMMD, de nombreuses interactions protéine-protéine ont été rapportées dans la littérature. En effet, la particularité principale que présentent ces protéines est la capacité à se dimériser entre elles. Une analyse réalisée par chromatographie d'exclusion stérique (*SEC-MALLS*) indique que COMMD1, COMMD7 et COMMD9 sont capables de former des homodimères et des hétérodimères grâce à leurs domaines COMM<sup>(9)</sup>. Cette spécificité est retrouvée chez l'ensemble des protéines composant la famille COMMD<sup>(5)</sup>. Ces interactions sont dues à la structure particulière du domaine COMM qui est composée de trois feuillets  $\beta$  suivie d'une hélice  $\alpha$ . Cette séquence contenant un grand nombre d'acides aminés hydrophobes, dont particulièrement des leucines, favorise l'interaction des domaines COMM en forme de poigné de main<sup>(9)</sup>.

Les protéines COMMD se sont vues rapidement associées à la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. Les études rapportent qu'elles interagissent avec plusieurs membres de la voie NF- $\kappa$ B dont les sous-unités NF- $\kappa$ B1, NF- $\kappa$ B2, RELA et RELB entre autres<sup>(4), (10)</sup>. Ces interactions permettant cette régulation seront discutées ultérieurement dans cette introduction.

De plus en plus d'études montrent également un lien direct entre les protéines COMMD et celles impliquées dans la régulation du trafic vésiculaire. En 2013, une première étude a démontré l'interaction entre les protéines COMMD et CCDC22<sup>(11)</sup>. Puis, deux ans plus tard, une seconde interaction est observée entre les protéines COMMD et CCDC93, identifiant ainsi un nouveau complexe nommé CCC (COMMD/CCDC22/CCDC93)<sup>(12)</sup>. Ce complexe CCC

nouvellement caractérisé participe à de nombreux processus dont l'homéostasie du cuivre<sup>(12)</sup>, du cholestérol<sup>(13), (14)</sup> et dans la signalisation du récepteur NOTCH<sup>(7)</sup> en agissant sur le recyclage et la régulation du trafic endosomal<sup>(15)</sup>. La participation des protéines COMMD semble importante dans la stabilité de ce complexe, puisque la perte de COMMD1, COMMD6 ou COMMD9 entraîne une diminution de l'expression des autres protéines associées au complexe CCC<sup>(13)</sup>. Le lien entre les protéines COMMD et la régulation du trafic endosomal se trouve renforcé par l'identification de nouveaux partenaires membres des complexes RETROMER et RETRIEVER dont VPS29<sup>(16)</sup>, DSCR3<sup>(16), (17)</sup> et C16orf62<sup>(12), (16), (17)</sup> (**Tableau II**).

**Tableau II : Interactions protéine-protéine des membres de la famille COMMD.**

La liste des interactions protéine-protéine a été réalisée à partir des bases de données du site [www.thebiogrid.org](http://www.thebiogrid.org)

	Famille des COMMD	CCC complexe	Voie NFκB	Trafic vésiculaire	Transporteurs / Canaux / Homéostasie
<b>COMMD1</b>	COMMD1-10	CCDC22 CCDC93	NFκB1, NFκB2, IκBα c-REL, RELA et RELB	DSCR3, VPS29, VPS33B et C16orf62	ENaCa, EnaCδ, EnaCy, ATP7A, ATP7B, SCLT1 et NKCC1
<b>COMMD2</b>	COMMD1-10	CCDC22 CCDC93	NFκB1, NFκB2 RELA et RELB	DSCR3, VPS29, CCDC151 et C16orf62	SCLT1
<b>COMMD3</b>	COMMD1-10	CCDC22 CCDC93	NFκB1	DSCR3, VPS29, CCDC151 et C16orf62	SCLT1
<b>COMMD4</b>	COMMD1-10	CCDC22 CCDC93	NFκB1, RELA et RELB	DSCR3, VPS29, CCDC151 et C16orf62	SCLT1 et ATP6V1D
<b>COMMD5</b>	COMMD1-10	CCDC22 CCDC93	NFκB1, RELA et RELB	DSCR3, VPS29 et C16orf62	
<b>COMMD6</b>	COMMD1-10	CCDC22 CCDC93	NFκB1 et RELA	DSCR3, VPS29, VPS33B et C16orf62	SCLT1
<b>COMMD7</b>	COMMD1-10	CCDC22 CCDC93	RELA, IKK-β et IKK-γ	DSCR3 et VPS29	
<b>COMMD8</b>	COMMD1-10	CCDC22 CCDC93	NFκB1, RELA et RELB	DSCR3, VPS29, CCDC151, CCDC14 et C16orf62	SCLT1, ATP9A et ATP6V1D
<b>COMMD9</b>	COMMD1-10	CCDC22 CCDC93	NFκB1 et RELB	DSCR3 et VPS29	
<b>COMMD10</b>	COMMD1-10	CCDC22 CCDC93	NFκB1, RELA et RELB	DSCR3, VPS29 et C16orf62	

## **D - Les différents rôles biologiques des protéines COMMD**

### ***1 - Contrôle de l'homéostasie***

Les rôles biologiques des protéines COMMD commencent à être de plus en plus identifiés au fur et à mesure des études publiées. Considérée initialement comme la protéine de référence, COMMD1 reste la protéine de la famille des COMMD la plus étudiée et la mieux caractérisée à ce jour. Les liens entre les protéines COMMD et les régulations du cuivre dans le foie et du sodium dans le rein sont relativement bien définis.

#### ***a - Régulation de l'excrétion du cuivre***

Le rôle de COMMD1 dans l'homéostasie du cuivre a largement été documenté depuis 2002. Le cuivre étant un oligo-élément essentiel pour l'organisme, il s'incorpore dans certaines protéines et cuproenzymes<sup>(18)</sup> intervenant dans divers processus biologiques<sup>(19)</sup>. Le foie est l'un des organes principaux impliqués dans le maintien de l'homéostasie du cuivre où les cellules hépatocytaires jouent un rôle important dans l'absorption et la régulation du cuivre<sup>(20)</sup>. Dans ces cellules, l'entrée du cuivre est facilitée par le transporteur CTR1 se trouvant au niveau de la membrane plasmique (MP)<sup>(21), (22), (23)</sup>. Puis, le cuivre intracellulaire est séquestré par les protéines chaperonnes CCS et ATOX1, permettant ainsi son utilisation par différents processus biologiques<sup>(24)</sup>. La protéine ATOX1 en particulier, accompagne le cuivre jusqu'aux pompes ATPase de type P (ATP7A et ATP7B ou protéine de Wilson) situées au niveau de l'appareil de Golgi<sup>(25), (26)</sup>. Lorsque la concentration en cuivre est augmentée de manière importante, les protéines ATP7A et ATP7B vont être transloquées au niveau de la MP par des vésicules intracellulaires<sup>(27)</sup> permettant ainsi l'élimination du cuivre par la bile<sup>(28)</sup>. Dans certaines

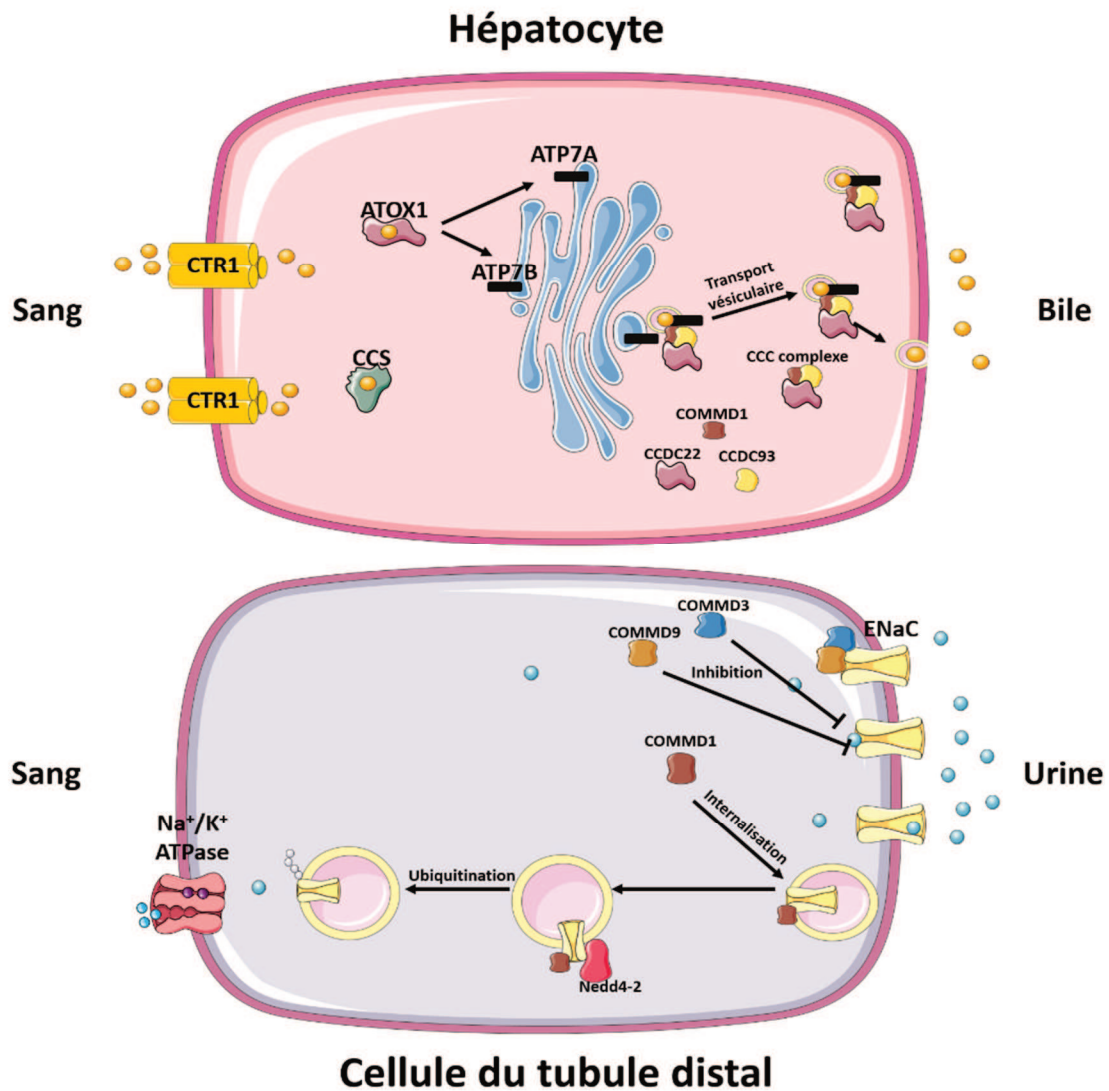
pathologies, dont la maladie de Wilson, le défaut dans l'élimination du cuivre par les voies biliaires induit une accumulation au niveau des lysosomes<sup>(29)</sup>. Cette surcharge lysosomale aura pour conséquence à moyen terme, de développer une cirrhose du foie ou entraîner une hépatite chronique chez les sujets affectés<sup>(30)</sup>. Depuis quelques années, un modèle canin permettant d'étudier cette surcharge lysosomale du cuivre dans le foie existe. En effet, la toxicose du cuivre est une maladie autosomale récessive spécifique au terrier Bedlington<sup>(31), (32), (33)</sup>. En 2002, une étude portant sur l'identification d'une région d'environ 500 kb responsable de la toxicose du cuivre chez le chien a permis de découvrir une mutation du gène COMMD1<sup>(34)</sup>. Cette mutation, qui induit une délétion de 39.7 kb englobant l'exon 2<sup>(35)</sup>, entraîne une accumulation de cuivre dans le foie<sup>(34)</sup>. L'analyse expressionnelle a démontré une absence totale de la protéine COMMD1 dans le foie de ces chiens malades<sup>(36)</sup>. Chez l'humain, cette mutation particulière de COMMD1 n'a pas été retrouvée chez les patients souffrants de la maladie de Wilson<sup>(37)</sup> ni chez les patients souffrant de toxicose hépatique du cuivre non wilsonienne<sup>(38)</sup>. D'un point de vue fonctionnel, les études ont révélé une interaction entre COMMD1 et la partie amino-terminale de la pompe ATPase ATP7B<sup>(39)</sup> sans toutefois avoir établi son rôle précis. L'inhibition de l'expression de COMMD1 n'entraîne pas de perturbation de la translocation d'ATP7A depuis l'appareil de Golgi vers les vésicules, mais joue un rôle dans une étape ultérieure de la voie d'excrétion du cuivre par la bile. En effet, la protéine COMMD1 se liant aux endosomes précoces (EP) par l'intermédiaire du complexe CCC, la diminution de l'une de ces protéines entraîne une absence de mouvement d'ATP7A depuis les endosomes vers la MP<sup>(12)</sup>. Malgré une interaction directe avec les protéines ATP7A et ATP7B, le rôle de

COMMD1 se situe principalement dans le mécanisme de régulation du trafic vésiculaire (**Figure 3**).

### ***b - Régulation du sodium***

Le canal sodique épithélial ENaC (*Epithelial Na Channel*) est composé de trois sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ <sup>(40), (41)</sup>. Récemment, une 4<sup>ème</sup> sous-unité  $\delta$  a été identifiée, mais son rôle n'a pas été encore clairement défini<sup>(42)</sup>. Néanmoins, cette sous-unité  $\delta$  partage une grande similarité avec la sous-unité  $\alpha$  et possède la capacité de former un canal avec les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ <sup>(43)</sup>. La protéine ENaC est située au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales des tubules rénaux, des poumons et du colon, permettant le passage du sodium extracellulaire vers l'interstitium<sup>(44)</sup>. Une fois les ions sodiques présents dans le cytoplasme des cellules épithéliales, ils se trouvent transportés vers l'interstitium par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase située sur la membrane basolatérale des cellules. Le flux d'ions sodiques, induisant un changement d'osmolarité, entraîne alors un déplacement d'eau. Par conséquent, la présence du canal ENaC au niveau rénal est donc essentielle à la régulation de la pression artérielle<sup>(45)</sup>. De nombreuses études ont révélé la capacité régulatrice des protéines COMMD sur le canal sodique ENaC, notamment COMMD1, COMMD3, COMMD9 et COMMD10. En effet, les protéines COMMD3 et COMMD9 ont montré des propriétés inhibitrices du canal sodique ENaC en interagissant avec lui et entraînant une baisse de son expression au niveau apical des cellules. La présence de COMMD3 et COMMD9 dans le tube collecteur rénal et leurs colocalisations avec la protéine ENaC suggèrent qu'elles pourraient être des régulateurs endogènes de ce canal<sup>(46)</sup>. Parallèlement, la partie carboxy-terminale de la protéine COMMD1 contenant le domaine

COMM interagit avec les sous-unités  $\delta$ ENaC ainsi qu'avec les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ <sup>(47)</sup>. L'expression de COMMD1 dans les cellules réduit de manière significative l'activité du canal ENaC en augmentant son internalisation et sa présence dans des vésicules de recyclage intracellulaires tout en favorisant son ubiquitination<sup>(48)</sup>. Cette régulation de la protéine ENaC agit sous l'action de la protéine Nedd4-2<sup>(49)</sup>, une ubiquitine-ligase<sup>(50)</sup>, en se liant de façon spécifique au motif PPxY présent dans la partie carboxy-terminale des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ <sup>(51)</sup> (**Figure 3**). La liaison entre Nedd4-2 et les protéines COMMD se trouve renforcé par le rôle de COMMD10 dans les cellules épithéliales de thyroïde, où son inhibition entraîne une diminution l'activité du canal ENaC par l'augmentation de l'expression de la protéine Nedd4-2<sup>(52)</sup>.



**Figure 3 : Régulation de l'homéostasie du cuivre et du sodium par les protéines COMMD.**

Dans les cellules hépatocytaires, COMMD1, en association avec les 2 autres membres du complexe CCC, favorisent la sécrétion du cuivre par les voies biliaires. Le complexe CCC se lie aux endosomes précoces et participe au mouvement vers la membrane plasmique. Dans les cellules du tubule distal, COMMD3 et COMMD9 interagissent avec ENaC entraînant une baisse de son expression. COMMD1 participe elle aussi à la régulation de l'expression d'ENaC en favorisant son internalisation et son ubiquitination.



## **2 - Régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B**

Le facteur de transcription nucléaire NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor Kappa B*) régule l'expression d'un très grand nombre de gènes impliqués dans divers processus physiologiques, dont l'immunité<sup>(53), (54)</sup>, l'inflammation<sup>(55), (56), (57)</sup>, la prolifération<sup>(58), (59), (60)</sup>, l'apoptose<sup>(59), (61), (62)</sup> et le développement tumoral<sup>(63), (64), (65)</sup>. La famille NF- $\kappa$ B se compose de cinq sous-unités différentes dont RELA, RELB, c-REL, NF- $\kappa$ B1 (p105/p50) et NF- $\kappa$ B2 (p100/p52). Son activation peut s'effectuer selon deux voies en fonction du type de stimuli<sup>(66)</sup>. La voie la plus caractérisée est la voie canonique qui se trouve activée par le facteur de nécrose tumorale (TNF)<sup>(67)</sup>, l'interleukine-1 (IL-1)<sup>(68), (69)</sup> et le lipopolysaccharide bactérien (LPS)<sup>(70), (71)</sup> entre autres. Une fois le signal reçu, il y aura un recrutement du complexe IKK composé des trois sous-unités IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  et IKK- $\gamma$  (aussi nommée NEMO) au niveau cytoplasmique. Cette I $\kappa$ B kinase entraîne la phosphorylation ainsi que la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  et d'I $\kappa$ B $\beta$ , permettant ainsi la dissociation des I $\kappa$ B au dimère NF- $\kappa$ B1/RELA<sup>(72)</sup>. Une fois cette dissociation effectuée, le dimère NF- $\kappa$ B1/RELA sera transloqué dans le noyau et activera les différents gènes associés. La voie non-canonique peut, quant à elle, être activée par la lymphotoxine bêta (LT- $\beta$ )<sup>(73)</sup> ou le ligand CD40<sup>(74)</sup>. Une fois activée, la protéine NIK (NF- $\kappa$ B inducing kinase) va phosphoryler et activer IKK- $\alpha$ . qui à son tour phosphoryle p100. Enfin, Il s'ensuit une libération de l'hétérodimère p52/Rel-B qui va activer les gènes cibles.

### ***a - Rôle inhibiteur de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B***

Depuis la découverte des protéines COMMD, de nombreuses études ont décrit leurs rôles dans la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. Tel que dans l'étude de l'homéostasie

du cuivre, COMMD1 est la première protéine à avoir été caractérisée. Elle intervient dans deux mécanismes différents permettant la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. La protéine COMMD1 participe, d'une part, à la stabilisation d'I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>(75)</sup> et d'autre part, à l'ubiquitination et la dégradation de certaines sous-unités NF- $\kappa$ B<sup>(76)</sup>. I $\kappa$ B $\alpha$  est une protéine inhibitrice intervenant dans la séquestration du dimère NF- $\kappa$ B1/RELA au niveau cytoplasmique<sup>(77)</sup>. La stabilisation d'I $\kappa$ B $\alpha$  par COMMD1 entraîne le blocage de son ubiquitination et de sa dégradation, contribuant ainsi à la régulation négative de la voie NF- $\kappa$ B<sup>(78), (10)</sup>. La perte de COMMD1 augmente la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  qui se traduit *in fine* par sa dégradation après une stimulation au TNF $\alpha$ . COMMD1 participe également à l'ubiquitination et la dégradation des différentes sous-unités de NF- $\kappa$ B grâce à son interaction avec le complexe ubiquitine-ligase E3 Ring ECS<sup>SOCS1</sup> composé des protéines CRL2, Elonguine B et C, Cullin 2 et SOCS1 au niveau nucléaire<sup>(76)</sup>.

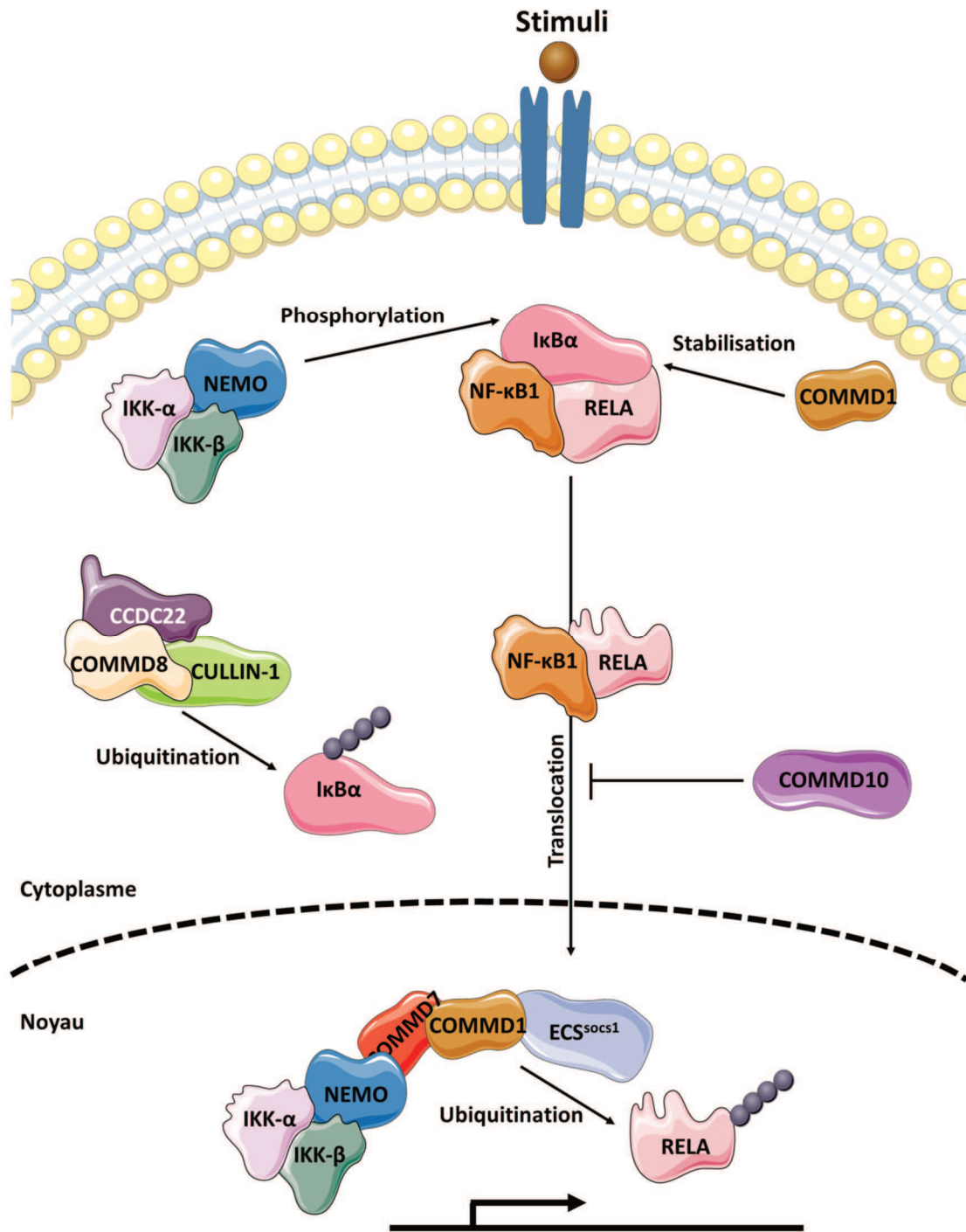
La protéine COMMD7 quant à elle, régule négativement la voie de signalisation NF- $\kappa$ B en se liant au complexe IKK par le biais de la sous-unité  $\gamma$ <sup>(79)</sup>. COMMD7 est l'unique protéine de la famille COMMD à être capable de s'y lier de manière spécifique. L'interaction entre COMMD7 et NEMO permet la stabilisation au niveau nucléaire du complexe IKK et entraîne le recrutement de COMMD1 sur la sous-unité RELA favorisant ainsi son ubiquitination par l'intermédiaire du complexe ECS<sup>soocs1</sup> <sup>(79)</sup>.

La protéine COMMD10 participe également à la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B en se liant aux sous-unités RELA, RELB et NF- $\kappa$ B1<sup>(4)</sup>. De manière plus spécifique, COMMD10 inhibe la translocation nucléaire de la sous-unité RELA. En effet, dans les cellules

cancéreuses de côlon (SW480), la diminution de COMMD10 favorise l'accumulation de la protéine RELA au niveau nucléaire après une stimulation avec du TNF $\alpha$ <sup>(80)</sup>. Cette accumulation a pour conséquence l'activation des gènes cibles de la voie NF- $\kappa$ B<sup>(80)</sup> (**Figure 4**).

#### ***b - Rôle activateur de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B***

Parmi l'ensemble des études portant sur le rôle des protéines COMMD dans la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, seule COMMD8 semble posséder la capacité de contrôler positivement cette voie. En effet, l'interaction de COMMD8 avec la protéine CCDC22 du complexe CCC induit une inhibition d'I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>(11)</sup> par l'intermédiaire de la protéine ligase Cullin1 impliquée dans l'ubiquitination et la dégradation des protéines<sup>(81)</sup>. L'inhibition de l'expression de COMMD8 entraîne un effet inverse se traduisant par la diminution de la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>(11)</sup> se qui aura pour conséquence de séquestrer le dimère NF- $\kappa$ B1/RELA bloquant ainsi l'activation du signal intracellulaire (**Figure 4**).



**Figure 4 : Régulation de la voie NF-κB par les protéines COMMD.**

La protéine COMMD1 agit sur la stabilisation d'IκBα séquestrant ainsi le dimère NF-κB1/RELA. COMMD1 participe également, en association avec COMMD7 au niveau nucléaire, à l'ubiquitination de la sous-unité RELA. COMMD10 inhibe la translocation nucléaire du dimère NF-κB1/RELA. COMMD8, par l'intermédiaire de la protéine CCDC22 et CULLIN-1 participe à l'ubiquitination d'IκBα. (Adapté de Esposito et coll, 2015)<sup>(79)</sup>

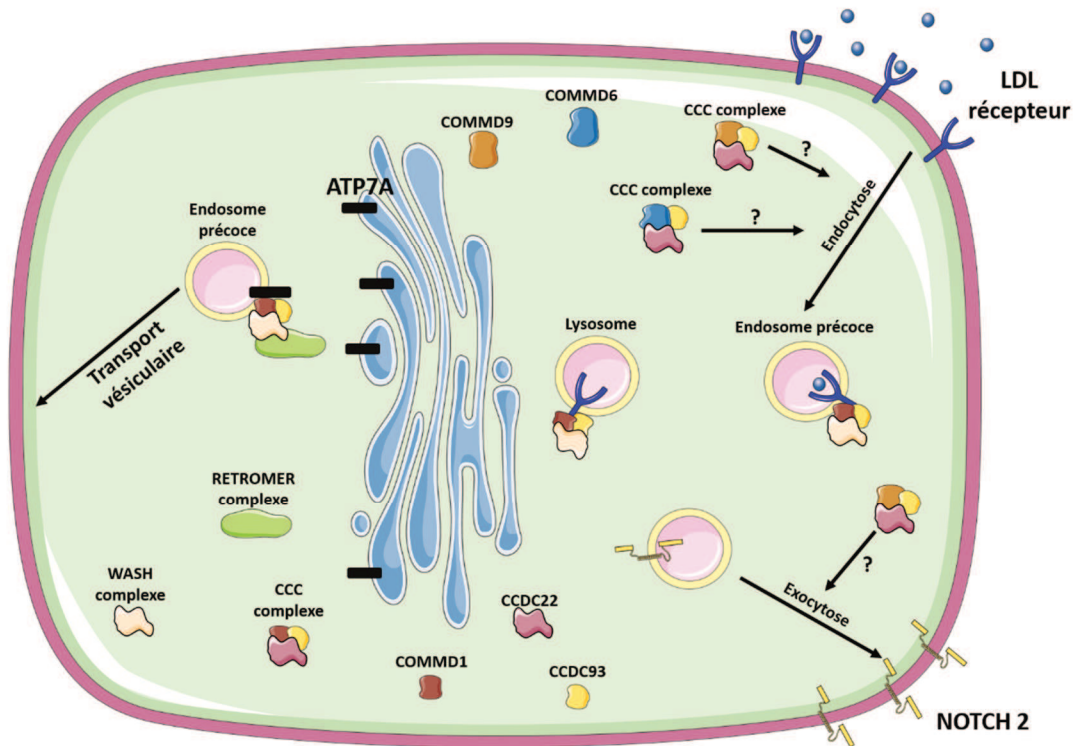
### **3 - Implication dans le trafic vésiculaire**

Le trafic vésiculaire est un processus permettant le déplacement de molécules à partir de vésicules sphériques composées d'une bicouche lipidique. Ces vésicules se forment en bourgeonnant à partir d'un compartiment donneur et sont dirigées vers un compartiment accepteur, auquel elles se fixent et fusionnent. Dans une cellule eucaryote, il existe deux types de mouvement bien distincts. Lorsque le déplacement vésiculaire s'effectue du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi puis vers les lysosomes ou vers la membrane plasmique, on qualifie ce mouvement d'antérograde. Dans le cas d'un mouvement allant de la membrane plasmique vers les endosomes (précoces et tardifs), les lysosomes et l'appareil de Golgi ou bien de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique, on qualifie ce mouvement de rétrograde.

Le complexe CCC, formé par les protéines COMMD, CCDC22 et CCDC93, joue un rôle important dans le trafic vésiculaire. Le rôle précis de chaque protéine COMMD intervenant dans ce complexe n'est pas clairement défini, mais il est démontré qu'elles participent à la stabilisation de ce complexe<sup>(13)</sup>. Tel que mentionné précédemment, la protéine COMMD1 inclus dans ce complexe, intervient dans l'homéostasie du cuivre grâce à la régulation vésiculaire permettant à la protéine ATP7A de se déplacer depuis l'appareil de Golgi vers la MP<sup>(12)</sup>. D'autres acteurs majeurs sont également impliqués dans cette régulation notamment les complexes WASH et RETROMER, qui colocalisent avec COMMD1 au niveau des EP et formant un regroupement nommé RETRIEVAL<sup>(12)</sup>. Cet ensemble est impliqué dans la récupération, le tri et recyclage des endosomes<sup>(82)</sup> (**Figure 5**).

La mutation du gène *CCDC22* dans la déficience intellectuelle liée au chromosome X a permis de faire le lien entre les protéines *COMMD* et la compréhension de l'hypercholestérolémie chez les personnes souffrant de ce syndrome. Dans différents modèles *in vivo* canin et murin, le KO de la protéine *COMMD1* dans le foie induit une hypercholestérolémie due à la dérégulation du récepteur aux lipoprotéines de basse densité (rLDL)<sup>(14)</sup>. En condition normale et après avoir été internalisé, le rLDL peut être dirigé vers les lysosomes pour subir une dégradation ou être recyclé et renvoyé à la surface au niveau de la MP<sup>(83)</sup>. Bien que l'absence de *COMMD1* n'induit pas de baisse expressionnelle du rLDL, son inhibition diminue fortement l'absorption cellulaire de LDL et entraîne une redistribution du rLDL<sup>(14)</sup>. En effet, le rLDL se retrouve moins présent dans les EP et les lysosomes par rapport à la condition contrôle<sup>(14)</sup>. De plus, la protéine *COMMD1*, *via* son domaine *COMM*, interagit avec le motif cytoplasmique NPxY du rLDL impliqué dans son internalisation<sup>(14), (84)</sup>. En association avec le complexe *WASH*, la protéine *COMMD1* combinée au CCC, participe au recyclage du rLDL<sup>(14)</sup>. *COMMD6* et *COMMD9* sont également des acteurs majeurs dans la régulation de cholestérol *via* le rLDL<sup>(13)</sup>. De façon similaire à *COMMD1*, l'inhibition de *COMMD6* ou de *COMMD9* induit une hypercholestérolémie chez les souris KO<sup>(13)</sup>. Néanmoins, la protéine *COMMD6* semble être indispensable au maintien du complexe CCC puisque son inhibition induit une baisse de l'expression de *COMMD1* et des protéines *CCDC22* et *CCDC93*<sup>(13)</sup>. En revanche, l'absence de *COMMD1* n'entraîne pas de variation de l'expression de *COMMD6*, mais diminue celles de *CCDC22* et *CCDC93*<sup>(13)</sup> (**Figure 5**).

Les protéines COMMD, CCDC22 et CCDC93 sont également impliquées dans la régulation du niveau d'expression membranaire de NOTCH2<sup>(7)</sup>. Comme pour le rLDL et la protéine ATP7A, l'inhibition de COMMD9 semble suivre le même schéma dans la régulation du trafic endosomal. Dans les cellules HeLa, la perte de COMMD9 n'entraîne pas de variation de l'expression de NOTCH2, mais agit plutôt sur sa relocalisation<sup>(7)</sup>. La protéine NOTCH2 est un récepteur transmembranaire composé d'une partie extracellulaire, ayant des motifs EGF, permettant la fixation d'un ligand et une partie intracellulaire NICD (*Notch Intra Cellular Domain*)<sup>(85)</sup>. L'interaction des ligands faisant partie de la famille Delta/Serrate avec le récepteur NOTCH entraîne le recrutement de deux enzymes de clivage dont l' $\gamma$ -Secretase et ADAM<sup>(86), (87)</sup>. La protéine ADAM clive de manière spécifique le domaine extracellulaire tandis que l' $\gamma$ -Secretase clive la partie intracellulaire permettant ainsi au domaine NICD d'aller se fixer sur certains promoteurs de gènes<sup>(88)</sup>. Lors de l'inhibition de COMMD9, la protéine NOTCH2 se trouve délocalisée depuis la MP vers les vésicules intracellulaires, ce qui a pour conséquence de diminuer l'expression des gènes induits par NOTCH2<sup>(7)</sup>. La restauration de COMMD9 dans ces cellules entraîne alors un retour de la protéine NOTCH2 au niveau de la MP<sup>(7)</sup> (**Figure 5**).



**Figure 5 : Régulation du trafic vésiculaire par les protéines COMMD.**

Les protéines de la famille des COMMD participent au trafic vésiculaire en association avec les protéines CCDC22 et CCDC93. La protéine COMMD1 est essentielle au déplacement de la protéine ATP7A de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique. Il est en de même pour COMMD9 qui se trouve être indispensable à l'exocytose de la protéine NOTCH2 vers la membrane plasmique. COMMD6, COMMD9 et COMMD1 participent également à la régulation du récepteur LDL.



#### **4 - Rôle dans le cancer**

##### ***a - Expression des membres de la famille des COMMD dans le cancer***

L'implication des protéines de la famille des COMMD dans la tumorigénèse semble dorénavant incontournable. En effet, l'expression des COMMD est fortement modulée dans la majorité des cancers et notamment dans les cellules cancéreuses du poumon où une bimodulation de l'expression génique des COMMD est observée. Tandis que COMMD3, COMMD4, COMMD5, COMMD6, COMMD8 sont diminués, une hausse de l'expression de COMMD9 est observée<sup>(89)</sup>. Bien que COMMD1 ne semble pas être impliquée dans le cancer du poumon, la baisse de son expression a été observée dans d'autres cancers dont celui des testicules<sup>(90), (91)</sup>, du pancréas<sup>(92)</sup>, l'ovaire<sup>(93)</sup> et du sein<sup>(94)</sup> (analyse de la base de données Oncomine réalisée par le Dr van de Sluis et coll, 2002)<sup>(95)</sup>. La diminution des niveaux l'ARNm de COMMD5 a également été observée dans les tumeurs du cerveau, du foie et de l'estomac par rapport à des échantillons sains<sup>(1), (96)</sup>. Dans les lignées cellulaires et les tumeurs hépatocellulaires en revanche, COMMD7 se trouve surexprimé par rapport aux cellules saines<sup>(97), (98)</sup>. Ces observations sur l'expression des différents membres de la famille des COMMD nous permettent de postuler qu'un rôle oncogénique ou suppresseur de tumeurs puisse être envisagé.

##### ***b - Effet suppresseur de tumeurs***

De nombreuses études portant sur le rôle des protéines COMMD dans le cancer montrent des effets suppresseurs de tumeurs. Les protéines COMMD étant ubiquitaires, leurs modulations dans différentes tumeurs ont poussé à comprendre leurs rôles. Dans les cellules

du cancer du côlon (HT29) et du cancer de l'os (U2OS), l'inhibition de COMMD1 a entraîné une augmentation de l'invasion cellulaire par rapport aux cellules contrôles<sup>(95)</sup>. Parallèlement, dans un modèle murin, l'injection de cellules mélanocytes B16.F10 surexprimant COMMD1 a induit une diminution du nombre de métastases au niveau pulmonaire par rapport aux souris ayant été injectées avec des cellules B16.F10 témoins<sup>(95)</sup>. D'un point de vue transcriptionnel, l'inhibition de COMMD1 dans la lignée cellulaire HT29 a favorisé l'expression de gènes impliqués dans l'invasion et les métastases dont CXCR4, MMP9, LOX et certains facteurs de transcriptions impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)<sup>(95)</sup>. La protéine COMMD1, par l'intermédiaire de son interaction avec l'extrémité amino-terminale de HIF1 $\alpha$ , empêchent la dimérisation avec HIF1 $\beta$  bloquant ainsi la liaison à l'ADN et l'activation transcriptionnelle de ces gènes<sup>(95)</sup>. Le rôle des protéines COMMD peut être également indirect en potentialisant l'effet de certaines thérapies. C'est le cas notamment, dans des cellules cancéreuses du poumon, du peptide anti-tumoral CIGB-552 qui en se liant à COMMD1, entraîne une inhibition de la croissance cellulaire<sup>(99)</sup>. L'absence de COMMD1 quant à elle, diminue fortement l'efficacité de l'effet anti-tumoral de ce peptide<sup>(99)</sup>. De la même manière, dans les cellules du cancer de l'ovaire en stade avancé, l'augmentation de COMMD1 au niveau nucléaire a augmenté la cytotoxicité de la cisplatine, s'accompagnant d'un contrôle G2/M plus efficace et d'une diminution du gène BRCA1<sup>(100)</sup>.

Dans le cancer du côlon, la diminution de COMMD10 est un facteur de mauvais pronostic<sup>(80)</sup>. En effet, la surexpression de COMMD10 dans les lignées cellulaires de tumeurs colorectales (SW620 et SW480) a entraîné une diminution de la prolifération par l'arrêt du cycle cellulaire en G1 ainsi que le nombre de colonies formées et l'invasion cellulaire<sup>(80)</sup>. De

façon inverse, l'inhibition de COMMD10 dans les lignées cellulaires HT29 et SW480 a augmenté la prolifération et l'invasion<sup>(80)</sup>.

### ***c - Effet oncogénique***

Malgré les effets suppresseurs de tumeurs de certaines protéines COMMD, COMMD9 et COMMD7 présentent des effets oncogéniques. Dans les lignées cellulaires et les tumeurs cancéreuses pulmonaires, l'analyse expressionnelle montre une augmentation significative de l'ARNm et de la protéine COMMD9<sup>(89)</sup>. L'inhibition de COMMD9 dans les lignées cellulaires A549 et H1299 de cancer pulmonaire a induit une baisse de la croissance, de la formation de colonies et de la migration cellulaire<sup>(89)</sup>.

Dans les lignées cellulaires d'hépatocarcinomes, l'analyse expressionnelle indique une augmentation de COMMD7 par rapport aux lignées contrôles du foie<sup>(97)</sup>. L'inhibition de COMMD7 dans les cellules HepG2 et SK-Hep1 a entraîné une diminution de la prolifération et réduit le nombre de colonies formées<sup>(97)</sup>. La diminution de COMMD7 dans ces cellules a bloqué le cycle cellulaire en phase S et diminue la phase G2/M, traduisant ainsi l'augmentation d'apoptose<sup>(97)</sup>.

### **E - Fonctions de COMMD5**

Les études portant sur le rôle de COMMD5 sont peu nombreuses et proviennent principalement de notre laboratoire. Depuis la découverte du gène en 2000, nos études se sont fortement axées autour de la fonction rénale et l'identification de mécanismes cellulaires.

## 1 - Régulation de la prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire est un processus biologique entraînant une augmentation du nombre de cellules induit par l'équilibre entre la division et la mort cellulaire. En condition physiologique, une cellule suit un cycle bien défini d'une durée variable et composé de plusieurs phases. La première phase dite G1, est une phase de croissance, la cellule va croître jusqu'à l'activation de signaux permettant le passage en phase S. Au cours de la phase S, dite de synthèse, la cellule va dupliquer son matériel génétique et poursuivre le cycle cellulaire. La phase suivante, dite G2, est une phase durant laquelle la cellule contenant le double de son matériel génétique va répliquer son centrosome afin de pouvoir rentrer en phase de mitose. La mitose est la dernière phase durant laquelle la cellule va se diviser en deux cellules contenant chacune son matériel génétique. Au cours de ce cycle cellulaire, de nombreux mécanismes existent permettant de réguler la transition entre les phases et de contrôler l'intégrité cellulaire. Une perte du contrôle du cycle cellulaire va entraîner une hyperprolifération des cellules et induire dans certains cas, le développement de tumeur.

Le premier processus biologique identifié impliquant la protéine COMMD5 est la régulation du cycle cellulaire dans les cellules embryonnaires de reins humains HEK-293<sup>(1)</sup>. La surexpression de COMMD5 a diminué la prolifération cellulaire<sup>(1)</sup> par l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M<sup>(101)</sup>. Afin de comprendre les mécanismes permettant de réguler le cycle cellulaire, une analyse de l'expression des ARNm par microarray et des protéines par Western blot a montré que les cellules HEK-293 surexprimant COMMD5 avaient un niveau d'expression de p21 augmenté par rapport aux cellules contrôles<sup>(101)</sup>. P21 est la première protéine

régulatrice du cycle cellulaire faisant partie de la famille des inhibiteurs des CDK à avoir été décrite. La protéine P21 a la capacité d'arrêter la progression du cycle cellulaire en phase G1/S ou en phase G2/M de façon dépendante ou indépendante de la protéine P53. L'arrêt du cycle cellulaire en G1/S est un processus dépendant de P53. En effet, lorsqu'un dommage à l'ADN survient, la protéine p53 va activer la protéine P21 qui va elle-même bloquer l'activité du complexe cycline E/CDK2<sup>(102)</sup>. Dans les cellules épithéliales rénales de chien MDCK, la surexpression de COMMD5 n'a pas modulé l'expression de la protéine P53 et l'inhibition de cette surexpression induit une baisse de l'expression de P21 sans affecter l'expression de la protéine P53<sup>(101)</sup>. Ces études ont démontré que COMMD5 agit sur le cycle cellulaire par l'intermédiaire de la protéine P21 indépendamment de la protéine P53.

## **2 - Migration cellulaire**

Suite aux études initiales sur la prolifération, le rôle de COMMD5 a également été évalué dans d'autres mécanismes cellulaires et plus particulièrement dans la migration. La migration cellulaire est un mécanisme biologique faisant appel au potentiel dynamique de la cellule lui permettant de se déplacer et intervient dans de nombreux processus dont l'embryogenèse<sup>(103), (104)</sup>, le cancer<sup>(105)</sup> ou la réparation tissulaire<sup>(106)</sup>. La surexpression de COMMD5 dans les cellules HEK-293 et MDCK a induit une augmentation à la fois de l'adhésion, de la migration cellulaire<sup>(107)</sup> ainsi que l'expression des différentes protéines participant à la migration cellulaire dont TGF $\alpha$ , Autotaxine, Galectin-1 et Fibronectine<sup>(107)</sup>. L'architecture des cellules surexprimant COMMD5 a été modifiée par la présence de larges extensions membranaires composées d'actine filamenteuse formant des lamellipodes<sup>(107)</sup>. Ces extensions

membranaires permettent le mouvement cellulaire par quatre étapes successives, dont la protrusion, l'adhésion, la translocation et la rétractation. Lorsque la cellule reçoit un signal chimioattractant, la formation des protrusions au niveau du front cellulaire s'effectue par l'extension de la MP. Les lamellipodes formés vont alors adhérer à la matrice extracellulaire permettant un ancrage, puis la cellule va se transloquer vers le front cellulaire et se rétracter en désassemblant les adhésions formées à l'arrière.

### **3 - Différenciation cellulaire**

La différenciation cellulaire est un processus biologique durant lequel une cellule non spécialisée se spécialise et subit de nombreux changements phénotypiques, métaboliques et acquièrent des propriétés fonctionnelles induits par une régulation épigénétique. Malgré l'hétérogénéité des différentes cellules, elles dérivent toutes initialement à partir des cellules souches embryonnaires totipotentes de l'œuf fécondé. Plus tard dans le développement, la masse interne du blastocyte va donner naissance aux cellules souches embryonnaire pluripotentes composant les trois feuillets embryonnaires, l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme. Chacune des cellules issues de ces feuillets vont être à l'origine des cellules souches multipotentes qui permettront aux cellules de se spécialiser de manière définitive.

À ce jour, le mécanisme de COMMD5 dans la différenciation cellulaire n'a pas été totalement élucidé. La surexpression de COMMD5 dans les cellules HEK-293 induit un changement morphologique augmentant la surface cellulaire et entraîne un aplatissement des cellules<sup>(101)</sup>. Par microscopie électronique, nous avons noté que ces cellules présentent des microvillosités et des jonctions cellulaires d'avantage différenciées caractérisées par la

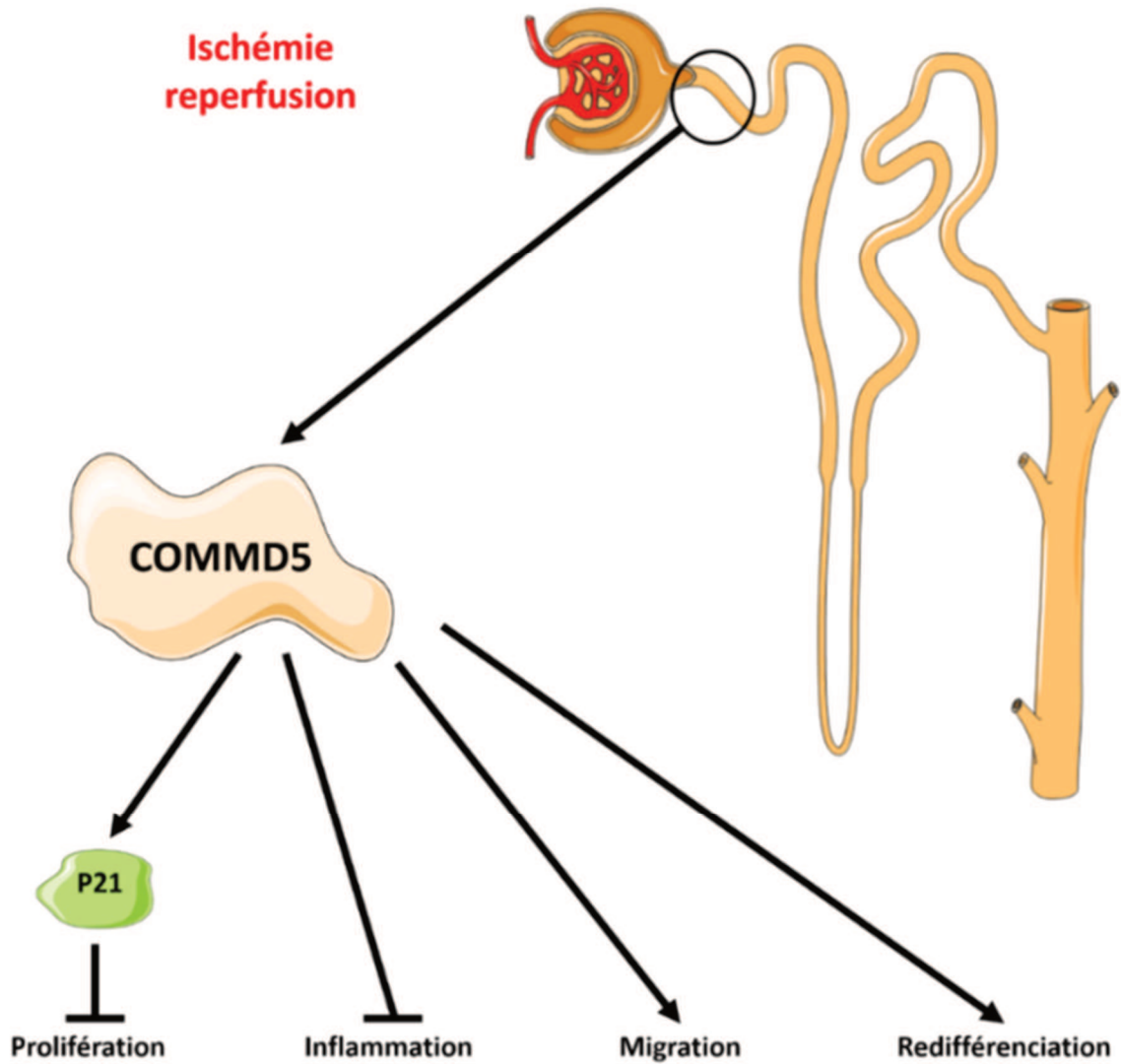
présence de desmosomes<sup>(101)</sup>. Le degré de différenciation cellulaire a été déterminé par l'expression de certaines protéines caractéristiques dont l'E-cadhérine, marqueur épithélial de différenciation (impliquée dans les jonctions cellulaires) et la Vimentine, un marqueur mésenchymateux de dé-différenciation (impliqué dans le cytosquelette). Dans les cellules MDCK, la surexpression de COMMD5 a augmenté l'expression protéique d'E-cadhérine tout en diminuant celle de la Vimentine par rapport aux cellules contrôles<sup>(108)</sup>. De façon concordante, la réalisation d'un « rescue », permettant d'inhiber la surexpression de COMMD5, a induit une diminution de la protéine E-cadhérine et une augmentation de la protéine Vimentine. L'inhibition de la surexpression de COMMD5 a donc induit une dé-différenciation cellulaire<sup>(108)</sup>.

#### **4 - Accélération de la réparation rénale**

Dans un contexte plus pathologique, le lien entre COMMD5 et la réparation rénale a clairement été démontré. Lors d'un dommage au niveau rénal, les cellules épithéliales endommagées perdent leurs polarités et finissent par mourir créant une plaie. Le mécanisme de réparation rénal fait intervenir différents processus biologiques dont la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire<sup>(109)</sup>. Les cellules adjacentes à la plaie d'origine vont migrer puis se dé-différencier et proliférer pour combler l'espace laissé par les cellules endommagées. S'en suit alors une restauration de la polarité cellulaire par la re-différenciation des cellules nouvellement mises en place. Le contrôle strict de chaque étape de la réparation cellulaire est indispensable pour éviter la fibrose et assurer l'intégrité tissulaire<sup>(110)</sup>. Notre groupe a démontré que COMMD5 participait individuellement à l'ensemble des processus

permettant la réparation tissulaire. Remarquablement, dans notre modèle de souris transgéniques ayant subies une ischémie rénale de 50 min puis une reperfusion, la surexpression de COMMD5 au niveau des tubules proximaux a mené à doubler leur survie par rapport aux souris contrôles<sup>(108)</sup>. De même, les marqueurs de dommages rénaux tels que la créatinine plasmatique et l'urée sanguine ont diminué plus rapidement chez les souris surexprimant COMMD5<sup>(108)</sup>. D'un point de vue anatomopathologique, l'analyse des reins a montré un dommage nettement diminué chez ces mêmes souris<sup>(108)</sup>. Au niveau cellulaire, la surexpression de COMMD5 a diminué la prolifération et l'inflammation tout en accélérant re-différenciation cellulaire. Nos études ont démontré que COMMD5 ne faisait pas que protéger contre les dommages aigus, mais accélérât plutôt dynamiquement le mécanisme de réparation rénale par l'intermédiaire des processus précédemment décrits<sup>(108)</sup> (**Figure 6**).





*Figure 6 : Accélération de la réparation rénale par COMMD5.*

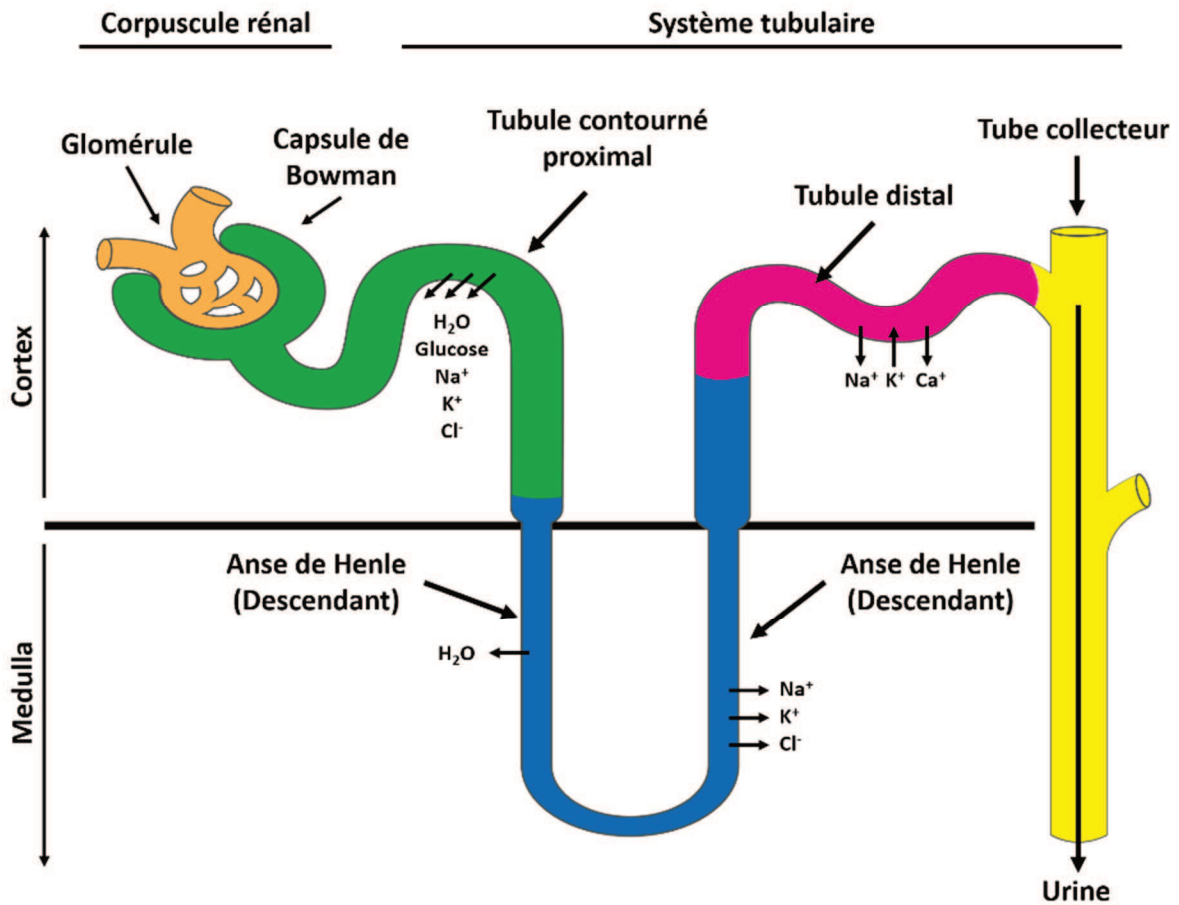
La surexpression de la protéine COMMD5 dans les tubules proximaux de souris accélère la réparation rénale après un dommage aigu d'ischémie-reperfusion. La protéine COMMD5 va dans un premier temps inhiber la prolifération des cellules par l'intermédiaire de la protéine P21. COMMD5 va entraîner également une diminution de l'inflammation. Afin de réparer la plaie, COMMD5 va favoriser la migration de cellules puis re-différencier celles-ci.

## **F - Le rein**

### **1 - Anatomie du rein**

Le rein est un organe en forme de haricot faisant partie du système urinaire en association avec les deux uretères, la vessie et l'urètre. Chez l'humain, ils mesurent environ 12 cm de hauteur, 6 cm de largeur et 3 cm d'épaisseur et pèsent environ 150 g chacun. Les reins se trouvent dans la partie dorsale de l'abdomen au niveau des deux dernières côtes de part et d'autre de la colonne vertébrale. Une couche de tissu fibreux appelée capsule rénale protège le rein et est surplombée par la glande surrénale protégée par le fascia de Gerota. En coupe sagittale, le rein se compose des deux zones : la zone claire se trouvant à l'extérieur est la partie corticale et la zone sombre située vers l'intérieur est la partie médullaire. Le bassinnet, au centre de chaque rein, permet la récupération de l'urine formée et la transite vers l'urètre. Le rein est composé d'environ un million de néphrons qui permettent la filtration du sang et l'amenant à la formation de l'urine. La répartition des néphrons montre qu'ils sont majoritairement dans la zone corticale puisqu'environ 85 % sont corticaux et 15 % sont juxtamédullaires. Structurellement, chaque néphron se compose d'un corpuscule de Malpighi et d'un système tubulaire. Ce corpuscule rénal regroupe un glomérule, une capsule de Bowman et des podocytes. Le glomérule est composé d'un petit amas de capillaires permettant la filtration du sang et formant l'urine primitive. Il se trouve englobé par la capsule de Bowman qui permet de recueillir l'urine primitive et de faire le lien avec le système tubulaire. Au niveau des capillaires sanguins des glomérules, les podocytes sont des petites cellules jouant un rôle indispensable dans la filtration glomérulaire via leurs pédicelles en

retenant les protéines et les globules rouges. Le système tubulaire, se compose d'une succession de tubules allant du glomérule au tube collecteur. Le passage par les différents tubules rénaux permet la réabsorption d'une grande partie de l'eau filtrée par le glomérule ainsi que la sécrétion et la réabsorption de certaines molécules dont principalement les minéraux. Se situant exclusivement au niveau du cortex rénal, le tubule contourné proximal est le premier segment à partir du glomérule et dont le rôle est la réabsorption de l'eau, du glucose, du sodium, du potassium et du chlore. Il se trouve suivi par l'anse de Henle qui est composée de deux branches ayant des rôles différents. La première branche, dite descendante, est mince et permet la réabsorption de l'eau. La seconde branche, cette fois-ci, ascendante est dans sa première partie mince puis épaisse. Elle permet la réabsorption du sodium, du chlore et du potassium. Le tubule distal quant à lui va permettre une réabsorption de sodium et de chlore et une sécrétion de potassium. L'urine ainsi formée est alors envoyée dans le tube collecteur puis les uretères et stockée dans la vessie (**Figure 7**).



*Figure 7 : Structure anatomique du néphron.*

Le néphron se compose de 2 parties distinctes. Au niveau du corpuscule rénal se trouve le glomérule niché dans la capsule de Bowman. Cette capsule permet les échanges et la formation d'urines primitives. Le système tubulaire se compose d'une succession de tubules permettant les échanges. Une fois formée, les urines sont récupérées au niveau du tube collecteur.

## 2 - Les diverses fonctions rénales

Les reins ne participent pas qu'à l'élimination des toxines, mais jouent également un rôle majeur dans la régulation de la pression artérielle notamment grâce au système rénine-angiotensine-aldostérone. Une baisse de la pression artérielle entraîne la sécrétion de la rénine par l'appareil juxtaglomérulaire situé à proximité du glomérule rénal. L'angiotensinogène, le peptide précurseur de l'angiotensine est libéré par le foie et est clivé par la rénine en angiotensine I puis en angiotensine II par l'enzyme de conversion sécrétée par les poumons. L'angiotensine II formée, va alors se lier aux récepteurs AT1R afin de stimuler la réabsorption tubulaire du sodium et du chlore tout en induisant l'excrétion du potassium et retenant l'eau. Ce mécanisme est renforcé par la libération d'aldostérone au niveau du cortex surrénalien. L'angiotensine II va agir directement au niveau des artérioles en entraînant leurs vasoconstrictions puis au niveau de l'hypophyse, favoriser la sécrétion de la vasopressine conduisant à la réabsorption d'eau par le tube collecteur.

Les reins participent également à la synthèse d'érythropoïétine (EPO). Une baisse du dioxygène ( $O_2$ ) au niveau de l'artère rénale entraîne une sécrétion EPO dans le sang favorisant l'érythropoïèse dans la moelle osseuse. Lorsque l' $O_2$  diminue de façon importante dans le rein, le facteur de transcription GATA-2, exerçant une régulation négative de l'EPO<sup>(111)</sup>, se trouve diminué et le facteur de transcription HIF est augmenté favorisant la stimulation d'EPO<sup>(112), (113)</sup>. L'érythropoïèse va permettre la production de globules rouges à partir de cellules souches hématopoïétiques et donc d'augmenter la capacité de transport d' $O_2$  dans le sang<sup>(114)</sup>.

De plus, les reins participent également à l'homéostasie calcique en libérant du calcitriol. Lorsque la concentration extracellulaire de calcium devient faible, les glandes parathyroïdiennes libèrent de l'hormone parathyroïdienne (PTH) dans le sang, ayant pour conséquence d'induire une réabsorption du calcium au niveau du tubule distal et de stimuler l'hydroxylase rénale (CYP27B1). L'hydroxylase rénale va transformer le calcifediol en calcitriol, qui est la forme active de la vitamine D. Le calcitriol et la PTH vont de concert permettre la libération du calcium osseux et ainsi augmenter le calcium extracellulaire<sup>(115)</sup>.

### **3 - Le cancer du rein**

#### ***a - Incidence et facteurs de risque***

Le cancer du rein affecte approximativement 300 000 nouvelles personnes dans le monde et entraîne environ 140 000 décès chaque année<sup>(116)</sup>. Il représente environ 3 % de l'ensemble des cancers et se classe au 6<sup>ème</sup> rang chez l'homme et au 10<sup>ème</sup> rang chez la femme<sup>(116)</sup>. Ces incidences diffèrent énormément en fonction de l'âge, du sexe, de l'ethnicité et de la région géographique<sup>(117)</sup>. En effet, des études épidémiologiques ont révélé des disparités entre les régions géographiques où les taux les plus élevés se retrouvent en Amérique du Nord et en République Tchèque<sup>(117)</sup>. Parallèlement, il a été observé que les hommes sont deux fois plus à risque de développer un cancer du rein par rapport aux femmes et était plus courant chez les personnes âgées entre 60 ans et 80 ans<sup>(118)</sup>.

Comme dans un grand nombre de cancers, les facteurs de risque sont nombreux et variés. Les facteurs associés au cancer du rein les mieux documentés dans la littérature sont le tabac, l'obésité et l'hypertension<sup>(119)</sup>. En effet, selon les études épidémiologiques, la

consommation de tabac augmenterait le risque de développer un cancer du rein d'environ 50 % chez l'homme et 20 % chez la femme<sup>(120), (119), (121)</sup>. De même, un indice de masse corporelle (IMC) élevé favoriserait le développement de ce cancer<sup>(122), (123), (124), (125)</sup>. Enfin, l'hypertension augmenterait le risque d'environ 75 % de développer un cancer rénal par rapport aux personnes non hypertendues<sup>(126), (127)</sup>. L'utilisation prolongée de certains médicaments (notamment des antihypertenseurs)<sup>(128)</sup>, les antécédents familiaux faisant mention de cancers rénaux et certaines prédispositions génétiques<sup>(129), (130)</sup> sont également des facteurs de risque. Parmi les altérations génétiques, le syndrome Von Hippel-Lindeau est responsable de la majorité des cancers du rein d'origine génétique<sup>(131)</sup>. Le syndrome de Von Hippel-Lindeau est une maladie autosomale dominante causée par la mutation du gène suppresseur de tumeur VHL<sup>(132), (133)</sup> qui affecte environ une naissance sur 36 000<sup>(134), (135)</sup>. La mutation de ce gène induit une diminution de l'expression protéique de VHL, entraînant ainsi une accumulation du facteur de transcription HIF1. L'accumulation de HIF1 a pour conséquence d'activer différents gènes impliqués dans l'angiogenèse, la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion.

### ***b - Caractéristiques***

Parmi les tumeurs malignes du rein, environ 90 % sont des carcinomes à cellules rénales (RCC) et 10 % sont des sarcomes à cellules claires, des lymphomes ou des métastases<sup>(136)</sup>. Les RCC peuvent se subdiviser en plusieurs sous-types ayant des proportions différentes. L'identification du sous-type est indispensable pour mettre en place la meilleure stratégie thérapeutique possible.

Environ 70 % à 75 % des RCC sont des carcinomes à cellules claires (ccRCC)<sup>(136), (137)</sup> et proviennent des cellules des tubules proximaux<sup>(136)</sup>. Ces tumeurs présentent une hypervascularisation et la survenue des métastases est relativement courante au niveau, du cerveau, des poumons, du foie ou des os<sup>(137)</sup>. D'un point de vue histologique, les tumeurs sont composées de cellules ayant un cytoplasme clair et présentant des granules éosinophiles<sup>(136)</sup> (**Figure 8**).

Le carcinome papillaire représente à lui seul, 10 % à 15 % des RCC et peut se diviser en deux sous-types différents<sup>(138), (139)</sup>. Le premier type, dit « basophile », se caractérise par des cellules de petite taille avec peu de cytoplasmes et de noyaux hyperchromatiques. Il est généralement détecté à un stade précoce et est associé à un bon pronostic de survie<sup>(137)</sup>. Le second type dit « éosinophile » se caractérise par un cytoplasme granulaire éosinophile abondant, avec des nucléoles saillants associés à des zones de nécrose. Ce type de cancer est souvent diagnostiqué tardivement et est fréquemment associé à des métastases ganglionnaires ou à une invasion des veines rénales<sup>(140)</sup> (**Figure 8**).

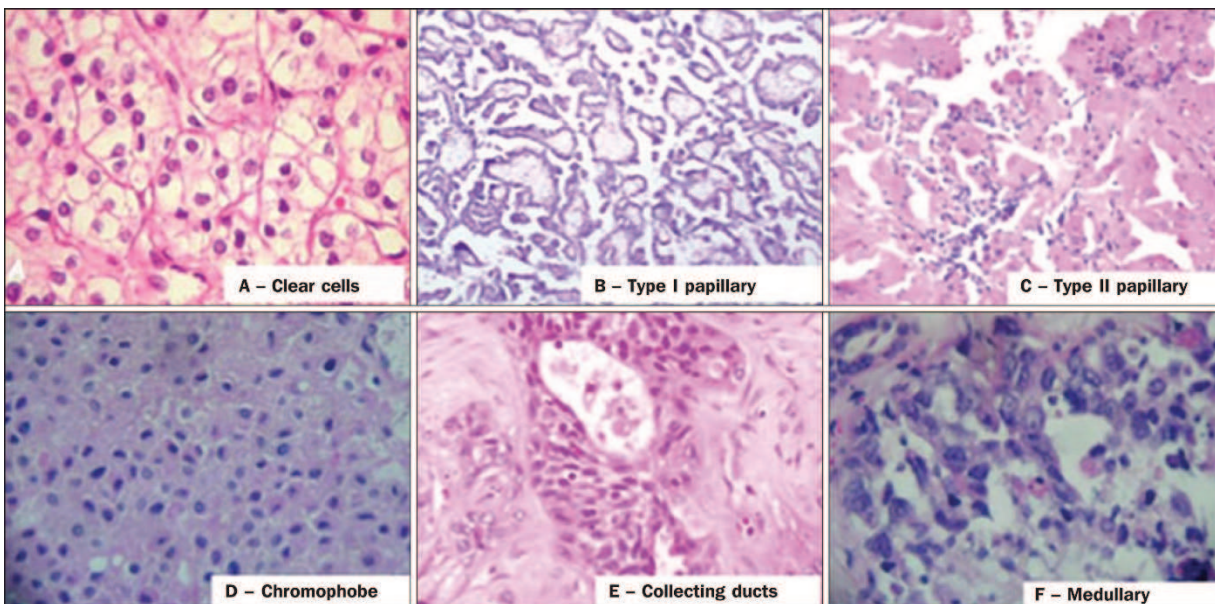
Le carcinome chromophile représente environ 5 % des RCC et est bien moins agressif que le ccRCC<sup>(137), (141)</sup>. Les cellules sont de grandes tailles, de couleur pâle, accompagné d'un cytoplasme réticulé et des halos périnucléaires<sup>(141), (142)</sup>. Des métastases ne surviennent que dans 7 % des cas et il présente le meilleur pronostic parmi l'ensemble des RCC<sup>(136)</sup> (**Figure 8**).

Le carcinome du tube collecteur (carcinome de Bellini) est très rare et représente moins de 1 % de toutes les tumeurs malignes du rein<sup>(136)</sup>. Il se caractérise par un agencement



irrégulier de cellules infiltrantes dans les parois des canaux collecteurs. Il est hautement agressif et son pronostic de survie est plutôt défavorable<sup>(143)</sup>. En effet, 30 % des patients diagnostiqués présentent des métastases et 60 à 70 % d'entre eux décèdent dans les deux ans<sup>(144)</sup> (**Figure 8**).

Les autres sous-types représentent une proportion infime de l'ensemble des RCC. C'est le cas du carcinome médullaire rénal, du carcinome mucineux tubulaire et à cellules fusiformes, du RCC associé au neuroblastome et autres tumeurs inclassifiables.



**Figure 8 : Histologie des différents sous-types de carcinomes à cellules rénales.**

Images des différents sous-types de carcinomes à cellules claires. Les cellules claires de carcinomes à cellules rénales (ccRCC) se trouvent dans le panneau A. Les deux types de carcinomes papillaires sont représentés en (Type basophile) B et (Type éosinophile). Le carcinome chromophile est représenté dans le panneau D. Le carcinome du tube collecteur (carcinome de Bellini) se trouve en E. Enfin, le carcinome médullaire est représenté en F. (*Adapté de Muglia et coll, 2015*)<sup>(136)</sup>

### c - Stades et traitements

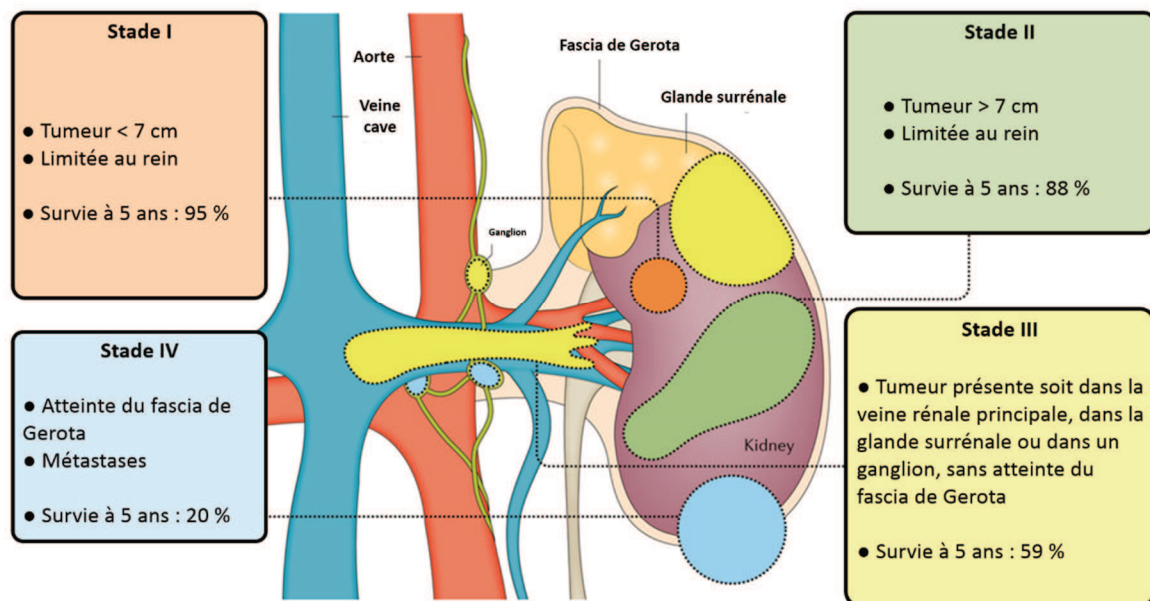
La classification du stade de la tumeur repose sur quatre critères majeurs dont la taille, l'expansion en dehors du rein, l'atteinte des ganglions lymphatiques et la présence de métastases.

Le stade I correspond à une tumeur inférieure à 7 cm de largeur et se limite uniquement au rein. Il n'y a pas d'atteinte de la glande surrénale ni des ganglions lymphatiques et aucune présence de métastase. Le traitement principal est chirurgical basé soit sur une néphrectomie partielle permettant ainsi de laisser une partie du rein fonctionnel ou une néphrectomie totale du rein. Si la chirurgie n'est pas réalisable, différents traitements permettent de réduire la taille de la tumeur et de soulager les symptômes dont l'embolisation artérielle et radiothérapie. La survie moyenne à cinq ans à ce stade est d'environ 95 %<sup>(143)</sup> (**Figure 9**).

Lorsque la tumeur dépasse 7 cm de largeur et comporte les mêmes caractéristiques que le stade I, on parle alors de stade II. Le traitement est une néphrectomie partielle ou totale avec une ablation de la glande surrénale, de la capsule rénale et du fascia de Gerota. La survie moyenne à cinq ans est légèrement inférieure au stade I soit de 88 %<sup>(143)</sup> (**Figure 9**).

Dans le cas où la tumeur a atteint soit les veines rénales principales, soit la glande surrénale ou un seul ganglion, sans dommage du fascia de Gerota, on parle alors de stade III. Le traitement consiste en une néphrectomie totale ainsi qu'une ablation de la glande surrénale, d'un thrombus des veines rénales touchées et d'un curage ganglionnaire. La survie à cinq ans est d'environ 59 %<sup>(143)</sup> (**Figure 9**).

Le stade IV est le dernier et le plus haut stade se caractérisant par une tumeur perforant le fascia de Gerota ou atteignant la région lymphatique et la présence de métastases. Le traitement consiste alors en une néphrectomie radicale avec une ablation de la glande surrénale, du thrombus des veines rénales touchées et une dissection du ganglion affecté. Les métastases sont généralement retrouvées au niveau du foie, du poumon, des os ou le cerveau et les traitements actuels sont axés sur l'immunothérapie, la chimiothérapie ou la thérapie ciblée. La survie à cinq ans est d'environ 20 %<sup>(143)</sup> (**Figure 9**).



**Figure 9 : La stadification du carcinome rénal.**

Représentation schématique des 4 stades du carcinome rénal. (Adapté de Hsieh et coll, 2017)<sup>(240)</sup>

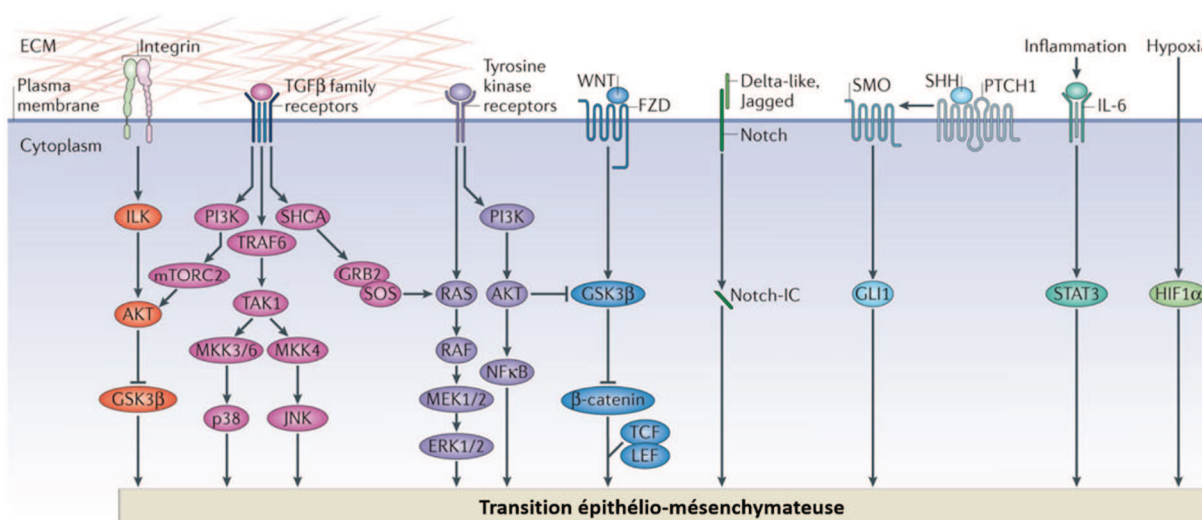
## **G - La transition épithélio-mésenchymateuse et la progression tumorale**

### **1 - Définition**

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus biologique évolutif et réversible, qui entraîne une dé-différenciation des cellules épithéliales en cellules ayant un phénotype mésenchymateux. Un processus inverse nommé transition mésenchymo-épithéliale (MET) a été décrit dans la littérature comme induisant une re-différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules ayant des caractéristiques épithéliales. Les cellules épithéliales sont des cellules polarisées présentant une MP apicale et une MP basale reposant sur une matrice extracellulaire. Elles peuvent se présenter sous quatre morphologies différentes, classifiées comme étant pavimenteuses, cubiques, cylindriques ou polymorphes, et se regroupent en couche simple, stratifiée ou pseudostratifiée. Elles sont associées les unes aux autres par différentes jonctions cellulaires (serrées, d'ancrages ou communicantes) formant ainsi une barrière épithéliale. L'épithélium ainsi formé joue un rôle de mouvement grâce à la présence de microvillosités, d'échange en laissant passer certaines protéines et molécules, de protection chimique ou mécanique et de sécrétion. Dans la littérature, trois types de EMT intervenant chacun dans des processus biologiques distincts ont été décrits. Le premier type d'EMT est présent au cours de l'embryogenèse et le développement des organes<sup>(145), (146)</sup>, le second type intervient durant la régénération tissulaire et la fibrose des organes<sup>(146)</sup> et enfin le dernier type participe à la progression du cancer et des métastases<sup>(146)</sup>.

## 2 - Mécanisme de transition épithélio-mésenchymateuse

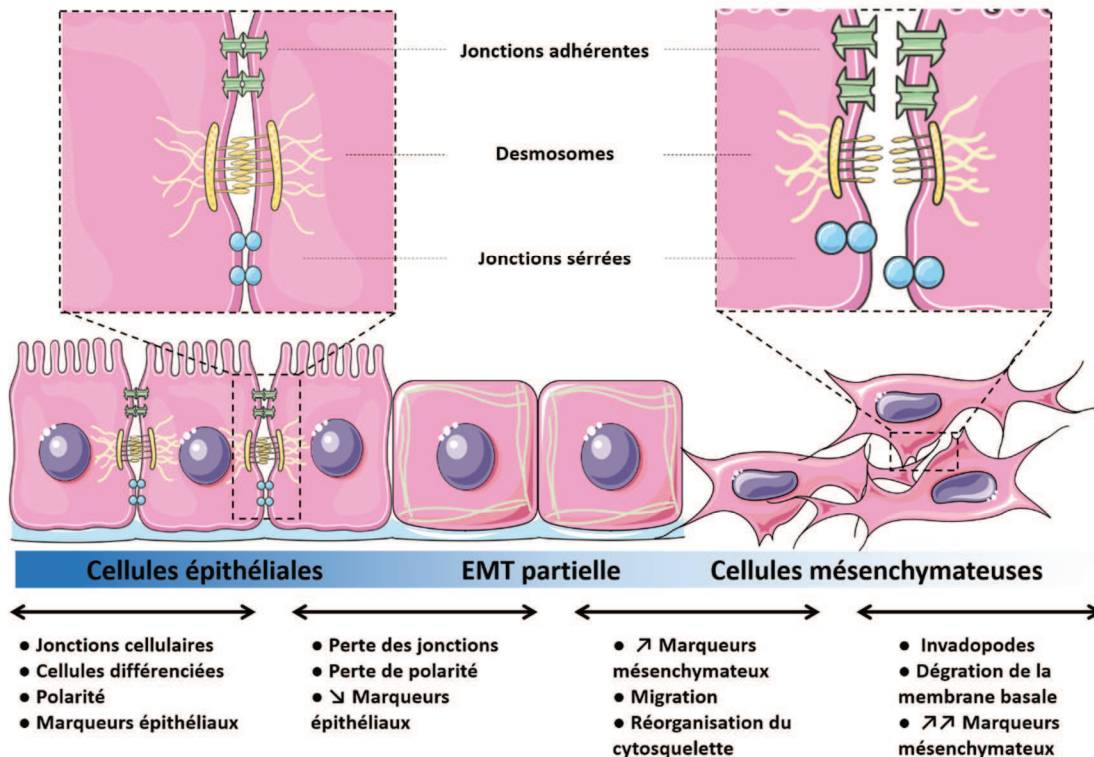
Depuis la découverte de ce processus, un grand nombre de facteurs ont été identifiés comme étant capables d'induire une EMT. C'est le cas notamment de ceux participant à l'inflammation, par l'intermédiaire des cytokines IL1 $\beta$ <sup>(147)</sup>, IL6<sup>(148), (149)</sup> ou IL8<sup>(150)</sup> entre autres, qui induit une EMT au cours du développement de cancer et la fibrose. Certains facteurs de croissance se lient aux récepteurs de la famille des tyrosines kinases comme le FGF, le HGF ou l'EGF entraînent une EMT par l'activation des voies PI3K et MAPK<sup>(151)</sup>. L'induction de l'EMT par le TGF $\beta$  est l'une des plus étudiées et est présente dans le mécanisme de fibrose et du développement tumoral<sup>(152), (153)</sup>. Enfin l'hypoxie, par la stabilisation du facteur de transcription HIF1 $\alpha$ , induit une EMT en réprimant directement le gène codant pour l'E-cadhérine et activant les facteurs de transcription TWIST, SNAIL et ZEB<sup>(154), (155), (156)</sup> (**Figure 10**).



**Figure 10 : Les différents inducteurs de la transition épithélio-mésenchymateuse.**

Représentation des différents inducteurs impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse ainsi que leurs voies de signalisation sous-jacentes. (Adapté de Lamouille et coll, 2014)<sup>(151)</sup>

L'EMT est un mécanisme se déroulant en plusieurs étapes continues, mais réversibles. Lorsqu'un signal initie l'EMT, les cellules épithéliales subissent une déstructuration des jonctions cellulaires entraînant un relâchement de la barrière épithéliale et une perte de polarité<sup>(157), (158)</sup>. Conséquemment, les cellules subissent une réorganisation du cytosquelette d'actine corticale et présentent une augmentation de fibres de stress d'actine<sup>(159)</sup>. Les cellules sont alors partiellement dé-différenciées et possèdent un phénotype intermédiaire; on parle alors d'EMT partielle. L'apparition de lamellipodes et de filopodes favorise la migration des cellules<sup>(160)</sup>. Enfin, la présence d'invadopodes et la sécrétion des métalloprotéases permettent aux cellules de dégrader la matrice extracellulaire et de favoriser l'invasion<sup>(161), (162)</sup> (**Figure 11**).



**Figure 11 : Le processus de transition épithélio-mésenchymateuse.**

Représentation schématique des différentes étapes successives de la transition épithélio-mésenchymateuse permettant le passage d'une cellule épithéliale à une cellule ayant un phénotype mésenchymateux. (Adapté de Vergara et coll, 2016)<sup>(241)</sup>

Dès le début de l'EMT, l'activation des facteurs de transcription tels que SNAIL, TWIST et ZEB permet la répression des gènes épithéliaux dont principalement CDH1, codant pour l'E-cadhérine, et l'activation de l'expression de gènes mésenchymateux. La diminution de l'E-cadhérine est la caractéristique principale et essentielle de l'EMT.

Ces facteurs de transcription sont exprimés de façons différentes selon le type cellulaire et le stimulus reçu. D'autres facteurs de transcriptions ont été identifiés comme participant à l'EMT, mais leurs rôles n'ont pas été clairement établis (**Tableau III**).

La famille du facteur de transcription SNAIL se compose de trois membres SNAIL (SNAIL1), SLUG (SNAIL2) et SMUC (SNAIL3)<sup>(163)</sup>. Ces trois protéines partagent une grande similarité et possèdent en position carboxy-terminale un domaine contenant quatre à six motifs « doigt de zinc » de types « Cys2His2 »<sup>(164)</sup>. Ce domaine peut se fixer sur le motif E-box 5'-CAGGTG-3' présent sur le promoteur du gène CDH1 codant pour l'E-cadhérine. Les protéines SNAIL et SLUG se caractérisent également par la présence d'une séquence nommée SNAG en position amino-terminale capable d'induire une répression transcriptionnelle en recrutant des corépresseurs comme AJUBA<sup>(165)</sup>, des histones désacétylases (HDAC1 et HDAC2)<sup>(166)</sup>, PRMT5<sup>(167)</sup> et PRC2<sup>(168)</sup>. *Via* leur domaine commun, les protéines SNAIL et SLUG peuvent réguler négativement d'autres protéines participant aux jonctions cellulaires tel que Claudine-1<sup>(151)</sup>, Occludine<sup>(151)</sup> et ZO-1<sup>(169)</sup>. À l'opposé, certains gènes sont quant à eux régulés positivement par SNAIL et SLUG comme les métalloprotéases MMP2, MMP9<sup>(170)</sup> et les facteurs de transcription ZEB et TWIST<sup>(151)</sup> (**Tableau III**).

La famille du facteur de transcription ZEB est composée de deux membres, ZEB1 ( $\delta$ EF1) et ZEB2 (SIF1)<sup>(171)</sup>. Ils sont constitués de trois domaines particuliers, dont deux, comportant des motifs « doigt de zinc » permettant une interaction avec l'ADN et un homéodomaine<sup>(171)</sup>. Au même titre que SNAIL, ZEB est capable de se fixer sur le motif E-box 5'-CAGGTG-3' présents sur le promoteur du gène CDH1 et le réprimer par l'intermédiaire du corépresseur CtBP<sup>(172)</sup>. Néanmoins, la présence de sites d'interaction avec des coactivateurs permet l'activation de l'expression de la N-cadhérine, et entre autres, des métalloprotéases<sup>(151)</sup> (**Tableau III**).

Les facteurs de transcription dit « hélices-boucles-hélices » (*bHLH*) TWIST1 et TWIST2 participent également à la régulation du gène CDH1. Leur structure commune se lie à l'ADN sur le motif E-box et ils agissent à la fois comme activateurs et répresseurs transcriptionnels. TWIST1 et TWIST2 répriment l'expression de CDH1 par l'intermédiaire d'un complexe composé des protéines Mi2 et NuRD<sup>(173)</sup>. TWIST1 et TWIST2 possèdent une séquence de type « élément de réponse à HIF » (HRE) permettant d'être surexprimés en condition d'hypoxie<sup>(156)</sup>. TWIST1 permet d'augmenter l'expression de la Fibronectine, de la N-Cadhérine et de l'Intégrine  $\alpha 5$ <sup>(151)</sup> (**Tableau III**).



**Tableau III : Liste des facteurs de transcription impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse.**

Liste des facteurs de transcription identifiés dans la régulation de la transition épithélio- mésenchymateuse ainsi que les différents gènes régulés. (Adapté de Lamouille S et coll, 2014)<sup>(151)</sup>

Facteurs de transcription	Expressions régulées négativement au cours de l'EMT	Expressions régulées positivement au cours de l'EMT
<b>SNAIL et SLUG</b>	E-cadherin, Claudine, Occludine, Crumbs3, PALS1, PATJ, Cytokeratine, Desmoplakine et Plakophiline	Fibronectine, N-cadhérine, Collagène, MMP15, MMP2, MMP9, TWIST, ID1, ID2, ZEB1 et ZEB2
<b>TWIST1</b>	E-cadhérine, Claudine, Occludine, Desmoplakine et Plakoglobine	Fibronectine, N-cadhérine et Integrine $\alpha 5$
<b>ZEB1 et ZEB2</b>	E-cadhérine, ZO-1, Crumbs3 et Plakophiline	N-cadhérine et MMPs
<b>FOXD3</b>	Inconnu	Inconnu
<b>FOXC2</b>	E-cadhérine	Fibronectine, Vimentine, N-cadhérine et $\alpha$ SMA
<b>FOXF1</b>	E-cadhérine, Claudine, Occludine et Desmoplakine	Fibronectine et N-cadhérine
<b>FOXQ1</b>	E-cadhérine	Fibronectine, N-cadhérine et Vimentine
<b>FOXO3A</b>	E-cadhérine	SNAIL1
<b>FOXA1</b>	E-cadhérine	Fibronectine, Vimentine et SNAIL1
<b>FOXA2</b>	E-cadhérine et ZO-1	Fibronectine, Vimentine, N-cadhérine, SNAIL1 et SNAIL2
<b>Serpent, GATA4 et GATA6</b>	E-cadhérine, Crumbs et Claudine	N-cadhérine et MMP1
<b>HMGA2</b>	E-cadhérine	SNAIL1, SNAIL2 et TWIST
<b>SOX9</b>	Inconnu	SNAIL2
<b>KLF8</b>	E-cadhérine	MMP9
<b>CBFA-KAP1</b>	Inconnu	FSP1
<b>ZNF703</b>	E-cadhérine	Vimentine, N-cadhérine, SNAIL1 et Cytokeratine
<b>PRX1</b>	E-cadhérine	Vimentine et Laminine

### 3 - Rôle de l'EMT dans la progression tumorale

Le cancer se caractérise par l'acquisition de plusieurs propriétés cellulaires dont une croissance autosuffisante, une insensibilité aux inhibiteurs de croissance, un échappement à l'apoptose, une réplication excessive, une présence importante d'angiogenèse, une invasion cellulaire et une apparition de métastases<sup>(174)</sup>. Dans de nombreux cancers dont ceux du sein, du côlon et de l'estomac, les facteurs de transcription de l'EMT sont fortement exprimés<sup>(175)</sup>. Dans les carcinomes rénaux, les expressions de SNAIL, TWIST et ZEB sont inversement corrélées à la survie des patients<sup>(176), (177), (178)</sup>. Ils possèdent la capacité de réprimer le gène CDH1 codant pour l'E-cadhérine. Cette diminution de l'expression d'E-cadhérine est le point majeur de la progression tumorale et entraîne un détachement des cellules épithéliales aidé par la perte d'autres protéines de jonctions cellulaires<sup>(179)</sup>. Lorsque les cellules sont partiellement différenciées, elles pourront migrer et envahir d'autres organes. La présence d'invadopodes et l'expression de métalloprotéases dont MMP2 et MMP9, permettront de dégrader la matrice extracellulaire et induire une intravasation vers la circulation sanguine. La forte expression de MMP2 et MMP9 dans les tumeurs est souvent associée à la progression de la tumeur et à l'apparition de métastases<sup>(180), (181), (182)</sup>. La dissémination va permettre aux cellules de coloniser d'autres organes à travers un mécanisme d'extravasation. Les métalloprotéases vont alors dégrader la membrane basale et les cellules s'implanteront. Une fois les cellules présentes dans le second site, elles subissent une redifférenciation par l'intermédiaire du processus inverse MET afin de développer une nouvelle tumeur<sup>(183)</sup>. Ce processus constituant la dernière étape métastatique, ne fait pas encore l'unanimité de

l'ensemble des scientifiques. Il n'en demeure pas moins que le contrôle de l'EMT semble indispensable pour lutter contre la progression de la tumeur.

## **H - Le récepteur EGFR et le carcinome à cellules rénales**

### **1 - Caractéristiques**

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) ou ErbB-1 est une glycoprotéine transmembranaire d'environ 170 kDa faisant partie de la famille des récepteurs tyrosine kinase ErbB. Il existe trois autres protéines associées à la famille ErbB dont ErbB-2, ErbB-3 et ErbB-4<sup>(184)</sup>. Ces protéines se caractérisent par quatre domaines extracellulaires servant de site de liaison du ligand en partie amino-terminale, suivis d'une région transmembranaire et d'une région intracellulaire dotée d'une fonction tyrosine kinase en position carboxy-terminale<sup>(184)</sup>. Parmi ces quatre récepteurs, ErbB-2 ne présente pas de site de fixation pour un quelconque ligand connu et ErbB-3 ne possède pas de fonction tyrosine kinase<sup>(185)</sup>. Ces récepteurs interviennent dans de nombreux processus biologiques dont la régulation de la prolifération, la survie cellulaire, la différenciation, la migration et l'apoptose. Le récepteur EGFR, de par l'interaction avec son ligand EGF, participe également dans la transition épithélio-mésenchymateuse<sup>(186)</sup>, à la régulation des métalloprotéases<sup>(187), (188)</sup> et au développement tumoral<sup>(189)</sup>.

### **2 - Ligands, activation et signalisation**

En condition basale, les récepteurs ErbB sont exprimés au niveau de la MP des cellules de façon monomérique et non activés. Il existe actuellement 13 ligands se fixant sur ces récepteurs, dont sept à l'EGFR<sup>(190)</sup>. Parmi ceux-ci, le facteur de croissance épidermique (EGF),

le facteur de croissance de transformation alpha (TGF $\alpha$ ), l'amphiréguline (AREG) et l'épigène (EPGN) sont spécifiques à EGFR. En revanche, le facteur de croissance de type EGF liant l'héparine (HBEGF), la bétacelluline (BTC) et l'épiréguline (EREG) peuvent également se fixer sur Erb3 et ErbB4<sup>(190)</sup>. Lorsque l'un des ligands se lie, l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation du récepteur EGFR entraîne une auto/transphosphorylation des résidus tyrosines présents dans la partie intracellulaire. Il existe plusieurs sites de phosphorylation ayant chacun un rôle essentiel dans la transduction du signal. En effet, la phosphorylation a pour conséquences l'activation des voies de signalisation RAS/ERK, PI3K/AKT, JAK/STAT et PLC $\gamma$ /PKC responsables de la prolifération, l'apoptose ou la différenciation cellulaire<sup>(191), (192)</sup>. De plus, la phosphorylation entraîne également à la fois l'internalisation du récepteur, son ubiquitination et sa dégradation, ou son recyclage vers la MP. Le mécanisme d'endocytose du récepteur est donc très important dans la régulation de la durée du signal<sup>(193), (194), (195)</sup>.

### **3 - EGFR et le cancer**

Depuis de nombreuses années, le rôle du récepteur à l'EGF est au centre de toutes les attentions. Des études ont montré qu'il présentait une forte activation dans de nombreux cancers dont celui du sein<sup>(189)</sup>, de l'ovaire<sup>(196)</sup>, du poumon<sup>(197)</sup> et du cerveau<sup>(198)</sup>. En condition normale, les cellules expriment entre 40 000 à 100 000 récepteurs EGFR<sup>(199), (185)</sup>. L'activation inappropriée d'EGFR a très souvent pour origine une anomalie génomique traduite par une mutation ponctuelle, une amplification, une insertion ou une délétion<sup>(184)</sup>. Le défaut dans la régulation endocytaire empêchant la dissociation du ligand avec le récepteur ou une surproduction de ligand peut également favoriser l'activation prolongée d'une multitude de

récepteurs<sup>(200)</sup>. La présence de mutations secondaires peut également apparaître suite à des traitements<sup>(201), (201)</sup>. Les mutations se produisent dans des régions bien précises du domaine extracellulaire ou du domaine kinase. Une délétion des exons 2 à 7 entraîne une perte de la partie extracellulaire permettant au ligand de se lier au récepteur. Cette mutation, EGFRvIII, présente une activation constitutive du domaine tyrosine kinase et fait l'objet d'un trafic endosomal anormal ou la majorité des récepteurs sont recyclés vers la MP plutôt que d'être dégradés<sup>(202),(203)</sup>. La présence de la mutation EGFRvIII s'est avérée importante dans la progression de la tumeur et est souvent corrélée à un mauvais pronostic<sup>(204)</sup>. De nombreuses mutations ont été trouvées dans la région tyrosine kinase, plus précisément dans les exons 18 à 21. La mutation T790M présente dans le cancer du poumon<sup>(205)</sup> entraîne une résistance aux médicaments de type inhibiteur de tyrosine kinase (TKI) et augmente le niveau basal de l'activité. De même, la mutation D770InsNPG, entraînant une insertion dans l'exon 20, induit une résistance TKI.

D'autres facteurs affectent la régulation du signal intracellulaire d'EGFR. La faible expression du gène suppresseur de tumeur PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) n'assume plus son rôle d'antagoniste au PI3K et favorise donc la transduction du signal par AKT.

L'implication du récepteur EGFR dans la progression du cancer étant très importante; plusieurs approches thérapeutiques ont été développées afin de cibler et réduire les conséquences médiées par l'EGFR. Deux types de stratégies thérapeutiques existent : les anticorps monoclonaux ciblant la partie extracellulaire du récepteur et les inhibiteurs de la tyrosine kinase (TKI) ciblant le domaine tyrosine kinase.

## **I - Mise en contexte du projet de recherche**

Les études portant sur les protéines COMMD ont montré que ces dernières participaient à de nombreux processus biologiques dont l'homéostasie, le trafic endosomal, la prolifération et la migration cellulaire. L'analyse de l'expression des différentes protéines COMMD nous indique qu'elles sont fortement modulées dans le cancer. La diminution ou l'augmentation de celles-ci entraînent à la fois des effets oncogéniques et suppresseurs de tumeur. De plus, la corrélation entre le niveau d'expression de certaines protéines COMMD et la survie des patients a aussi été démontrée.

Dès la découverte de COMMD5, nous avons observé qu'elle était moins exprimée dans les tissus cancéreux du foie, du cerveau et l'estomac par rapport aux tissus sains. La surexpression de COMMD5 participe à la régulation du cycle cellulaire en bloquant les cellules en phase G2/M par l'augmentation de l'expression de P21 et conduit à une augmentation de la migration. COMMD5 favorise la différenciation cellulaire caractérisée par l'apparition de jonctions matures et de microvillosités. Récemment, nous avons montré que la surexpression de COMMD5 au niveau des tubules proximaux rénaux de souris induisait une accélération de la réparation rénale et doublait la survie des souris après une ischémie-reperfusion. Les mécanismes impliqués dans cette réparation rénale font intervenir les processus de prolifération, de migration et de différenciation cellulaire.

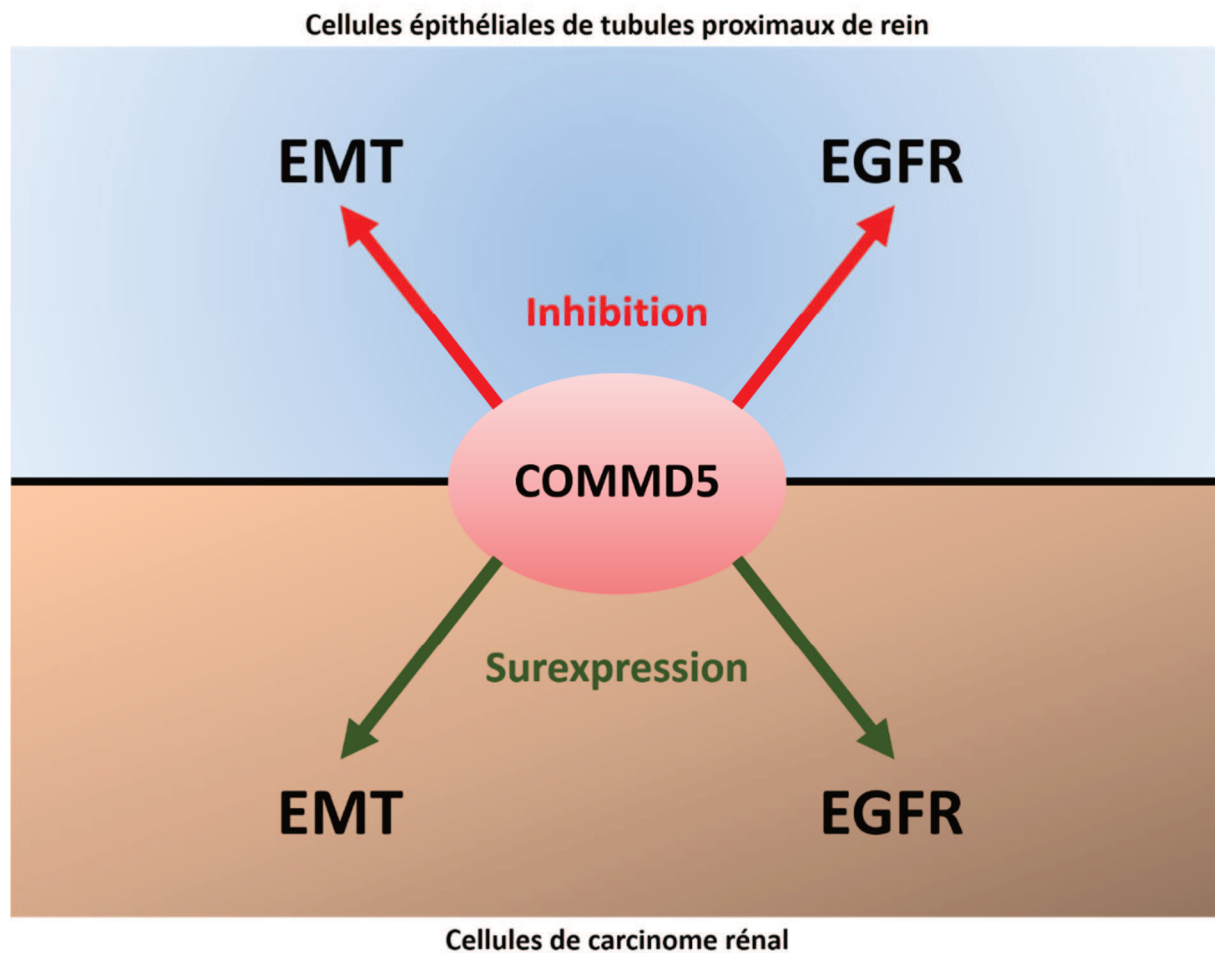
Partant de ces constatations observées dans le modèle de dommage rénal aigu, nous nous sommes intéressés au rôle de COMMD5 dans le cancer du rein. L'hypothèse postulée

dans cette thèse est que COMMD5 se comporte comme un gène suppresseur de tumeur dans le carcinome à cellules rénales.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié le rôle de COMMD5 dans l'EMT et dans la régulation du récepteur EGFR. En effet, l'EMT et l'activation prolongée d'EGFR sont des processus importants dans le développement du carcinome rénal et sont donc des cibles thérapeutiques importantes. Nous avons voulu savoir dans un premier temps, quelles étaient les raisons et les conséquences de la perte de COMMD5 dans des cellules épithéliales de tubules proximaux de reins humains. Puis, nous avons cherché à savoir si le rétablissement de l'expression de COMMD5 dans les carcinomes rénaux pouvait arrêter, ou à tout le moins, diminuer le développement tumoral et si oui, par quels mécanismes. (**Figure 12**).

Les résultats de cette thèse indiquent que la perte de COMMD5 dans les tubules proximaux de reins favorise la dé-différenciation, la perte des jonctions cellulaires et l'activation de certains facteurs de transcription impliqués dans l'EMT. De plus, la perte de COMMD5 provoque une augmentation des métalloprotéases MMP2 et MMP9 responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire et de l'invasion. COMMD5 participe également à la stabilité du cytosquelette via son interaction directe avec l'actine et la tubuline. La suppression de COMMD5 induit une déstructuration du cytosquelette et empêche le bon déroulement du recyclage du récepteur EGFR alors que la surexpression de COMMD5 dans les cellules de carcinomes rénaux favorise la re-différenciation cellulaire par le processus de MET. COMMD5 inhibe HIF1 $\alpha$  induisant une baisse du facteur de transcription SNAIL et séquestre SNAIL au niveau du cytoplasme. La surexpression de COMMD5 régule l'expression

transcriptionnelle des récepteurs de la famille ErbB en hyperméthylant leurs promoteurs. Les conséquences de cette régulation se résument par une diminution de la prolifération cellulaire et une diminution de la taille de la tumeur rénale.



**Figure 12 : Schéma des différentes études permettant de comprendre le rôle de COMMD5 dans le cancer du rein.**

- 1<sup>ère</sup> partie : Étude des conséquences de la perte de COMMD5 dans la transition épithélio-mésenchymateuse (*article en préparation*).
- 2<sup>ème</sup> partie : Identification du rôle de COMMD5 dans la transition épithélio-mésenchymateuse (*article en préparation*).
- 3<sup>ème</sup> partie : Caractérisation du rôle de COMMD5 sur l'expression du récepteur EGFR (*article publié, Matsuda et coll 2017, Oncotarget*).
- 4<sup>ème</sup> partie : Étude des conséquences de la perte de COMMD5 sur la régulation du récepteur EGFR (*article publié, Campion et coll 2018, Cell reports*).



**Chapitre II : L'inhibition de HCaRG/COMMD5 induite par  
l'hypoxie favorise la dé-différenciation cellulaire par  
l'intermédiaire du processus d'EMT**

Verissimo T, Campion CG, Cossette S, Hamet P, Chan J SD et Tremblay J

*Article en préparation*

## **Contribution des auteurs**

Thomas Verissimo et Dre Johanne Tremblay ont conçu l'étude et rédigé le manuscrit.

Thomas Verissimo a effectué l'ensemble des expériences et des analyses de données dans ce manuscrit. Il a réalisé 90 % des expériences de Western blot, des PCR en temps réel ainsi que l'ensemble des expériences de cultures cellulaires. Il a également réalisé l'analyse protéique et génique des tumeurs.

Dre Carole Campion a participé à l'acquisition et à l'analyse de certaines images au microscope confocale. Elle a également réalisé certaines expériences de Western blot et a participé à la correction du manuscrit.

Suzanne Cossette a participé aux expériences de cultures cellulaires et réalisé certains Western blot. De même, elle a également participé à la correction du manuscrit

Les Dr Pavel Hamet et Dr John Chan ont contribué à la conception de l'étude.

## A - Introduction

Au cours du développement tumoral, de nombreux mécanismes biologiques sont activés afin de permettre aux cellules de proliférer de façon anarchique et de survivre. L'hypoxie est l'une des principales caractéristiques communes à l'ensemble des tumeurs solides<sup>(206)</sup>. En effet, l'absence de O<sub>2</sub> joue un rôle indispensable dans le développement de l'angiogenèse<sup>(207)</sup>, dans la progression maligne<sup>(208), (209)</sup> et dans le développement de métastases<sup>(210)</sup>.

Le facteur de transcription HIF1 est un régulateur majeur dans l'homéostasie du O<sub>2</sub><sup>(211)</sup> et se compose de deux sous-unités, HIF1 $\alpha$  (826 acides aminés) et HIF1 $\beta$  (789 acides aminés) qui forment ensemble un hétérodimère<sup>(212)</sup>. La sous-unité  $\alpha$  se trouve régulée par la concentration en O<sub>2</sub> tandis que la sous-unité  $\beta$  reste exprimée de façon stable<sup>(213)</sup>. La sous-unité  $\alpha$  ayant une demi-vie d'environ 5 min en normoxie, elle est continuellement transcrite puis traduite et dégradée<sup>(83), (214)</sup> en subissant une hydroxylation des acides aminés proline situées en position 402 et 564 par la proline hydroxylase-2 (PHD-2)<sup>(215), (216)</sup>. Puis, la protéine membre du complexe E3 ubiquitine ligase Von Hippel-Lindeau (VHL) va venir se fixer à HIF1 $\alpha$ , entraînant l'ubiquitination et l'envoi au protéasome<sup>(217), (218)</sup>. En l'absence d'O<sub>2</sub>, le substrat de la PHD-2 n'étant plus disponible, les protéines responsables de la dégradation de HIF1 $\alpha$  retrouvent donc inactivées, conduisant ainsi à sa stabilisation. Cette stabilisation va permettre à HIF1 $\alpha$  de se dimériser avec HIF1 $\beta$  et ainsi de se lier sur la séquence centrale 5'-(A/G) CGTG-3' du site HRE (*hypoxia response element*) de gènes cibles<sup>(219)</sup>. Parmi les gènes activés par le complexe HIF1 $\alpha$ /HIF1 $\beta$ , certains sont impliqués dans l'angiogenèse comme VEGF<sup>(220)</sup>, dans

l'EMT tel que SNAIL, TWIST ou ZEB<sup>(154), (221)</sup> ou l'invasion et les métastases tel que MMP2 et MMP9<sup>(191)</sup>. L'activation de ces gènes par l'hypoxie va permettre aux cellules de survivre à l'absence d'O<sub>2</sub>, de proliférer et de se dé-différencier. En condition normale, la dérégulation de la dégradation de la protéine HIF1α emmène fréquemment le développement de tumeur. Dans le syndrome de Von Hippel-Lindeau, la mutation du gène VHL cause une accumulation de la protéine HIF1α dans les cellules et favorise le développement de ccRCC dans environ 24 % à 45 % des cas. Le développement des ccRCC induit par le syndrome VHL constitue ainsi le principal cancer héréditaire du rein<sup>(222)</sup>. La dé-différenciation cellulaire est l'une des principales caractéristiques des cellules tumorales. La perte des jonctions cellulaires caractérisées par la baisse de l'expression de la protéine E-cadhérine, la réorganisation du cytosquelette et l'expression de gènes impliqués dans l'invasion ou l'angiogenèse, sont des marqueurs importants et caractéristiques de la tumorigenèse. Au cours de ces changements cellulaires, l'EMT est activée.

Le rôle précis de COMMD5 dans la dé-différenciation des cellules épithéliales n'a pas encore été clairement élucidé. Les évidences actuelles révèlent que l'expression de COMMD5 est modulée dans différents processus biologiques impliquant les mécanismes de dé-différenciation cellulaire dont le développement fœtal<sup>(1)</sup>, le cancer<sup>(1), (96)</sup> et l'ischémie<sup>(1)</sup>. En effet, l'analyse de l'expression de l'ARNm de COMMD5 a montré une diminution marquée dans les tissus fœtaux par rapport aux tissus adultes au niveau du cerveau, du cœur, des reins, du foie, de la rate et des poumons<sup>(1)</sup>. De plus, nous avons observé que l'expression de COMMD5 était beaucoup plus faible dans les lignées cancéreuses par rapport aux lignées saines<sup>(1)</sup>. Cette observation a également été constatée dans les tumeurs du cerveau et du

foie<sup>(1)</sup>. Enfin, notre étude portant l'ischémie-reperfusion chez le rat a révélé que l'expression de COMMD5 était diminuée durant les 6 premières heures post-ischémie suivie par une forte augmentation de son expression. Au niveau cellulaire, nous avons montré que la surexpression de COMMD5 dans les cellules HEK-293 a favorisé la maturation des jonctions cellulaires se caractérisant par l'apparition de desmosomes<sup>(1)</sup>.

L'ensemble de nos données suggère que COMMD5 pourrait jouer un rôle important dans la perte de différenciation cellulaire impliquée dans le cancer. Nos hypothèses formulées ici sont 1) qu'au cours du développement de la tumeur rénale, l'hypoxie inhibe l'expression de COMMD5 et 2) que COMMD5 est indispensable au maintien des caractéristiques épithéliales des cellules par la régulation de facteurs de transcription impliqués dans l'EMT.

L'étude rapportée dans ce chapitre décrit le mécanisme d'inhibition de COMMD5 dans le développement de tumeur par le facteur de transcription HIF1 et apporte des précisions quant à son rôle dans le maintien de la différenciation cellulaire. Notamment que la perte de COMMD5 mène à la dé-différenciation des cellules épithéliales des tubules proximaux de reins humains et une augmentation des facteurs de transcriptions impliqués dans l'EMT.

## **B - Matériels et Méthodes**

### **1 - Réactifs, cellules et tumeurs**

À moins d'indication contraire, tous les produits chimiques ont été achetés chez Sigma et les réactifs de culture cellulaire chez de Life Technologies Inc. Le chlorure de cobalt ( $\text{CoCl}_2$ ) a été solubilisé à une concentration de 20 mM dans du PBS puis utilisé à deux différentes concentrations finales de 200  $\mu\text{M}$  et 400  $\mu\text{M}$ . Les cellules épithéliales immortalisées (par transduction du papillomavirus 16) de tubules proximaux de rein humain, HK-2 (ATCC) ont été cultivées sans antibiotique, dans un milieu DMEM/F12 (1:1) supplémenté de D-glucose 5,5 mM et 10 % de sérum de veau fœtal (FBS) puis maintenues à 37°C avec 5 % de  $\text{CO}_2$ . Afin de préserver leurs propriétés épithéliales, les cellules n'ont été utilisées que jusqu'à passage 12. Les biopsies de tumeurs rénales de patients ont été obtenues gracieusement par un de nos collaborateurs auprès d'une biobanque chinoise.

### **2 - Chambre hypoxique**

Les cellules HK-2 ont été placées durant 24 h dans un incubateur modulaire (Billups-Rothenberg) permettant de contrôler le pourcentage d' $\text{O}_2$  présent. Préalablement, le milieu de culture des cellules a été remplacé par un milieu frais, puis les cellules ont été placées en chambre modulaire. Un mélange de gaz (5 %  $\text{CO}_2$  balancé en  $\text{N}_2$ ) a été injecté pendant 5 min à un débit de 20 L/min suivi, 30 min plus tard, d'une seconde injection afin de chasser complètement l' $\text{O}_2$  restant. Une bandelette *Dry Anaerobic* (Becton Dickinson) servant d'indicateur visuel a été placée à l'intérieur de l'incubateur modulaire avant chaque expérience afin de confirmer l'absence d' $\text{O}_2$ .

### 3 - Immuno-buvardage de type Western blots

Les cellules ou les tumeurs ont été maintenues sur glace puis rincées deux fois avec du PBS froid et lysées avec un tampon RIPA. Les lysats ont été centrifugés à 10000 g pendant 5 min puis les protéines des surnageants ont été récupérées et dosées selon la méthode de Bradford. 15 µg de protéines ont été dénaturées puis déposées sur gel de gradient 4-15 % TGX-polyacrylamide (Biorad) puis migrées pendant 90 min à 110 V. Les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose durant 10 min à 2.5 A (Trans-Blot Turbo, BioRad). Les membranes ont été bloquées avec une solution de TTBS contenant 10 % de lait pendant 1 h puis rincées trois fois 10 min. Les membranes ont été hybridées à 4°C pendant 16 h avec les anticorps primaires. Ensuite, les membranes ont été incubées durant 1 h avec un anticorps secondaire puis exposées à un réactif électrochimiluminescent (ECL prime GE) pendant 30 sec. L'acquisition des signaux ont été effectuées par film radiographique ou par Chemidoc (BioRad). Les expressions protéiques ont été normalisées par la protéine de référence  $\alpha$ -Tubuline. La liste des anticorps et leurs dilutions est disponible dans le **Tableau I** en annexe de ce chapitre.

### 4 - RT-qPCR

Les ARN totaux des cellules ou des tumeurs ont été extraits avec le réactif TRIzol (Life Technologie Inc) selon les recommandations du fabricant. Trois µg d'ARN total ont été rétrotranscrit en utilisant le kit Superscript IV (Invitrogen), en présence de dNTPs et d'oligoDT. Pour l'amplification, 20 ng d'ADNc, 300nM d'amorces sens et antisens ont été mixés au SybrGreen PowerUP (Thermo Fisher Scientific). L'amplification et l'acquisition ont été réalisées en utilisant le thermocycleur RotorGene 3000 (Corbett Research). Chaque amplification a été

réalisée en triplicata et la méthode de Livak ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) a été utilisée afin de quantifier le changement relatif d'expression des gènes et normalisée par rapport à l'amplification du gène de référence 18S ou GAPDH. La liste des séquences des amorces est disponible dans le **Tableau II** en annexe de ce chapitre.

### **5 - Transfection des Si ARN**

Les cellules HK-2 ont étéensemencées à faible confluence. Après 24 h, le milieu de culture a été remplacé par du milieu OptiMEM puis les cellules ont été transfectées par lipotransfection avec 25 nM de Si ARN COMMD5 ou HIF1 $\alpha$  en utilisant la Lipofectamine RNAimax (Invitrogen). Après 6 h d'incubation, le milieu des cellules a été changé par un milieu DMEM/F12 supplémenté de 10 % FBS. Les cellules ont été lysées après 48 ou 72 h pour procéder au Western Blot ou au RT-qPCR tel que décrit précédemment.

### **6 - Microscopie confocale**

Les cellules HK-2 ont étéensemencées sur lamelles rondes puis après 24 h d'adhérence, les cellules ont subi différents traitements (exposition au CoCl<sub>2</sub> ou transfection avec Si ARN). Les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS puis fixées pendant 10 min avec 4 % paraformaldéhyde. La perméabilisation des cellules a été réalisée avec 0,1 % Triton X100/PBS puis les lamelles ont été immergées dans 3 % BSA pour saturation. Les cellules ont été incubées 1 h avec la phalloïdine couplée avec un fluorophore Alexa 594. Les lamelles ont été montées et fixées sur lame avec Prolong Gold (Thermo Fischer Scientific). L'observation et l'acquisition des données ont été réalisées avec un microscope confocal (Leica) et le logiciel Leica Application Suite.



## **7 - Analyses statistiques**

Toutes les expériences de cette étude ont été réalisées de manière indépendante au minimum en triplicata. Le réplica des expériences est mentionné en légende de chaque figure. Tous les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad (PRISM) et les tests de Student bilatéral ou Anova à 1 facteur ont été utilisés pour l'analyse statistique de cette étude. Le choix du test statistique est mentionné dans la légende de chaque figure. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne.

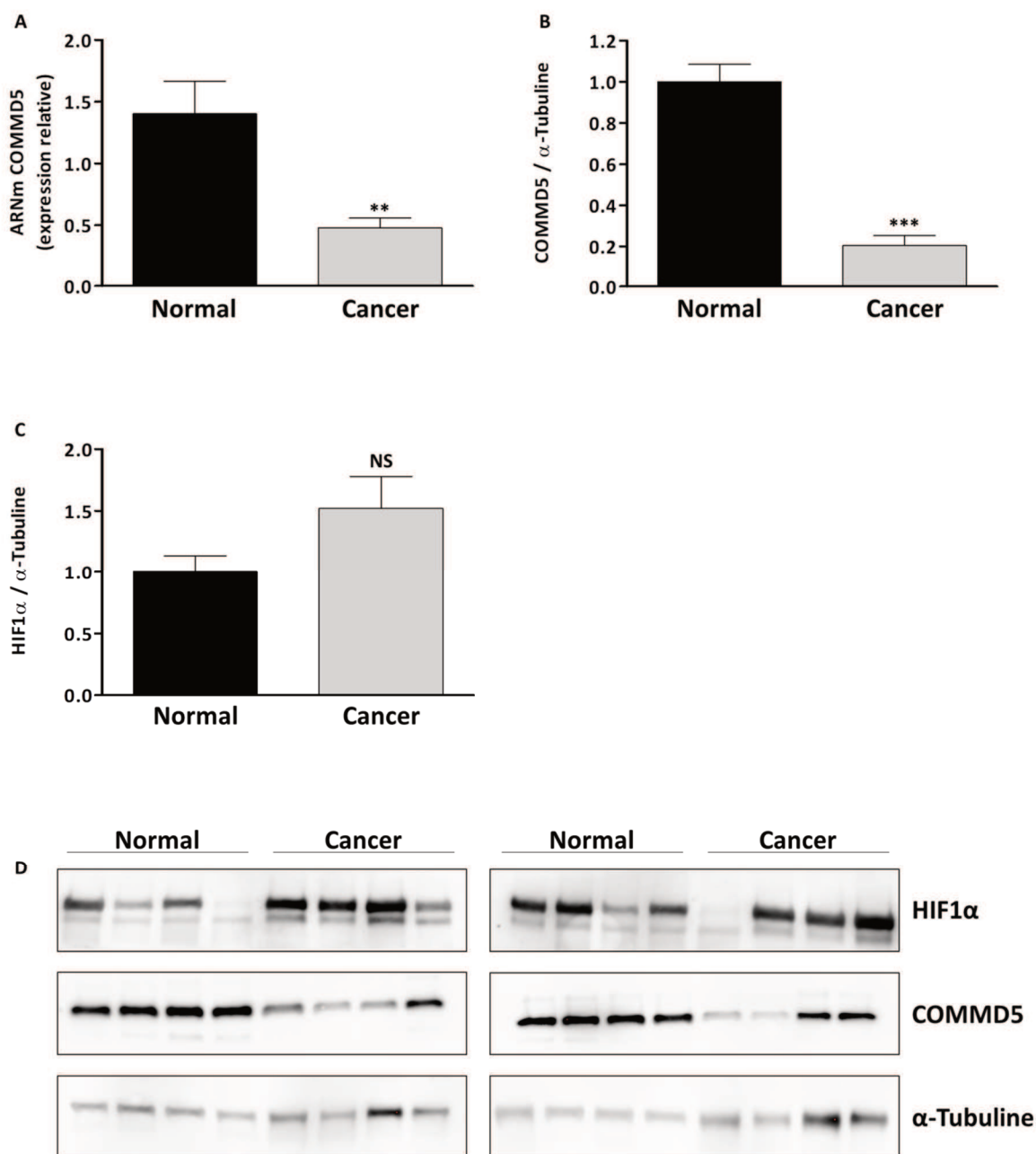
## C - Résultats

### 1 - L'expression de COMMD5 est diminuée dans les carcinomes de reins

#### humains

Les études portant sur COMMD5 ont révélé une baisse de son expression dans différents types de cancers dont le foie et l'estomac<sup>(1), (96)</sup>. À partir de 16 échantillons de biopsies rénales composées de huit tissus cancéreux et huit tissus sains, nous avons quantifié l'expression génique et protéique de COMMD5. Les résultats ont montré que la quantité d'ARNm de COMMD5 était plus faible dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus sains. De même, l'expression protéique de COMMD5 était également fortement diminuée dans ces tissus cancéreux (**Figure 1A, 1B et 1D**). Dans la majorité des carcinomes rénaux, l'expression de HIF1 $\alpha$  est fortement augmentée. La quantification de l'expression de HIF1 $\alpha$  a été réalisée dans ces 16 échantillons et les résultats observés ont montré une augmentation de la protéine HIF1 $\alpha$  dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus sains, mais pas de manière significative (**Figure 1C et 1D**).

Ces premiers résultats portant sur l'analyse expressionnelle confirment clairement une diminution de COMMD5 dans les tumeurs cancéreuses de rein et s'accompagne parallèlement d'une augmentation de HIF1 $\alpha$ .



**Figure 1 : Expression de COMMD5 dans les carcinomes de reins humains.**

**A** : Histogramme représentant l'expression relative de l'ARNm de COMMD5 dans 8 échantillons de biopsies de reins et 8 échantillons de biopsies de carcinomes rénaux réalisée par qPCR et normalisée par le gène de référence GAPDH. **B et C** : Compilations graphiques des expressions relatives des protéines COMMD5 et HIF1 $\alpha$  dans les mêmes échantillons que **A** réalisées par WB et normalisées par  $\alpha$ -Tubuline. **D** : Immunoblot de HIF1 $\alpha$ , COMMD5 et  $\alpha$ -Tubuline dans les échantillons de biopsies. **Statistiques** : Test de student bilatéral, ns=non significatif, \*=p<0.05, \*\*=p<0.01 et \*\*\*=p<0.001 (barre d'erreur = SEM)

## 2 - L'hypoxie entraine une diminution de l'expression de COMMD5

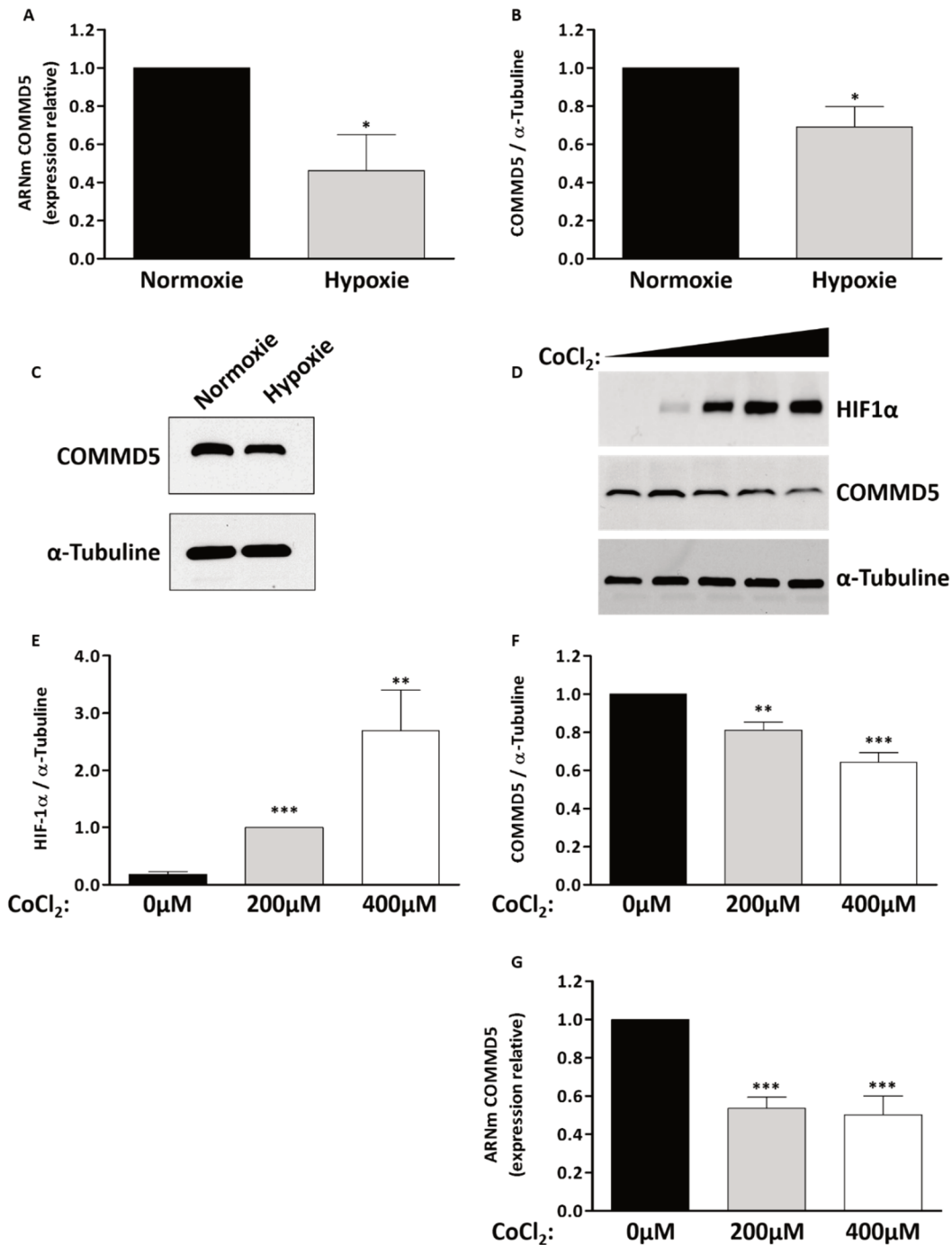
Afin de mieux comprendre le mécanisme du contrôle négatif de COMMD5 dans les tumeurs rénales et son lien avec la protéine HIF1 $\alpha$ , les cellules HK-2 ont été placées en condition d'hypoxie. Après 24 h, les cellules HK-2 ont présenté des niveaux beaucoup plus faibles d'ARNm et de protéine COMMD5 par rapport aux cellules maintenues en condition normoxique (**Figure 2A, 2B et 2C**). La sous-unité HIF1 $\alpha$  ayant une demi-vie très courte, il n'a pas été possible de la détecter dans ces conditions. Pour contourner ce problème et pour confirmer ces premières observations, le CoCl<sub>2</sub> a été utilisé comme agent mimétique de l'hypoxie<sup>(223)</sup>. Tel que prévu, l'exposition des cellules HK-2 avec le CoCl<sub>2</sub> pendant 24 h a entraîné une augmentation dose-dépendante de l'expression protéique de HIF1 $\alpha$  par rapport aux cellules contrôles (**Figure 2D et 2E**), tandis que les expressions génique et protéique de COMMD5 ont été fortement diminuées (**Figure 2E, 2F et 2G**).

Nous avons noté également que l'exposition au CoCl<sub>2</sub> a induit un changement phénotypique important des cellules HK-2. Les cellules se sont arrondies et sont devenues plus grosses avec l'apparition de fibres de stress. De plus, l'actine corticale est devenue beaucoup plus prononcée par rapport aux cellules non stimulées au CoCl<sub>2</sub> (**Figure 3A**). Ces modifications du cytosquelette s'accompagnent généralement d'une perte de jonctions cellulaires caractéristiques de cellules épithéliales différenciées. La dé-différenciation des cellules HK-2 par l'exposition au CoCl<sub>2</sub>, a été confirmée par la diminution prononcée de l'expression du marqueur de référence E-cadhérine (**Figure 3B**).

Nous avons également pu établir un lien entre la protéine HIF1 $\alpha$  et l'expression de COMMD5. En effet, l'inhibition de HIF1 $\alpha$  avec un Si ARN spécifique dans les cellules HK-2

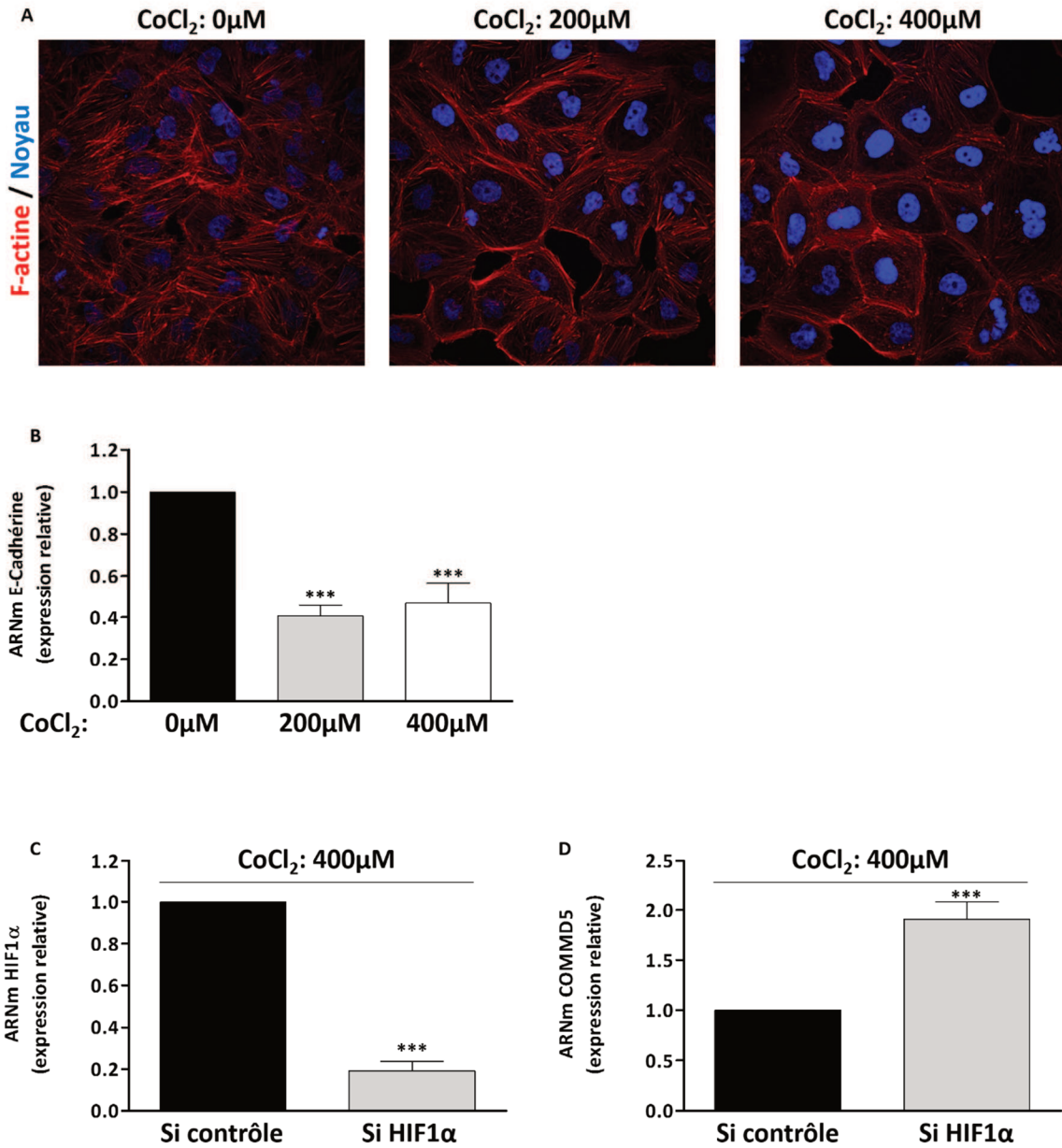
suivies d'une exposition à 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  pendant 24 h a conduit à une inhibition importante du niveau d'ARNm de HIF1 $\alpha$  (**Figure 3C**), et d'une expression deux fois plus importante de COMMD5 (**Figure 3D**).

Nos résultats montrent pour la première fois que l'hypoxie induit une régulation négative de COMMD5 au niveau transcriptionnel par l'intermédiaire de la sous-unité HIF1 $\alpha$ . À l'heure actuelle, nous ne pouvons pas décrire précisément le mécanisme d'action. Une étude du promoteur de COMMD5 semble indispensable pour caractériser formellement le mécanisme d'action de HIF1 $\alpha$  sur la transcription de COMMD5.



**Figure 2 : L'hypoxie induit une diminution de l'expression de COMMD5 dans les cellules HK-2.**

**A** : Quantification de l'expression d'ARNm de COMMD5 en normoxie et hypoxie réalisée par qPCR et normalisée par 18S (n=3). **B** : Représentations des expressions relatives de la protéine COMMD5 en normoxie et hypoxie réalisée par WB et normalisées par  $\alpha$ -Tubuline (n=4). **C** : Immunoblot de COMMD5 et  $\alpha$ -Tubuline dans les cellules HK-2 en normoxie et hypoxie. **D** : Immunoblot de HIF1 $\alpha$ , COMMD5 et  $\alpha$ -Tubuline après 24 h d'exposition à des doses croissantes (0  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 300  $\mu$ M et 400  $\mu$ M) de CoCl<sub>2</sub>. **E et F** : Représentation des expressions protéiques de HIF1 $\alpha$  et COMMD5 après 24 h d'exposition au CoCl<sub>2</sub> réalisées par WB et normalisées par l' $\alpha$ -Tubuline (n=5). **G** : Quantification de l'expression relative de l'ARNm de COMMD5 après 24 h d'exposition au CoCl<sub>2</sub> réalisée par qPCR et normalisée par le gène de référence 18S (n=7). **Statistiques** : Test de student bilatéral (**A et B**) et Test Anova à 1 facteur (**E, F et G**), ns=non significatif, \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$  et \*\*\*= $p < 0.001$  (barre d'erreur = SEM)



**Figure 3 : Dé-différenciation des cellules HK-2 après exposition au CoCl<sub>2</sub>.**

**A** : Cellules HK-2 exposées avec 0 μM, 200 μM et 400 μM de CoCl<sub>2</sub> réalisées au microscope confocal. Marquage de la F-actine marquée à la phalloïdine594 (rouge) et des noyaux au DAPI (bleu). Grossissement X63. **B** : Quantification de l'expression relative de l'ARNm d'E-cadhérine après 24 h d'exposition au CoCl<sub>2</sub> réalisée par qPCR et normalisée par le gène de référence 18S (n=5). **C et D** : Quantifications des expressions des ARNm de HIF1α et de COMMD5 après inhibition de HIF1α par Si ARN et 24 h d'exposition au CoCl<sub>2</sub> réalisées par qPCR et normalisées par le gène de référence GAPDH (n=5). **Statistiques** : Test de student bilatéral (C et D) et Test Anova à 1 facteur (B), ns=non significatif, \*=p<0.05, \*\*=p<0.01 et \*\*\*=p<0.001 (barre d'erreur = SEM)

### 3 - La perte de COMMD5 entraîne une dé-différenciation des cellules

#### épithéliales HK-2 ainsi qu'une augmentation des marqueurs de l'EMT

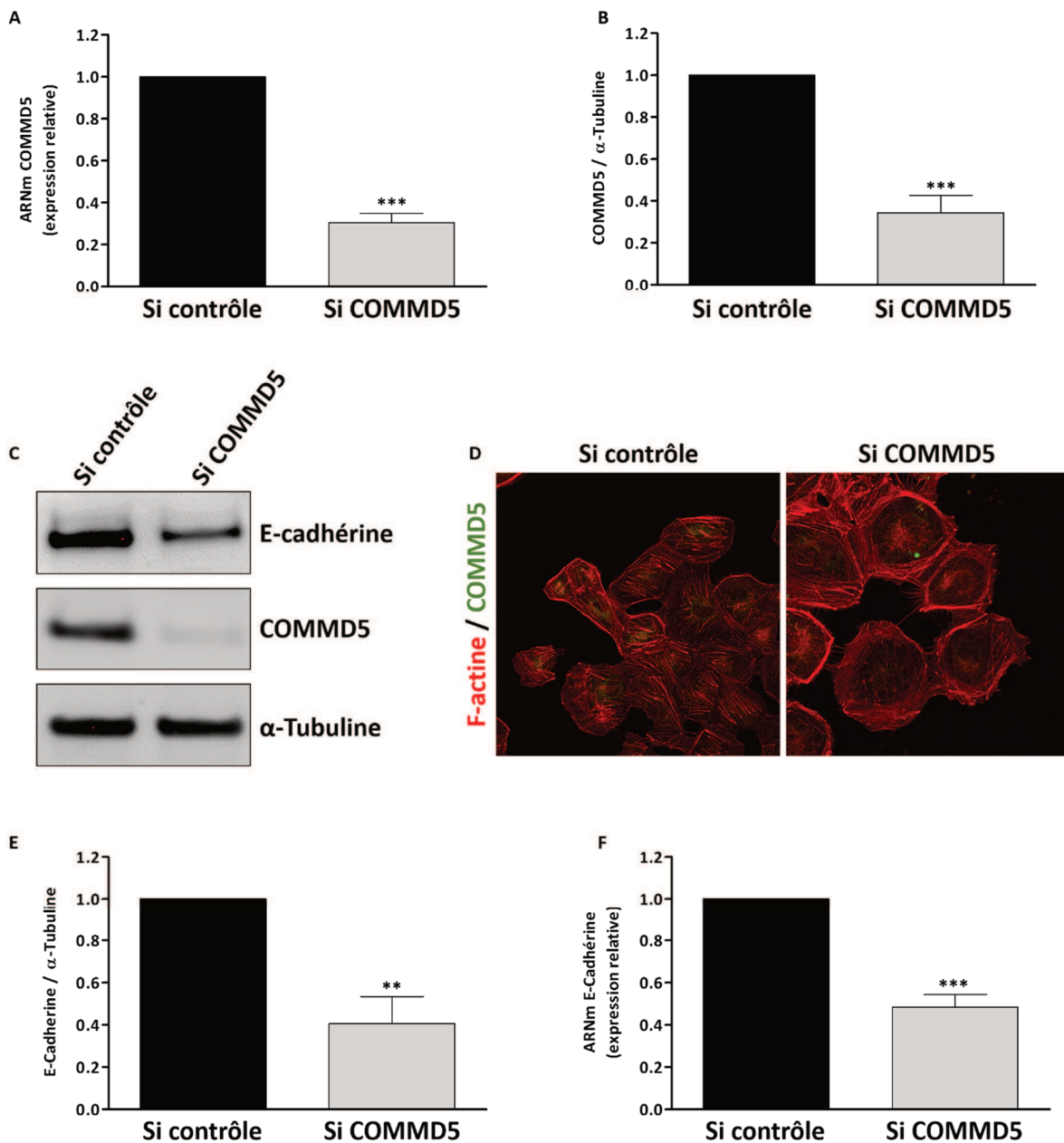
Les conséquences de la régulation négative de COMMD5 par l'hypoxie ont été étudiées dans les cellules épithéliales HK-2. Pour cela, nous avons utilisé une approche d'inhibition de COMMD5 par l'intermédiaire d'un Si ARN spécifique en position en 5'-UTR. Après 72 h de transfection, les cellules HK-2 ont présenté un taux d'inhibition de COMMD5 d'environ 75 % (**Figure 4A, 4B et 4C**). De façon surprenante, l'absence de COMMD5 a également modifié de façon importante le phénotype des cellules HK-2 se caractérisant par une augmentation de la taille, une forme arrondie, la présence de fibre de stress et une actine corticale beaucoup plus importante (**Figure 4D**). Ce phénotype présentait donc des similarités avec celui observé lorsque les cellules étaient exposées au  $\text{CoCl}_2$ . La dé-différenciation cellulaire a été confirmée par la quantification de l'expression de l'E-cadhérine. En effet, l'absence de COMMD5 a diminué les expressions génique et protéique de l'E-cadhérine (**Figure 4C, 4E et 4F**). Ces premières constatations révèlent l'importance de la protéine COMMD5 dans le maintien des propriétés épithéliales des cellules.

La dé-différenciation cellulaire étant un marqueur tumoral important, nous avons voulu savoir si COMMD5 était impliquée dans d'autres processus contribuant au développement de la tumeur tels que l'angiogenèse ou l'invasion cellulaire. Nous avons donc évalué l'expression de VEGF $\alpha$  ainsi que les différentes métalloprotéases responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire MMP2 et MMP9. L'inhibition de COMMD5 dans les cellules HK-2 a augmenté fortement les ARNm de VEGF $\alpha$  (**Figure 5A**), MMP2 et MMP9 (**Figure 5B et 5C**).



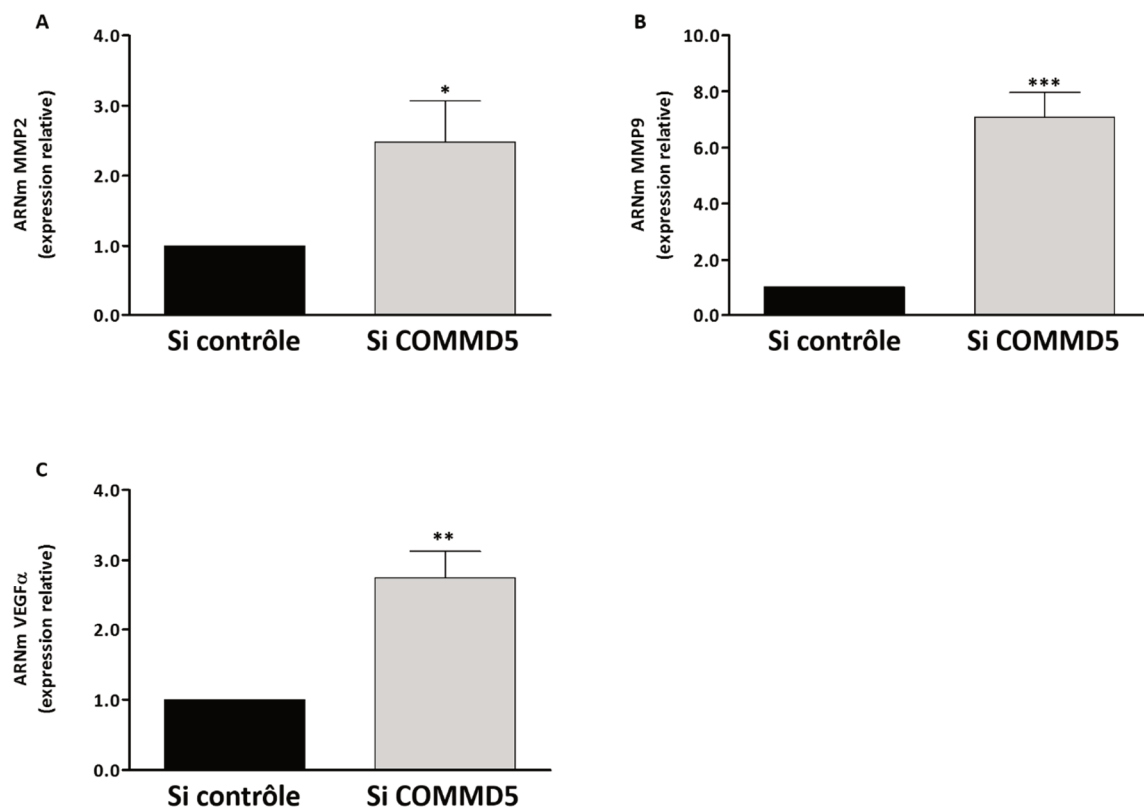
La régulation des gènes impliqués dans la dé-différenciation cellulaire, l'invasion et l'angiogenèse fait appel aux différents facteurs de transcriptions impliqués dans l'EMT dont SNAIL, TWIST et ZEB. L'inhibition de COMMD5 dans les cellules HK-2 a augmenté les niveaux des ARNm de TWIST et ZEB ainsi que de la protéine ZEB (**Figure 6A, 6C et 6D**) sans pour autant moduler l'expression de SNAIL au niveau génique et protéique (**Figure 6B et 6D**).

Ces résultats montrent l'importance de COMMD5 dans le développement tumoral. En effet, la perte de COMMD5 dans les cellules épithéliales HK-2 favorise leurs dé-différenciations par l'activation de l'EMT et augmente de façon très significative l'expression des marqueurs de l'invasion et de l'angiogenèse.



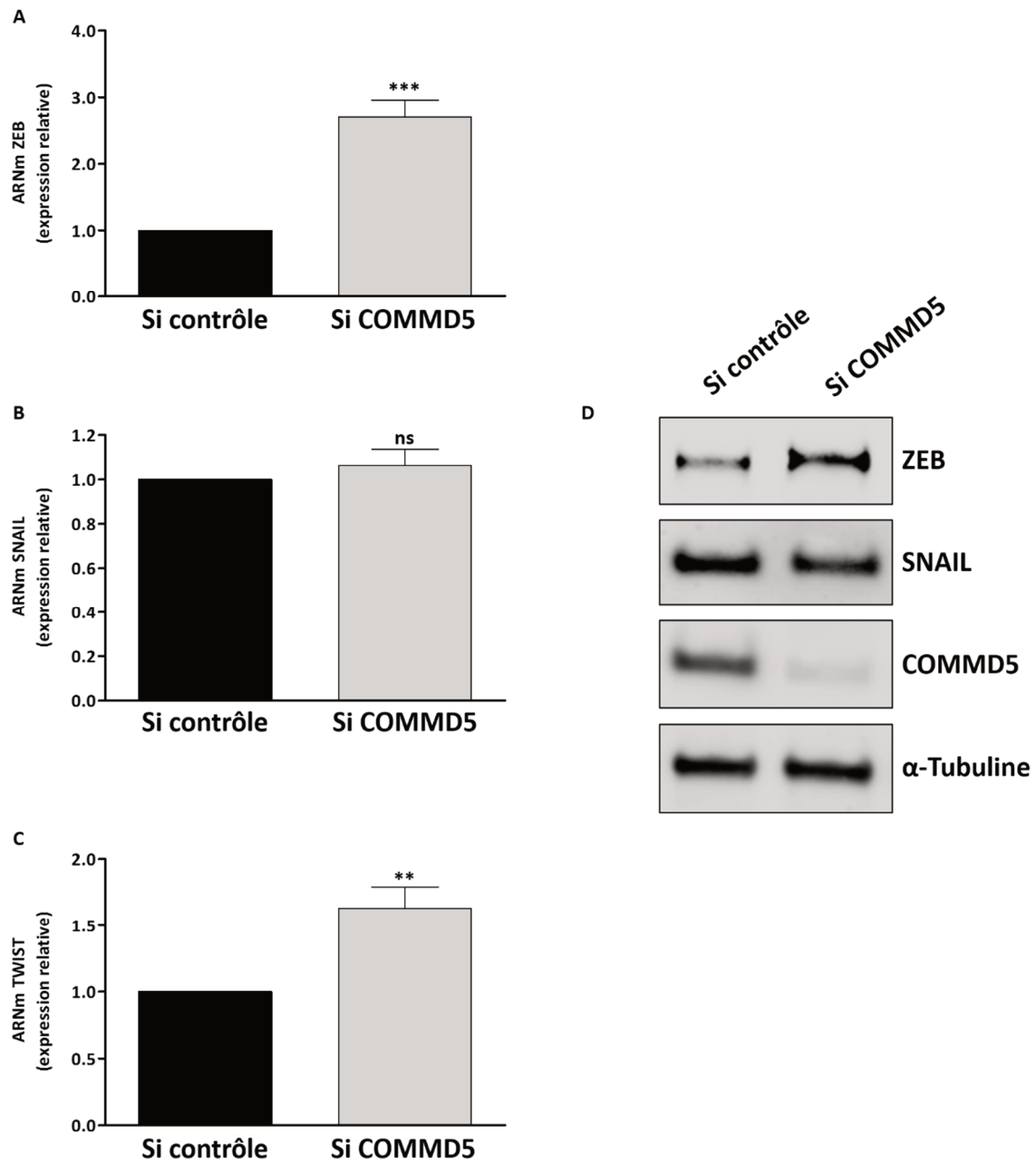
**Figure 4 : L'inhibition de COMMD5 induit une dé-différenciation des cellules HK-2.**

**A et B** : Représentations des expressions génique et protéique de COMMD5 après 72 h de transfection avec un Si ARN COMMD5 réalisées par qPCR et WB et normalisées par le gène de référence 18S et par l' $\alpha$ -Tubuline (n=5) **C** : Immunoblot de COMMD5, E-cadhérine et  $\alpha$ -Tubuline. **D** : Images des cellules HK-2 par microscopie confocale. **E et F** : Représentations des expressions génique et protéiques d'E-cadhérine après 72 h de transfection avec un Si ARN COMMD5 réalisées par WB et qPCR normalisées par l' $\alpha$ -Tubuline et le gène de référence 18S (n=5). **Statistiques** : Test de student bilatéral, ns=non significatif, \*=p<0.05, \*\*=p<0.01 et \*\*\*=p<0.001 (barre d'erreur = SEM)



**Figure 5 : L'inhibition de COMMD5 augmente l'expression des marqueurs de l'invasion et l'angiogenèse dans les cellules HK-2.**

**A :** Quantification de l'expression relative de l'ARNm de MMP2 après 72 h de transfection avec un Si ARN COMMD5 réalisée par qPCR et normalisée par le gène de référence 18S (n=5). **B** Quantification de l'expression relative de l'ARNm de MMP9 après 72 h de transfection avec un Si ARN COMMD5 réalisée par qPCR et normalisée par le gène de référence 18S (n=5). **C :** Quantification de l'expression relative de l'ARNm de VEGFα après 72 h de transfection avec un Si ARN COMMD5 réalisée par qPCR et normalisée par le gène de référence 18S (n=5). **Statistiques :** Test de student bilatéral, ns=non significatif, \*=p<0.05, \*\*=p<0.01 et \*\*\*=p<0.001 (barre d'erreur = SEM)



**Figure 6 : L'inhibition de COMMD5 induit une augmentation de l'expression des facteurs de transcription impliqués dans l'EMT dans les cellules HK-2.**

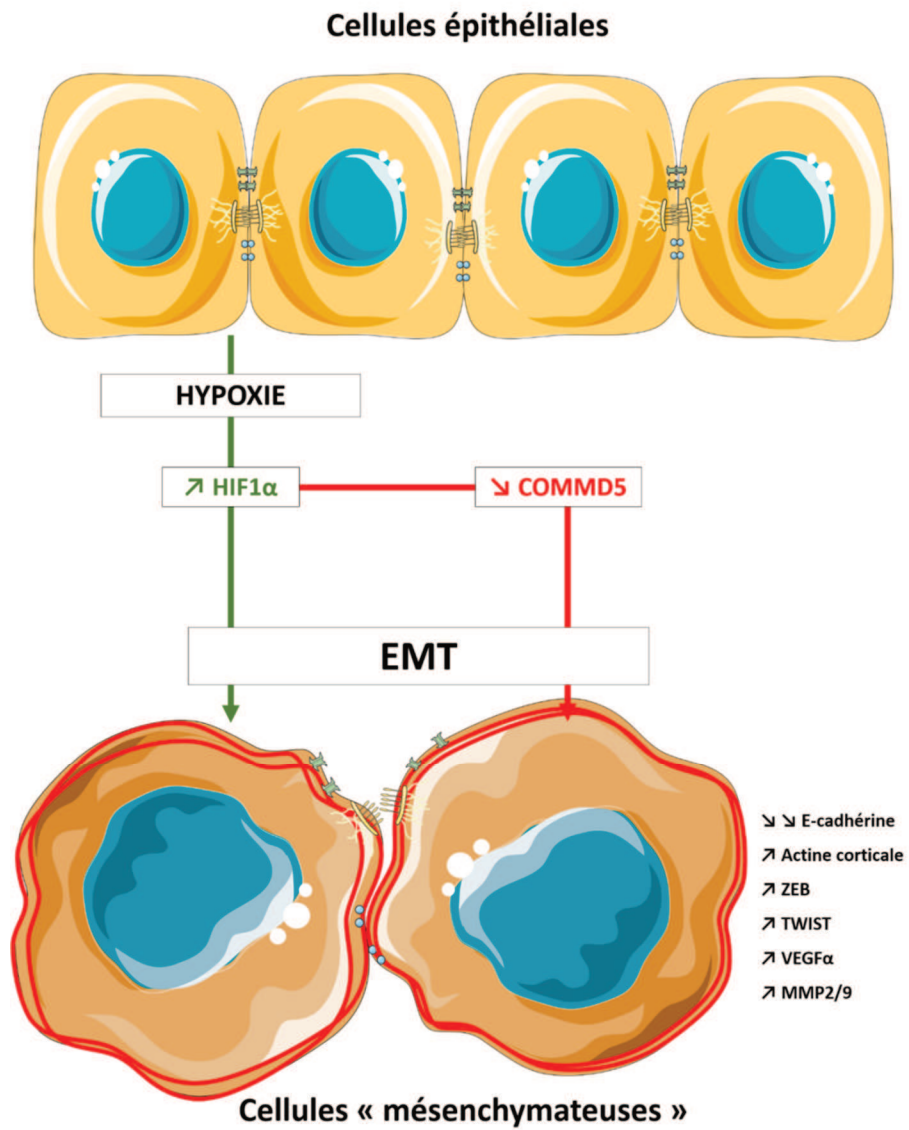
**A, B et C :** Quantifications des expressions géniques de ZEB, SNAIL et TWIST après 72 h de transfection avec un Si ARN réalisées par qPCR et normalisée par le gène de référence GAPDH (n=5). **D :** Immunoblot de ZEB, SNAIL, COMMD5 et  $\alpha$ -Tubuline des cellules HK-2 après 72 h de transfection avec un Si ARN COMMD5. **Statistiques :** Test de student bilatéral, ns=non significatif, \*=p<0.05, \*\*=p<0.01 et \*\*\*=p<0.001 (barre d'erreur = SEM)

## D - Conclusions

Au cours du développement de la tumeur, l'hypoxie présente dès le début, induit l'EMT par la voie de signalisation HIF1. L'activation de ce mécanisme va causer une perte des propriétés épithéliales des cellules et celles-ci acquerront la capacité de survivre à un milieu pauvre en nutriment, de proliférer ou de migrer de façon incontrôlée. Les premières étapes de cette transition se caractérisent par la perte des jonctions cellulaires dont l'E-cadhérine est l'un des principaux marqueurs. S'en suit une réorganisation du cytosquelette d'actine puis une augmentation de l'expression de gènes tel que VEGF $\alpha$  et les métalloprotéases MMP2 et MMP9, permettant de survivre et de se disséminer dans l'organisme. Ces changements biologiques sont possibles par l'activation des facteurs de transcriptions ZEB, TWIST et SNAIL.

La diminution d'O<sub>2</sub> dans les cellules épithéliales HK-2 a induit une diminution transcriptionnelle de COMMD5. Cette diminution a également été constatée dans les tumeurs de reins humains parallèlement à l'augmentation de HIF1 $\alpha$ . La perte de COMMD5 dans les cellules HK-2 a entraîné une déstructuration des jonctions cellulaires et l'apparition de fibre de stress d'actine ainsi qu'une présence d'actine corticale beaucoup plus marquée avec un phénotype cellulaire arrondi. L'élévation du niveau d'expression des facteurs de transcriptions TWIST et ZEB impliqués dans l'EMT ainsi que l'augmentation de VEGF $\alpha$  et des métalloprotéases MMP2 et MMP9 nous indiquent que la présence de COMMD5 est importante au maintien de l'intégrité des cellules épithéliales. En conclusion, l'absence de COMMD5 favorise la transformation des cellules épithéliales en cellules ayant des caractéristiques cancéreuses par le processus d'EMT.

## E - Conclusions schématisées



*Figure 7 : Schéma bilan.*

L'hypoxie augmente la stabilité de la sous-unité  $\alpha$  du facteur de transcription HIF1 et entraîne une diminution de COMMD5. La perte de COMMD5 induit une dé-différenciation des cellules épithéliales par l'intermédiaire de la transition épithélio-mésenchymateuse et augmente les marqueurs de l'angiogenèse et de l'invasion.

## F - Annexes

**Tableau I : Liste des anticorps primaires et secondaires.**

Anticorps	Dilutions	Compagnies
<i>Primaire</i>		
Lapin anti-COMMD5	1/2000	ProteinTech
Souris anti-HIF1 $\alpha$	1/500	SantaCruz Biotechnology
Lapin anti- $\alpha$ -Tubuline	1/40000	Abcam
Lapin anti-ZEB	1/2000	Cell Signaling
Lapin anti-SNAIL	1/2000	Cell Signaling
Souris anti-E-cadhérine	1/4000	BD Transduction Laboratories
<i>Secondaire</i>		
IgG anti-lapin	1/10000	SantaCruz Biotechnology
IgG anti-souris	1/10000	SantaCruz Biotechnology

**Tableau II : Liste des séquences d'amorces sens et antisens.**

Gènes	NM_accessions		Séquences
COMMD5	014066.3	Sens	TTCGGAGAGCTCTGGATACT
		Antisens	TGCTGCTGCTTCCTCTTT
E-cadhérine	004360.3	Sens	CGACCCAACCCAAGAATCTATC
		Antisens	AGGTGGTCACTTGGTCTTTATTC
GAPDH	001289745.1	Sens	CAAGAGCACAAGAGGAAGAGAG
		Antisens	CTACATGGCAACTGTGAGGAG
HIF1 $\alpha$	001530.3	Sens	GTCTGCAACATGGAAGGTATTG
		Antisens	GCAGGTCATAGGTGGTTTCT
SNAIL	005985.3	Sens	CAGCTATTTGAGCCTCCTGTT
		Antisens	CCGACAAGTGACAGCCATTA
TWIST	000474.3	Sens	AGACTCTGGAGCTGGATAACT
		Antisens	GCCTGTCTCGTTTCTCTTT
ZEB	030751.5	Sens	CCCATCACCTCTAAACCTTTCC
		Antisens	GGTTCTACTTGTGGCTCTTCTT
MMP9	004994.2	Sens	GGGCTTAGATCATTCTCAGTG
		Antisens	GCCATTACCGTCGCTTAT
MMP2	001302508.1	Sens	GGCACCCATTTACACCTACA
		Antisens	CCAAGTCAATGTGAGGAGAG
18S	003286.2	Sens	CGGCTACCACATCCAAGGAA
		Antisens	GCTGGAATTACCGCGGCT
VEGF $\alpha$	001025366.2	Sens	TGTCTTGGGTGCATTGGAG
		Antisens	TGCGCTGATAGACATCCATG

**Chapitre III : La surexpression de COMMD5 induit une  
re-différenciation des cellules cancéreuses rénales et inhibe  
l'invasion cellulaire via le processus de la MET**

Verissimo T, Campion CG, Cossette S, Zaoui K, Xinping Z, Hamet P, Chan J SD et Tremblay J

*Article en préparation*



## **Contribution des auteurs**

Thomas Verissimo et Dre Johanne Tremblay ont conçu l'étude et rédigé le manuscrit.

Thomas Verissimo a effectué l'ensemble des expériences et des analyses de données dans ce manuscrit. Il a réalisé 90 % des expériences de Western blot et PCR en temps réel. De plus, il a réalisé la majorité des expériences de cultures cellulaires ainsi que l'analyse protéique et génique des tumeurs.

Dre Carole Campion a participé à l'acquisition et à l'analyse des images au microscope confocale. Elle a également réalisé certaines expériences de Western blot. De plus elle a participé à la correction du manuscrit

Suzanne Cossette a réalisé des expériences de Western blot et a participé aux expériences de cultures cellulaires et certains Western blot. De même, elle a participé à la correction du manuscrit

Les Dr Kossay Zaoui et Dre Zhao Xinping ont participé à l'acquisition et à l'analyses de certaines images au microscope confocale.

Les Dr Pavel Hamet et John Chan ont contribué à la conception de l'étude.

## A - Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons identifié le rôle de la sous-unité HIF1 $\alpha$  dans la régulation négative de COMMD5 au niveau transcriptionnel. L'expression de HIF1 $\alpha$  est augmentée dans une grande majorité des tumeurs rénales par l'intermédiaire de la mutation du gène codant pour la protéine VHL et par l'absence d'O<sub>2</sub> lors du développement de la tumeur<sup>(224), (225)</sup>. Ces deux conditions favorisent l'expression permanente de HIF1 $\alpha$  induisant une dé-différenciation des cellules par l'intermédiaire de l'EMT et l'action des facteurs de transcription TWIST, SNAIL et ZEB<sup>(212)</sup>. Ces trois facteurs de transcription vont induire l'inhibition des marqueurs épithéliaux tels que l'E-cadhérine et l'activation des gènes mésenchymateux permettant d'acquérir des capacités migratoire, invasive et proliférative.

L'expression de COMMD5 est beaucoup plus faible dans les tumeurs cancéreuses de reins humains que dans le tissu sain adjacent. Nos résultats ont montré que l'inhibition de COMMD5 dans les cellules de tubules proximaux de reins a entraîné une dé-différenciation des cellules épithéliales et une activation des facteurs de transcriptions impliqués dans l'EMT. De plus, la perte de COMMD5 a induit une augmentation du marqueur de l'angiogenèse VEGF $\alpha$  ainsi que ceux de l'invasion MMP2 et MMP9.

Dans les RCC, l'expression des métalloprotéases MMP2 et MMP9 est corrélée avec le grade de la tumeur, la présence de métastases, l'invasion des veines principales du rein et la survie des patients<sup>(178), (226), (227), (228), (229)</sup>. Les métalloprotéases sont impliquées dès le début de la tumorigénèse dans la dégradation de la matrice extracellulaire afin d'améliorer l'angiogenèse ainsi que la dégradation de la membrane basale pour favoriser le

développement des métastases. L'angiogenèse induite par la tumeur est essentielle à sa croissance et dans l'apparition des métastases. En effet, la néovascularisation est un site d'entrée des cellules tumorales dans la circulation pour aller coloniser d'autres organes. Le rôle de la glycoprotéine VEGF $\alpha$  est indispensable au développement de l'angiogenèse par l'intermédiaire de ses récepteurs VEGFR-1 et VEGFR2<sup>(230)</sup>. L'activation des récepteurs tyrosines kinases par VEGF $\alpha$  génère un signal proangiogénique par l'intermédiaire des voies de signalisation Ras, Pi3K et PLC $\gamma$ -PKC-MAPK.

L'hypothèse formulée dans ce chapitre est que le rétablissement de l'expression de COMMD5 dans les carcinomes rénaux favorise la re-différenciation cellulaire par la régulation de la MET inhibant ainsi le développement de la tumeur, l'angiogenèse et l'invasion.

L'étude que nous rapportons dans ce chapitre montre le rôle de COMMD5 dans la régulation de la MET par l'inhibition de HIF1 $\alpha$  induisant ainsi une baisse de l'expression de SNAIL. De plus, COMMD5, à travers son domaine COMM, interagit avec la protéine SNAIL et la séquestre au niveau du cytoplasme. Ces deux mécanismes vont permettre aux cellules de carcinomes rénaux de se re-différencier en cellules présentant des caractéristiques épithéliales et d'inhiber les capacités angiogénique et invasive.

## **B - Matériels et Méthodes**

### **1 - Réactifs, cellules**

À moins d'indication contraire, tous les produits chimiques ont été achetés chez Sigma alors que les réactifs de culture cellulaire proviennent de Life Technologies Inc. Le chlorure de cobalt ( $\text{CoCl}_2$ ) a été re-suspendu à une concentration de 20 mM dans du PBS puis utilisé à deux différentes concentrations finales de 200  $\mu\text{M}$  et 400  $\mu\text{M}$ . Le  $\text{TGF}\beta$  (Preprotech) a été resuspendu à une concentration de 1 mg/mL dans 100 mM d'acide acétique puis utilisé à une concentration finale de 10 ng/mL. Les cellules épithéliales de tubules proximaux de rein humain, HK-2 (ATCC) ont été cultivées sans antibiotique, dans un milieu DMEM/F12 (1:1) supplémenté de D-glucose 5,5 mM et 10 % de FBS et maintenues à 37°C avec 5 % de  $\text{CO}_2$ . Les cellules claires de carcinomes à cellules rénales de souris RENCA (ATCC) ont été cultivées sans antibiotique dans un milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10 % de FBS

Afin d'établir des lignées stables surexprimant COMMD5, les cellules RENCA ont été transfectées avec un plasmide contrôle (pcDNA3.1-neo) ou un plasmide codant pour la protéine COMMD5 de rat (pcDNA3.1-neo-rHCaRG) ayant une résistance à la généticine. Les cellules RENCA ont été sélectionnées avec 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de généticine puis les clones Renca-Neo et Renca-rHCaRG ont été isolés et multipliés.

### **2 - Tumeurs *In vivo***

Les souris mâles BALB/c utilisées proviennent de Charles River. Afin de générer une tumeur sous-cutanée,  $1 \times 10^6$  cellules Renca-Neo ou Renca-rHCaRG ont été injectées par voie

sous-cutanée dans le flanc droit des souris âgées de 8 semaines. 28 jours après l'injection, les souris ont été sacrifiées puis les tumeurs ont été prélevées et analysées.

### **3 - Test d'invasion**

Vingt milles cellules Renca-Neo et Renca-rHCaRG ont été ensemencées dans la partie supérieure des inserts (*Transwell*) contenant une matrice extracellulaire et un milieu de culture sans FBS. Dans la partie inférieure, un milieu RPMI 1640 supplémenté de 10 % de FBS a été ajouté. Après 24 h, les cellules ont été fixées avec 4 % paraformaldéhyde pendant 10 min, perméabilisées pendant 20 min avec du méthanol et colorées avec une solution de cristal violet. L'invasion a été observée au microscope.

### **4 - Compartimentalisation cellulaire**

Les cellules HK-2 ont été ensemencées puis exposées à 400  $\mu$ M de  $\text{CoCl}_2$  pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été fragmentées à l'aide du kit de fractionnement subcellulaire protéique (Thermo Fisher) en suivant les instructions du fabricant. Les échantillons ont été dosés et 20  $\mu$ g de protéines ont été déposées sur un gel gradient 4-15 % TGX-polyacrylamide (Biorad). Afin de vérifier la pureté du fractionnement, les anticorps lapin anti- $\alpha$ -Tubuline et anti-NUP98 ont été utilisés comme marqueurs cytoplasmique et nucléaire. La liste des anticorps et leurs dilutions est disponible dans le **Tableau 1** en annexe de ce chapitre.

### **5 - Immuno-buvarpage de type Western blots**

À la fin de chaque expérience, les cellules ou les tumeurs ont immédiatement été placées sur glace, rincées deux fois avec du PBS froid et lysées avec un tampon RIPA. Les lysats

ont été centrifugés à 10000 g pendant 5 min puis les surnageants ont été récupérés et dosés selon la méthode de Bradford. 15 µg de protéines ont été dénaturées puis déposées sur gel gradient 4 % - 15 % de polyacrylamide. Après environ 90 min de migration à 110 V, les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose pendant 10 min à 2.5 A par l'intermédiaire du Trans-Blot Turbo (BioRad). Les membranes ont été saturées avec une solution de TTBS contenant 10 % lait pendant 1 h puis rincées trois fois pendant 10 min avec du TTBS. Les membranes ont été incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires puis incubées avec un anticorps secondaire pendant 1 h. Les membranes ont été exposées à un réactif électrochimiluminescent (ECL prime GE) durant 30 sec et l'acquisition des signaux a été effectuée soit par film radiographique ou soit par l'utilisation d'un Chemidoc (BioRad). Les expressions des protéines ont été normalisées par rapport à la protéine de référence  $\alpha$ -Tubuline. La liste des anticorps et leurs dilutions est disponible dans le **Tableau I** en annexe de ce chapitre.

## 6 - RT-qPCR

Les ARN totaux des cellules et des tumeurs ont été extraits avec le réactif TRIzol (Life technologies Inc) selon les recommandations du fabricant. Après dosage, 3 µg d'ARN total ont été rétrotranscrits en ADNc simple brin en utilisant l'enzyme de rétro transcription Superscript IV (Invitrogen), en présence de dNTPs et d'oligoDT. Pour l'amplification, 20 ng d'ADNc, 300 nM d'amorces sens et antisens ont été mixés au SybrGreen PowerUP (Thermo Fisher Scientific). L'amplification et l'acquisition ont été réalisées en utilisant le thermocycleur RotorGene 3000 (Corbett Research). Chaque amplification a été réalisée en triplicata et la méthode de Livak ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) a été utilisée afin de quantifier le changement relatif d'expression des gènes

normalisé par le gène de référence 18S ou GAPDH. La liste des séquences des amorces est disponible dans le **Tableau II** en annexe de ce chapitre.

### **7 - Microscopie confocale**

Les cellules RENCA ont étéensemencées sur lamelles rondes, puis après 24 h d'adhérence, les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS et fixées pendant 10 min avec 4 % paraformaldéhyde. La perméabilisation des cellules a été réalisée avec 0,1 % Triton X100/PBS, puis les lamelles ont été immergées dans 3 % BSA/PBS pour la saturation. Les cellules ont été incubées pendant 1 h avec la phalloïdine couplée avec un fluorophore Alexa 594 puis les lamelles ont été montées et fixées sur lame avec du Prolong Gold (Thermo Fischer Scientific). L'observation et l'acquisition des données ont été réalisées avec un microscope confocal (Leica) et le logiciel adapté.

### **8 - Pull down assay**

Quatre mL des clones bactériens fusionnés avec la GST ont été induits à 37°C pendant toute la nuit, dans le milieu d'expression Magicmedia. Les protéines ont été purifiées avec le kit de solubilisation et de renaturation de corps d'inclusion-GST (Cell Biolabs) conformément aux instructions du fabricant. Les protéines recombinantes extraites ont été liées toute la nuit à 4°C, à des billes de glutathion sépharose 4B (GE HealthCare). Les protéines de cellules HEK-293 ont été extraites dans un tampon de lyse tampon (2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl à pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 % CA-630, Pefabloc SC PLUS (Roche), complete mini, 0,014 U DNase I). Les protéines totales du surnageant cellulaire ont été dosées par la méthode de Bradford. Les complexes de protéines recombinantes-billes ont été additionnés à 0,5-3 mg

de lysat des HEK2-93 puis, incubés sur une roue rotative pendant une nuit à 4°C, dans un mélange (3.5:1) du tampon de lyse et du tampon de dilution (10 mM Tris-HCl à pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.4 mM Pefabloc SC PLUS, complete mini). Après liaison, les complexes ont été lavés et élués des billes à 95°C durant 10 min dans le tampon dénaturant (15 % SDS, 40 % glycérol, 280 mM Tris-HCl à pH 6,8 et 25 % 2-mercaptoéthanol). Les échantillons ont été dilués dans l'H<sub>2</sub>O (2:1 pour les interacteurs et 1:4 pour la détection de la GST), puis chargés sur deux gels 4-20 % mini-PROTEAN TGX et migrées à 120 V pendant 90 min. Les membranes ont été hybridées avec les anticorps primaires à 4°C pendant 16 h puis hybridées les anticorps secondaires. La détection a été effectuée par chimioluminescence avec un substrat Clarity Max Western ECL et la révélation a été captée en utilisant un Chemidoc (Bio-Rad). La liste des anticorps et leurs dilutions est disponible dans le **Tableau I** en annexe de ce chapitre.

### **9 - Test de dégradation de la gélatinase**

Cinq milles cellules Renca-Neo et Renca-rHCaRG ont été ensemencées dans un puits recouvert de collagène couplé avec un fluorophore Alexa 488. Après 72 h d'incubation, les cellules ont été fixées avec 3 % formaldéhyde, perméabilisées puis incubées 1 h avec de la phalloïdine couplée avec un fluorophore Alexa 594. La dégradation de la gélatinase a été observée au microscope confocal (Leica).

### **10 - Analyses statistiques**

Toutes les expériences de cette étude ont été réalisées de manière indépendante au minimum en triplicata. Le réplica des expériences est mentionné en légende de chaque figure. Tous les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad (PRISM) et les tests de



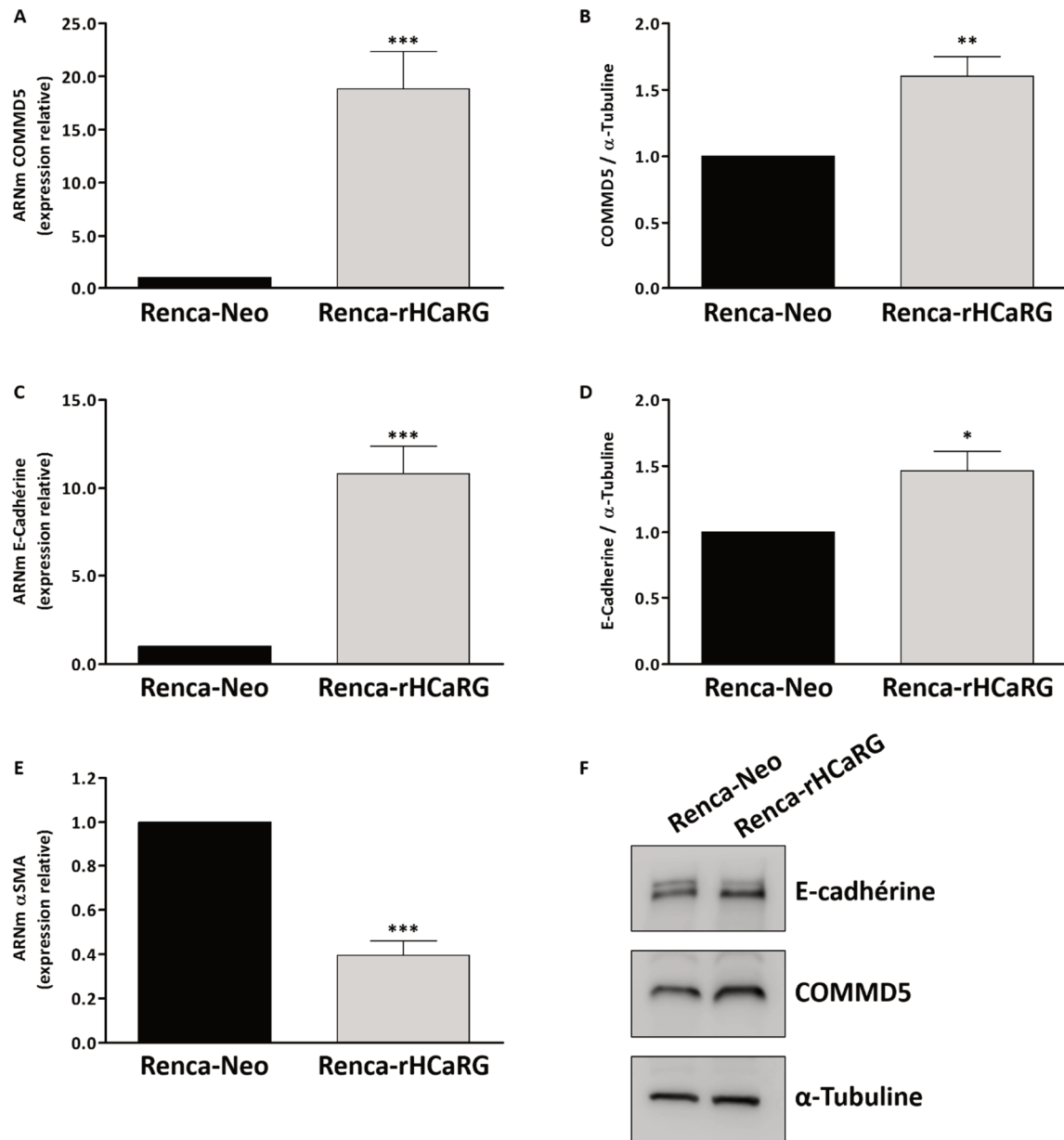
Student bilatéral ou Anova à 1 facteur ont été utilisés pour l'analyse statistique de cette étude. Le choix du test statistique est mentionné dans la légende de chaque figure. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne.

## C - Résultats

### 1 - La surexpression de COMMD5 dans les carcinomes de reins permet une re-différenciation cellulaire

Dans le but de mieux comprendre le rôle de COMMD5 dans la régulation de la re-différenciation cellulaire, les cellules RENCA ont été transfectées avec un plasmide afin de surexprimer COMMD5 de manière stable. Les cellules Renca-rHCaRG ont présenté un niveau d'ARNm de COMMD5 environ 20 fois supérieur et une augmentation protéique de plus de 50 % par rapport aux cellules contrôles Renca-Neo (**Figure 1A, 1B et 1F**). Afin d'évaluer l'impact de cette surexpression dans les cellules de carcinomes rénaux, les expressions des marqueurs épithélial E-cadhérine et mésenchymateux  $\alpha$ SMA ont été comparées entre les cellules Renca-Neo et Renca-rHCaRG. La surexpression de COMMD5 a augmenté l'expression d'E-cadhérine (**Figure 1C, 1D et 1F**) et diminué l'expression d' $\alpha$ SMA (**Figure 1E**).

Ces premiers résultats montrent que la surexpression de COMMD5 dans les cellules RENCA stimule leur re-différenciation cellulaire.



**Figure 1 : La surexpression de COMMD5 dans les cellules RENCA induit une re-différenciation cellulaire.**

**A et B :** Quantifications des expressions génique et protéique de COMMD5 dans les cellules Renca-Neo et Renca-HCaRG réalisées par qPCR et WB et normalisées par le gène de référence GAPDH et la protéine  $\alpha$ -Tubuline (n=5). **C et D :** Quantifications des expressions génique et protéique d'E-cadhérine dans les cellules Renca-Neo et Renca-HCaRG réalisées par qPCR et WB et normalisées par le gène de référence GAPDH et la protéine  $\alpha$ -Tubuline (n=5 et n=3). **E :** Quantification de l'expression de l'ARNm d' $\alpha$ SMA réalisée par qPCR et normalisée par le gène de référence GAPDH (n=4). **F :** Immunoblot de COMMD5, E-cadhérine  $\alpha$ -Tubuline dans les cellules Renca-Neo et Renca-HCaRG. **Statistiques : Test de student bilatéral, ns=non significatif, \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$  et \*\*\*= $p < 0.001$  (barre d'erreur = SEM)**

## **2 - COMMD5 entraîne une diminution de l'expression de SNAIL via l'inhibition de HIF1 $\alpha$**

Pour mieux comprendre le mécanisme par lequel COMMD5 stimule la re-différenciation des cellules cancéreuses, nous nous sommes focalisés sur la régulation des facteurs de transcription impliqués dans l'EMT. En effet, dans les cellules HK-2, la perte de COMMD5 avait entraîné une augmentation de ces facteurs de transcription. Nous avons donc vérifié si la surexpression de COMMD5 induisait le phénomène inverse. Dans les cellules RENCA, nous avons noté que l'expression des protéines TWIST et ZEB n'a pas été modulée par la surexpression de COMMD5 (**Figure 2B et 2C**) tandis que la protéine SNAIL a été fortement diminués (**Figure 2A et 2D**).

Les cellules Renca-Neo et Renca-rHCaRG ont été par la suite injectées dans le flanc des souris BALB/c afin de développer des tumeurs sous-cutanées. Au bout de 28 jours, les tumeurs ont été prélevées et l'expression des facteurs de transcriptions SNAIL, TWIST et ZEB a été quantifiée. Dans les tumeurs issues des cellules Renca-rHCaRG, les niveaux d'expressions de TWIST et ZEB n'ont pas été modulés (**Figure 3B, 3C et 3D**). En revanche, tel qu'en condition de culture, la surexpression de COMMD5 a induit une diminution significative de SNAIL (**Figure 3A, 3D et 3E**).

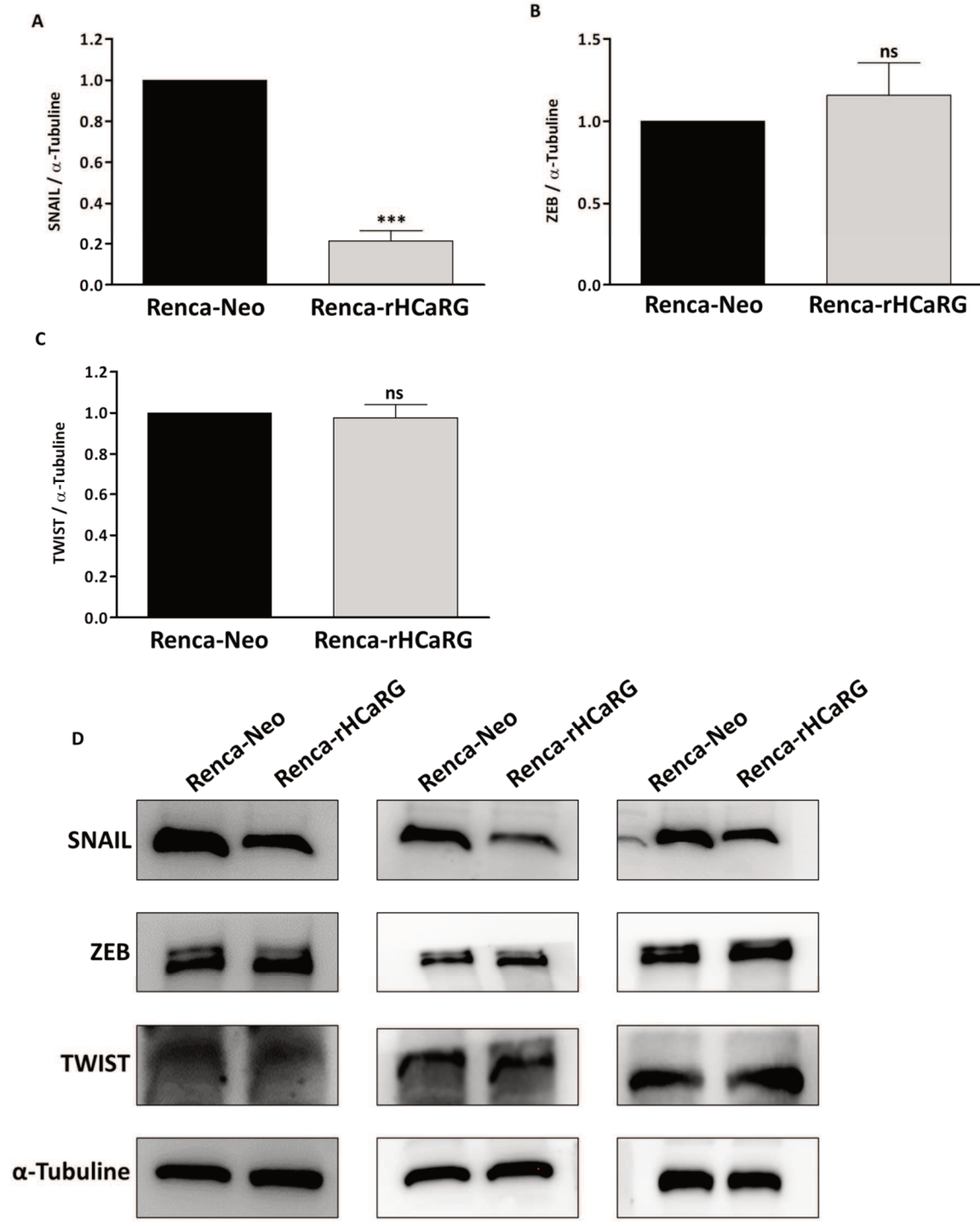
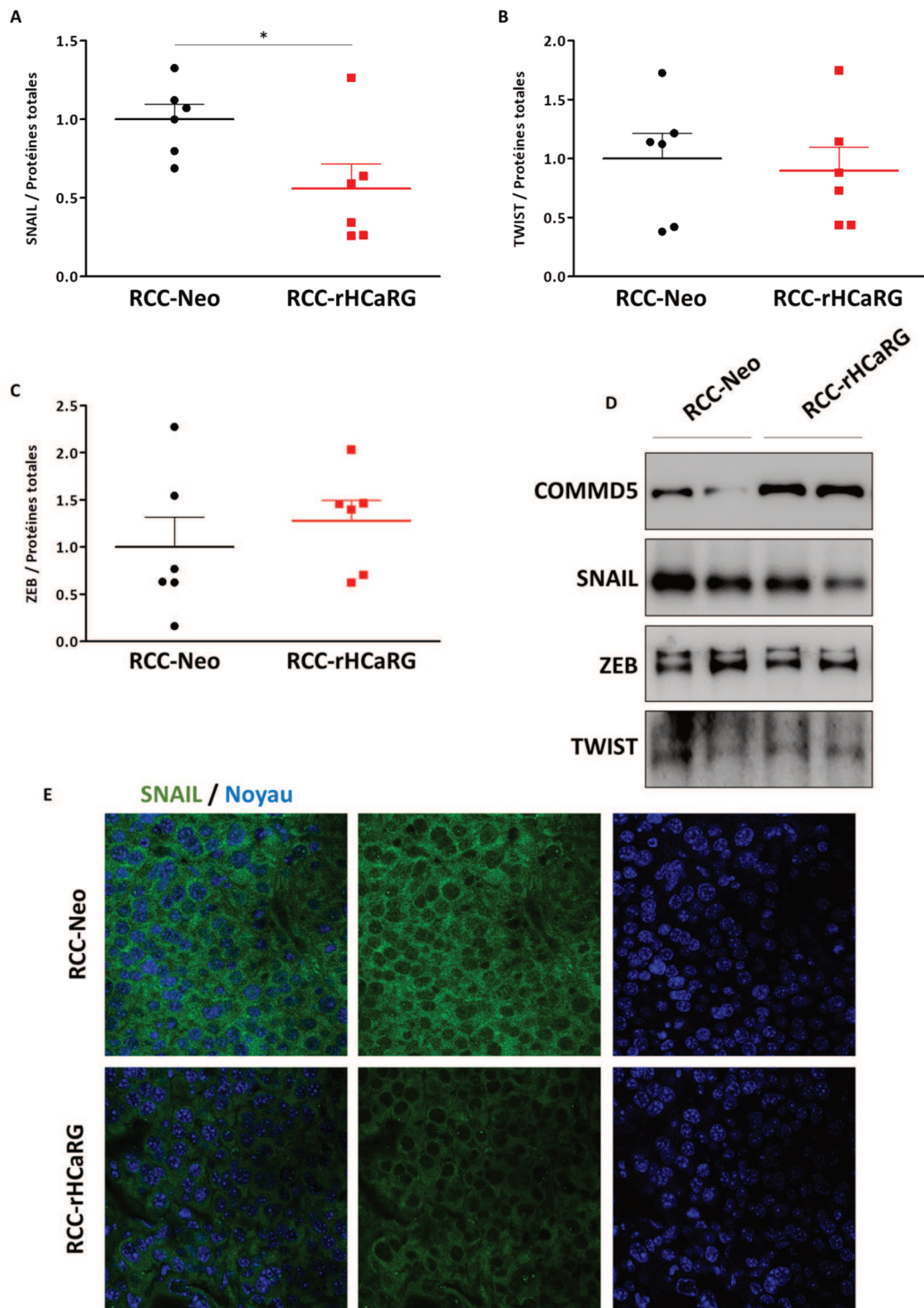


Figure 2 : Diminution de l'expression de SNAIL dans les cellules RENCA surexprimant COMM5.

**A, B et C** : Expressions de SNAIL, TWIST et ZEB dans les cellules Renca-Neo et Renca-rHCaRG, quantifiées par WB et normalisées par l' $\alpha$ -Tubuline (n=3). **D** : Immunoblot de SNAIL, TWIST et ZEB dans les cellules Renca-Neo et Renca-rHCaRG. **Statistiques** : Test de student bilatéral, ns=non significatif, \*=p<0.05, \*\*=p<0.01 et \*\*\*=p<0.001 (barre d'erreur = SEM)



**Figure 3 : Diminution de l'expression de SNAIL dans les tumeurs rénales de souris surexprimant COMMD5.**

**A, B et C :** Expressions de SNAIL, TWIST et ZEB dans les tumeurs rénales RCC-Neo et RCC-rHCaG issues de souris, réalisées par WB et normalisées par la quantité de protéine totales (n=6 par groupe). **D :** Immunoblot de COMMD5, SNAIL, TWIST et ZEB dans les tumeurs RCC-Neo et RCC-rHCaG. **E :** Images des tumeurs RCC-Neo et RCC-rHCaG réalisées par microscopie confocale. Marquage de SNAIL à l'Alexa488 (vert) et les noyaux au Dapi (bleu). **Statistiques :** Test de student bilatéral, ns=non significatif, \*= $p<0.05$ , \*\*= $p<0.01$  et \*\*\*= $p<0.001$  (barre d'erreur = SEM)

### 3 - COMMD5 inhibe l'expression de SNAIL par la régulation négative de HIF1 $\alpha$

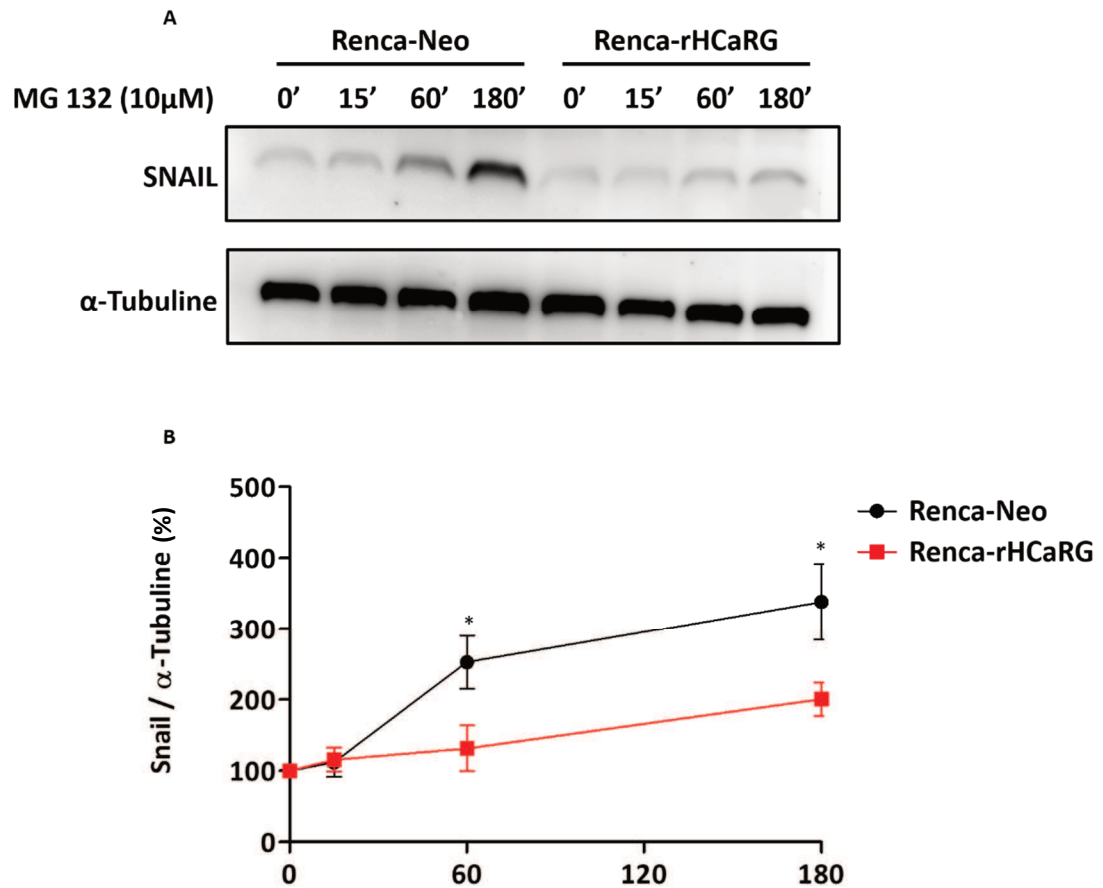
Les membres de la famille COMMD jouent un rôle essentiel dans l'ubiquitination des protéines notamment dans la voie NF- $\kappa$ B<sup>(8)</sup>. Afin de comprendre le mécanisme impliquant COMMD5 dans la baisse de l'expression de SNAIL, les cellules Renca-Neo et Renca-rHCaRG ont été exposées à 10  $\mu$ M de MG132 pendant 15, 60 et 180 min. Le MG132 étant un inhibiteur du protéasome, les cellules Renca-Neo ont présenté une forte augmentation de la protéine SNAIL d'environ 500 % après 180 min d'exposition. Néanmoins, cette augmentation n'a pas été observée dans les cellules Renca-rHCaRG (**Figure 4A et 4B**). Ce résultat suggère que COMMD5 ne participe pas à la dégradation de SNAIL par le protéasome, mais par un autre mécanisme.

Afin d'identifier ce mécanisme, nous avons donc examiné l'expression de la protéine HIF1 $\alpha$ . Dans les cellules Renca-Neo et Renca-rHCaRG il n'a pas été possible de détecter l'expression de cette protéine. Néanmoins, pour contourner ce problème, les cellules HK-2 ont d'abord été exposées à 400  $\mu$ M de CoCl<sub>2</sub> ou 10 ng/mL de TGF $\beta$  ou aux deux simultanément. Après 24 h d'incubation, le CoCl<sub>2</sub> et le TGF $\beta$  ont induit une augmentation de la protéine SNAIL. Cette augmentation a été plus importante par la stimulation combinée des deux agents (**Figure 5A et 5B**). Ce résultat confirme donc la présence de deux voies de signalisation différentes permettant d'induire l'expression de SNAIL. Afin de comprendre comment COMMD5 inhibe la protéine SNAIL, nous avons transfectées transitoirement les cellules HK-2 avec les mêmes plasmides que ceux utilisés pour les cellules RENCA. Après 24 h de transfection, les cellules ont ensuite été exposées à 400  $\mu$ M de CoCl<sub>2</sub> ou 10 ng/mL de TGF $\beta$  pendant 24 h puis le niveau de l'ARNm de SNAIL a été quantifié. L'expression de la protéine SNAIL a été diminuée par la

surexpression de COMMD5 après une stimulation au CoCl<sub>2</sub>. Néanmoins, cette diminution de la protéine SNAIL n'a pas été retrouvée dans les cellules ayant été exposées au TGFβ (**Figure 5C et 5D**). Ces résultats ont suggéré que COMMD5 devait être impliquée en amont de la voie de signalisation de la protéine SNAIL. La protéine HIF1α étant un inducteur de SNAIL, nous avons voulu savoir si COMMD5 agissait sur celui-ci. La surexpression de COMMD5 dans les cellules stimulées avec du CoCl<sub>2</sub> a entraîné effectivement une baisse de l'expression protéique de HIF1α (**Figure 5E**).

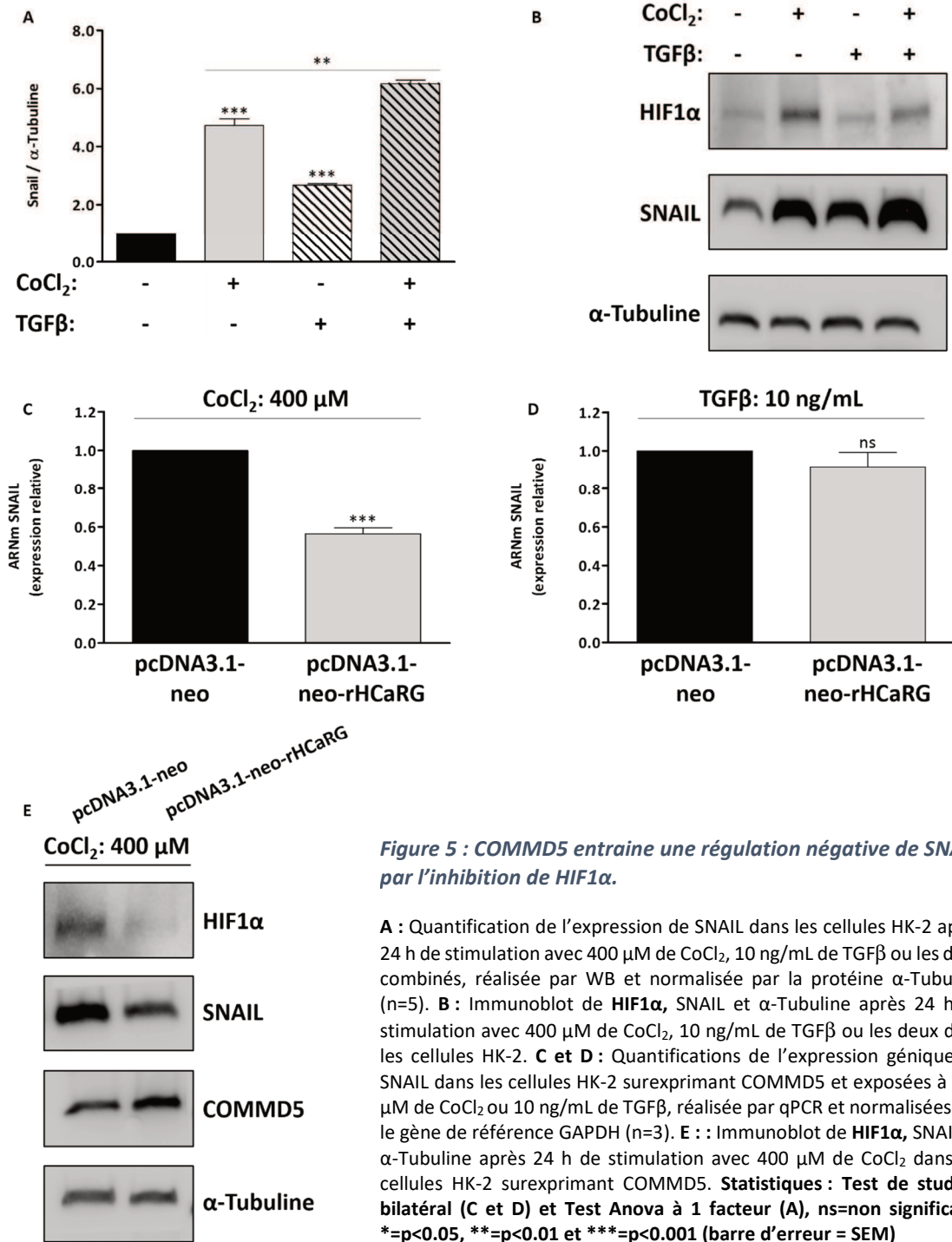
Les résultats de cette partie de la thèse montrent que COMMD5 inhibe SNAIL spécifiquement par l'intermédiaire de la régulation négative de HIF1α.





**Figure 4 : COMMD5 ne favorise pas la dégradation de SNAIL par le protéasome.**

**A** : Immunoblot de SNAIL et  $\alpha$ -Tubuline dans les cellules Renca-Neo et Renca-rHCaRG exposées avec l'inhibiteur du protéasome MG132 à une concentration de 10  $\mu$ M pendant 0, 15, 60 et 180 min. **B** : Représentation de l'expression de SNAIL dans les cellules Renca-Neo et Renca-rHCaRG après stimulation au MG132 (n=5). **Statistiques** : Test Anova à 1 facteur, ns=non significatif, \*=p<0.05, \*\*=p<0.01 et \*\*\*=p<0.001 (barre d'erreur = SEM)



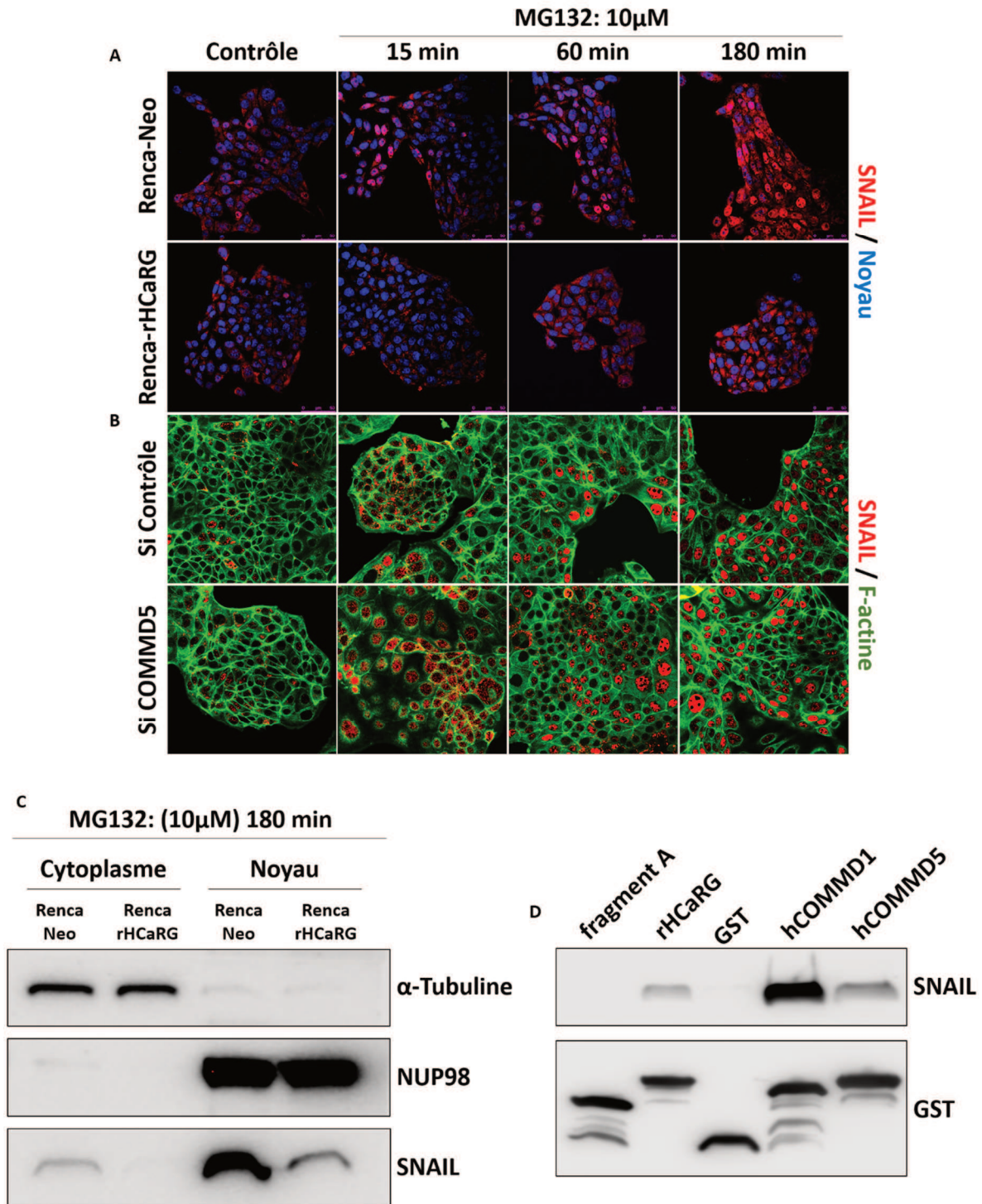
**Figure 5 : COMMD5 entraîne une régulation négative de SNAIL par l'inhibition de HIF1α.**

**A :** Quantification de l'expression de SNAIL dans les cellules HK-2 après 24 h de stimulation avec 400 μM de CoCl<sub>2</sub>, 10 ng/mL de TGFβ ou les deux combinés, réalisée par WB et normalisée par la protéine α-Tubuline (n=5). **B :** Immunoblot de HIF1α, SNAIL et α-Tubuline après 24 h de stimulation avec 400 μM de CoCl<sub>2</sub>, 10 ng/mL de TGFβ ou les deux dans les cellules HK-2. **C et D :** Quantifications de l'expression génique de SNAIL dans les cellules HK-2 surexprimant COMMD5 et exposées à 400 μM de CoCl<sub>2</sub> ou 10 ng/mL de TGFβ, réalisée par qPCR et normalisées par le gène de référence GAPDH (n=3). **E :** Immunoblot de HIF1α, SNAIL et α-Tubuline après 24 h de stimulation avec 400 μM de CoCl<sub>2</sub> dans les cellules HK-2 surexprimant COMMD5. **Statistiques :** Test de student bilatéral (C et D) et Test Anova à 1 facteur (A), ns=non significatif, \*=p<0.05, \*\*=p<0.01 et \*\*\*=p<0.001 (barre d'erreur = SEM)

#### 4 - COMMD5 inhibe la translocation nucléaire de SNAIL

Afin d'activer les gènes mésenchymateux, la protéine SNAIL, par l'intermédiaire de sa séquence NLS, est transloquée au niveau du noyau. Nous avons voulu savoir si COMMD5 participait au déplacement cytoplasmique de SNAIL. Afin de vérifier cela, les cellules Renca-Neo et Renca-rHCaRG ont été exposées à 10  $\mu$ M de MG132 pendant 15, 60 et 180 min. La compartimentalisation cellulaire ainsi que le marquage immunfluorescent de SNAIL ont montré une accumulation au niveau du cytoplasme et nucléaire après 180 min d'exposition dans les cellules Renca-Neo. Étonnement, l'accumulation de SNAIL dans le noyau n'a pas été retrouvée dans les cellules-rHCaRG (**Figure 6A et 6C**). Pour confirmer le rôle de COMMD5 dans la translocation nucléaire de SNAIL, les cellules RENCA WT ont été transfectées pendant 48 h avec un Si ARN spécifique COMMD5 puis stimulées avec 10  $\mu$ M de MG132 pendant 180 min. Le marquage immunfluorescent a démontré que l'absence de COMMD5 a accéléré le transfert de SNAIL dans le noyau (**Figure 6B**). Afin de comprendre par quel moyen COMMD5 pouvait inhiber la translocation nucléaire de SNAIL, une étude d'interaction protéine-protéine entre COMMD5 et SNAIL a été réalisée par un essai *Pull Down*. Alors que les clones « rHCaRG » et « hCOMMD5 » contenant les séquences entières de COMMD5 ont interagi avec SNAIL, il n'y a eu aucune interaction avec le fragment « A » ne contenant pas le domaine COMM. Pour confirmer la liaison de SNAIL au domaine COMM, le clone « hCOMMD1 » contenant la séquence humaine de COMMD1 a été utilisée comme contrôle. Les résultats ont bien montré une interaction avec COMMD1 confirmant ainsi que SNAIL se lie au domaine COMM des protéines COMMD1 et COMMD5 (**Figure 6D**).

Les résultats de cette partie montrent le rôle important de COMMD5 dans la régulation de la translocation de SNAIL. La perte de COMMD5 favorise l'entrée dans le noyau de SNAIL tandis que sa surexpression empêche cette translocation. Ce mécanisme est médié par l'interaction entre SNAIL et COMMD5 *via* son domaine COMM.



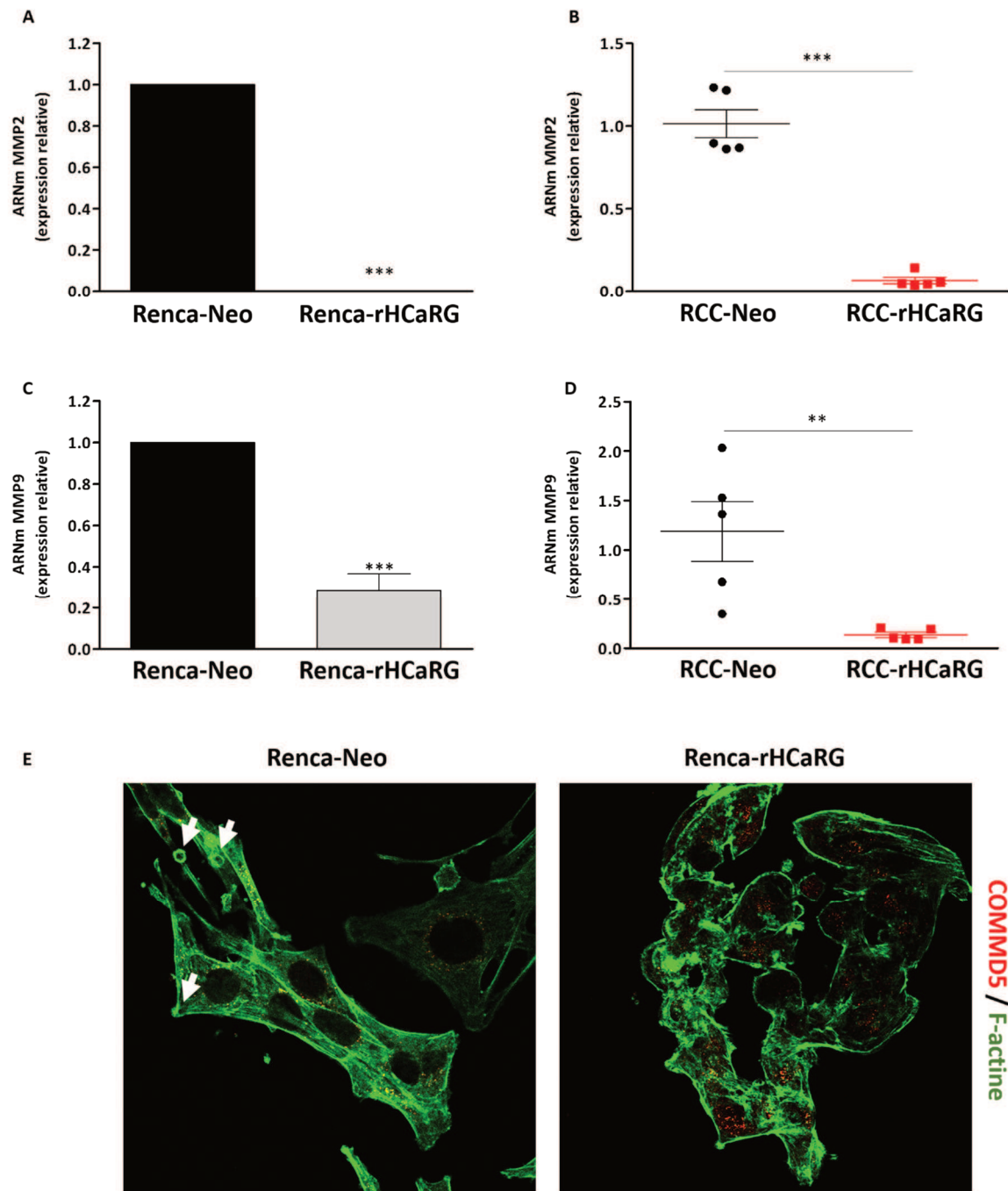
**Figure 6 : COMMD5 inhibe la translocation nucléaire de SNAIL.**

**A :** Images des cellules Renca-Neo et Renca-rHcARG stimulées avec 10  $\mu$ M de MG132 pendant 0, 15, 60 et 180 min et captées par microscopie confocale. Le rouge représente SNAIL et le bleu représente les noyaux. **B :** Images des cellules RENCA WT transfectées avec ou non avec un Si ARN spécifique à COMMD5 et stimulées avec 10  $\mu$ M de MG132 pendant 0, 15, 60 et 180 min, réalisées par microscopie confocale. Marquage de SNAIL à l'Alexa594 (rouge), F-actine à la phalloïdine488 (vert) et les noyaux au Dapi (bleu). **C :** Immunoblot de la compartimentalisation cellulaire des cellules Renca-Neo et Renca-rHcARG stimulées avec 10  $\mu$ M de MG132 pendant 180 min (n=4). **D :** Immunoblot de l'essai *Pull Down* (n=3).

## 5 - COMMD5 inhibe l'invasion des cellules de carcinomes rénaux

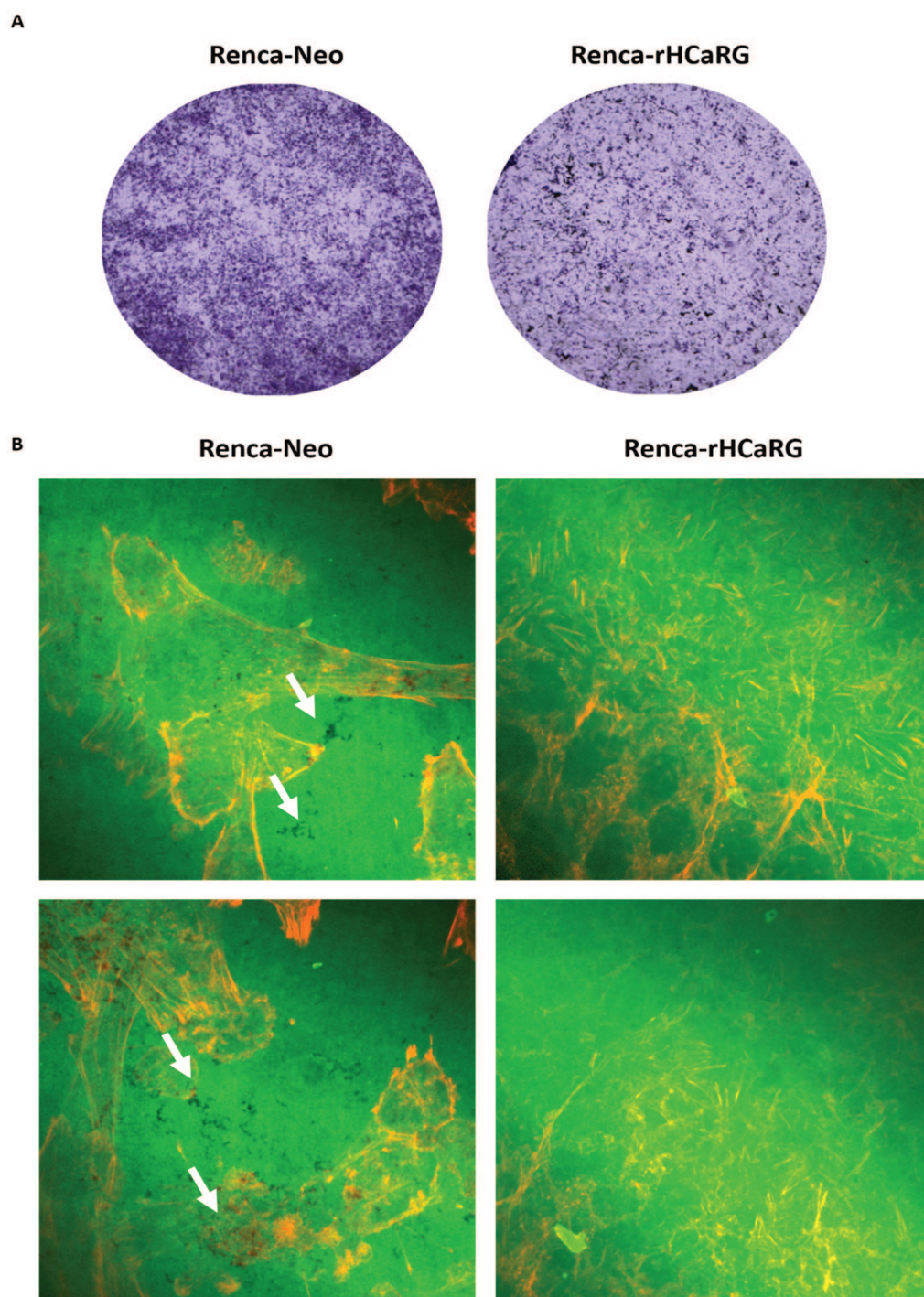
La protéine SNAIL participe à la régulation des métalloprotéases MMP2 et MMP9 responsables de la survenue des métastases. La forte expression de MMP2 et de MMP9 est associée à un mauvais pronostic de survie chez les patients atteints de carcinomes rénaux. La perte de COMMD5 dans les cellules HK-2 a entraîné une forte augmentation de ces deux métalloprotéases. Nous avons voulu savoir si, dans les cellules de carcinomes du rein RENCA, la surexpression de COMMD5 pouvait diminuer l'expression de MMP2 et de MMP9. Ainsi, dans les cellules surexprimant COMMD5, l'expression de l'ARNm de MMP2 a été fortement diminuée (**Figure 7A**). Cette observation a également été retrouvée dans les tumeurs sous-cutanées (**Figure 7B**). De même, l'ARNm de MMP9 s'est retrouvée diminuée à la fois dans les cellules et les tumeurs surexprimant COMMD5 (**Figure 7C et 7D**). Après 24 h d'incubation, les cellules Renca-Neo ont présenté une invasion plus importante par rapport aux cellules Renca-rHCaRG (**Figure 8A**). De même, l'analyse de la gélatine couplée à un fluorophore a révélé une absence de dégradation dans les cellules surexprimant COMMD5 (**Figure 8B**). Finalement, l'analyse du cytosquelette d'actine au microscope a permis de révéler la présence de rosettes d'invadopodes uniquement dans les cellules Renca-Neo (**Figure 7E, flèches blanches**).

Ces résultats confirment donc le rôle de COMMD5 dans l'inhibition de la dissémination du cancer rénal. La surexpression de COMMD5 diminue fortement l'expression des métalloprotéases MMP2 et MMP9 entre autres, responsables de l'invasion cellulaire.



**Figure 7 : COMMD5 inhibe les métalloprotéases MMP2 et MMP9 dans les cellules RENCA.**

**A et C :** Quantifications des expressions géniques de MMP2 et de MMP9 les cellules Renca-Neo et Renca-rHCaRG réalisées par qPCR et normalisées par le gène de référence GAPDH (n=4). **B et D :** Quantifications des expressions géniques de MMP2 et de MMP9 dans les tumeurs RCC-Neo et RCC-rHCaRG réalisées par qPCR et normalisées par le gène de référence GAPDH (n=5). **E :** Images des cellules Renca-Neo et Renca-rHCaRG réalisées par microscopie confocale. Le vert représente la F-actine. Les flèches blanches indiquent la présence de rosettes. **Statistiques :** Test de student bilatéral, ns=non significatif, \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$  et \*\*\*= $p < 0.001$  (barre d'erreur = SEM)



**Figure 8 : La surexpression de COMMD5 inhibe l'invasion.**

**A :** Images des cellules Renca-Neo et Renca-rHCaRG après 24 h d'incubation. Réalisées au microscope optique. **B :** Test de dégradation de la matrice de gélatinase marquée avec un fluorophore Alexa 488. Les flèches blanches représentent les zones dégradées.

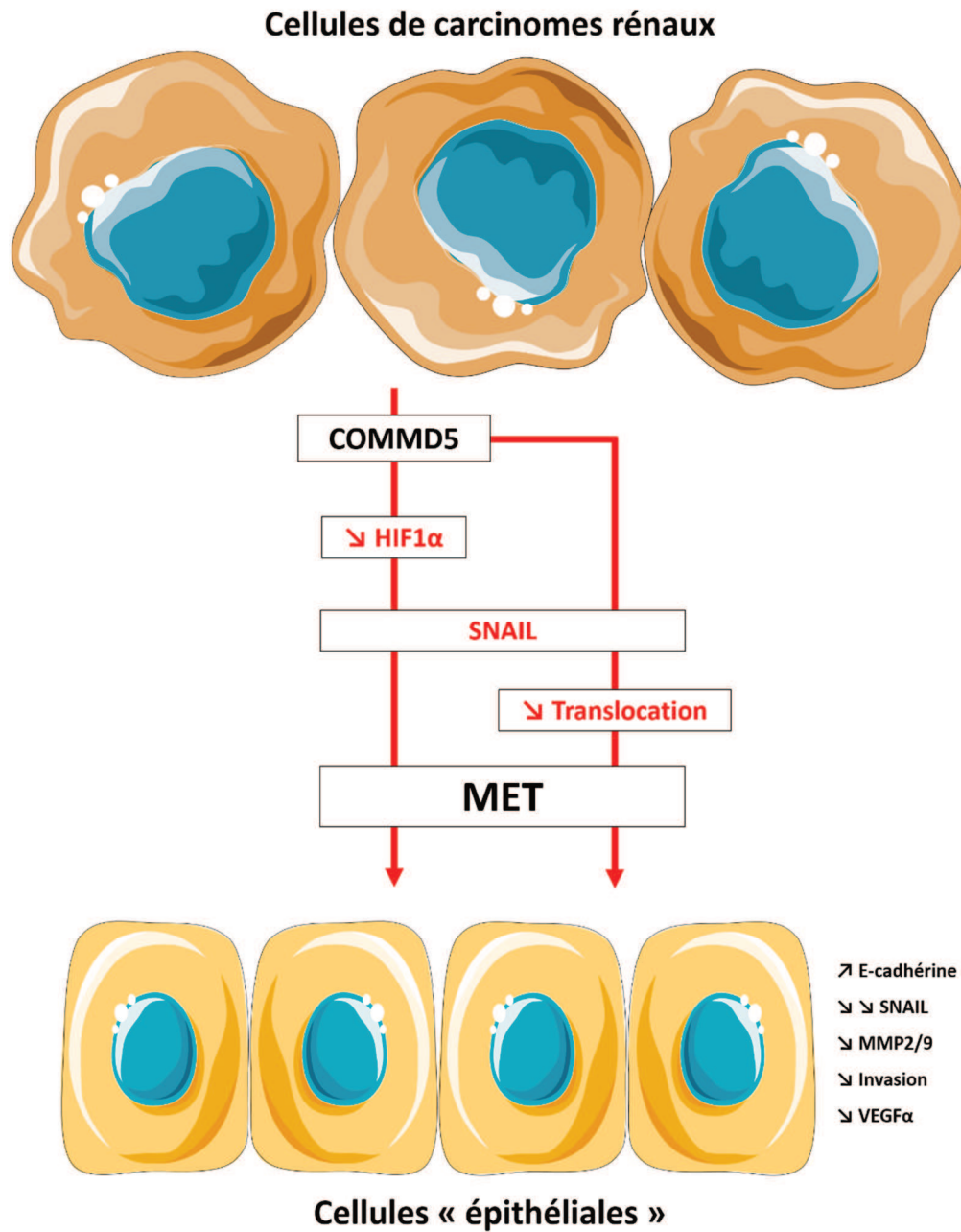


## D - Conclusions

Le mécanisme d'EMT est un processus important dans le développement tumoral. Dû à la surexpression des facteurs de transcription SNAIL, TWIST et ZEB, les cellules perdent leur caractère épithélial et acquièrent des caractéristiques mésenchymateuses. La présence des métalloprotéases MMP2 et MMP9 dans les tumeurs RCC favorise l'invasion cellulaire et l'apparition de métastases. SNAIL en particulier, régule positivement la transcription de ces métalloprotéases. Contrôler ce phénomène d'EMT au cours de la tumorigénèse est donc essentiel pour lutter contre l'expansion de la tumeur.

Dans les cellules dé-différenciées de carcinome de rein, la surexpression de COMMD5 a permis une re-différenciation cellulaire comme en témoignent l'augmentation de l'E-cadhérine et la diminution du marqueur mésenchymateux  $\alpha$ SMA. La protéine E-cadhérine étant un marqueur de référence dans la caractérisation tumorale, son contrôle est médié par les facteurs de transcription SNAIL, TWIST et ZEB. COMMD5 a induit une baisse de l'expression de SNAIL par l'intermédiaire de la diminution de HIF1 $\alpha$ . De plus, COMMD5, par l'intermédiaire de son domaine COMM, interagit avec SNAIL et agit sur la translocation de ce dernier du cytoplasme vers le noyau. La présence de COMMD5 a permis de séquestrer SNAIL au niveau du cytoplasme tandis que son absence a accéléré l'importation nucléaire de SNAIL. Enfin, la surexpression de COMMD5 dans les cellules de carcinome de rein a fortement diminué l'invasion par l'inhibition des métalloprotéases MMP2 et MMP9. En conclusion, la restauration de COMMD5 dans les carcinomes de rein réduit drastiquement le caractère oncogénique des tumeurs.

## E - Conclusions schématisées



*Figure 9 : Schéma du mécanisme d'inhibition de SNAIL par COMMD5 via HIF1 $\alpha$  et d'induction de la MET dans les cellules RENCA.*

La surexpression de COMMD5 dans les cellules de carcinome rénal inhibe la sous-unité  $\alpha$  du facteur de transcription HIF1 et diminue l'expression de SNAIL empêchant ainsi l'activation des gènes MMP2, MMP9 ainsi que VEGF $\alpha$ . COMMD5 entraîne une re-différenciation des cellules caractérisée par une augmentation de l'expression d'E-cadhérine.

## F - Annexes

**Tableau I : Liste des anticorps primaires et secondaires**

Anticorps	Dilutions	Compagnies
<i>Primaire</i>		
Lapin anti-COMMD5	1/2000	ProteinTech
Souris anti-HIF1 $\alpha$	1/500	SantaCruz Biotechnology
Lapin anti- $\alpha$ -Tubuline	1/40000	Abcam
Lapin anti-ZEB	1/2000	Cell Signaling
Lapin anti-SNAIL	1/2000	Cell Signaling
Lapin anti-NUP98	1/2000	Cell Signaling
lapin anti-GST	1/90000	SantaCruz Biotechnology
Souris anti-E-cadhérine	1/4000	BD Transduction Laboratories
<i>Secondaire</i>		
IgG anti-lapin	1/10000	SantaCruz Biotechnology
IgG anti-souris	1/10000	SantaCruz Biotechnology

**Tableau II : Liste des amorces sens et antisens**

Gènes	NM_accessions		Séquences
COMMD5	025536.2 / 139108.2	Sens	CTGGCGGGCACACACA
		Antisens	CCCAAATGCCAAACTGGC
E-cadhérine	009864.3	Sens	TTGGTGTGGGTCAGGAAATC
		Antisens	GTGTCCCTCCAAATCCGATAC
GAPDH	001289726.1	Sens	AAGGTCATCCCAGAGCTGAA
		Antisens	CTGCTTCACCACCTTCTTGA
SNAIL	011427.3	Sens	ACTATGCCGCGCTCTTTC
		Antisens	GTAGGGCTGCTGGAAGGTAATA
MMP9	013599.4	Sens	CAATCCTTGCAATGTGGATGTT
		Antisens	CCTGTAATGGGCTTCTCTATG
MMP2	00860.3	Sens	CTGGAATGCCATCCCTGATAA
		Antisens	GGTTCTCCAGCTTCAGGTAATAA
18S	003286.2	Sens	CGGCTACCACATCCAAGGAA
		Antisens	GCTGGAATTACCGCGGCT
VEGF $\alpha$	001025257.3	Sens	AGGCTGCTGTAACGATGAAG
		Antisens	TCTCTATGTGCTGGCTTTG
$\alpha$ SMA	007392.3	Sens	CTGACAGAGGCCACTGAA
		Antisens	CATCTCCAGAGTCCAGCACA

## **Chapitre IV : HCaRG/COMMD5 inhibits ErbB receptor-driven renal cell carcinoma**

Hiroyuki Matsuda, Carole G. Champion, Kyoko Fujiwara, Jin Ikeda, Suzanne Cossette, Thomas Verissimo, Maiko Ogasawara, Louis Gaboury, Kosuke Saito, Kenya Yamaguchi, Satoru Takahashi, Morito Endo, Noboru Fukuda, Masayoshi Soma, Pavel Hamet, Johanne Tremblay

*Article publié dans le journal Oncotarget en 2017*

*(Oncotarget. 2017 May 19;8(41):69559-69576. doi: 10.18632/oncotarget.18012.)*

## **A - Résumé de l'article**

Les études portant sur la protéine COMMD5 montrent qu'elle participe à la régulation de nombreux processus biologiques dont la prolifération, la migration, la différenciation cellulaire et la régulation de l'EMT. Dans les chapitres précédents de cette thèse, nous avons constaté que COMMD5 était régulée négativement durant le développement du cancer du rein par HIF1 $\alpha$  et qu'elle était indispensable au maintien de l'intégrité des propriétés épithéliales des cellules. De plus, nous avons observé que COMMD5 contrôlait la re-différenciation des cellules de carcinomes rénaux par l'activation de la MET.

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la régulation des récepteurs tyrosine kinase de la famille ErbB dans les carcinomes rénaux. En effet, dans une grande majorité de cancers, l'expression du récepteur EGFR est fortement augmentée entraînant une activation permanente des voies de signalisations sous-jacentes. La surexpression du récepteur EGFR entraîne une augmentation de la prolifération, induit une dé-différenciation et favorise la migration cellulaire. Le contrôle de l'activation du récepteur EGFR est donc un élément essentiel dans la stratégie thérapeutique contre le cancer.

L'hypothèse formulée dans ce chapitre est que la restauration de COMMD5 dans les carcinomes rénaux puisse contribuer à la régulation de la prolifération et à la différenciation cellulaire par l'intermédiaire de la régulation négative des récepteurs ErbB.

Les résultats de cette étude montrent que les ccRCC surexprimant COMMD5 présentent un phénotype plus différencié par rapport aux cellules contrôles. De plus,

COMMD5 possède également la capacité d'inhiber la prolifération cellulaire par l'augmentation de la durée du cycle cellulaire. En effet, la surexpression de COMMD5 allonge la durée de manière significative la phase G2/M et induit l'autophagie. Dans un modèle *in vivo* de souris, le développement de tumeurs rénales est diminué par COMMD5. D'un point de vue cellulaire, COMMD5 induit une diminution de l'expression des récepteurs EGFR et ErbB-3 due à une hyperméthylation des promoteurs et entraîne la déphosphorylation d'ErbB-2, favorisant ainsi l'inactivation des voies de signalisation sous-jacentes Pi3K/AKT et mTOR. Les résultats d'analyse de biopsies montrent que l'expression de COMMD5 est corrélée avec la survie des patients atteints de carcinomes à cellules rénales.

Les résultats obtenus dans ce chapitre montrent que COMMD5 joue un rôle dans l'inhibition de la progression tumorale en tant qu'inhibiteur des récepteurs de la famille ErbB et pourrait être considéré comme un marqueur pronostique de survie chez les patients atteints de carcinomes à cellules rénales.

### **Contribution des auteurs**

Dr Hiroyuki Matsuda et Dre Johanne Tremblay ont conçu l'étude et rédigé le manuscrit. Dr Hiroyuki. Matsuda a effectué l'ensemble des expériences et des analyses de données dans cette étude.

Dre Carole Champion a participé à l'acquisition et à l'analyse des images au microscope confocale, a l'écriture du manuscrit et a réalisé certaines expériences de Western blot.

Thomas Verissimo a réalisé certaines PCR en temps réel, ainsi que certaines expériences de Western Blot et de cultures cellulaires. De même, il a participé à la correction du manuscrit.

Suzanne Cossette a réalisé des expériences de Western blot et a participé aux expériences de cultures cellulaires et certains Western blot. Elle a participé à la correction du manuscrit.

Le Dr Pavel Hamet a contribué à la conception de l'étude et a relu le manuscrit de manière critique.

# HCaRG/COMMD5 inhibits ErbB receptor-driven renal cell carcinoma

Hiroyuki Matsuda<sup>1, 2, 3</sup>, Carole G. Champion<sup>1</sup>, Kyoko Fujiwara<sup>3</sup>, Jin Ikeda<sup>3</sup>, Suzanne Cossette<sup>1</sup>, Thomas Verissimo<sup>1</sup>, Maiko Ogasawara<sup>3</sup>, Louis Gaboury<sup>4, 5</sup>, Kosuke Saito<sup>3</sup>, Kenya Yamaguchi<sup>6</sup>, Satoru Takahashi<sup>6</sup>, Morito Endo<sup>7</sup>, Noboru Fukuda<sup>8</sup>, Masayoshi Soma<sup>3</sup>, Pavel Hamet<sup>1, 2</sup>, Johanne Tremblay<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), 900 Saint-Denis Street, Montréal, Québec, Canada, H2X 0A9

<sup>2</sup> Department of Medicine, 5Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, 2900 boulevard Édouard-Montpetit, Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4

<sup>3</sup> Division of General Medicine, Department of Internal Medicine, Department of Urology, Nihon University, 30-1 Oyaguchi-kamicho, Itabashi-ku, Tokyo, Japan, 173-8610

<sup>4</sup> Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie (IRIC), Université de Montréal, 2950 Chemin de Polytechnique, Pavillon Marcelle-Coutu, Quai 20, Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4

<sup>7</sup> Faculty of Human Health Science, Hachinohe Gakuin University, 13-98 Mihono, Hachinohe, Aomori, Japan, 031-8588

<sup>8</sup> University Research Center, Nihon University, 12-5, Gobancho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan, 102-8251

Correspondence to: Dr. J. Tremblay, CRCHUM, Room R08.456, 900 Saint-Denis Street, Montréal, Québec, Canada H2X 0A9. Telephone: +1 514-890-8247; Fax: +1 514-412-7638; email: johanne.tremblay@umontreal.ca

**Keywords: HCaRG/COMMD5, Renal cell carcinoma, EGFR, differentiation, autophagic cell death**

The number of figures: 7

The number of tables: 3



## **Abstract**

Hypertension-related, calcium-regulated gene (HCaRG/COMMD5) is highly expressed in renal proximal tubules, where it contributes to the control of cell proliferation and differentiation. HCaRG accelerates tubular repair by facilitating re-differentiation of injured proximal tubular epithelial cells, thus improving mouse survival after acute kidney injury. Sustained hyper-proliferation and de-differentiation are important hallmarks of tumor progression. Here, we demonstrate that cancer cells overexpressing HCaRG maintain a more differentiated phenotype, while several of them undergo autophagic cell death. Its overexpression in mouse renal cell carcinomas led to smaller tumor size with less tumor vascularization in a homograft tumor model. Mechanistically, HCaRG promotes de-phosphorylation of the proto-oncogene erythroblastosis oncogene B (ErbB)2/HER2 and epigenetic gene silencing of epidermal growth factor receptor and ErbB3 via promoter methylation. Extracellular signal-regulated kinase, AKT and mammalian target of rapamycin which mediate ErbB-downstream signaling pathways are inactivated by HCaRG expression. In addition, HCaRG is underexpressed in human renal cell carcinomas and more expressed in normal tissue adjacent to renal cell carcinomas of patients with favorable prognosis. Taken together, our data suggest a role for HCaRG in the inhibition of tumor progression as a natural inhibitor of the ErbB signals in cancer and as a potential prognostic marker for renal cell carcinomas.

## Introduction

Hypertension-related, calcium-regulated gene (HCaRG/COMMD5), the longest member of the COMM domain containing (COMMD) protein family, was identified as a gene that is more expressed in the renal proximal tubules (RPT)s of spontaneously-hypertensive than of normotensive rats [1]. Hypertension is not only a well-established risk factor for the progression of renal failure but also increases the risk for renal cell carcinoma (RCC) [2]. Moreover, patients with end-stage renal failure, acquired cystic kidney disease and tubular sclerosis are vulnerable to RCC [3]. Transgenic mice overexpressing HCaRG are more resistant to renal ischemia/reperfusion injury [4]. HCaRG accelerates RPT repair after injury by facilitating re-differentiation and controlling proliferation of injured RPT cells, resulting in a higher mice survival.

HCaRG up-regulation by rosiglitazone was shown to suppress the growth of gastric cancer in the rat model [5]. It is also known that rosiglitazone inhibits RPT cell proliferation through the down-regulation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways [6]. The erythroblastosis oncogene B (ErbB) receptors such as epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB1/HER1) and ErbB2, also known as HER2 or p185c-neu, are implicated and overexpressed in the development of many types of cancer, and undergo several alterations in human cancers [7, 8]. Inhibitors targeting the ErbB2 selective tyrosine kinase and combined blockade of PI3K/AKT and MAPK pathways inhibit tumor growth including RCC [9, 10]. A recent study reported that HCaRG and other COMMD proteins were decreased in non-small cell lung cancer, whereas increased COMMD9 promoted

cell proliferation, migration and cell-cycle progression, and inhibited autophagy via transcription factor Dp-1/E2F transcription factor 1 activation [11]. Furthermore, COMMD1 has been shown to be suppressed in human cancer and its decreased expression to correlate with a more invasive tumor phenotype [12].

We hypothesized that a low level of HCaRG expression contributes to uncontrolled cell proliferation and de-differentiation in RCC. We demonstrate here that HCaRG is less expressed in RCC and that its overexpression prevents tumorigenesis and angiogenesis of RCC in a homograft mouse model and enhances autophagic cell death. Finally, we report here that the inhibition of tumor development by HCaRG is mediated by inactivation of ErbB signalling.

## Results

### **HCaRG inhibits cell-cycle progression and facilitates differentiation**

To test whether HCaRG might act as a tumor-suppressor gene, we initially evaluated the impact of its overexpression in a mouse renal adenocarcinoma cell line, Renca cells and a melanoma cell line, B16-F10 cells. Cells were stably transfected with control plasmid (Neo-Renca and Neo-B16-F10) or an expression plasmid containing rat HCaRG cDNA (HCaRG-Renca and HCaRG-B16-F10) as described previously [13]. As expected, rat HCaRG mRNA could be detected only in HCaRG-Renca and HCaRG-B16-F10 cells (supplementary Figure S1A), and HCaRG protein levels were higher in stably transfected HCaRG-Renca and HCaRG-B16-F10 cells than in Neo-control cells (Figure 1A). HCaRG overexpression inhibited cell proliferation of both Renca and B16-F10 cells as we previously reported for other cell types (Figure 1B) [1]. While HCaRG produced similar effects in two different cancer cell lines, the current study focused on RCC. Neo-Renca cells were spindle shaped and expressed high levels of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA), a marker of mesenchymal phenotype [14], whereas HCaRG-Renca cells had a more cobblestone-like epithelial shape and expressed E-cadherin, a marker of epithelial integrity (Figure 1C) [15].

Cell-cycle analysis of synchronized Neo- and HCaRG-Renca cells is shown in Figure 1D and Table 1. The cell-cycle length was approximately 8 hours in Neo-Renca cells. HCaRG overexpression increased cell cycle length by more than 4 hours. These data demonstrate that HCaRG inhibited cell proliferation by augmenting cell-cycle length with G2/M cell-cycle

accumulation and facilitating differentiation of Renca cells. Similar results were obtained with B16-F10 cells (supplementary Figure S1B).

### **HCaRG enhances autophagic cell death**

To assess the impact of HCaRG on cell death, both Neo- and HCaRG-Renca cells were seeded so as to reach the same number of living cells 24 hours after serum deprivation and were double-stained with calcein-AM and ethidium homodimer (EthD)-1 for relative fluorescence quantification (Figure 2A). The number of dead cells was 1.6-fold higher in HCaRG-Renca than in Neo-Renca cells. After 48 hours deprivation, the number of surviving HCaRG-Renca cells was 40 % of Neo-Renca cells. HCaRG produced the same effect in B16-F10 cells (supplementary Figure S2A). Programmed cell death (PCD), a regulated process crucial to organ homeostasis and tumor suppression, can be classified into several types that include apoptosis, cell death with autophagy and necroptosis [16]. In comparison with DNase I-treated positive control cells, there were only a few apoptotic cells with no differences between Neo- and HCaRG-Renca cells by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay 24 and 48 hours after serum deprivation (Figure 2B), and none in B16-F10 cells (supplementary Figure S2B). The activation of the proapoptotic mediator, caspase-3 was inhibited to the same extent 24 hours after serum deprivation (Figure 2C), suggesting that HCaRG had no impact on Renca cell apoptosis.

We then tested whether HCaRG induced autophagy. The expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3B)-II as well as LC3B puncta, a widely used marker of autophagosome [17], were markedly increased by serum deprivation in HCaRG-Renca and

HCaRG-B16-F10 but not in Neo-control cells (Figure 2C and 2D, supplementary Figure S2C and S2D). The inhibition of autophagy by treatment with chloroquinone (CQ), which is a pharmacological agent capable of impairing lysosomal acidification [18], caused a further increase in the amount of LC3B-II protein relative to the LC3B-I and enlarged LC3B puncta in HCaRG-Renca cells. As expected, cleaved-caspase-3 level was increased in HCaRG-Renca cells treated with CQ (Figure 2C). Moreover, large autolysosomes that were formed by the fusion of autophagosomes stained with Cyto-ID Green and lysosomes detected by LysoTracker Red probe were observed only in HCaRG-Renca cells, while the punctate distribution of autophagosomes did not co-localize with lysosomes in HCaRG-Renca cells treated with CQ treatment (Figure 2E). Flow cytometry was used to analyze dead cell sub-populations. As shown in Figure 2F, HCaRG overexpression significantly decreased dual-negative living cells. HCaRG-Renca cells showed a higher percentage of propidium iodide (PI)-positive/Annexin-V-negative necrotic cells with a reduced level of early (PI-negative/Annexin-V-positive) and late (dual-positive) apoptotic cells than Neo-Renca cells. Treatment of HCaRG-Renca cells with CQ increased mortality with a higher percentage of apoptotic cells than serum deprivation alone. These data indicate that the high level of autophagy induced by HCaRG overexpression under serum deprivation is associated with reduced rather than enhanced cell death.

To exclude the possibility that HCaRG-induced cell death is due to necroptosis, we incubated HCaRG-Renca cells with Necrostatin-1, which suppresses necroptosis by inhibiting receptor-interacting protein-1 kinase activity [19, 20]. Necrostatin-1 treatment decreased the number of living HCaRG-Renca cells with a parallel increase in the number of necrotic cells

(Figure 2F). We can therefore conclude that HCaRG expression in Renca cells does not promote apoptosis or necroptosis but rather fosters autophagic cell death.

### **HCaRG inhibits tumor growth and angiogenesis**

We then evaluated the effects of HCaRG on tumor growth in vivo using a homograft tumor model. Six syngeneic BALB/c mice per group were injected subcutaneously with HCaRG-Renca cells (HCaRG-RCC) or Neo-Renca cells (Neo-RCC). The size of the tumors was measured 28 days after injection. The tumor size of HCaRG-RCCs was 32 % of the tumor size of Neo-RCCs (Figure 3A). HCaRG-RCCs also appeared to be more differentiated than Neo-RCC as demonstrated by their higher content in E-cadherin and lower  $\alpha$ SMA levels (Figure 3B). In addition, hematoxylin and eosin (H&E) staining of tumors showed a higher number of multinucleated giant cells in HCaRG-RCCs compared to Neo-RCCs (Figure 3C). We corroborated that HCaRG overexpression inhibited cell proliferation in RCCs by immunostaining with the proliferating nuclear cell antigen (PCNA) and Ki-67 (Figure 3C). These data suggest that HCaRG inhibited tumor growth of RCCs by maintaining a more differentiated phenotype and by controlling cell proliferation, suggesting a role of HCaRG as a tumor-suppressor gene in RCC.

We concurrently examined the effects of HCaRG on angiogenesis in experimental RCCs. Tumor angiogenesis is induced by the secretion of various growth factors including platelet-derived growth factor (PDGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF). PI3K/AKT signaling pathway controls these angiogenic factors through the activation of transcriptional regulator hypoxia inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  [21, 22]. We showed that HIF-1 $\alpha$  expression was diminished in HCaRG-RCCs (Figure 3B). We then demonstrated subsequent reduction of VEGFA

mRNA levels in HCaRG-RCCs (Figure 3D) and serum VEGF concentration in HCaRG-RCC mice (Table 2). To confirm the anti-angiogenic effect of HCaRG in experimental RCCs, we performed immunohistochemical staining of tumor microvessels using anti-CD34-antibody (Figure 3E) [22]. HCaRG-RCCs clearly had less CD34-positive microvessels and endothelial cells relative to Neo-RCCs. These data show that HCaRG overexpression negatively controlled the transcription of VEGF by down-regulating HIF-1 $\alpha$ , thus reducing tumor angiogenesis.

### **HCaRG targets ErbB receptors and their signaling pathways**

Oncogene amplification and overexpression of ErbB receptors have been observed in many human tumors of epithelial origin, and have been linked to cancer development and progression [23]. We thus examined the effect of HCaRG on the expression/activation of ErbB receptors and their downstream signaling pathways. HCaRG overexpression dramatically inhibited the expression/phosphorylation of EGFR and ErbB3 in experimental RCCs (Figure 3B). Interestingly, while ErbB2 expression was not different between Neo- and HCaRG-RCCs, its phosphorylation was abolished by HCaRG overexpression.

The MAPK and PI3K/AKT represent the major ErbB signaling pathways [7, 23]. HCaRG overexpression inhibited these signaling pathways in experimental RCCs as illustrated in Figure 3B. More precisely, HCaRG overexpression did not reduce extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 expression, but inhibited its phosphorylation. The most important regulators of PI3K are the catalytic subunit p110 $\alpha$  and its associated regulatory subunit p85/p55 [24]. Again, HCaRG overexpression did not reduce p110 $\alpha$  expression, but inhibited p85/p55 phosphorylation. Similarly, AKT level was not decreased by HCaRG overexpression but its



phosphorylated state was diminished. The levels of p53, which acts as a p21 transcriptional activator [25], were not different between Neo- and HCaRG-RCCs, while p21 was increased in HCaRG-RCCs independently of p53 (Figure 3D). In addition, the mRNA levels of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B, which is indirectly controlled by AKT and stimulates cell survival, proliferation and angiogenesis in cancers [24, 26], was significantly lower in HCaRG-RCCs relative to Neo-RCCs. These data suggest that the MAPK and PI3K/AKT signaling pathways were inactivated as a consequence of the down-regulation of EGFR and ErbB3 by HCaRG overexpression. The inhibitory effect of HCaRG on ErbB expression was also seen in cultured Renca cells (Figure 4A). Similar pattern of ErbB receptor expression was seen in B16-F10 cells, with the exception of EGFR that was not detectable in this cell line (supplementary Figure S3A). Furthermore, we showed that this effect is specific to HCaRG expression as knockdown of HCaRG by small interfering RNA (siRNA) increased EGFR and ErbB3 expressions in wild-type (WT)-Renca cells (Figure 4B), suggesting that HCaRG controls the expression of EGFR/ErbB receptor family and their subsequent signaling pathways in Renca and B16-F10 cells (Figure 4C and 4D, Supplementary Figure S3B and S3C).

### **HCaRG leads to DNA hyper-methylation of EGFR and ErbB3**

To investigate the mechanism by which HCaRG suppresses ErbB receptors, we performed luciferase reporter assays for human EGFR, ErbB2 and ErbB3 promoters (Figure 4E). Promoter activities of EGFR and ErbB3 but not of ErbB2 were significantly lower in HCaRG-Renca cells than in Neo-controls while their mRNA degradation was not different (Figure 4F), suggesting that HCaRG effects occur at the transcriptional level. We then observed that the

diminished EGFR and ErbB3 mRNA levels in HCaRG-Renca cells were rescued and/or increased by treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR), which is a demethylating agent that inhibits DNA methyltransferase activity, in a dose-dependent manner (Figure 4G). In fact, several CpG sites located in the EGFR and ErbB3 promoters showed higher methylation levels in HCaRG-Renca cells than in Neo-Renca cells (Figure 5), and these hyper-methylated CpG sites in HCaRG-Renca cells could be demethylated by 5-Aza-CdR treatment. These data indicate that a hyper-methylated state in EGFR and ErbB3 promoters could result in their transcriptional gene silencing observed in HCaRG-Renca cells.

#### **HCaRG levels in RPTs predict survival of patients with RCC**

Human clear-cell RCCs (ccRCCs) and normal tissues adjacent to tumors were immunohistochemically stained with anti-HCaRG-antibody (Figure 6A). HCaRG levels were much lower in ccRCCs tumors than in their paired normal tissues. The strongest HCaRG staining intensity was seen in normal RPTs around tumors of smaller size. The compilation of ccRCCs from 117 subjects is shown in Figure 6B and Table 3. Classification of normal RPTs into high (strong staining) and low (weak/absence staining) levels of HCaRG showed a significant difference in tumor diameter ( $P = 0.0362$ ), pathological T stage ( $P = 0.0041$ ), Fuhrman grade ( $P = 0.0085$ ) and recurrence within 5 years ( $P = 0.0296$ ). HCaRG levels in normal RPTs were negatively correlated with tumor size and nuclear grade. The correlation of HCaRG expression in normal tissues with survival was also analyzed. Figure 6C illustrates the recurrence-free survival curves during 5 years of patients classified into low and high HCaRG groups. Low

HCaRG levels in normal tissues were significantly ( $P = 0.0396$ ) associated with worse clinical outcome.

Since high expression level of HCaRG in RPTs could be involved in the slow growth rate of ccRCC, we lastly determined if HCaRG secreted by RPTs inhibits tumor growth. For this purpose, we transfected mouse kidney epithelial cells with control plasmid (Neo-TCMK-1) or rat-HCaRG expression plasmid (HCaRG-TCMK-1). As expected, both intracellular and secreted HCaRG protein levels were higher in HCaRG-TCMK-1 cells than in Neo-TCMK-1 cells (Figure 6D). Cell-culture supernatants of HCaRG-TCMK-1 cells inhibited cell proliferation of WT-Renca cells after 48 hours compared to cells incubated with cell-culture supernatant of Neo-TCMK-1 cells (Figure 6E). The expression of EGFR and ErbB3 was also suppressed in WT-Renca cells incubated with cell-culture supernatant of HCaRG-TCMK-1 cells after 96 hours, while endogenous HCaRG and ErbB2 expression was not different (Figure 6F).

## Discussion

About 270,000 people worldwide are diagnosed with kidney cancer every year and nearly 120,000 die from it annually. Until the underlying pathophysiological mechanisms of renal oncogenesis is known, partial or radical nephrectomy will remain the main curative treatment for localized RCC while the current therapy for advanced RCC is still inadequate [3, 27-29]. We report here that HCaRG reduced tumor enlargement and facilitated differentiation in RCC through the inactivation of the ErbB receptor tyrosine kinase family. Upon binding their specific ligands, ErbB receptors undergo homodimerization and/or heterodimerization, and subsequent transphosphorylation of their intrinsic kinase domain. Despite the fact that there is no known extracellular ligand for ErbB2, it is the preferred heterodimerization partner of all the other ErbB receptors [7, 30]. Due to its enhanced expression in cancers and involvement in essential signaling processes, ErbB2 constitutes an important target for cancer therapy. We found that HCaRG overexpression markedly inhibited ErbB2 phosphorylation without reducing its protein level. The other ErbB receptors, EGFR and ErbB3, were suppressed by HCaRG overexpression at the transcriptional levels through the modification of the methylated status of their promoter regions, and conversely knockdown of HCaRG increased EGFR and ErbB3 expression. These data suggest that the increased methylation status of EGFR and ErbB3 promoters induced by HCaRG overexpression results in a reduction of their protein levels and subsequent reduced capacity to heterodimerize with ErbB2. Widespread DNA hyper- or hypomethylation are associated with underlying gene mutations of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ccRCC [31].

Recent advances into the molecular understanding of RCC have contributed to the development of novel molecularly targeted therapeutics such as VEGF-antibody and small molecules interfering with tyrosine kinase receptors and mammalian target of rapamycin (mTOR) [32, 33]. Our studies also demonstrate that HCaRG overexpression inactivates the MAPK and PI3K/AKT signaling pathways downstream of ErbB receptors in renal carcinoma and melanoma cells (Figure 3 and 4, supplementary Figure S3). In cancer, these crucial pathways are frequently inhibited, resulting in perturbations in downstream targets that deregulate growth factors and cell survival signals [24, 30, 34]. We thus conclude that HCaRG has a potential for tumor suppression not only in ccRCC but also in other ErbB- or PI3K/AKT signaling-driven cancers including melanoma. In our previous reports, HCaRG inhibited cell proliferation and facilitated differentiation through the induction of p21, transactivated by a p53-independent pathway [4, 35]. p21 induction has been shown to be controlled by the PI3K/AKT pathway through nuclear export of nuclear forkhead box (FoxO) proteins [24]. Furthermore, the AKT/mTOR signals lead to increased expression of HIF-1 $\alpha$  and subsequent angiogenic factors including VEGF and PDGF [30, 36]. Under normal conditions, HIF-1 $\alpha$  is degraded by von Hippel-Lindau gene (VHL), however its levels are abnormally high in ccRCC due to dysfunction or absence of VHL [37]. In our study, HCaRG overexpression significantly reduced tumor vascularization most probably by suppressing VEGF through the inactivation of AKT/mTOR/HIF signaling independently of abnormal VHL expression (Figure 4C). Our results support the notion that lower HCaRG expression observed in ccRCC may contribute to tumor-associated sustained proliferative phenotypes and neovasculature, thus resulting in rapid tumor progression (Figure 7).

Evading PCD is one of the critical features of tumorigenesis. PCD can be caused not only by apoptotic signals but also by necroptosis and autophagic cell death which is defined by morphological characteristics such as autophagosome/autolysosome formation [16, 38, 39]. In this study, HCaRG induced autophagy under serum deprivation most probably through the inactivation of PI3K/AKT/mTOR pathway. Autophagy can help cancer cells to survive under hypoxia or insufficient nutritional condition [40]. Over the past decade, many studies have shown that autophagy is critically important for the survival, activation and differentiation of multiple cell types. During malignant transformation, as well as in response to cancer therapy, autophagy reportedly promotes either cell survival or death. We showed here that inhibition of autophagy by CQ treatment enhanced apoptosis with caspase-3 activation and impaired Renca cell survival. It seems that autophagy induced by serum deprivation is involved in anti-apoptosis. On the other hand, a high level of autophagy can cause necrotic cell death that is not associated to necroptosis and inactivation of autophagy is related to tumorigenesis [20, 38, 41]. The induction of autophagosome/autolysosome formation was observed only in HCaRG-Renca cells and HCaRG overexpression was associated with a 3-fold increase in the percentage of necrotic cells that was not diminished by the necroptosis inhibitor, Necrostatin-1. Moreover, the presence of multinucleated giant cells was a characteristic of HCaRG-RCCs, and HCaRG overexpression led to the appearance of multinuclear giant cells and over-activated autophagy in these cells (Supplementary Figure S4A and S4B). Altogether, our data suggest that activated autophagy by HCaRG promotes PCD rather than prolong cancer cell survival.

We previously reported that HCaRG levels are decreased in various cancer cell lines including glioblastoma, a partly differentiated RCC and a moderately differentiated hepatocellular tumor [1]. Immunohistochemistry of surgical specimens shows that HCaRG expression is suppressed in ccRCC specimens compared to normal tissues adjacent to tumors. Tumor size is one of the best predictors of RCC prognosis [28], and our study confirms that tumor size and recurrence are higher in patients with low HCaRG levels in normal tissues than in patients with high levels of HCaRG. Numerous studies suggest that biomarkers levels from normal-appearing tissue may be more reliable, due to their homogeneity, compared to the heterogeneous nature of tumors and we are showing here that HCaRG levels in normal tissues correlated with survival rate of patients with ccRCC. In addition, HCaRG secreted from renal epithelial cells inhibited tumor cell proliferation and suppressed the expression of ErbB receptors (EGFR and ErbB3). While the mechanisms of action of secreted HCaRG is still unknown, we have recently observed that intracellular HCaRG controls EGFR internalization and recycling to the cell membrane (Campion et al. unpublished data). Schneider et al.[42] reported that gene expression levels in tumor-adjacent normal tissue might reflect the regulation of the tumor microenvironment that indicates the possibility of recurrence. Our data suggest that higher HCaRG levels in normal tissue around the tumors could favor controlled cell proliferation and differentiation, thus inhibiting tumor growth and that the screening for HCaRG expression levels and somatic mutations of HCaRG not only in ccRCC but also in normal tissues could be a marker for renal cancerization, progression and prognosis of ccRCC.

Another member of the COMMD protein family, COMMD1, has also been shown to be decreased in a variety of cancers [12]. COMMD1 was shown to inhibit HIF-mediated gene expression, resulting in reduction of tumor metastases. Members of the COMMD protein family are known to interact with one another [43, 44]. We have no evidence that COMMD1 is involved in HCaRG/COMMD5 effects reported here as HCaRG overexpression in Renca cells did not modify COMMD1 expression, but we cannot exclude that HCaRG might interact with other members as it does with COMMD1 in ccRCC (Supplementary Figure S5A and S5B).

In conclusion, this is the first report on the expression and clinical significance of HCaRG in ccRCC suggesting that HCaRG could be marker of development and progression of ccRCC. Our data demonstrate that overexpression of HCaRG inhibits RCC development and tumor angiogenesis by inactivating the proto-oncogene, ErbB2, and gene silencing of EGFR and ErbB3. HCaRG preserves cell differentiation and promotes autophagic cell death. HCaRG/COMMD5 acts as a tumor suppressor gene of RCC and as such restoring its levels to control EGFR/ErbB signaling holds potential to treat cancer.



## **Materials and methods**

All procedures in this project are conformed to guidelines of the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of the Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal.

### **Studies using human ccRCC samples**

The use of ccRCC specimens was approved by the Examination Committee for Clinical Research of Nihon University Itabashi Hospital. The patients underwent surgery for ccRCC at Nihon University Itabashi Hospital (Tokyo, Japan) from 1997 to 2006. The samples were collected from the archives of the Department of Pathology of Nihon University. All patients provided written informed consent prior to surgery. Tumor size was based as the longest diameter of pathological specimens. Kaplan-Meier curves were generated for time to recurrence-free survival in Figure 6C were compared using the log-rank test.

For HCaRG immunohistochemical staining, sections including not only ccRCC but also normal tissue around tumors were deparaffinized, hydrated, and subjected to antigen unmasking using 10 mM citrate buffer pH 6.0 in a pressure cooker for 5 minutes. After blocking, the sections were incubated with anti-HCaRG-antibody (1:25, 10393-1-AP; Proteintech Group Inc., Chicago, IL, USA) overnight at 4°C. The reaction products were visualized using Cell & Tissue Staining kit (CTS005; R&D systems, Minneapolis, MN, USA) in accordance with the manufacturer's recommendations. Finally, sections were counterstained with Mayer's hematoxylin [4].

### **Stable transfection and cell culture**

Renca , TCMK-1 and B16-F10 cell line were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Both cancer cells were transfected with control plasmid (pcDNA/Neo1, V79020; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) or the plasmid encoding rat HCaRG using Attractene transfection reagent (301005; Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's protocol. Transfected cells were first selected in G418 (11811023; Thermo Fisher Scientific) containing medium, and single clones were isolated [13]. In some experiments, the cells were serum deprived in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI)-1640 medium or Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific) in the presence or absence of CQ (036-17972; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan), Necrostatin-1 (ab141053; abcam, Cambridge, MA, USA), 10 µg/ml of  $\alpha$ -amanitin (A2263; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or 5-Aza-CdR (A3656; Sigma-Aldrich).

### **siRNA knockdown**

HCaRG was knocked down with siRNA targeting a HCaRG sequence (4390815; Thermo Fisher Scientific). WT-Renca cells were transfected with 25 nM of negative control siRNA (4390844; Thermo Fisher Scientific) or siRNA-HCaRG with HiPerFect transfection reagent (301705; Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Forty-eight hours after transfection, the cells were harvested and knockdown efficacy was assessed by western blot.

### **Cell proliferation assay**

Stable transfected cells were seeded onto 96-well microliter plates and cell proliferation was measured with the cell proliferation Reagent WST-1 (5015944001; Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's recommendations. The absorption of WST-1 was measured at 450 nm using a Multilabel counter 1420 Victor3 V (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA).

### **Cell-cycle analysis**

Time course of cell-cycle profiles was performed by addition of 10 % fetal bovine serum (FBS) medium 24 hours after serum deprivation. Neo- and HCaRG-Renca cells were harvested to proceed to nucleic acid staining. Fixed cells were incubated in phosphate buffered saline (PBS; Thermo Fisher Scientific) containing 0.5 mg/ml bovine pancreatic DNase-free RNase (11119915001; Sigma-Aldrich) and 50 µg/ml PI (P1304MP; Thermo Fisher Scientific) for 20 minutes at room temperature. Cells were analyzed using FACScanto instrument (BD Biosciences, Mississauga, Canada), and compiled with ModFit LT (Verity Software House, Topsham, ME, USA) and FACS DivaSoftware (BD Biosciences).

### **Cell death analysis**

Plating of Neo- and/or HCaRG-Renca cells on 96-well microliter plates was adjusted so as to reach the same number of living cells at the time of cell death assessment. After serum deprivation, cells were double-stained with calcein-AM and EthD-1 (L3224; Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Live and dead cells were viewed by a fluorescence microscope (Olympus, Hicksville, NY, USA) and quantified using the microplate reader at wavelengths of 485 nm and 540 nm, respectively.

Apoptosis was detected with the DeadEnd Fluorometric TUNEL system (G3250; Promega). Briefly, after 24 hours of serum deprivation, cells were fixed and permeabilized. After pre-equilibration, strands of DNA were end-labeled by incubation with recombinant terminal deoxynucleotidyl transferase for 60 minutes at 37°C. The reaction was stopped by adding 2× saline-sodium citrate buffer for 15 minutes. After washing, the slides were mounted with Vectashield mounting medium with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, H-1200; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) and viewed by fluorescence microscopy.

Autolysosomes in Renca cells incubated with or without serum for 3 hours were detected by staining with the Cyto-ID Green autophagy detection reagent (ENZ-51031; Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA) and LysoTracker Red probe (L7528; Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. After incubation for 30 minutes, cells were fixed in 4 % paraformaldehyde and mounted with Vectashield mounting medium with DAPI.

To elucidate dead cell populations using the annexin-V/PI dual-staining assay (556547; BD Biosciences), collected cells were re-suspended in 100 µl of binding buffer containing 5 µl of FITC-Annexin-V and PI for 15 minutes at room temperature in the dark. After incubation, the cells were added to 400 µl of binding buffer and then analyzed using FACScanto instrument.

### **In vivo tumor growth**

BALB/c male mice were purchased from Charles River Laboratories international, Inc. (Montreal, QC, Canada). To generate subcutaneous tumor,  $1 \times 10^6$  Neo- or HCaRG-Renca cells were injected subcutaneously into the right flank of BALB/c mice under isoflurane anesthesia. Six 8-week old BALB/c mice were used per group. Tumors were measured on twice per week using caliper, and tumor volume (TV) was calculated using the following formula:  $TV = A \times (B)^2 \times 0.52$ . A and B were the longest length and width, respectively, for each tumor. After 4 weeks, the tumors were harvested and stained with H&E.

### **mRNA quantification and expression**

Real-time quantitative PCR was performed with diluted cDNA using designed Taqman probes (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR data were analyzed with standard curves and normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) with its specific primer sets (5' and 3' primers: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' and 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3') as described previously [4, 45]. Correlation coefficients for standard curves were all  $>0.95$ .

### **Western blot**

Rat tumor tissues, cultured cells and acetone-precipitated supernatants were lysed in a modified radioimmunoprecipitation assay protein extraction buffer as described previously [4]. Each sample was applied equally to 8-15 % polyacrylamide gels and transblotted to polyvinylidene difluoride membranes (GE healthcare, Uppsala, Sweden). After blocking, primary-antibodies to AKT1 (1:2000, 2938), phospho-AKT1 (1:1000, 9271), Caspase-3 (1:1000,

9665), ERK1/2 (1:1000, 4695), phospho-ERK1/2 (1:1000, 4370), LC3B (1:1000, 3868), mTOR (1:1000, 2972), phospho-mTOR (1:1000, 2971), PI3K p110 $\alpha$  (1:1000, 249) phospho-PI3K p85/p55 (1:500, 4228) (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA),  $\beta$ -actin (1:1000, sc-47778), EGFR (1:250, sc-03), ErbB2 (1:1000, sc-284), ErbB3 (1:1000, sc-285), phospho-ErbB2 (1:500, sc-81508), phospho-ErbB3 (1:250, sc-135654), HIF-1 $\alpha$  (1:1000, sc-53546), GAPDH (1:2000, sc-20357) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), phospho-EGFR (1:1000, 44-790G; Thermo Fisher Scientific),  $\alpha$ SMA (1:2000, ab32575; abcam), E-cadherin (1:2000, 610181; BD Biosciences) and HCaRG (1:2000) were incubated overnight, followed by incubation with secondary horseradish-peroxidase conjugated-antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) for 60 minutes. Immunocomplexes were detected by enhanced chemiluminescence (PerkinElmer Life Sciences).

### **Immunostaining**

Neo- and HCaRG-Renca cells were grown on sterile cover slips under the same conditions described above. For E-cadherin staining, cells were fixed and permeabilized in cold methanol. After blocking, cells were incubated with anti-E-cadherin-antibody (1:100) for 2 hours at room temperature. For  $\alpha$ SMA staining, cells were fixed in 4 % paraformaldehyde and permeabilized with 0.2 % Triton-X-100 in PBS. After blocking, cells were incubated with anti- $\alpha$ SMA-antibody (1:100) overnight at 4°C. For autophagosome assessment, cells were incubated with or without serum for 3 hours. Cells were then fixed, permeabilized and incubated with anti-LC3B-antibody (1:100) for 90 minutes at room temperature. After

incubation with secondary-antibodies (Thermo Fisher Scientific), the samples were mounted with Vectashield mounting medium with DAPI and viewed by fluorescence microscopy.

The ccRCC sections were stained using PCNA staining kit (931143; Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's recommendations, or incubated with anti-Ki-67-antibody (1:25, M7249; Dako, Glostrup, Denmark) or anti-CD34-antibody (1:25, ab8158; abcam). The quantification of CD34-positive microvessels was evaluated in 10 randomly-chosen non-overlapping fields per section for each mouse using Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Corporation, San Jose, CA, USA) [46]. The results were expressed as the percentage of CD34-positive area in total area of the field.

#### **Measurement of serum VEGF concentration**

Serum VEGF protein levels were determined by a mouse VEGF ELISA kit (KMG0111; Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Serum samples from mice injected with Neo- or HCaRG-Renca cells under the skin were collected at the end of the study and diluted 1:5 in incubation buffer.

#### **EGFR, ErbB2 and ErbB3 promoter activities**

Human EGFR 5' flanking region containing 1.7 kb of its promoter, human ErbB2 5' flanking region containing 0.7 kb of its promoter and human ErbB3 5' flanking region containing 2.2 kb of its promoter were cloned into multiple cloning sites of pGL4.18 luciferase reporter vector (E6731; Promega). Each reporter plasmid and pGL4.74-TK vector (E6921; Promega), as an internal control, were used to transfect Renca clones with Attractene

transfection reagent. Cells were harvested 48 hours post-transfection and luciferase activities were revealed using a Dual-luciferase reporter assay system (E1910; Promega).

### **MassARRAY quantitative methylation analysis**

Quantitative analysis of methylation level of EGFR and ErbB3 promoters was performed using a Sequenom MassARRAY Compact System as described previously [47]. Genome DNAs were extracted from cells using Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (A1120; Promega) according to the manufacturer's protocol and were treated with sodium bisulfite using the EZ-96 DNA Methylation Gold Kit (D5007; Zymo Research, Irvine, CA, USA). Primers were designed by MethPrimer software to span the promoter CpGi of both genes [48]. Details of primer information are listed in Supplementary Table S1. Bisulfite-treated DNA samples were applied for amplification of the target sequences using HotStarTaq DNA polymerase (203203; Qiagen) with specific primers. PCR products were treated with shrimp alkaline phosphatase and then subjected to in vitro transcription and ribonuclease A cleavage for the T-reverse reaction, as described in the manufacturer's instructions. The samples were incubated with Clean Resin to remove extra salt and spotted on a 384-element SpectroCHIP using a MassARRAY nanodispenser (Samsung, Seoul, Korea), followed by spectral acquisition on a MassARRAY Analyzer Compact MALDITOF MS. The data were analyzed by EpiTYPER software v1.0 (Sequenom, San Diego, CA, USA) to evaluate the quantitative methylation level of each CpG site or an aggregate of multiple CpG sites. The non-applicable reading and its corresponding site were eliminated during calculation.



### **Statistical analysis**

The animals were randomly divided into Neo- and HCaRG-Renca cells injected groups. Values were reported as mean  $\pm$  standard error. Values and percentages between groups were analyzed by Student's t test, two-way analysis of variance,  $\chi^2$  test or Fisher's exact test. All analyses were performed using JMP software v8 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant.

### **Acknowledgments and funding**

The authors are grateful to Catherine Michel, Renaud Balthazard, Yuko Katakawa, Dr. Junzheng Peng, Dr. Yoshihiro Suzuki-Karasaki and Dr. Shant Der Sarkissian for their expert technical assistance and advice, and gratefully acknowledge the help of Andrée Lévesque. This work was supported by a grant from Canadian Institutes of Health Research (MOP-133690 to J.T.) and Japan Society for the Promotion of Science (25830090 and 15K06844 to H.M.)

### **Conflicts of interest**

The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Solban N, Jia HP, Richard S, Tremblay S, Devlin AM, Peng J, Gossard F, Guo DF, Morel G, Hamet P, Lewanczuk R and Tremblay J. HCaRG, a novel calcium-regulated gene coding for a nuclear protein, is potentially involved in the regulation of cell proliferation. *J Biol Chem.* 2000; 275: 32234-32243.
2. Hamet P. Cancer and hypertension: a potential for crosstalk? *J Hypertens.* 1997; 15: 1573-1577.
3. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Algaba F, Patard JJ, Khoo V, Eisen T, Horwich A and Group EGW. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014; 25 Suppl 3: iii49-56.
4. Matsuda H, Lavoie JL, Gaboury L, Hamet P and Tremblay J. HCaRG accelerates tubular repair after ischemic kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2011; 22: 2077-2089.
5. Chen BL, Yu J, Zeng ZR, Chu WK, Wong CY, Cheng YY, Sung JJ, Hu PJ and Leung WK. Rosiglitazone suppresses gastric carcinogenesis by up-regulating HCaRG expression. *Oncol Rep.* 2008; 20: 1093-1097.
6. Choi IJ, Kim SY, Kwon CH and Kim YK. Rosiglitazone inhibits proliferation of renal proximal tubular cells via down-regulation of ERK and Akt. *Ren Fail.* 2010; 32: 103-111.
7. Hynes NE and Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5: 341-354.
8. Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R and Greene MI. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest.* 2007; 117: 2051-2058.
9. Deshane J, Siegal GP, Alvarez RD, Wang MH, Feng M, Cabrera G, Liu T, Kay M and Curiel DT. Targeted tumor killing via an intracellular antibody against erbB-2. *J Clin Invest.* 1995; 96: 2980-2989.
10. Nagasawa J, Mizokami A, Koshida K, Yoshida S, Naito K and Namiki M. Novel HER2 selective tyrosine kinase inhibitor, TAK-165, inhibits bladder, kidney and androgen-independent prostate cancer in vitro and in vivo. *Int J Urol.* 2006; 13: 587-592.

11. Zhan W, Wang W, Han T, Xie C, Zhang T, Gan M and Wang JB. COMMD9 promotes TFDP1/E2F1 transcriptional activity via interaction with TFDP1 in non-small cell lung cancer. *Cell Signal*. 2016; 30: 59-66.
12. van de Sluis B, Mao X, Zhai Y, Groot AJ, Vermeulen JF, van der Wall E, van Diest PJ, Hofker MH, Wijmenga C, Klomp LW, Cho KR, Fearon ER, Vooijs M, et al. COMMD1 disrupts HIF-1alpha/beta dimerization and inhibits human tumor cell invasion. *J Clin Invest*. 2010; 120: 2119-2130.
13. El Hader C, Tremblay S, Solban N, Gingras D, Beliveau R, Orlov SN, Hamet P and Tremblay J. HCaRG increases renal cell migration by a TGF-alpha autocrine loop mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 289: F1273-1280.
14. Dudas PL, Argentieri RL and Farrell FX. BMP-7 fails to attenuate TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in human proximal tubule epithelial cells. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2009; 24: 1406-1416.
15. Yang J and Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *The American journal of pathology*. 2001; 159: 1465-1475.
16. Kreuzaler P and Watson CJ. Killing a cancer: what are the alternatives? *Nat Rev Cancer*. 2012.
17. Mizushima N, Yoshimori T and Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*. 2010; 140: 313-326.
18. Lu Z, Luo RZ, Lu Y, Zhang X, Yu Q, Khare S, Kondo S, Kondo Y, Yu Y, Mills GB, Liao WS and Bast RC, Jr. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *The Journal of clinical investigation*. 2008; 118: 3917-3929.
19. Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A, et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol*. 2008; 4: 313-321.
20. Fulda S and Kogel D. Cell death by autophagy: emerging molecular mechanisms and implications for cancer therapy. *Oncogene*. 2015; 34: 5105-5113.

21. Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T and Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 2001; 12: 363-369.
22. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ and Abraham RT. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 7004-7014.
23. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA and Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*. 2000; 19: 3159-3167.
24. Bader AG, Kang S, Zhao L and Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5: 921-929.
25. el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y and et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res*. 1994; 54: 1169-1174.
26. Osaki M, Oshimura M and Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*. 2004; 9: 667-676.
27. Canda AE and Kirkali Z. Current management of renal cell carcinoma and targeted therapy. *Urology journal*. 2006; 3: 1-14.
28. Rini BI, Rathmell WK and Godley P. Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol*. 2008; 20: 300-306.
29. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010; 127: 2893-2917.
30. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007; 26: 6469-6487.
31. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature*. 2013; 499: 43-49.
32. Dutcher JP. Recent developments in the treatment of renal cell carcinoma. *Therapeutic advances in urology*. 2013; 5: 338-353.

33. Garcia-Donas J, Rodriguez-Moreno JF, Romero-Laorden N and Rodriguez-Antona C. Renal carcinoma pharmacogenomics and predictors of response: Steps toward treatment individualization. *Urologic oncology*. 2014.
34. Grant S. Cotargeting survival signaling pathways in cancer. *J Clin Invest*. 2008; 118: 3003-3006.
35. Devlin AM, Solban N, Tremblay S, Gutkowska J, Schurch W, Orlov SN, Lewanczuk R, Hamet P and Tremblay J. HCaRG is a novel regulator of renal epithelial cell growth and differentiation causing G2M arrest. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003; 284: F753-762.
36. Populo H, Lopes JM and Soares P. The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *Int J Mol Sci*. 2012; 13: 1886-1918.
37. Clark PE. The role of VHL in clear-cell renal cell carcinoma and its relation to targeted therapy. *Kidney Int*. 2009; 76: 939-945.
38. Tsujimoto Y and Shimizu S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ*. 2005; 12 Suppl 2: 1528-1534.
39. Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144: 646-674.
40. Fung C, Lock R, Gao S, Salas E and Debnath J. Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol Biol Cell*. 2008; 19: 797-806.
41. Wu W, Liu P and Li J. Necroptosis: an emerging form of programmed cell death. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012; 82: 249-258.
42. Schneider S, Park DJ, Yang D, El-Khoueiry A, Sherrod A, Groshen S, Streeter O, Iqbal S, Danenberg KD and Lenz HJ. Gene expression in tumor-adjacent normal tissue is associated with recurrence in patients with rectal cancer treated with adjuvant chemoradiation. *Pharmacogenet Genomics*. 2006; 16: 555-563.
43. Liu YF, Swart M, Ke Y, Ly K and McDonald FJ. Functional interaction of COMMD3 and COMMD9 with the epithelial sodium channel. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013; 305: F80-89.
44. Li H, Koo Y, Mao X, Sifuentes-Dominguez L, Morris LL, Jia D, Miyata N, Faulkner RA, van Deursen JM, Vooijs M, Billadeau DD, van de Sluis B, Cleaver O, et al. Endosomal sorting of Notch receptors through COMMD9-dependent pathways modulates Notch signaling. *J Cell Biol*. 2015; 211: 605-617.

45. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A and Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3: RESEARCH0034.
46. Dahab GM, Kheriza MM, El-Beltagi HM, Fouda AM and El-Din OA. Digital quantification of fibrosis in liver biopsy sections: description of a new method by Photoshop software. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004; 19: 78-85.
47. Fujiwara K, Ghosh S, Liang P, Morien E, Soma M and Nagase H. Genome-wide screening of aberrant DNA methylation which associated with gene expression in mouse skin cancers. *Mol Carcinog.* 2015; 54: 178-188.
48. Li LC and Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics.* 2002; 18: 1427-1431.

## Figure legends

**Figure 1: HCaRG facilitates differentiation of Renca cells and inhibits cell-cycle progression.** (A) Total (exogenous and endogenous) HCaRG protein levels, revealed by western blot, were higher in HCaRG-Renca and HCaRG-B16-F10 cells than in Neo-control cells. (B) Cell growth curves of Renca and B16-F10 clones. HCaRG-Renca and HCaRG-B16-F10 cells proliferated less than Neo-controls. †P <0.005. (C) Western blot and immunostaining of differentiation markers in Renca clones. E-cadherin was detected only in HCaRG-Renca cells while  $\alpha$ SMA expression was lower in HCaRG-Renca than in Neo-Renca cells. HCaRG promoted differentiation of Renca cells. Scale bars, 50  $\mu$ m. (D) Cell-cycle analysis by DNA content in Renca cells. Representative cell-cycle DNA histograms showed the effect of HCaRG overexpression on cell-cycle progression in Renca cells. The maximal peak of G2/M accumulation was observed at 4 hours in Neo-Renca and at 8 hours in HCaRG-Renca cells, respectively. HCaRG delayed cell-cycle progression by 4 hours with G2/M cell-cycle accumulation. G0/G1, G2/M and S phases are shown.

**Figure 2: HCaRG induces autophagic cell death distinct from apoptosis or necroptosis in Renca cells.** (A) Living cells and nuclei of dead cells were double-stained with calcein-AM (green) and EthD-1 (red), respectively, for relative fluorescence (FLU) quantification. HCaRG overexpression increased the number of dead cells compared to Neo-controls. Serum deprivation decreased the number of surviving cells in HCaRG-Renca cells compared to Neo-controls after 48 hours. †P <0.005. Scale bars, 100  $\mu$ m. NS, not significant. (B) TUNEL staining in synchronized Renca cells grown in serum depleted medium. Only a few apoptotic cells could

be detected with no differences between Neo- and HCaRG-Renca cells relative to the DNase I-treated positive control Renca cells. Scale bars, 100  $\mu\text{m}$ . (C) Western blots of LC3B and caspase-3 protein levels in Renca cells. The expression of LC3B-II was increased by HCaRG overexpression 24 hours after serum deprivation. Pro-caspase-3 levels were not different between Neo- and HCaRG-Renca cells. Cleaved-caspase-3 was reduced by serum deprivation in both Neo- and HCaRG-Renca cells. Inhibition of autophagy by CQ increased LC3B-II and cleaved-caspase-3 expression. (D) Immunofluorescence staining of LC3B in Renca cells. LC3B puncta were higher in HCaRG-Renca than Neo-cells after 3 hours serum deprivation. CQ treatment increased the number of enlarged LC3B puncta in HCaRG-Renca cells. Scale bars, 10  $\mu\text{m}$ . (E) Fluorescent stains of autophagosomes and lysosomes in Renca cells. Large autolysosomes (autophagosome-lysosome fusion) were detected only in HCaRG-Renca after 3 hours of serum deprivation. CQ treatment inhibited the formation of autolysosomes in HCaRG-Renca cells. Scale bars, 10  $\mu\text{m}$ . (F) Annexin-V/PI staining was performed to quantify the dead cell population. There were more PI-positive and Annexin V-negative necrotic cells in HCaRG-Renca cells than in Neo-Renca cells. HCaRG overexpression decreased dual positive apoptotic cells, in parallel. CQ treatment decreased significantly more living cells with a higher percentage of apoptotic cells than serum deprivation in HCaRG-Renca cells. Inhibition of necroptosis by Necrostatin-1 treatment increased the number of necrotic cells. The percentage of cells in each quadrant is indicated as mean  $\pm$  SD. ‡P <0.05, \*P <0.01, †P <0.005 compared to starved HCaRG-Renca controls.



**Figure 3: HCaRG inhibits tumor growth in a mouse homograft RCC model.** (A) Renca clones were implanted by subcutaneous injection ( $1 \times 10^6$  cells/mouse). HCaRG overexpression significantly inhibited tumor growth of homografted Renca cells as seen after 8 days. ‡P <0.05, \*P <0.01. (B) Tumor lysates obtained 28 days after implantation were analyzed by western blot using appropriate antibodies. HCaRG overexpression led to more differentiated tumor cells in experimental RCCs, as indicated by more E-cadherin and less of  $\alpha$ SMA compared to Neo-controls. Representative blots showed further that HCaRG suppresses EGFR and ErbB3. ErbB2 protein level was not changed by HCaRG overexpression, while its phosphorylation was diminished. The subsequent MAPK and PI3K/AKT pathways were inactivated in HCaRG-RCCs. (C) Representative images of H&E stain and immunostaining with two different proliferation markers, PCNA and Ki-67. HCaRG-RCCs showed less cell proliferation with increased multinucleated giant cells relative to Neo-RCCs. The black arrow indicates a multinucleated giant cell. Scale bars, 100  $\mu$ m. (D) The mRNA expressions of ErbB receptors and their downstream genes were demonstrated by Real-Time PCR. ‡P <0.05, †P <0.005. NS, not significant. (E) Representative images and quantitative data of immunostaining with anti-CD34-antibody. HCaRG overexpression markedly decreased CD34-positive microvessels and endothelial cells in experimental RCCs at day 28. \*P <0.01. Scale bars, 100  $\mu$ m.

**Figure 4: HCaRG suppresses EGFR and ErbB3 by enhancing their promoter methylation.** (A) The expression of total (t) ErbB receptors was demonstrated by Real-Time PCR and western blot. HCaRG overexpression reduced EGFR and ErbB3 expression at the

mRNA and protein levels in Renca cells. ErbB2 mRNA and total protein levels were not modified by HCaRG overexpression. †P <0.005. NS, not significant. (B) Knockdown of HCaRG with siRNA treatment in WT-Renca cells. siRNA-HCaRG treatment reduced HCaRG protein expression compared to a negative control (NC) and led to up-regulation of EGFR and ErbB3. ErbB2 expression was not changed by siRNA against HCaRG. (C) The effect of inhibition of MAPK and PI3K/AKT signals on downstream genes was demonstrated by Real-Time PCR in Renca cells. The decrement of HIF-1 $\alpha$  and subsequent VEGFA and PDGF genes was caused by HCaRG overexpression independent of the expression of anti-oncogene of RCC, VHL. †P <0.05, \*P <0.01, †P <0.005. NS, not significant. (D) Renca lysates were analyzed by western blot using appropriated antibodies. Representative blots show the inactivation of subsequent MAPK and/or PI3K/AKT signaling pathways by HCaRG overexpression. (E) HCaRG inhibits the transcriptional activity of EGFR and ErbB3 at the promoter level. Human EGFR, ErbB2 and ErbB3 5' flanking regions containing their respective promoters were cloned and transfected into Neo- or HCaRG-Renca cells. HCaRG overexpression repressed the promoter activities of EGFR and ErbB3, but not of ErbB2. Promoter activity was normalized to the activity of pGL4.74-TK control vector. †P <0.05, †P <0.005. (F) mRNA degradation of ErbB receptors was tested by inhibiting their transcription with  $\alpha$ -amanitin. mRNA levels were normalized to polymerase I-dependent transcription of the 28S ribosomal gene. mRNA degradation was presented as percentage of mRNA levels relative to controls without  $\alpha$ -amanitin. HCaRG did not cause mRNA degradation after 24 hours. (G) Demethylation of promoter DNA with treatment of 5-aza-2'-deoxycytidine rescued and/or increased mRNA levels of EGFR and ErbB3 in HCaRG-Renca cells in a dose-dependent manner. †P <0.05, †P <0.005.

**Figure 5: HCaRG fosters CpG island hyper-methylation of EGFR and ErbB3 promoters.**

Methylation level of CpG island located in EGFR and ErbB3 promoters was quantified using MassARRAY quantitative methylation analysis in Renca clones. Both EGFR and ErbB3 promoters showed significantly higher methylation levels in HCaRG-Renca cells than in Neo-Renca cells. Several hyper-methylated CpG sites located in EGFR and ErbB3 promoters in HCaRG-Renca cells were de-methylated 72 hours after treatment of 5-Aza-CdR. ‡P <0.05, \*P <0.01, †P <0.005.

**Figure 6: HCaRG is less expressed in human ccRCCs than in normal renal tubules. (A)**

Representative HCaRG immunohistochemical staining was performed on sections that included not only ccRCC (upper panels) but also normal kidney tissues adjacent to tumors. Strong HCaRG intensity was recorded in normal kidneys adjacent to smaller ccRCCs (maximum tumor diameter 30 and 40 mm) as in a and b. HCaRG staining intensity was weak in ccRCCs and renal tubules from patients with larger tumor size (maximum tumor diameter 70 and 90 mm) as in c and d. Scale bars, 100  $\mu$ m. (B) High HCaRG levels in normal renal tubules were associated with small tumor size of ccRCCs (‡P <0.05). Patients were classified into high and low HCaRG levels in renal tissues adjacent to tumors. (C) 5-year recurrence-free survival curves of ccRCC patients. High HCaRG levels in normal renal tubules are a predictor of better prognosis. (D) Total (exogenous and endogenous) HCaRG protein levels in cell lysates and acetone-precipitated supernatants of culture media from mouse kidney epithelial cells, TCMK-1 clones, revealed by western blot, were higher in HCaRG-TCMK-1 cells than in Neo-controls. HCaRG protein was secreted by renal tubular epithelial cells. (E) Cell growth curve of WT-Renca cells

incubated with cell-culture supernatant from Neo-TCMK-1 or HCaRG-TCMK-1 cells. Cell proliferation of WT-Renca cells incubated with cell-culture supernatant of HCaRG-TCMK-1 cells was inhibited compared to cells incubated with cell-culture supernatant of Neo-TCMK-1 cells. ‡P < 0.05, \*P < 0.01. (F) WT-Renca cells were incubated in cell-culture supernatant of Neo- or HCaRG-TCMK-1 cells for 96 hours. The cell-culture supernatant from HCaRG-TCMK-1 cells reduced the protein levels of EGFR and ErbB3 compared to cells incubated in cell-culture supernatant of Neo-TCMK-1 cells. Endogenous HCaRG and ErbB2 expression levels were not changed by these cell-culture supernatants.

**Figure 7: Scheme depicting the suppressive role of HCaRG in tumorigenic pathways of RCC.** Cancer cells overexpressing HCaRG show a more differentiated phenotype with lower cell proliferation than Neo-controls. HCaRG inhibits the phosphorylation of the proto-oncogene ErbB2 and inactivates subsequent MAPK and PI3K/AKT pathways by inducing the epigenetic gene silencing of EGFR and ErbB3 genes through their promoter methylation (Me). In addition, HCaRG facilitates programmed cell death by inducing autophagy via inactivation of AKT/mTOR pathway. As a result, tumor growth and angiogenesis of RCC are inhibited by HCaRG. The blue color indicates down-regulation or de-phosphorylation. The red color indicates up-regulation or activation.

**Table I : Cell-cycle analysis by DNA content in Renca cells.**

<b>Time (hour)</b>		<b>0</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>24</b>
<b>Neo</b>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> (%)	55.1	53.7	60.1	46.4	52.0
	G <sub>2</sub> /M (%)	15.9	24.3	16.3	13.6	15.6
	S (%)	29.0	22.0	23.6	40.0	32.4
<b>HCaRG</b>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> (%)	47.1	37.4	36.1	40.7	39.6
	G <sub>2</sub> /M (%)	22.5	23.5	37.1	29.3	26.8
	S (%)	30.4	39.1	26.8	30.0	33.6

**Table II : Serum VEGF concentration at day 28 (pg/ml).**

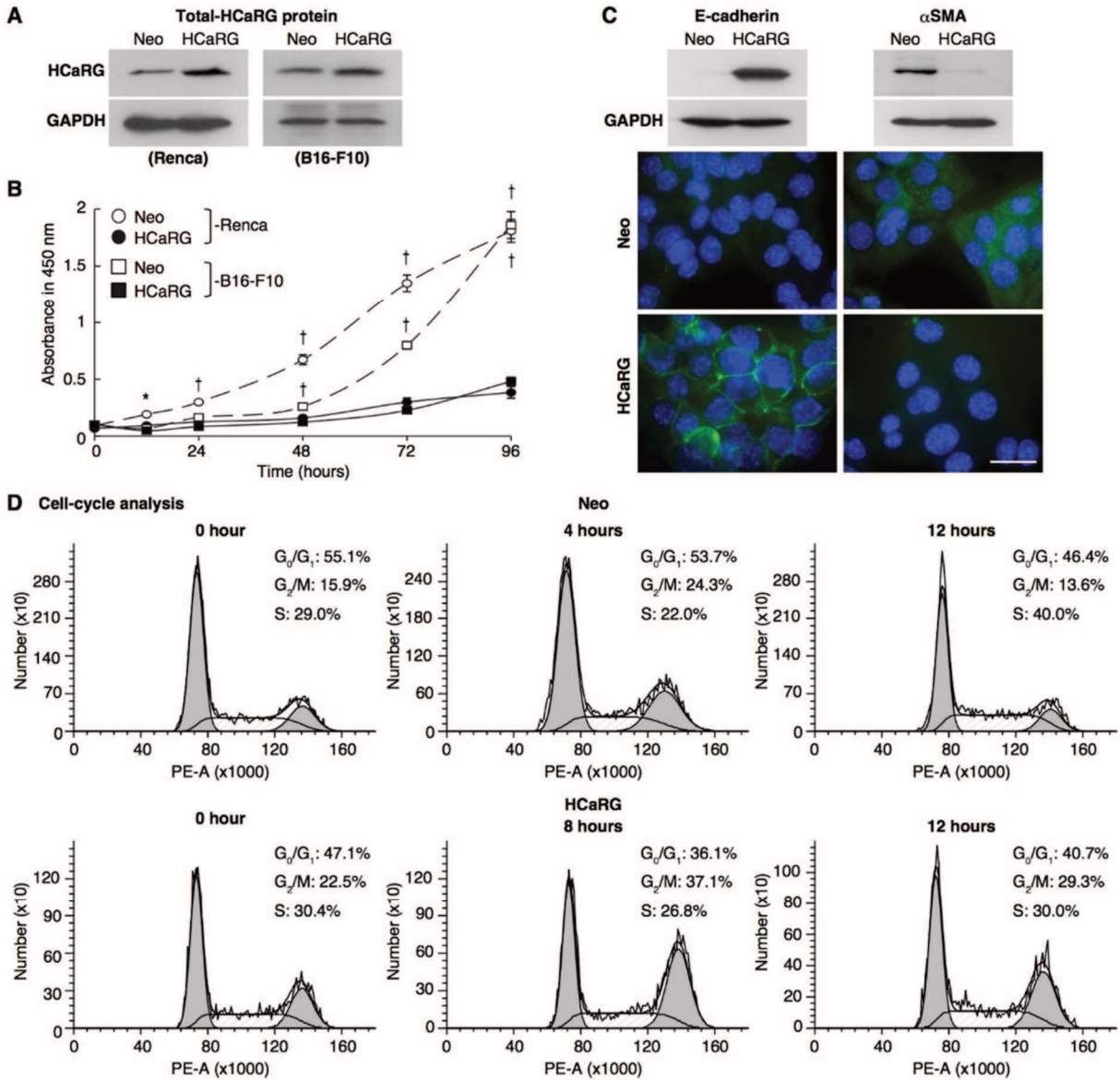
<b>Sham</b>	<b>Neo</b>	<b>HCaRG</b>
112.3±10.3 (n=5)	135.1±8.4 (n=6) *	116.5±17.2 (n=6) ‡

Data are shown as mean ± SD. \**P* < 0.01 vs Sham control mice. ‡*P* < 0.05 vs mice with Neo-RCCs.

*Table III : Clinicopathological features of the 117 ccRCCs patients and their correlations with HCaRG expression in normal RPTs.*

Parameter		HCaRG expression		P value
		= 52)	High (n = 65)	
<b>Maximum diameter (mm)</b>		42.9±23.3 SD	54.0±26.9 SD	0.0205
<b>Age (year)</b>		61.8±10.3 SD	59.7±11.4 SD	0.291
<b>Gender</b>	Male	42	41	0.0362
	Female	10	24	
<b>Pathological T stage</b>	T1a (≤4 cm)	33	24	0.0041
	≥T1b (>4 cm)	19	41	
<b>Pathological N stage</b>	N0	52	64	1
	N+	NA	1	
<b>M stage</b>	M0	48	56	0.2926
	M+	4	9	
<b>Fuhrman Grade</b>	1	24	15	0.0085
	≥2	28	50	
<b>Recurrence within 5 years</b>	+	7	20	0.0296
	free	45	45	

NA: not applicable.



**Figure 1 : HCaRG facilitates differentiation of Renca cells and inhibits cell-cycle progression.**

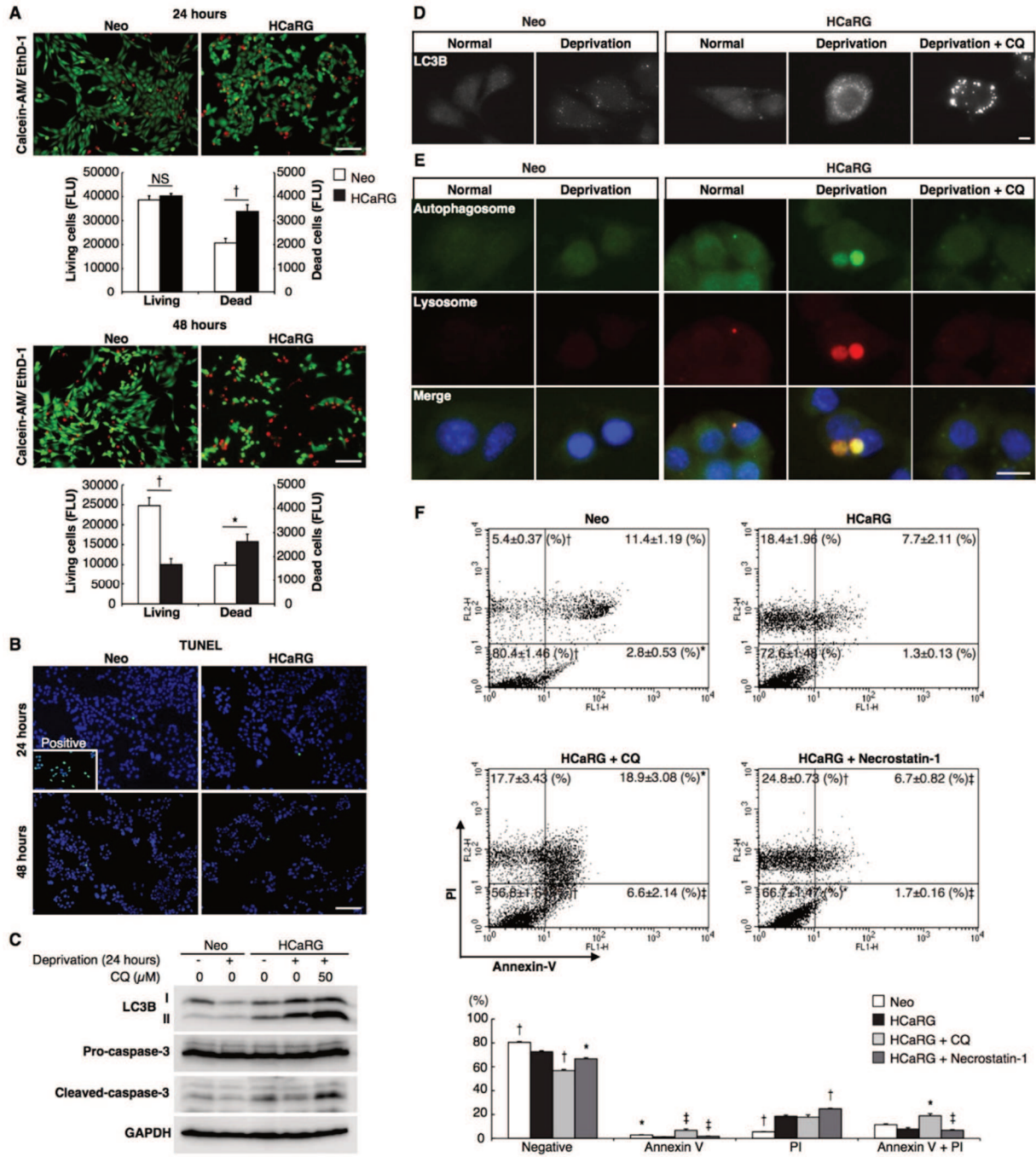


Figure 2 : HCaRG induces autophagic cell death distinct from apoptosis or necroptosis in Renca cells.



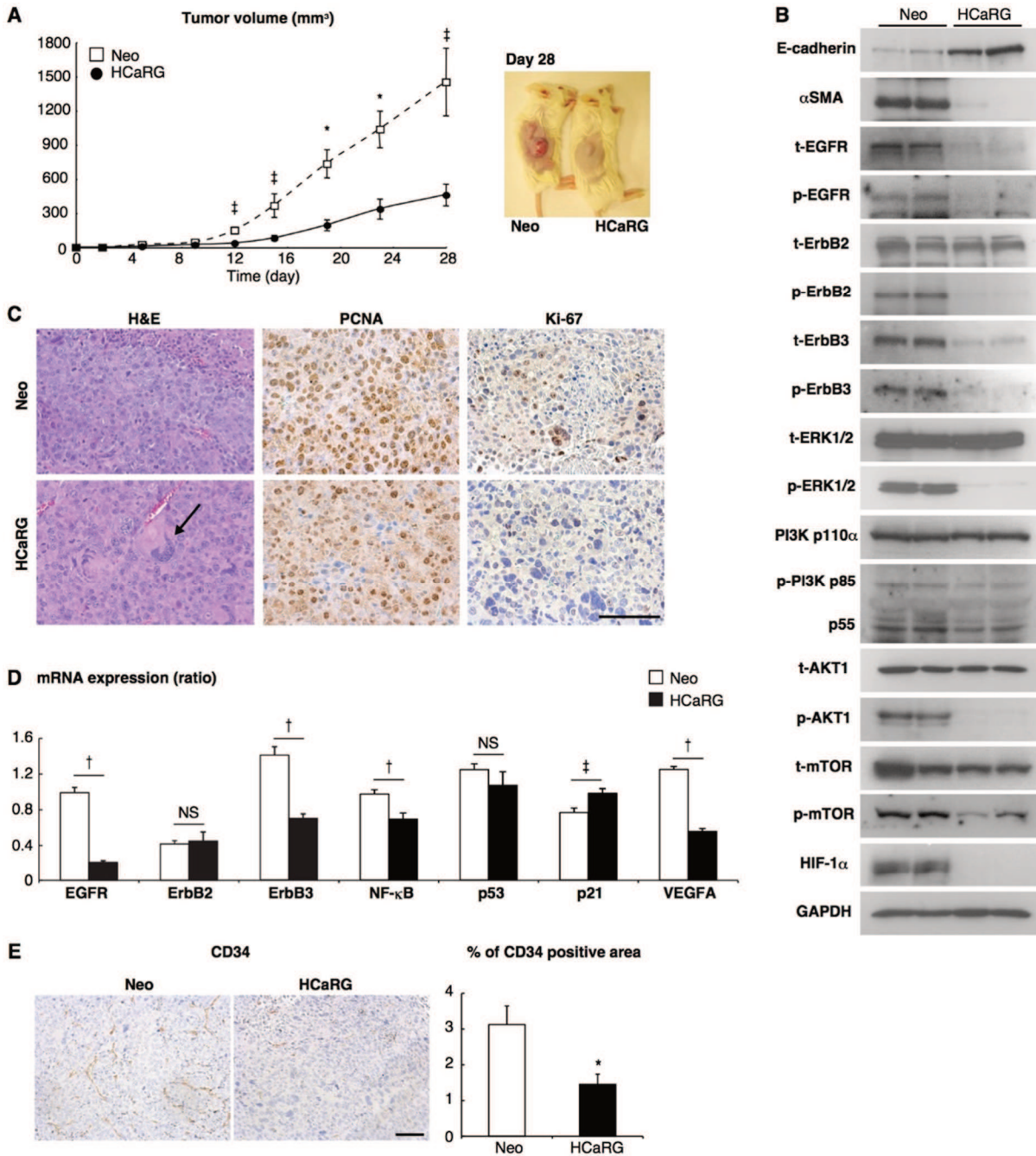


Figure 3 : HCaRG inhibits tumor growth in a mouse homograft RCC model.

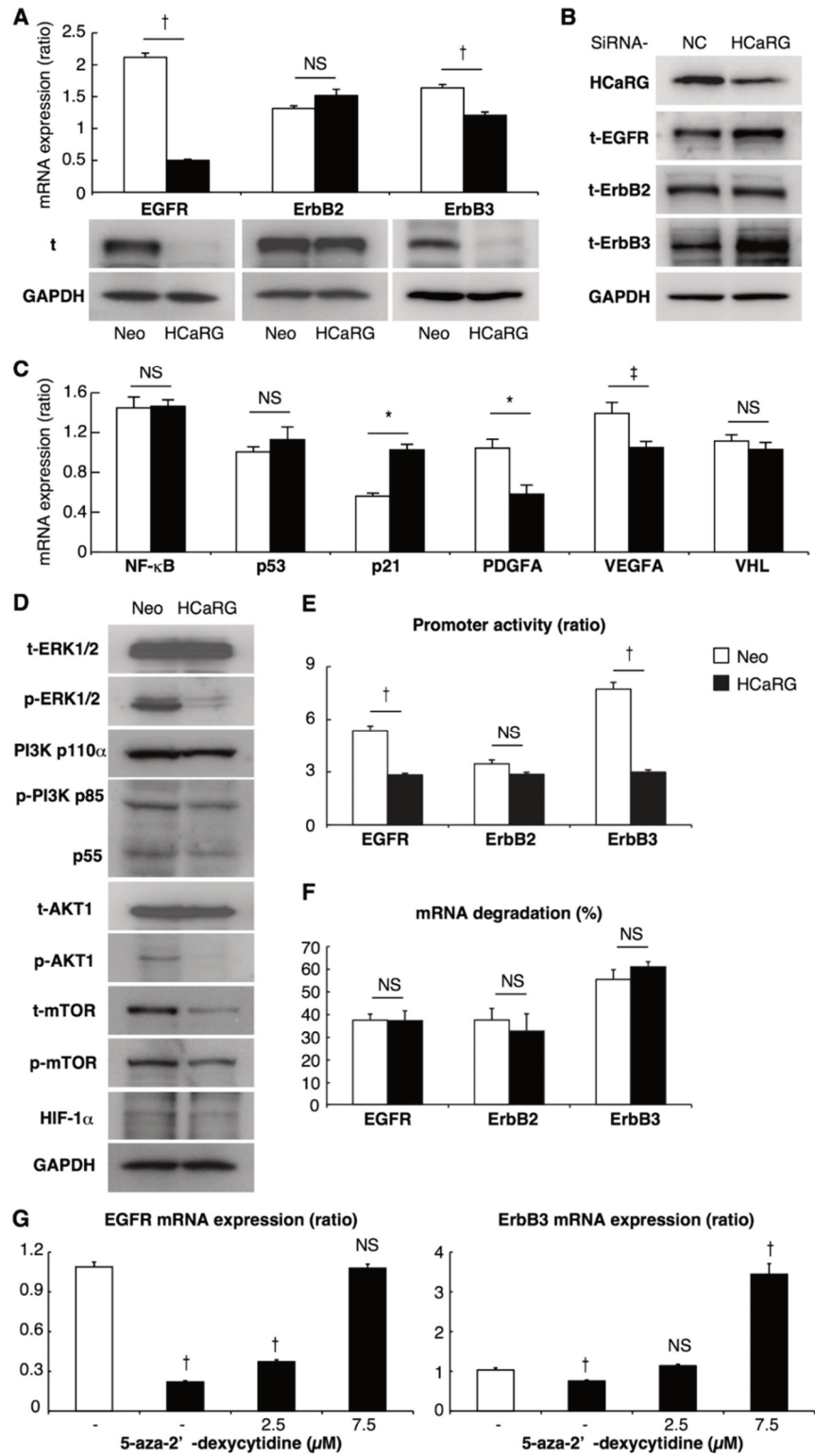
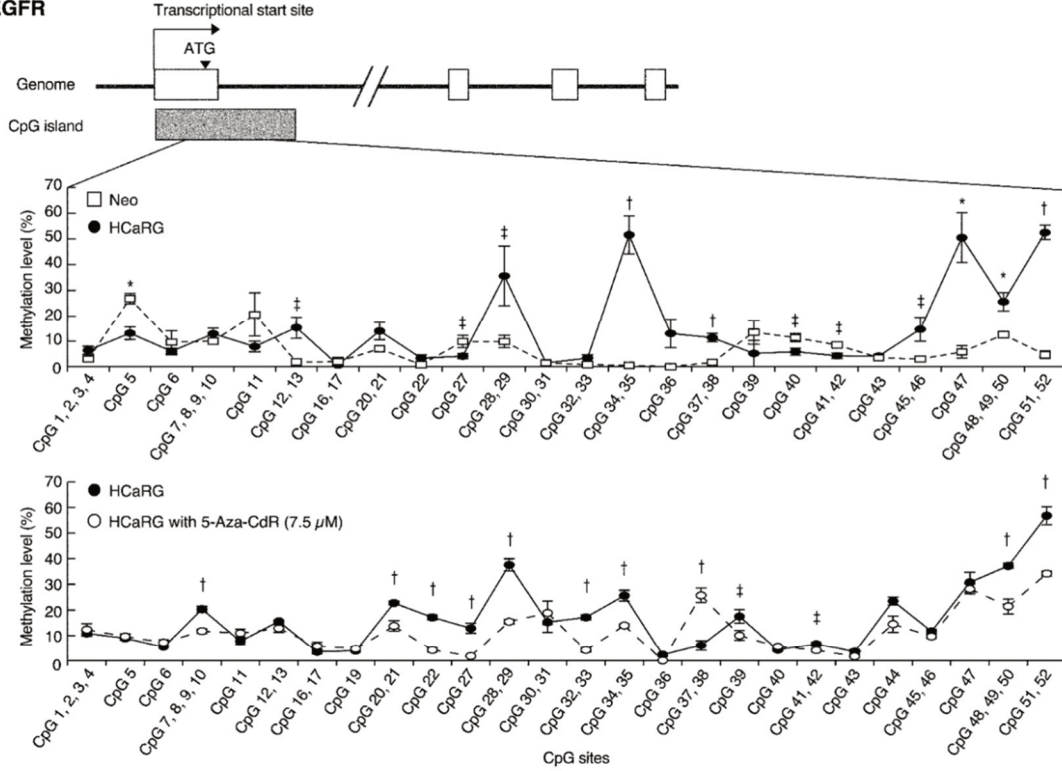
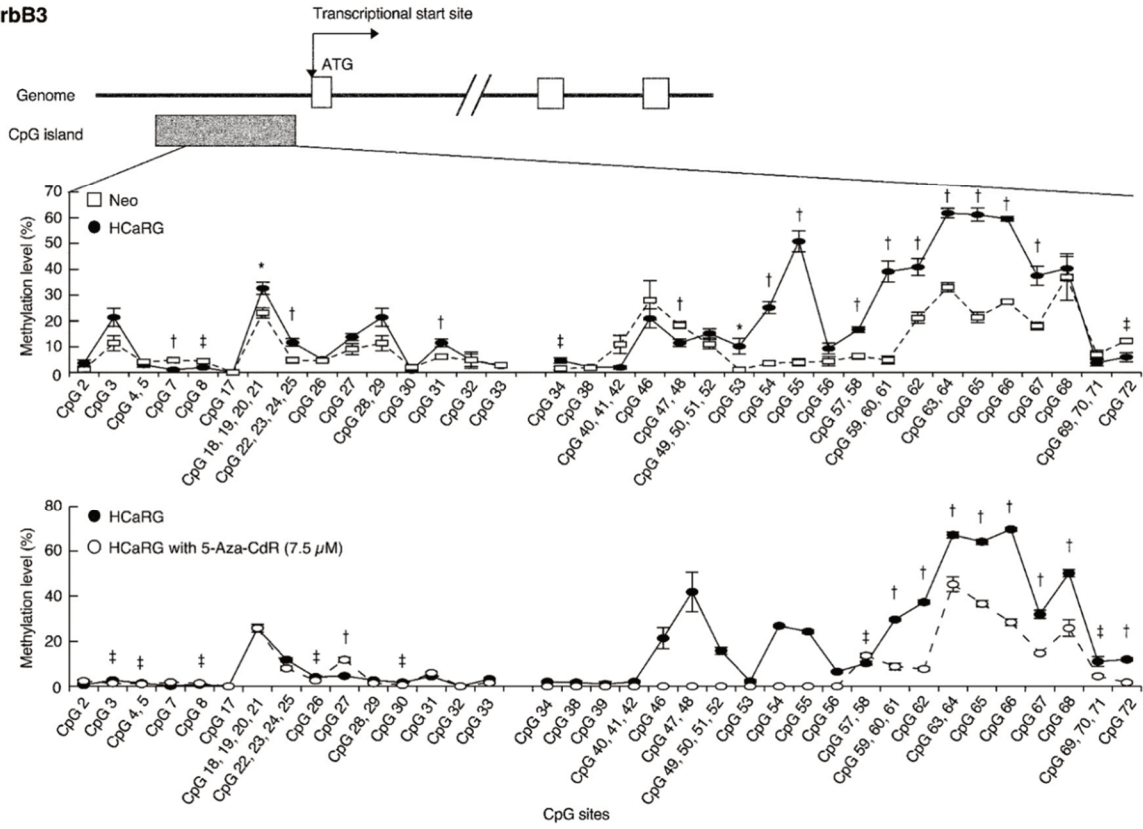


Figure 4 : HCaRG suppresses EGFR and ErbB3 by enhancing their promoter methylation.

**EGFR**



**ErbB3**



**Figure 5 : HCaRG fosters CpG island hyper-methylation of EGFR and ErbB3 promoters.**

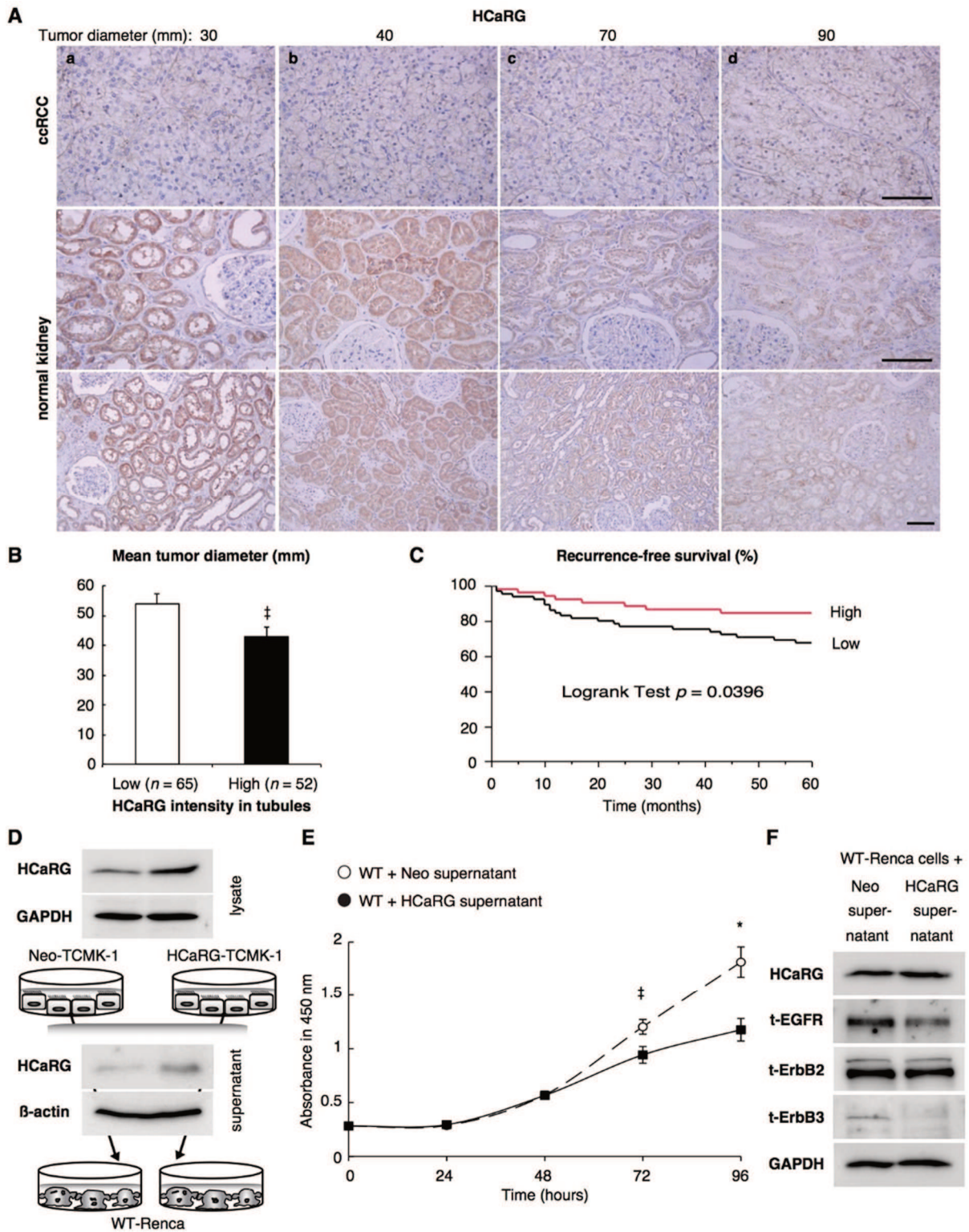


Figure 6 : HCaRG is less expressed in human ccRCCs than in normal renal tubules.

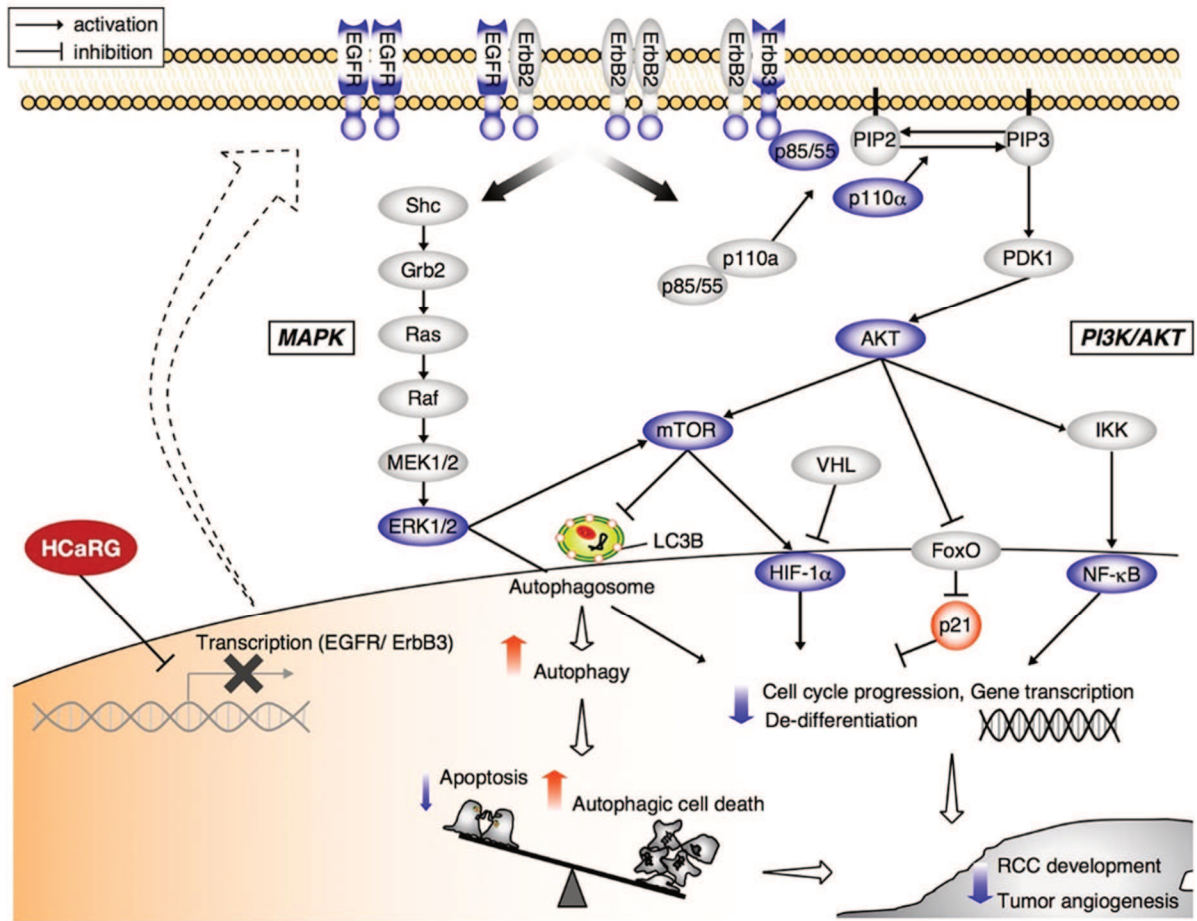


Figure 7 : Scheme depicting the suppressive role of HCaRG in tumorigenic pathways of RCC.

## Supplementary figure legends

**Supplementary Figure S1: HCaRG overexpression delays cell-cycle progression in B16-F10 cells.** (A) Exogenous rat HCaRG and endogenous mouse HCaRG mRNA levels in Renca and B16-F10 clones were quantified using Real-Time PCR and normalized to GAPDH. Exogenous HCaRG mRNA was detected only in HCaRG-cancer cells. The expression of endogenous HCaRG mRNA was slightly decreased or increased by transgene. (B) Representative cell-cycle DNA histograms showed the effect of HCaRG overexpression on cell-cycle progression in B16-F10 cells. HCaRG clearly delayed cell-cycle progression in association with G2/M accumulation. The cell-cycle length lasted for about 48 hours in Neo-B16-F10 cells and for at least 48 hours in HCaRG-B16-F10 cells. G0/G1, G2/M and S phases are given.

**Supplementary Figure S2: HCaRG induces cell death with autophagy distinct from apoptosis in B16-F10 cells.** (A) Living and dead cells were double-stained with calcein-AM (green) and ethidium homodimer (EthD)-1 (red) for relative fluorescence (FLU) quantification. HCaRG overexpression markedly decreased the number of living cells and increased the number of dead cells compared to Neo-controls 48 hours after serum starvation. #P < 0.05, †P < 0.005. Scale bars, 100  $\mu$ m. (B) TUNEL staining in B16-F10 clones under serum deprivation for 48 hours. Only a few apoptotic cells could be detected without any difference between Neo- and HCaRG-B16-F10 cells. Scale bars, 100  $\mu$ m. The expression of LC3B, a marker of autophagosome, was demonstrated by western blot in (C) and immunostaining in (D) with or without serum deprivation. HCaRG overexpression markedly fostered autophagy under the both conditions as is the case of Renca cells. Scale bars, 10  $\mu$ m.

**Supplementary Figure S3: HCaRG inhibits the MAPK and PI3K/AKT signaling pathways in B16-F10 cells.** (A) The expression of total (t) ErbB receptors was demonstrated by Real-Time PCR and western blot in B16-F10 cells. HCaRG overexpression reduced ErbB3 expression at the mRNA and protein levels in HCaRG-B16-F10 cells. ErbB2 mRNA and total protein levels were not modified by HCaRG overexpression. EGFR mRNA and protein were not detectable in this cell line. †P < 0.005. ND, not detectable. NS, not significant. (B) The effect of inhibition of MAPK and PI3K/AKT signals on downstream genes was demonstrated by Real-Time PCR in B16-F10 cells. †P < 0.005. NS, not significant. (C) B16-F10 cell lysates were analyzed by western blot using appropriated antibodies. Representative blots show the inactivation of subsequent MAPK and/or PI3K/AKT signaling pathways by HCaRG overexpression.

**Supplementary Figure S4: HCaRG increases overactivation of autophagy in multinucleated giant cells.** (A) HCaRG overexpression increased the percentage of multinuclear giant cells as shown by cellular DNA content detected by flow cytometry. †P < 0.005. (B) Immunostaining for LC3B in Renca clones. The LC3B puncta (red) were increased in multinucleated giant cells of both Neo- and HCaRG-Renca clones compared to respective mononucleated cells. Autophagy was particularly overactivated in multinucleated HCaRG-Renca cells compared to its Neo-control cells. DAPI staining was used to determine nuclei (blue). Scale bars, 10  $\mu$ m.

**Supplementary Figure S5: HCaRG and COMMD1 expression in Renca cell lines.** (A) HCaRG overexpression did not modify COMMD1 expression in Renca cells. (B) Immunofluorescence of HCaRG (green) and COMMD1 (red). HCaRG was abundant in

cytoplasm and plasma membrane and COMMD1 was restricted to the perinuclear region where it colocalized with HCaRG. Neo- and HCaRG-Renca cells were grown to semi-confluence on sterile cover slips. Cells were fixed in 4 % paraformaldehyde and permeabilized with 0.1 % Triton-X-100 in PBS. After blocking, cells were incubated with primary-antibodies (anti-COMMD5, 1:50 YF-PA26072: AbFrontier, Seoul, Korea and anti-COMMD1, 1:50, 11938-1-AP; Proteintech Group Inc.). After incubation with secondary-antibodies, the samples were mounted and viewed by a Leica laser scanning microscope (Leica Microsystems, Concord, ON, Canada). Scale bar, 10  $\mu$ m.



Table IV : Primers for MassARRAY quantitative methylation analysis (S1).

Primer sets #	Sequence of primers (5'-3')
<b>EGFR #1</b>	<u>AGGAAGAGAGAGAGA</u> AATTATATTGTTGGTGTGTTGA CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTCCCTAACAACCCCTCTACTC
<b>EGFR #2</b>	<u>AGGAAGAGAGAGTAGGAGTAGAGGGGTTGTTAGG</u> CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTTCCACACTTCCAAATCATTACTA
<b>ErbB3 #1</b>	<u>AGGAAGAGAGAGGTTT</u> AGGGGGAGGGGATTATAA CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTTTTCCAACCTAAAAACAAACCC
<b>ErbB3 #2</b>	<u>AGGAAGAGAGAGGGTTT</u> GTTTTAGGTTGGAAAT CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTAATCTCACTCCAACAATTTCC
<b>ErbB3 #3</b>	<u>AGGAAGAGAGAGGGAAAT</u> TGTTGGAGTGAGATT CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTACCAAACCTAAAAAAAAAACCCA

Tag sequences for EpiTyper analysis are underlined.

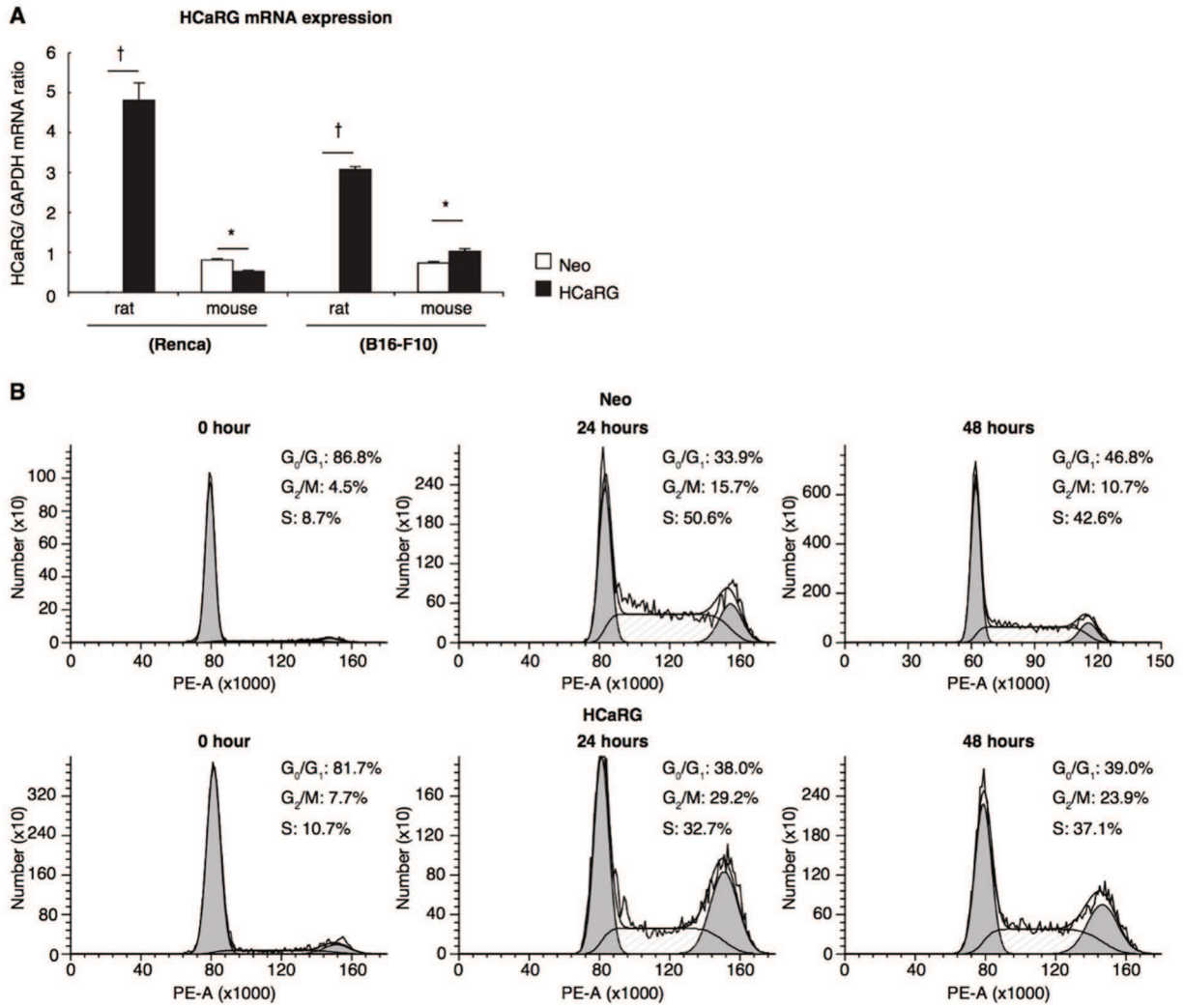


Figure S1 : HCaRG overexpression delays cell-cycle progression in B16-F10 cells (S1).

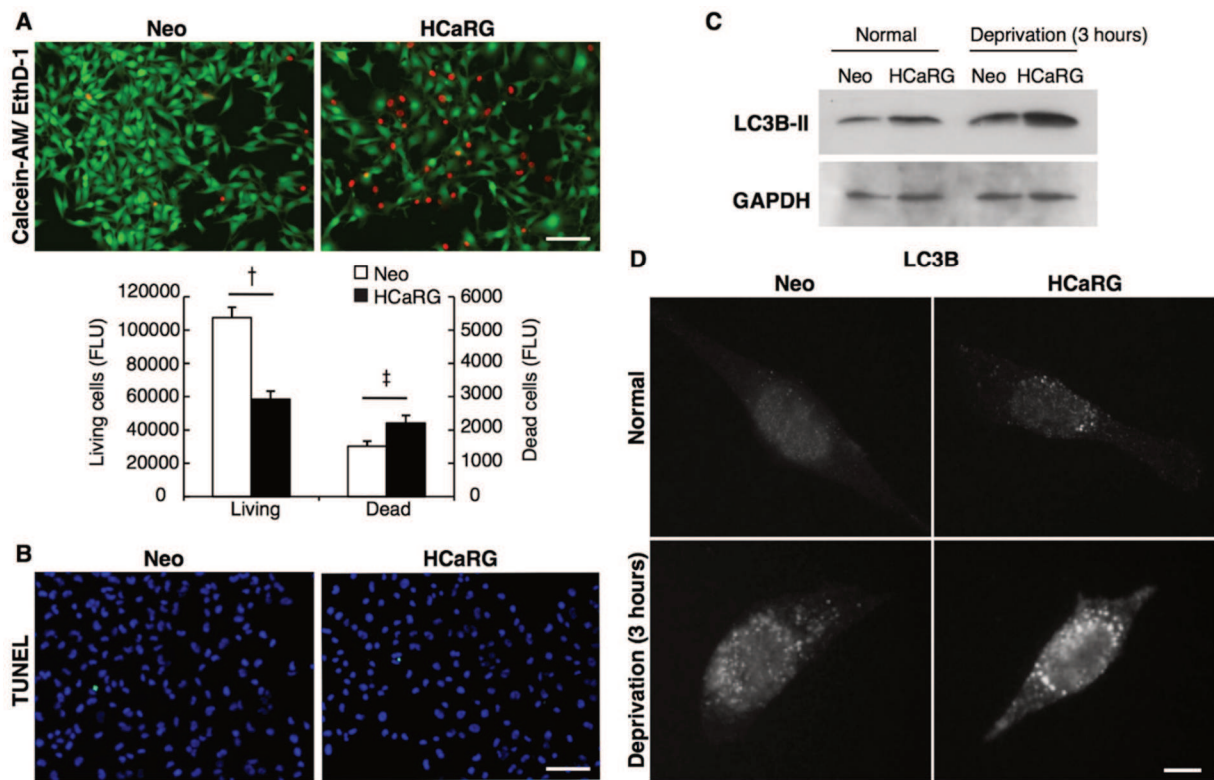


Figure S2 : HCaRG induces cell death with autophagy distinct from apoptosis in B16-F10 cells (S2).

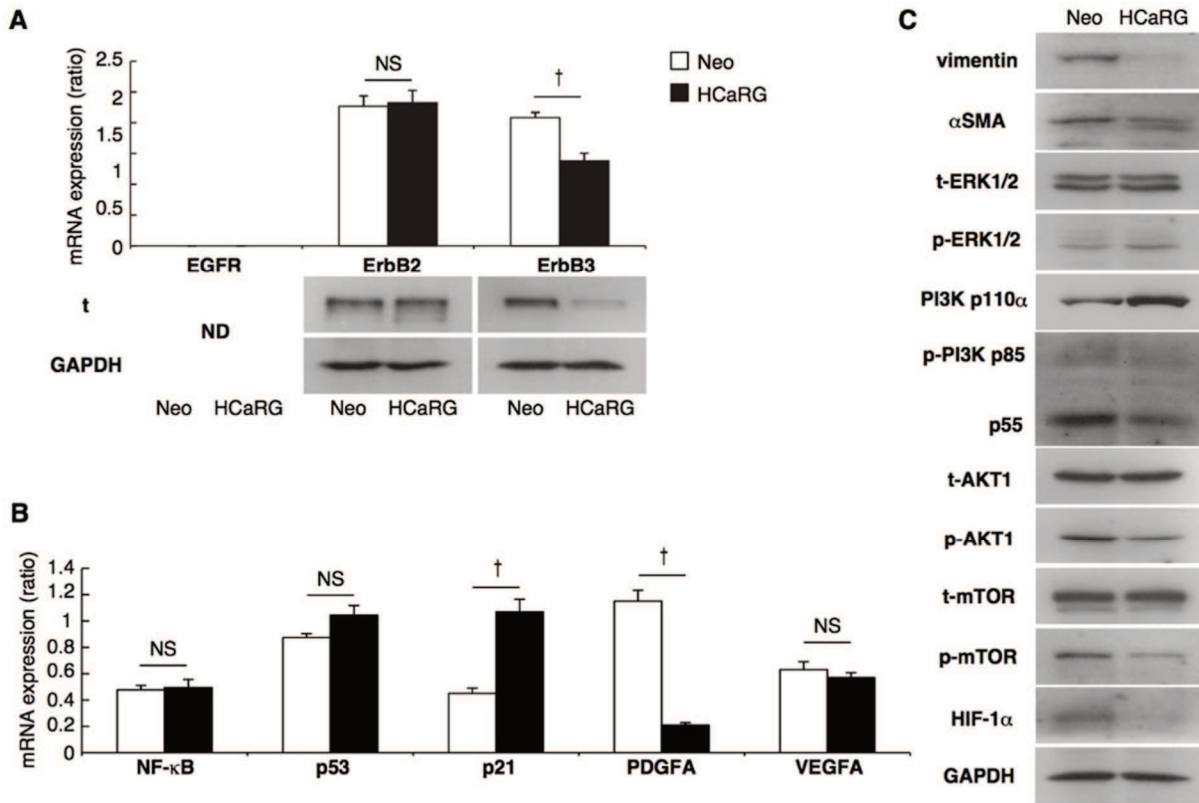


Figure S3 : HCaRG inhibits the MAPK and PI3K/AKT signaling pathways in B16-F10 cells (S3).

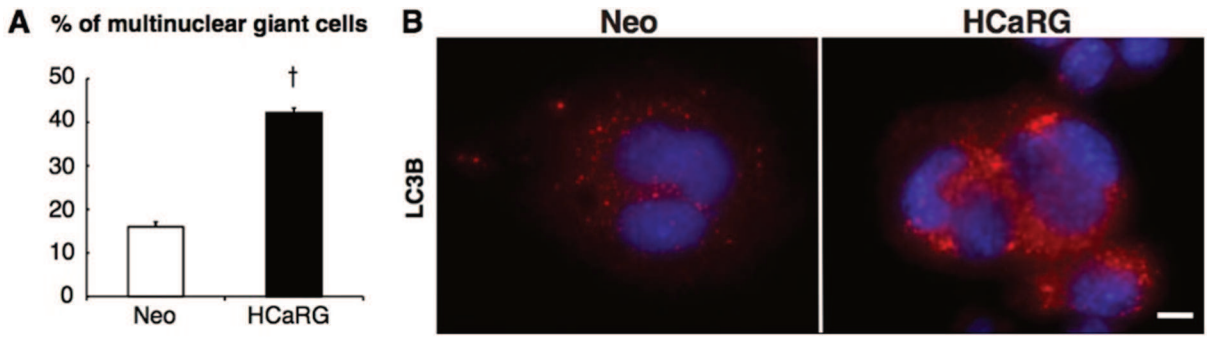


Figure S4 : HCaRG increases overactivation of autophagy in multinucleated giant cells (S4).

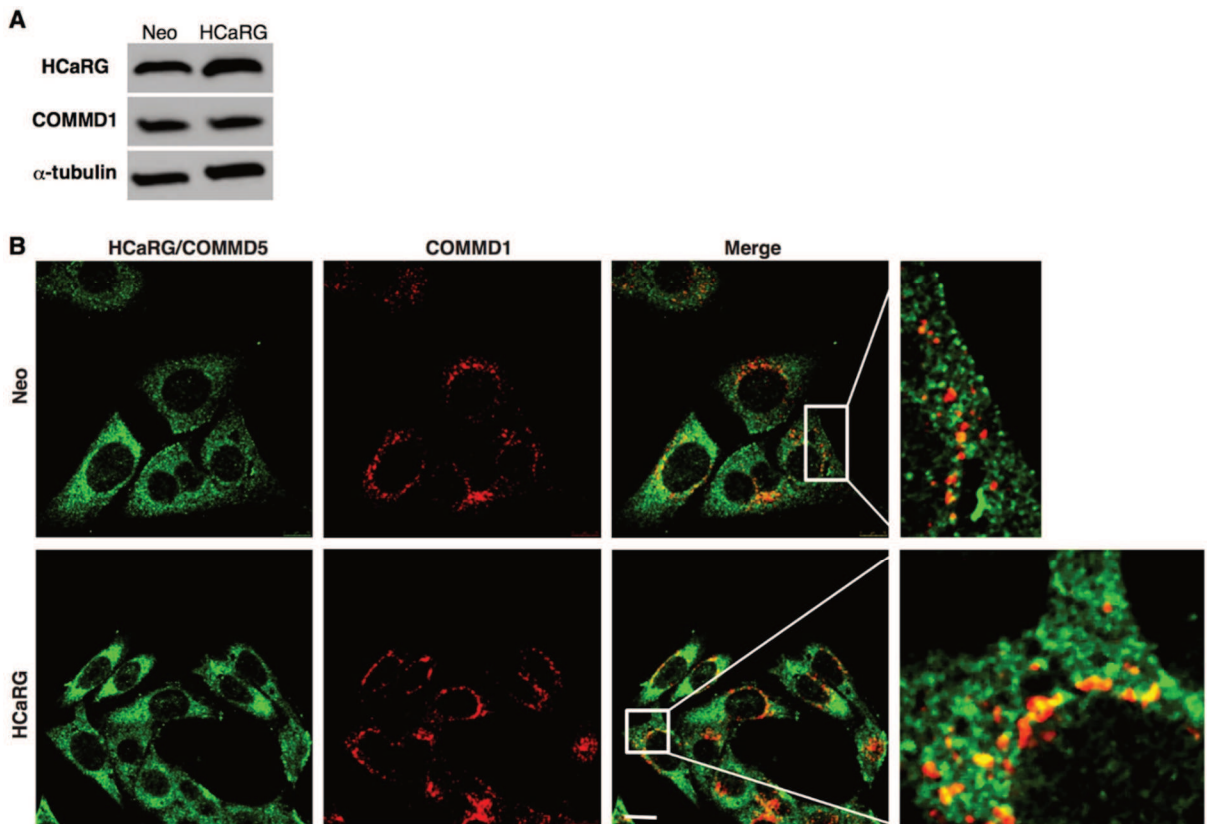


Figure S5 : HCaRG and COMMD1 expression in Renca cell lines (S5).

## C - Conclusion de l'article

Après avoir montré le rôle de COMMD5 dans le contrôle de l'EMT, ce chapitre dévoile un nouvel aspect du rôle de COMMD5 dans le cancer du rein. En effet, les résultats ont montré que COMMD5 possède la capacité de réduire de manière significative la taille des tumeurs dans un modèle *in vivo* par l'intermédiaire de la régulation de la prolifération cellulaire et de l'autophagie. D'un point de vue cellulaire, COMMD5 module l'expression des récepteurs de la famille ErbB participants à ces processus. Le contrôle de l'activation du récepteur EGFR est l'une des stratégies thérapeutiques les plus importantes dans le traitement du cancer. Les résultats de cette partie confirment la caractéristique anti-oncogénique et ouvre la voie à une thérapie possible par COMMD5.

# **Chapitre V : COMMD5/HCaRG hooks endosomes on cytoskeleton and coordinates EGFR trafficking**

Carole G. Champion, Kossay Zaoui, Thomas Verissimo, Suzanne Cossette, Hiroyuki Matsuda,  
Nicolas Solban, Pavel Hamet and Johanne Tremblay

*Article publié dans le journal Cell Reports en 2018*

*(Cell Rep. 2018 Jul 17;24(3):670-684.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.056.)*

## **A - Résumé de l'article**

Les données précédentes ont permis de déterminer que la surexpression de COMMD5 dans les carcinomes à cellules rénales entraînait une diminution de l'expression des récepteurs de la famille des tyrosines kinase ErbB par l'hyperméthylation des promoteurs. Parallèlement à nos recherches et à nos avancées, des études ont mis en évidence le rôle de certaines protéines de la famille COMMD dans la cholestérolémie et l'homéostasie du sodium par la régulation du trafic endosomal.

Partant de ce constat, nous nous sommes focalisés dans cette étude, au rôle de COMMD5 sur le recyclage du récepteur EGFR dans les cellules rénales.

Les résultats montrent que la perte de COMMD5 dans les cellules épithéliales HK-2 induit une réorganisation majeure des réseaux d'actine et des microtubules entraînant une augmentation des fibres de stress d'actine corticale près de la MP. Cette dérégulation du cytosquelette a un impact majeur dans la régulation du trafic endosomal et la régulation du récepteur EGFR avec pour conséquence son activation prolongée. De plus, COMMD5 participe au transport des endosomes et au recyclage d'EGFR en fournissant la force nécessaire pour déformer et assister la scission des vésicules dans le tri des endosomes. COMMD5 participe à la régulation du trafic endosomal en interagissant à la fois avec les endosomes précoces grâce à sa partie amino-terminale et Rab5. La partie carboxy-terminale contenant le domaine COMM interagit également et directement avec l'actine et la tubuline.



Les résultats de ce chapitre confirment le rôle important de COMMD5 l'organisation du cytosquelette des cellules et sa participation active dans la coordination du trafic endosomal du récepteur EGFR.

### **Contribution des auteurs**

Dre Carole G. Champion et Dre Johanne Tremblay ont conçu l'étude et rédigé le manuscrit. Dre Carole G. Champion a effectué l'ensemble des expériences et des analyses de données.

Dr Kossay Zaoui a participé à l'acquisition et à l'analyse des images de cellules vivantes au microscope confocale, a réalisé l'étude de l'activité de RhoA et certains essais de cicatrisation de plaies.

Thomas Verissimo a réalisé les expériences de PCR en temps réel, ainsi que des expériences de cultures cellulaires, des transfections et Western Blot. Il a participé à la réalisation des tests de viabilité et à l'identification des partenaires protéiques de COMMD5 par Pull Down assay et Co-immunoprécipitation. Il a participé également à la correction du manuscrit.

Suzanne Cossette a réalisé des tests Co-IP et pull-down, a participé aux expériences de cultures cellulaires et certains Western blot. Elle a participé à la correction du manuscrit.

Le Dr Nicolas Solban a effectué le test de Yeast to hybride.

Le Dr Pavel Hamet a contribué à la conception de l'étude et a relu le manuscrit de manière critique.

# **COMMD5/HCaRG hooks endosomes on cytoskeleton and coordinates EGFR trafficking**

Carole G. Champion<sup>1,2</sup>, Kossay Zaoui<sup>1</sup>, Thomas Verissimo<sup>1,2</sup>, Suzanne Cossette<sup>1</sup>, Hiroyuki

Matsuda<sup>3</sup>, Nicolas Solban<sup>1</sup>, Pavel Hamet<sup>1,2</sup> and Johanne Tremblay<sup>1,2,\*</sup>.

Running title: COMMD5/HCaRG regulates endosomal transport and EGFR trafficking

Authors' affiliations:

<sup>1</sup> Centre de Recherche, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada, H2X 0A9

<sup>2</sup> Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4

<sup>3</sup> Division of General Medicine, Department of Internal Medicine, Nihon University, Itabashi-ku, Tokyo, Japan, 173-8610

\*Lead contact and corresponding author: Johanne Tremblay, CRCHUM, Room R14.400, 900 Saint-Denis Street, Montréal, Québec, Canada H2X 0A9. Telephone: +1 514-890-8000 (23607); Fax: +1 514-412-7655; Email: johanne.tremblay@umontreal.ca

**Keywords: COMMD5/HCaRG, endosome trafficking, early and recycling endosomes, Rab, receptor trafficking, EGFR, tubulin, microtubule, actin, migration**

## **Abstract**

COMMD5/HCaRG is involved in tissue repair and its low expression is associated with tumorigenicity. Cell growth, migration, and differentiation are controlled by COMMD5. We previously reported that COMMD5 inhibited the growth of renal carcinoma cells by regulating expression or phosphorylation of ErbB members. Here, we demonstrate that COMMD5 is crucial for the stability of the cytoskeleton. Its silencing leads to a major re-organization of actin and microtubule networks. The N-terminal of COMMD5 binds to the endosomal Rab5 and its C-terminal, including the COMMD domain, binds to the cytoskeletal scaffolding. COMMD5 participates in long-range endosome transport, including EGFR recycling, and provides the strength to deform and assist the scission of vesicles into sorting endosomes. This study establishes the molecular mechanism by which COMMD5 acts as an adaptor protein to coordinate endosomal trafficking and reveals its important role for EGFR transport and activity.

## Introduction

HCaRG was identified in 2000 as one of the few genes of parathyroids whose expression is regulated by extracellular calcium (Solban et al., 2000). We named it HCaRG for Hypertension-related, Calcium-Regulated Gene as it was more expressed in tissues of hypertensive rats and mice compared to their normotensive counterparts. Motif analysis revealed that HCaRG protein possesses a COMM (Copper Metabolism MURR1) domain, and it was later renamed COMMD5 (Maine and Burstein, 2007a). It is the longest protein of the COMMD family. COMMD5/HCaRG is ubiquitously expressed in adult epithelial tissues and its levels correlate with the differentiation state of cells: they are low in fetal tissues and various cancer cell lines in rodents and humans and are downregulated during the de-differentiation phase of tissue injury (Devlin et al., 2003; El Hader et al., 2005; Solban et al., 2000; Tremblay et al., 2008). Our studies support a role for COMMD5/HCaRG in the establishment and maintenance of the epithelial cell phenotype and suggest a tumor suppressor gene function. COMMD5/HCaRG is involved in kidney repair (Matsuda et al., 2011, 2014). Transgenic mice overexpressing COMMD5/HCaRG in renal proximal tubules recovered their kidney function and integrity faster than non-transgenic mice after acute injury resulting in higher mouse survival rate. More recently, we reported that COMMD5/HCaRG overexpression inhibited tumor growth and angiogenesis in a homograft renal carcinoma mouse model (Matsuda et al., 2017). COMMD5/HCaRG promoted de-phosphorylation of the proto-oncogene erythroblastosis oncogene B2 ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 and the epidermal growth factor receptor (ErbB1/HER1, EGFR), leading to inhibition of ErbB signaling pathways.

Recent studies report that all 10 members of the COMMD family are integral components of a regulatory complex, the CCC (COMMD/CCDC22/CCDC93) complex. This multiprotein complex regulates endosomal sorting of membrane receptors such as ATP7A (Phillips-Krawczak et al., 2015), Notch (Li et al., 2015) and LDLR (Bartuzi et al., 2016) through the interaction of CCDC22 and CCDC93 with FAM21 and WASH complex. However, the specific contribution of each COMMD proteins in the endosomal sorting process of cargo proteins is still unknown. Recent studies speculated that individual members of COMMD family affect distinct aspects of the receptor trafficking process. We show here that COMMD5 coordinates EGFR-containing endosome trafficking as its silencing by siRNA impaired EGFR transport leading to sustained activation of EGFR that accumulates in large vesicles of low motility near the plasma membrane. COMMD5 interacts with the cytoskeleton and serves as a crucial adaptor protein to drive endosomes from one subcellular compartment to another. We demonstrated that COMMD5 directly binds actin and tubulin with its C-terminal end encompassing the COMM domain while its N-terminal end, that shows no homology in sequence between the different COMMD proteins, binds the endosomal protein Rab5 ascribing a specific role for each COMMD protein. We also show that COMMD5 depletion results in a major reorganization of actin filaments and microtubules distribution with consequences on directional cell migration and junctions. This study exposes the molecular mechanism by which COMMD5 coordinates endosomal trafficking and reveals its direct interaction with cytoskeletal proteins. Finally, our data reveals the important role played by COMMD5 in EGFR trafficking.

## Results

### **COMMD5 is localized on endosomes and regulates EGFR trafficking and activity**

COMMD5 is present in both cytoplasmic and membrane fractions in HK-2 and HEK-293 renal cell protein extracts (Figure 1A) and is detected as numerous puncta scattered throughout the cytoplasm (Figure 1B). Subsequent co-localization (Figure 1C-G) and statistical analysis (Figure 1H) revealed the COMMD5 association with EEA1, Rab5, Rab11 and with sorting vesicles containing Alexa488-transferrin (Tf), but not with Rab7. These results indicate a specificity of COMMD5 for early endosomes (EEA1, Rab5) and for the recycling pathway (Rab11, Tf). We noted that COMMD5 and Rab5 were present near the plasma membrane (PM) and in the perinuclear region (Figure 1D). COMMD5 had no affinity for late endolysosomes (Rab7) located in the perinuclear region (Figure 1G).

We showed that COMMD5 co-localized partially with EGFR (Pearson correlation  $r=0.53$ ) in cytoplasm (Figure 2A and 2C), and with p-EGFR [Tyr1173] ( $r=0.56$ ) (Figure 2B and 2C) in EEA1-early endosomes near the PM (Figure 2B, box 1) and in the perinuclear region after 30 min of EGF stimulation (Figure 2B, box 2). The dynamic interaction of COMMD5 with EGFR was imaged live using spinning disk confocal microscopy in HK-2 cells transfected with GFP-COMMD5 and subsequently loaded with Alexa555-EGF. COMMD5 associated to Alexa555-EGF dots in newly internalized vesicle-like structures at the inner surface of PM and both moved together throughout the cytoplasm (Figure 2D and Movie S1). We next knocked-down COMMD5 using siRNA that specifically targeted its expression (Figure S1A and S1B) and stimulated cells with EGF. In control cells, EGF stimulation induced a gradual decrease of total

EGFR protein ( $-0.2976 \pm 0.001/\text{min}$ ) probably via the endolysosomal pathway (Figure 2E and 2F), while in COMMD5 depleted cells, EGFR degradation was rapid during the first 30 min of EGF stimulation, followed by its slow-down after 30 min ( $-0.1958 \pm 0.023/\text{min}$ ,  $p < 0.05$  compared to siCTRL) (Figure 2E and 2F). Therefore, the ratio of phosphorylated EGFR [Tyr1086]/total EGFR was higher in COMMD5-depleted cells and persisted for more than one hour before returning to the levels as in control cells (Figure 2G). In addition, we noted that prolonged EGFR phosphorylation in COMMD5-depleted cells resulted in persistent Akt phosphorylation, a downstream target in the EGFR signaling pathway (Figure 2H-J). These data are consistent with our observations that COMMD5 is present in the early and recycling pathway and absent in endolysosomes. This suggests that 1) COMMD5 participates in the recycling of the internalized EGFR to the cell surface and that 2) COMMD5 silencing redirects EGFR to the degradation machinery. This effect is not exclusive to EGFR: other RTKs, including HER-2/ErbB2 and insulin receptor  $\beta$ , had their total receptor levels diminished under basal conditions in COMMD5-depleted cells (Figure S1C). These results seem specific to COMMD5, as COMMD1 (another member of the COMMD family) silencing did not affect EGFR or pEGFR [Tyr1086] levels under the same conditions (Figure S1D).

The outcome of endocytosed EGF was determined by pulse-chase experiments with Alexa555-EGF. While after 30 min of EGF stimulation, most of the EGF signal was detected in clustered puncta within the perinuclear region where degradation in lysosomes occurred, in COMMD5-depleted cells, EGF signal was still detected near the PM or throughout the

cytoplasm, suggesting impairment of intracellular trafficking of EGFR (Figure 2K). This EGF transport defect was not observed with COMMD1 silencing (Figure S1E).

It is known that EGFR activity is regulated by endocytic trafficking (Burke et al., 2001; Ceresa, 2012) and our results strongly suggest that COMMD5 is a key player in endocytic trafficking of EGFR and thereby of its activity.

### **Loss of COMMD5 leads to cytoskeletal re-organization**

To investigate the mechanism by which COMMD5 regulates the endocytotic trafficking, we analyzed the dynamic of endosome transport following COMMD5 depletion. HK-2 cells were co-electroporated with siCOMMD5 and GFP-Rab5, then incubated with Alexa555-EGF during 5 min and recorded by spinning disk confocal microscopy. In control cells, Alexa555-EGF appeared as small puncta associated to Rab5-positive endosomes, and these EGF-containing vesicles moved rapidly from the PM towards the perinuclear space (Figure 3A, upper panel, Movie S2). In COMMD5-depleted cells, enlarged static Rab5-positive endosomes accumulated underneath the PM where Alexa555-EGF puncta seemed to be trapped (Figure 3A, lower panel, Movie S2). By analyzing cytoskeleton distribution, we found that COMMD5 silencing led to a major re-organization of actin filaments with enrichment of cortical actin stress fibers near the PM (Figure 3B, lower panels), while actin fibers are dispersed throughout the cytoplasm in control cells (Figure 3B, upper panels). This major cytoskeletal modification induced by COMMD5 depletion impacted on the distribution of endosomes. COMMD5 located in small distinct EEA1-positive endosomes throughout the cytoplasm in control cells, and larger EEA1-endosomes clustered in the center of the cell in COMMD5-depleted cells (Figure 3B). Actin re-



organization was observed with two different siRNA against COMMD5 (Figure 3C), but not with a siRNA against COMMD1 (Figure 3D). This actin re-distribution induced by COMMD5 depletion led to morphological changes including a rounded cell shape (Figure S2A) and an increased cell size (Figure S2B) as compared to control cells. We also observed that intercellular junctions between HK-2 cells depleted of COMMD5 decreased as witnessed by E-cadherin protein decrease (Figure S2C). Since it has been described that different stages of apoptosis are accompanied by dramatic changes in actin filament organization (Häcker, 2000; Papakonstanti and Stournaras, 2008), we performed TUNEL and cell viability assays to determine whether this distinct cell phenotype induced by COMMD5 depletion was associated to cell mortality. After 72h of cell transfection, siCOMMD5#1 or #2 did not induce DNA fragmentation or cell mortality (Figure S2D and S2E) but affected cell proliferation. Indeed, since the proliferation rate was similar during the first 72h following transfection between control and siCOMMD5#1 transfected cells, after 72h, the period corresponding to maximal knockdown of COMMD5, we observed near 50 % inhibition of COMMD5-depleted cells proliferation (Figure S2F).

The reorganization of actin cytoskeleton coincided with alterations in microtubule network (Figure 3E). Control cells exhibited an oriented microtubule distribution and well-defined centrosomes near the nucleus from which microtubules emerge (Figure 3E, upper panels). In COMMD5-depleted cells, the centrosomes were not clearly defined and surrounded the nucleus leading to a non-oriented and equal radial distribution of microtubules (Figure 3E, lower panels). EGF is known to stimulate actin polymerization, lamellipodia extension and an oriented microtubule distribution (Chan et al., 2000, 1998; Segall et al., 1996) (Figure 3F and

3G, upper panels). However, cortical accumulation of stress fibers and disorganized microtubules distribution were present even after EGF stimulation in COMMD5-depleted cells (Figure 3F and G, lower panels).

These results demonstrate that COMMD5 silencing caused a major re-organization of actin and microtubule cytoskeleton which could perturb endosomal distribution and trafficking.

### **COMMD5 directly interacts with actin cytoskeleton and its silencing affects endosome distribution, morphology and movement**

To determine how COMMD5 could affect cytoskeleton organization, we analyzed COMMD5 function and potential interactions with cytoskeletal proteins. A yeast two-hybrid screening with COMMD5 as bait identified COMMD5 interacting proteins related to intracellular transport or associated to cytoskeleton, including CCT5, a molecular chaperone known to play a role in the folding of actin and tubulin (Brackley and Grantham, 2009; Ursic et al., 1994) and with the C-terminal end of  $\beta$ -actin (Table S1). We confirmed COMMD5-actin interaction by co-immunoprecipitation experiments in HEK-293 cells (Figure 4A) and our pull-down assays demonstrated that COMMD5 interacted directly with the two actin conformations, the globular (G-actin) and the filamentous (F-actin) (Figure 4B). This actin interaction was however not specific to COMMD5 as COMMD1 also binds actin (Figure 4C).

The dynamic of COMMD5 interactions with F-actin was visualized in HK-2 cells co-transfected with GFP-COMMD5 and mCherry-actin and recorded by spinning disk confocal microscopy (Movie S3). Indeed, COMMD5 dynamically interacted with distinct globular actin

(Movie S3, box a), whereas its position was completely static along actin filaments (Movie S3, box b). By confocal microscopy, we observed that COMMD5 strongly localized on actin patches along actin filaments labelled by phalloidin in HK-2 cells cytoplasm (Figure 4D, arrowheads). COMMD5 formed clear distal dots that co-localized perfectly with actin patches in well-defined circular EEA1-positive endosome (Figure 4E). These actin patches represent a platform of dynamic actin polymerization at the surface of endosomes that are controlled by WASH and the Arp2/3 complexes and are required to generate branched actin networks for production and/or scission of endosomal tubules (Derivery et al., 2012a; Duleh and Welch, 2010a). Therefore, COMMD5 dynamically interacted with the WASH1 complex in HK-2 cells (Movie S4), and partially co-localized with it (Figure 4F, left panel) and its partner Arp2/3 (Figure 4F, right panel). These results strongly suggest that COMMD5 is involved in actin polymerization. As a matter of fact, COMMD5 depletion induced a strong decrease of RhoA activity (Figure 4G), a Rho GTPase known to bind to a variety of effectors once activated, including protein kinases (Zhao and Manser, 2005) and some actin-binding proteins which directly or indirectly affect the local assembly or disassembly of filamentous actin (Hall and Nobes, 2000; Spiering and Hodgson, 2011). We also observed that after cytochalasin D treatment, COMMD5 that was associated to EEA1-endosomes, collapsed on actin filament ends where actin aggregates and foci are found (Figure 4H).

Since actin polymerization is a key mechanism in membrane dynamics of endosomes by inducing endosomal fission and scission (Derivery et al., 2012b), we analyzed the impact of COMMD5 silencing on endosomes morphology. In COMMD5-depleted cells, Rab5-endosomes

were larger, and many tubulo-vesicular endosomes made of endosomes joined together were detected, suggesting a defect in endosome scission (Figure 4I, Movie S5). By analyzing movement and morphology of mCherry-Rab5 endosomes (Movie S5), we confirmed that endosomes moved slowly and were larger in cells depleted of COMMD5 (Figure 4J and 4K). Furthermore, numerous small puncta of Rab5-positive endosomes containing fluorescent Tf remained near the PM or accumulated in the perinuclear region in COMMD5-depleted cells suggesting a strong defect in Tf recycling (Figure S3).

Altogether our results suggest an important role for COMMD5 in regulating cytoskeletal changes via its interaction with actin and the modulation of the Rho pathway. We demonstrate that COMMD5, located on endosome with actin, assists in the scission of vesicles which is an essential step for endosomal sorting and generation of transport intermediates to recycling pathways.

### **COMMD5 drives long-range endosome movements by binding tubulin via its C-terminal region encompassing the COMM domain**

Dual-color time lapse imaging by spinning disk confocal microscopy of GFP-COMMD5 and mCherry-Rab5, showed that the movements of COMMD5/Rab5 complex were relatively static within the perinuclear region or near the PM of HK2 cells (Figure 5A and movie S6). However, between these two locations, COMMD5 and Rab5 moved together rapidly in both inward and outward directions and these movements appeared to be driven by COMMD5 located at the forefront of the COMMD5/Rab5 complex (Figure 5A, right panel). This suggests that COMMD5 is not only involved in the tethering of Rab5-positive endosomes but is hauling

COMMD5/Rab5 complex along a rectilinear and oriented path. As microtubules support both short- and long-range movements, we next investigated whether COMMD5 could be associated to the microtubule cytoskeleton. Indeed, COMMD5 co-immunoprecipitated with  $\alpha$ -tubulin in HEK-293 cell extracts (Figure 5B) and COMMD5 puncta localized within microtubule dense areas of the perinuclear region (Figure S4A, upper panels). Furthermore, microtubule depolymerization by nocodazole completely dispersed COMMD5 near the PM (Figure S4A, lower panels) without completely destabilizing its association with EEA1-early endosomes (Figure S4B). Using live cell imaging, we observed distinct COMMD5 dots moving along microtubules tracks in HK-2 cell cytoplasm (Movie S7).

To identify the domains within COMMD5 that interact with actin or tubulin, we designed full-length GST-COMMD5 [1-224] and several deleted fragments of GST-COMMD5: [1-116], [1-172], [52-172], [64-116], [64-224] and [64-172] (Figure 5C). These COMMD5 constructs contain deletions at the N-terminal end which is known to vary between COMMD proteins, or at the C-terminal region which spans the COMM domain ([152-214]) and is well conserved among members of the family. GST pull-down assays with HEK-293 cell lysates showed that the two fragments [1-116] and [64-116], deleted of the COMM domain, were the only ones that did not bind  $\alpha$ -tubulin, while all four fragments that included the COMM domain [1-172], [52-172], [64-224] and [64-172] bound  $\alpha$ -tubulin with efficacy comparable to the full-length COMMD5 [1-224] (Figure 5D). On the other hand, binding of Rab5 by the two fragments [1-116] and [64-116] deleted of the COMM domain, was comparable to the full-length COMMD5 [1-224], while the four fragments that included the COMM domain, [1-172], [52-

172], [64-224] and [64-172], did not bind Rab5 (Figure 5E). We also confirmed that COMMD5, via its C-terminal end (Figure 5F), but also COMMD1 (Figure 5G), directly interacted with polymerized tubulin. This C-terminal region encompassing the COMM domain was also a binding site for the interaction of COMMD5 with G-actin (Figure 5H).

Thus, the C-terminus of COMMD5 binds tubulin and actin, and its N-terminus binds the endosomal protein Rab5. We showed that COMMD1 also interacts with tubulin or actin, probably via the COMM domain. However, as the N-terminal region varies between COMMD proteins, each member of the COMMD family could have different affinity for Rab proteins. Moreover, although COMMD5 and COMMD1 interact together as shown by co-IP (Figure S5A) and co-localized on vesicle-like structures within the perinuclear space (Figure S5B), COMMD1 co-localized with Rab5 but less than COMMD5 (Figure S5C), particularly near the PM where COMMD5 and Rab5 were strongly associated (Figure S5D).

These results demonstrate that COMMD5 is as an actin- and tubulin-binding protein that hooks Rab5-endosomes to the cytoskeleton to control scission and cargo transport along actin and microtubule tracks.

### **Disruption of cytoskeletal organization by COMMD5 depletion alters directional cell migration**

As the cytoskeleton plays several fundamental roles in the cell, including cell dynamics and migration, we next determined whether cytoskeletal modifications induced by COMMD5 silencing could affect directional cell migration. We performed a wound healing assay of HK-2 cells. While in control cell, the wound was almost closed after 24 h (77 % of wound closure),

cells depleted of COMMD5 failed to close the wound over the same period (siCOMMD5#1: 48 %; siCOMMD5#2: 44 %) (Figure 6A). COMMD5-depleted cells remained dispersed, exhibited a random migration and most of them seemed to spin around themselves (Figure 6B and Movie S8). By measuring individual cell movements, we confirmed that cells depleted of COMMD5 (siCOMMD5#1) lost their directional movement (Figure 6B) leading to a shorter distance of migration and a reduced cell motility (Figure 6C). The strong accumulation of actin stress fibers in the cortical region and the loss of microtubule orientation observed in COMMD5-depleted cells probably caused their rounded shape, thus abolishing their directional movement (Figure 6D).

These results provide evidence that COMMD5 depletion caused a significant disruption of the normal organization of actin and microtubule cytoskeleton which in turn perturbed cell direction sensing causing an uncontrolled and random migration and a loss of intercellular junctions.

## Discussion

The regulation of the ubiquitin pathway was the main function attributed to the COMMD protein family (Maine and Burstein, 2007a, 2007b; Maine et al., 2009) up to recent studies that linked COMMD proteins to the endocytic and secretory pathways (Bartuzi et al., 2016; Burkhead et al., 2009; Li et al., 2015; Phillips-Krawczak et al., 2015). Recent mass spectrometry maps of the human interactome revealed that COMMD proteins are part of a large multiprotein complex named Commander, that contains up to 15 subunits including the CCC complex: COMMDs proteins (10 members), CCDC22 and CCDC93, and three other components: C16orf62, SH3GLB1 and DSCR3 (Mallam and Marcotte, 2017). The CCC complex is highly conserved in vertebrates and has been involved in the endocytic sorting and recycling of various membrane proteins such as the copper transporter (Phillips-Krawczak et al., 2015), Notch (Li et al., 2015) and lipoprotein receptors (Bartuzi et al., 2016). Burstein et al. suggested that various combinations of COMMD proteins operate at diverse stages of the endocytic and secretory pathways and act as sorting receptors for specific endosomal cargoes (Li et al., 2015). Up to now, no specific function has been attributed to any of the COMMD proteins on different endosome compartments. Our study reveals the crucial role played by COMMD5 as an actin and tubulin binding protein. Through this mechanism, COMMD5 is a hook linking endosomes to the cytoskeleton and regulates the transport of membrane receptors such as EGFR described here.



## **COMMD5 at the interface between the cytoskeleton and endosomes**

The subcellular localization of COMMD proteins with endosomes has been demonstrated only recently (Bartuzi et al., 2016; Li et al., 2015; Mallam and Marcotte, 2017; Phillips-Krawczak et al., 2015) but it is not surprising as the COMM domain adopts a structure similar to the pleckstrin homology domain which is a phosphoinositide-binding domain that targets proteins to phospholipid-enriched membranes (Burkhead et al., 2009; Mallam and Marcotte, 2017). We carried out a variety of live-imaging experiments to follow the spatiotemporal relationship between endosomes and COMMD5. COMMD5 is restricted to endosomes related to the early and recycling pathway, acting in concert with the Rab5 protein to facilitate transport and recycling of endocytosed EGF receptor. We determined that the C-terminal region of COMMD5, which encompasses the COMM domain serves as a platform for direct interaction with G- and F-actin and with polymerized tubulin. COMMD5 acts not only as a regulator of actin network but also as a direct link between endosome and cytoskeleton. Indeed, we found that depletion of COMMD5 strongly re-organized cytoskeleton affecting endosomes morphology and transport. Actin polymerization is an essential process for endocytosis, endosomes scission and transport (Derivery et al., 2012b), and we showed that COMMD5 associated to WASH and Arp2/3 complexes, two major players in actin polymerization (Derivery et al., 2009; Duleh and Welch, 2010b), suggesting that COMMD5 participates to actin branching network on endosomes. COMMD5 depletion also regulates RhoA activity. RhoA coordinately regulates multiple aspects of cell functions, including cell cycle maintenance, development, transcriptional control, but its predominant role is in cell shape regulation, polarity and locomotion via actin polymerization, actomyosin contractility,

cell adhesion and microtubule dynamics (Hall and Nobes, 2000; Spiering and Hodgson, 2011). We found that RhoA activity is decreased following COMMD5 depletion suggesting that COMMD5 regulates cytoskeleton organization through RhoA signaling. However, the dynamics of Rho GTPase activities are highly complex and tightly regulated in order to achieve their specific subcellular localization (Marjoram et al., 2014), thus, the mechanism by which COMMD5 directly or indirectly regulates the activity of RhoA needs to be investigated further. Figure 7 summarizes our findings on the role of COMMD5 in endosomal transport. During endocytosis, COMMD5 is recruited to Rab5-nascent endosomes where it might interact to actin network with associated actin-binding proteins (WASH, Arp2/3) regulating RhoA activity and the dynamic of cytoskeleton rearrangement. By this mechanism, COMMD5 regulates the shape, scission and trafficking of newly formed vesicles. Then, COMMD5 binds to Rab5-positive endosomes via its N-terminal region and could probably switches from actin- to microtubule-based movements. The question of how COMMD5 switches between these two major transport systems has not been elucidated in this study. However, it is known that actin-microtubules switching can be regulated via the number of actively engaged motors (Schneider and Persson, 2015; Slepchenko et al., 2007). We can speculate that COMMD5 could interact with myosin which carries cargos along actin filaments, and kinesin and/or dynein which drive cargos along microtubules (Ross et al., 2008). COMMD5 could switch from actin to microtubule tracks depending of the number of engaged motor proteins through a tug-of-war mechanism described in Schroeder et al. (Schroeder et al., 2010). Previous studies on COMMD proteins (Bartuzi et al., 2016; Li et al., 2015; Phillips-Krawczak et al., 2015), demonstrated that they are linked to endosome or WASH complex through their association with CCDC22 and CCDC93

proteins. Mallam and Marcotte suggested that CCDC22 and CCDC93 function as direct points of contact between actin and the CCC complex since these two proteins are members of a family that has been implicated in binding of actin and microtubule (Mallam and Marcotte, 2017). In our study, we clearly demonstrate that COMMD5 mediates the crosstalk between endosome and cytoskeleton. Our data also suggest that other members of the COMMD family could bind actin and tubulin via the COMM domain, as we showed for COMMD1. Furthermore, while COMMD1 depletion did not induce the same actin re-organization as with COMMD5 silencing, we observed a different cytoskeleton pattern suggesting that COMMD1 could regulate actin in a different manner.

### **Key role of COMMD5 in receptor membrane trafficking**

The present study also showed that COMMD5 is crucially involved in the endocytic sorting, transport and recycling of EGFR. We showed that in the first minutes of EGF stimulation, EGFR is rapidly degraded in COMMD5-depleted cells, but if the signal persists longer, larger and slow-moving Rab5-endosomes containing EGF ligand accumulate. This impaired endosome trafficking caused a sustained EGFR activation and signaling. Endocytic regulation of EGFR signaling has great implications in cancer and other diseases. Any factors that can slow-down the progression of EGFR through the endocytic pathway, enhance its signaling, and can therefore lead to uncontrolled cell proliferation, de-differentiation, migration, as well as other hallmarks of cancer such as epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) (Mosesson et al., 2008; Yarden and Sliwkowski, 2001). Conversely, accelerated trafficking may reduce EGFR signaling and alter tissue homeostasis and repair. Indeed, EGFR

activity is an essential component of organ physiology and a crucial mediator of tissue regeneration after injury (Chen et al., 2012; He et al., 2013; Humes et al., 1989; Komposch and Sibilio, 2015; Puddicombe et al., 2000; Zhuang et al., 2004). However, its overexpression has been associated to the initiation or worsening of several diseases (Mendelsohn and Baselga, 2000; Uhlman et al., 1995). Consequently, EGFR signaling must be tightly controlled and its endocytic trafficking represents an important negative feed-back mechanism controlling its activity (Burke et al., 2001; Ceresa, 2012). By regulating transport of endosomes containing EGFR, COMMD5 plays therefore a crucial role in EGFR activation and consequently, could be a potential therapeutic alternative target in EGFR-targeted therapy. Our study offers an explanation to why overexpression or downregulation of COMMD5 in cancer could correlate with favorable or poor prognosis (Matsuda et al., 2017), or why COMMD5 expression is associated to tissue repair (Matsuda et al., 2011). In addition, we have shown that COMMD5 overexpression enhanced autophagic cell death in renal cell carcinoma (Matsuda et al., 2017).

A recent study identified a multiprotein complex, called retriever, that is structurally and functionally related to retromer by regulating endosomal cargo recycling (McNally et al., 2017). This complex associates with the cargo adaptor sorting nexin 17 (SNX17) and couples to CCC (CCDC93, CCDC22, COMMD) and WASH complexes to prevent lysosomal degradation and promote cargo cell surface recycling. As COMMD5 is an integral component of the CCC complex and co-localized with WASH, it might thus regulate the recycling of EGFR and numerous other cargoes via its indirect coupling to retriever. Indeed, we found that COMMD5 depletion induced the downregulation of two other tyrosine kinase family receptors, ErbB2

and insulin receptor, suggesting a potential role for COMMD5 in diseases such as cancer or diabetes. In addition, loss of COMMD5 also induced the downregulation of E-cadherin expression, which is an important mediator of intercellular adhesion and the establishment and maintenance of cell polarity, differentiation, migration and signaling pathways.

### **COMMD5 is a crucial factor for the maintenance of cell differentiation, migration and cell junctions**

We previously showed that COMMD5 overexpression in kidneys accelerates tubular repair after ischemic injury by modulating cell proliferation, migration and by facilitating cell re-differentiation (Matsuda et al., 2011). Indeed, we showed that COMMD5 mRNA levels decrease abruptly after ischemia/reperfusion and increased steadily during the recovery phase (Solban et al., 2000). Kidney injury caused by ischemia/reperfusion induces apical membrane disruption and impairs key membrane receptor expression leading to a loss of cell polarity in proximal tubules that finally reduces cell attachment leading to renal tubular obstruction (Basile et al., 2012). The cytoskeleton is required to move vesicles directionally to the site of the disruption and to deliver receptors or adherens molecules to their appropriate membrane domains and to promote the exocytic events required for resealing (Abreu-Blanco et al., 2012). An intact microtubule and actin network is essential for efficient membrane trafficking and is required to maintain cell polarity, adhesion and function. We showed that COMMD5 by interacting with the cytoskeleton participated in the cellular machinery that generates polarized distribution of proteins including of EGFR and E-cadherin. Tissue repair requires generation of functional multicellular organ and tissue patterns, and actin and microtubule

network are also involved in the directional cell migration that is essential for the healing of the damaged epithelium. We observed that the loss of COMMD5 leads to an impaired cell orientation perturbing cell direction sensing and leading to an uncontrolled random migration. We hypothesized that under stress conditions of tissue injury, impaired membrane trafficking induced by loss of COMMD5 leads to mislocalization of proteins affecting cell polarity and adhesion and perturbs direction sensing and correct cell orientation. Overall, COMMD5 downregulation could lead to epithelial to mesenchymal transition and to uncontrolled cell invasion.

In this study, we identified a specific and crucial role for COMMD5 in the endocytic trafficking machinery and especially, we determined COMMD5 as an actin- and tubulin-binding protein. Our results provide a further insight into the essential role of COMMD5 on every aspect of cellular processes, from membrane receptor trafficking to cytoskeleton organization, cell migration and junctions. This also supports our previous studies that described COMMD5 as a key regulator of repair processes and tumor suppressor. It is conceivable that loss of COMMD5 expression by mutations, deletions or in the opposite, its overexpression by gene amplification, could influence not only cellular processes but also the epithelium function and thus leading to important disorders, diseases and cancers.

### **Acknowledgements**

This study was funded by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (grant MOP-133690) to JT. CGC was supported by a KRESCENT postdoctoral fellowship. We gratefully acknowledge the technical help of Guillaume Beaudoin and Renauld Balthazar. The authors

would like to thank Dr Alexandre Desjardins and Dr Sean Taylor. We thank the Cell Imaging core facility of CRCHUM and its technical supervisor, Dr Aurélie Cleret-Buhot.

#### **Author contributions**

CGC and JT conceived and designed the study and wrote the manuscript. CGC performed most of the experiments and data analyzes. KZ contributed to live cell imaging, RhoA activity and wound healing assays. TV performed real time PCR assays, transfections, some Western Blots, viability assay and helped with co-IP. SC performed Co-IP and pull-down assays. NS performed the yeast two-hybrid assay. PH contributed to the design of the study and critically reviewed the manuscript. HM designed the cloning strategies for the pull-down assay and supervised its achievement.

#### **Declaration of interest**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## References

- Abreu-Blanco, M.T., Watts, J.J., Verboon, J.M., and Parkhurst, S.M. (2012). Cytoskeleton responses in wound repair. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 2469–2483.
- Bartuzi, P., Billadeau, D.D., Favier, R., Rong, S., Dekker, D., Fedoseienko, A., Fieten, H., Wijers, M., Levels, J.H., Huijckman, N., et al. (2016). CCC- and WASH-mediated endosomal sorting of LDLR is required for normal clearance of circulating LDL. *Nat. Commun.* 7, 10961.
- Basile, D., Anderson, M., and Sutton, T. (2012). Pathophysiology of Acute Kidney Injury. *Compr. Physiol.* 2, 1303–1353.
- Brackley, K.I., and Grantham, J. (2009). Activities of the chaperonin containing TCP-1 (CCT): Implications for cell cycle progression and cytoskeletal organisation. *Cell Stress Chaperones* 14, 23–31.
- Burke, P., Schooler, K., and Wiley, H.S. (2001). Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. *Mol. Biol. Cell* 12, 1897–1910.
- Burkhead, J.L., Morgan, C.T., Shinde, U., Haddock, G., and Lutsenko, S. (2009). COMMD1 forms oligomeric complexes targeted to the endocytic membranes via specific interactions with phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 284, 696–707.
- Ceresa, B.P. (2012). Spatial regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 72–87.
- Chan, A.Y., Bailly, M., Zebda, N., Segall, J.E., and Condeelis, J.S. (2000). Role of cofilin in epidermal growth factor-stimulated actin polymerization and lamellipod protrusion. *J. Cell Biol.* 148, 531–542.
- Chan, a Y., Raft, S., Bailly, M., Wyckoff, J.B., Segall, J.E., and Condeelis, J.S. (1998). EGF stimulates an increase in actin nucleation and filament number at the leading edge of the lamellipod in mammary adenocarcinoma cells. *J. Cell Sci.* 111 ( Pt 2, 199–211.
- Chen, J., Chen, J.-K., and Harris, R.C. (2012). Deletion of the epidermal growth factor receptor in renal proximal tubule epithelial cells delays recovery from acute kidney injury. *Kidney Int.* 82, 45–52.
- Derivery, E., Sousa, C., Gautier, J.J., Lombard, B., Loew, D., and Gautreau, A. (2009). The Arp2/3 Activator WASH Controls the Fission of Endosomes through a Large Multiprotein Complex. *Dev. Cell* 17, 712–723.
- Derivery, E., Helfer, E., Henriot, V., and Gautreau, A. (2012a). Actin polymerization controls the organization of WASH domains at the surface of endosomes. *PLoS One* 7.



Derivery, E., Helfer, E., Henriot, V., Gautreau, A., and Berland, L. (2012b). Actin Polymerization Controls the Organization of WASH Domains at the Surface of Endosomes. *PLoS One* 7, e39774.

Devlin, A.M., Solban, N., Tremblay, S., Gutkowska, J., Schurch, W., Orlov, S.N., Lewanczuk, R., Hamet, P., and Tremblay, J. (2003). HCaRG is a novel regulator of renal epithelial cell growth and differentiation causing G2M arrest. *Am J Physiol Ren. Physiol* 284, F753–F762.

Duleh, S.N., and Welch, M.D. (2010a). WASH and the Arp2/3 complex regulate endosome shape and trafficking. *Cytoskeleton* 67, 193–206.

Duleh, S.N., and Welch, M.D. (2010b). WASH and the Arp2/3 complex regulate endosome shape and trafficking. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 67, 193–206.

Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 301, 5–17.

El Hader, C., Tremblay, S., Solban, N., Gigras, D., Beliveau, R., Orlov, S.N., Hamet, P., and Tremblay, J. (2005). HCaRG increases renal cell migration by a TGF- $\alpha$  autocrine loop mechanism. *Am J Physiol Ren. Physiol* 289, F1273–F1280.

Hall, A., and Nobes, C.D. (2000). Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 355, 965–970.

He, S., Liu, N., Bayliss, G., and Zhuang, S. (2013). EGFR activity is required for renal tubular cell dedifferentiation and proliferation in a murine model of folic acid-induced acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 304, F356-66.

Humes, H.D., Cieslinski, D.A., Coimbra, T.M., Messana, J.M., and Galvao, C. (1989). Epidermal growth factor enhances renal tubule cell regeneration and repair and accelerates the recovery of renal function in postischemic acute renal failure. *J. Clin. Invest.* 84, 1757–1761.

Komposch, K., and Sibilias, M. (2015). EGFR Signaling in Liver Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 17.

Li, H., Koo, Y., Mao, X., Sifuentes-Dominguez, L., Morris, L.L., Jia, D., Miyata, N., Faulkner, R.A., van Deursen, J.M., Vooijs, M., et al. (2015). Endosomal sorting of Notch receptors through COMMD9-dependent pathways modulates Notch signaling. *J. Cell Biol.* 211, 605–617.

Maine, G.N., and Burstein, E. (2007a). COMMD proteins: COMMMing to the scene. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1997–2005.

Maine, G.N., and Burstein, E. (2007b). COMMD proteins and the control of the NF kappa B pathway. *Cell Cycle* 6, 672–676.

Maine, G.N., Mao, X., Muller, P.A., Komarck, C.M., Klomp, L.W.J., and Burstein, E. (2009). COMMD1 expression is controlled by critical residues that determine XIAP binding. *Biochem. J.* 417, 601–609.

- Mallam, A.L., and Marcotte, E.M. (2017). Systems-wide Studies Uncover Commander, a Multiprotein Complex Essential to Human Development. *Cell Syst.* 4, 483–494.
- Marjoram, R.J., Lessey, E.C., and Burridge, K. (2014). Regulation of RhoA Activity by Adhesion Molecules and Mechanotransduction. *Curr. Mol. Med.* 14, 199–208.
- Matsuda, H., Lavoie, J.L., Gaboury, L., Hamet, P., and Tremblay, J. (2011). HCaRG accelerates tubular repair after ischemic kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 2077–2089.
- Matsuda, H., Hamet, P., and Tremblay, J. (2014). Hypertension-related, calcium-regulated gene (HCaRG/COMMD5) and kidney diseases: HCaRG accelerates tubular repair. *J. Nephrol.* 27, 351–360.
- Matsuda, H., Champion, C.G., Fujiwara, K., Ikeda, J., Cossette, S., Verissimo, T., Ogasawara, M., Gaboury, L., Saito, K., Yamaguchi, K., et al. (2017). HCaRG/COMMD5 inhibits ErbB receptor-driven renal cell carcinoma. *Oncotarget.*
- McNally, K.E., Faulkner, R., Steinberg, F., Gallon, M., Ghai, R., Pim, D., Langton, P., Pearson, N., Danson, C.M., Nägele, H., et al. (2017). Retriever is a multiprotein complex for retromer-independent endosomal cargo recycling. *Nat. Cell Biol.* 19, 1214–1225.
- Mendelsohn, J., and Baselga, J. (2000). The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 19, 6550–6565.
- Mosesson, Y., Mills, G.B., and Yarden, Y. (2008). Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 835–850.
- Papakonstanti, E.A., and Stournaras, C. (2008). Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* 582, 2120–2127.
- Phillips-Krawczak, C.A., Singla, A., Starokadomskyy, P., Deng, Z., Osborne, D.G., Li, H., Dick, C.J., Gomez, T.S., Koenecke, M., Zhang, J.-S., et al. (2015). COMMD1 is linked to the WASH complex and regulates endosomal trafficking of the copper transporter ATP7A. *Mol. Biol. Cell* 26, 91–103.
- Puddicombe, S.M., Polosa, R., Richter, A., Krishna, M.T., Howarth, P.H., Holgate, S.T., and Davies, D.E. (2000). Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma. *FASEB J.* 14, 1362–1374.
- Ross, J.L., Ali, M.Y., and Warshaw, D.M. (2008). Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 41–47.
- Schneider, R., and Persson, S. (2015). Connecting two arrays: the emerging role of actin-microtubule cross-linking motor proteins. *Front. Plant Sci.* 6.

Schroeder, H.W., Mitchell, C., Shuman, H., Holzbaur, E.L.F., and Goldman, Y.E. (2010). Motor Number Controls Cargo Switching at Actin-Microtubule Intersections In Vitro. *Curr. Biol.* 20, 687–696.

Segall, J.E., Tyerech, S., Boselli, L., Masseling, S., Helft, J., Chan, A., Jones, J., and Condeelis, J. (1996). EGF stimulates lamellipod extension in metastatic mammary adenocarcinoma cells by an actin-dependent mechanism. *Clin. Exp. Metastasis* 14, 61–72.

Slepchenko, B.M., Semenova, I., Zaliapin, I., and Rodionov, V. (2007). Switching of membrane organelles between cytoskeletal transport systems is determined by regulation of the microtubule-based transport. *J. Cell Biol.* 179, 635–641.

Solban, N., Jia, H.P., Richard, S., Tremblay, S., Devlin, A.M., Peng, J., Gossard, F., Guo, D.F., Morel, G., Hamet, P., et al. (2000). HCaRG, a novel calcium-regulated gene coding for a nuclear protein, is potentially involved in the regulation of cell proliferation. *J Biol Chem* 275, 32234–32243.

Spiering, D., and Hodgson, L. (2011). Dynamics of the rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adhes. Migr.* 5, 170–180.

Tremblay, J., Hamet, P., Lewanczuk, R., Gossard, F., and Solban, N. (2008). HCaRG, A Novel Calcium-Regulated Gene.

Uhlman, D., Nguyen, P., Manivel, J., Zhang, G., Hagen, K., Fraley, E., Aeppli, D., and Niehans, G. (1995). Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in papillary and nonpapillary renal cell carcinoma: correlation with metastatic behavior and prognosis. *Clin. Cancer Res.* 1, 913–920.

Ursic, D., Sedbrook, J.C., Himmel, K.L., and Culbertson, M.R. (1994). The essential yeast Tcpl1 protein affects actin and microtubules. *Mol. Biol. Cell* 5, 1065–1080.

Yarden, Y., and Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127–137.

Zhao, Z., and Manser, E. (2005). PAK and other Rho-associated kinases--effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem. J.* 386, 201–214.

Zhuang, S., Dang, Y., and Schnellmann, R.G. (2004). Requirement of the epidermal growth factor receptor in renal epithelial cell proliferation and migration. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 287, F365-72.

## Method details

### Reagents, cells and plasmids

Reagents were from Sigma unless otherwise specified. Pure porcine brain tubulin (>99 %) and pure rabbit skeletal muscle actin (>99 %) were purchased from Cytoskeleton, Inc. All cell lines were obtained from ATCC and maintained in 5 % CO<sub>2</sub> at 37°C. Human kidney cell line (HK-2) was cultured in 1:1 mixture of DMEM and Ham's F12 (Life Technologies) supplemented with 10% fetal serum. HEK-293 cells were cultured in DMEM containing 10 % fetal serum. Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells (ThermoFisher) was used according to the manufacturer's instructions. Plasmids used in pull-down assays were derived from rat kidney cDNA. Total rat COMMD5 and deleted fragments were cloned in frame (primers used are listed in the Key Resources Table) with the GST in pGEX-3X vector (Clontech) at BglII/EcoRI sites. Total human COMMD5 and COMMD1 were amplified from human cDNA and inserted in frame with GST at BamHI/SmaI-blunted and BamHI/EcoRI sites respectively, in pGEX-3X. Clones were transformed in subcloning efficiency DH5α E. Coli, sequenced and then, sub-transformed in One-shot-star-BL21(DH3) E. Coli. For Co-IP, the entire coding region of human COMMD5 including its 3'UTR was fused (primers used are listed in the Key Resources Table) in frame to GFP in pEGFP-C1 (Clontech) through a blunt HindIII site and sequenced. All plasmids, antibodies and staining used in this study are listed in the KEY RESSOURCES TABLES. mCherry-Rab5, mCherry-Actin and mCherry-tubulin were kindly provided by Dr Morag Park (McGill University) and GFP-Rab5 and GFP-Rab11 by Dr Nicole Leclerc (CRCHUM). mCherry-Kinesin11-N-18 (plasmid #55067), mCherry-WASH1-N-18 (plasmid #55163) were a gift from

Michael Davidson (Addgene), and dsRed-Rab7 (plasmid #12661) was a gift from Richard Pagano (Addgene).

### **Western blot analysis**

Western blots using lysates from HK-2 or HEK-293 cells were performed with the following antibodies: COMMD5 (1:2,000), COMMD1 (1:2,000), ErbB2/HER-2 (1:1,000), Insulin receptor  $\beta$  (1:1,000),  $\alpha$ -tubulin (1:10,000), E-cadherin (1:1,000), EGFR (1:1,000), p-EGFR [Tyr1086] (1:1,000), Akt (1:1,000), p-Akt [Ser473] (1:1,000) and NUP98 (1:1,000). Cells were harvested, lysed in a modified radioimmunoprecipitation assay protein extraction (RIPA) buffer (150 mM NaCl, 1 % Igepal CA-630, 0,5 % sodium deoxycholate, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0,1 % SDS) supplemented with proteases inhibitors (Roche), frozen/thawed, triturated, and centrifuged. 10  $\mu$ g of proteins were mixed with sample buffer (63 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1 % SDS, 10 % glycerol, 0.5 % bromophenol blue 1 % 2-mercaptoethanol) and then heated for 5 minutes at 95°C. Each sample was applied equally to a 4-15% mini-PROTEAN TGX gel (Bio-Rad) at 100 V for 1 h. Transfer to nitrocellulose membrane (Bio-Rad) was performed at 1.3 A, for 10 min at room temperature (RT) using the Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). The membrane was then briefly washed in (TBST) (20 mM Tris-HCl, pH 7.3, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween20), and allowed to block at RT for 1 h in 5 % skim milk-TBST. The membrane was then washed 3X 5 min in TBST and blotted with primary antibody diluted in TBST with 3 % bovine serum albumin (BSA) overnight at 4°C, then underwent 3X 5 min washes with TBST were performed. The secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody was diluted 1:10,000 in skim milk-TBST and the membrane was blotted at RT for 1 h. The membrane was

then washed 3X 5 min in TBST and ECL detection reagent (GE Healthcare) was applied to the membrane for 5 minutes. The immunoblots were developed using films. In each experiment, expression levels were normalized to  $\alpha$ -tubulin expression.

### **GST pull-down assay and co-immunoprecipitation (Co-IP)**

The expression of the GST fusion proteins was induced at 37°C, overnight in Magimmedia E.coli expression medium (Invitrogen). Proteins were purified with the rapid GST Inclusion Body Solubilization and Renaturation kit (Cell Biolabs) according to the manufacturer's instructions. Extracted recombinant proteins were bound on 20  $\mu$ l of 50 % slurry beads of glutathione sepharose 4B (GE HealtCare) at 4 °C, on a rocker for 1 h. 3X ice-cold PBS washed beads-GST clone complexes were then incubated overnight at 4 °C on a rotative wheel with 0.5-3 mg of HEK-293 protein lysate or with tubulin, G- or F-actin or polymerized tubulin in (3.5:1) lysis buffer (2.5 M MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 % igePAL CA-630, 0.4 mM Pefabloc SC PLUS (Roche), complete mini and 0.014 U DNase I) and dilution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.4 mM Pefabloc SC PLUS, complete mini). Polymerized tubulin was prepared as manufacturer's instructions. Briefly, 10  $\mu$ g/ $\mu$ l of tubulin was incubated at 37°C for 30 min in glycerol-supplemented G-PEM buffer (80 mM PIPES, pH 6.9, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 1mM GTP, 5 % glycerol). 99 % pure G-actin was reconstituted at 10  $\mu$ g/ $\mu$ l in water. F-actin was obtained from polymerization of G-actin incubated at (RT) for 1 h in actin polymerization buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP). After binding, complexes were washed 3X with cold dilution buffer and eluted from beads at 95°C for 10 min in sample buffer (15 % SDS,

40 % glycerol, 280 mM Tris-HCl, pH 6.8 and 25 % 2-mercaptoethanol). Samples were diluted in water (2:1 for interactors and 1:4 for GST detection), loaded on a 4-20 % mini-PROTEAN TGX gel and run at 120 V for 90 min. Transfer to nitrocellulose membrane was performed at 2.5 A, for 7 min using the Trans-Blot Turbo Transfer System. The membrane was blocked at RT for 1 h in 5 % skim milk-TBST. The membrane was then blotted with primary antibody diluted in 5 % skim milk-TBST, overnight at 4°C. Primary antibodies used for hybridization were: actin (1:800),  $\alpha$ -tubulin (1:1,000),  $\beta$ -tubulin (1:1,000), Rab5 (1:700) and GST (1:90,000). The day after, 3X 5 min washes with TBST were performed and membrane was hybridized with the secondary anti-rabbit-HRP (1:10,000) in 5 % skim milk-TBST at RT for 1 h. The membrane was washed 3X 5 min in TBST and immunolabeled proteins were detected by chemiluminescence revelation with Clarity or Clarity Max Western ECL Substrate (Bio-Rad) using a Chemidoc station (Bio-Rad).

For co-immunoprecipitation, HEK-293 cells or HK-2 cells were seeded onto 10-cm plates and transfected with 4  $\mu$ g of GFP-expression plasmids for 6 h in lipofectamine 2000 (Invitrogen) and Opti-MEM (Invitrogen) as manufacturer's instruction. After 16 h in fresh medium, cells were lysed in lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 % igepal, 0.4 mM PEFABLOC SC PLUS, complete mini). 2 mg of whole extracted proteins were diluted in (2:3) lysis buffer:dilution buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.4 mM PEFABLOC SC PLUS, complete mini) and bound overnight at 4°C, to nano GFP beads using the GFP-trap\_MA (Chromotek) as manufacturer's protocol. After 3X washes with dilution buffer, immunocomplexes were dissociated in the same sample buffer used for pull-down assay and beads were magnetically removed from samples. Gels, immunoblots,

revelation and detection were processed as described above in the pull-down assay. Membranes were blotted with primary antibodies: actin (1:800),  $\alpha$ -tubulin (1:1,000), and GFP (1:500). Secondary antibodies used were: anti-rabbit-HRP (1:10,000) and anti-rat-HRP (1:10,000). Co-immunoprecipitation in Figure S5A was performed using HEK-293 cells as described previously using following antibodies: COMMD1 (1:1,000), GFP (1:90,000).

### **siRNA transfection**

Silencer Select pre-designed siRNA products (siCOMMD5#1: s26375; siCOMMD5#2: s26377, siCOMMD1: s225736; siCTRL: 4390843) were purchased from Life Technologies. HK-2 cells were seeded in a 12-well plate and transfection of 25 nM siRNA was carried out using Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) in Opti-MEM (Invitrogen), according to manufacturer's instructions. After 4h of transfection, cells were replenished with complete medium for 72h, and processed for confocal microscopy, or harvested, lysed in RIPA buffer and processed for western blot analysis as described in the method.

For EGF stimulation experiments in Figure 2E-J, HK-2 cells were transfected with siRNAs. After 48 h, cells were incubated in 0.1 % BSA medium supplemented with 10 ng/ml cycloheximide. After overnight incubation, 100 ng/ml recombinant human EGF was added to the medium for indicated periods. Cells were then harvested at indicated time, lysed with RIPA buffer and processed for western blot analysis.

### **RT-qPCR**



In Figure S1B, total RNA was extracted from HK-2 cells with TRIzol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instruction. 1 $\mu$ g of total RNA was reverse transcribed using the Omniscript Reverse Transcriptase kit (Qiagen) to synthesize single-stranded cDNA with oligo-(dt)12-18 primer (Invitrogen). cDNA was used to perform qPCR in triplicate using PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) and Rotor Gene 3000 (Corbett Research) following the manufacturer's instruction. The  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method was used to analyze the relative changes in gene expression levels. Primers used in RT-qPCR are listed in the Key Resources Table.

### **Immunofluorescence labelling**

Confocal microscopy was performed using HK-2 or HEK-293 cells with the following antibodies: COMMD5 (1:50), COMMD1 (1:50), EEA1 (1:50),  $\beta$ -tubulin (1:50), Phalloidin (1:200), Arp2/3 (1:50), Rab5 (1:50), EGFR (1:50) and phospho-EGFR [Tyr1173-] (1:50).

Half confluent HK-2 or HEK-293 cells were seeded onto glass coverslips previously coated with 0.025 % rat tail collagen (Roche) in PBS, pH 7.4, with 0.02 % acetic acid. After 24 h, the cells were successively washed with PBS 2X 3 min, fixed in 4 % paraformaldehyde for 10 min at RT, washed with TBST 3X 3min, permeabilized with 0.1 % Triton X-100 for 5 min at RT and blocked in 3 % BSA-TBST for at least 1 h. Cells were first incubated at RT with the indicated primary antibody for 2 h, washed 3x 3 min with TBST, and then, incubated with secondary antibody (1:100) for 1 h and re-washed 3x 3 min with TBST. Microscope slides were mounted using ProLong Gold Antifade Reagent with or without Dapi (Life Technologies) and visualized using a Leica laser scanning microscope (Leica Microsystems).

For HK-2 cells transfected with GFP-Rab11 in Figure 1E, or with siRNAs in Figure 2K, 3B and 3G, HK-2 cells were seeded onto collagen coated glass coverslips and transfected with 2  $\mu$ g of GFP-Rab11 using lipofectamine 3000 (Invitrogen) in Opti-MEM (Invitrogen) or with 25 nM siCTRL, siCOMMD5#1 or siCOMMD5#2 using Lipofectamine RNAiMax in Opti-MEM as previously described. After 4h of transfection, cells were replaced in complete medium for 24 h (for GFP-Rab11) or 72 h (for siRNAs), and then processed for immunofluorescence staining and confocal microscopy as previously described.

For Alexa488-transferrin experiments in Figure S3, HK-2 cells depleted of COMMD5 were seeded onto collagen coated glass coverslips and transfected with 25 nM siCTRL or siCOMMD5#1 as previously described. After 4 h of transfection, cells were replenished with complete medium for 48 h, and then incubated in 0.1 % BSA medium. After an overnight incubation, 10  $\mu$ g/ml Alexa488-transferrin was added to culture for 30 min and then processed for immunofluorescence staining with Rab5 specific antibody, and confocal microscopy.

For nocodazole treatment experiments in Figure S4, HK-2 cells were seeded onto collagen coated glass coverslips. Cells were treated with 10  $\mu$ g/ml of nocodazole for 30 min to disrupt microtubules, and then processed for immunofluorescence staining with COMMD5,  $\beta$ -tubulin or EEA1 specific antibodies, and confocal microscopy.

### **Laser scanning confocal images**

Confocal images were acquired on a Leica TCS-SP5 inverted microscope (Leica Microsystems) using a HCX PL APO 20x/0.70 IMM, HCX PL APO 63x/1.4 OIL or HCX PL APO 100x/1.4 OIL objectives. Excitation system was performed using a 405-diode laser for DAPI, a 488 nm line of an Argon laser for AlexaFluor488 and a 561 nm diode laser for AlexaFluor555 or AlexaFluor594 using a sequential acquisition at 200Hz scan speed. Spectral detectors were set accordingly to each fluorophore to avoid cross-talk excitation and emission. Images were acquired with the Las-AF software (Leica Microsystems). Final images are 8bits, 1024x1024 and image analysis was performed using Las-AF and FIJI (NIH) softwares.

### **Nucleofection for live cell imaging**

For spinning disk confocal microscopy, HK-2 cells were electroporated by nucleofection with GFP-COMMD5, mCherry-Rab5, GFP-Rab5, dsRed-Rab7, mCherry-actin, mCherry-tubulin or mCherry-WASH1 plasmid with or without siRNAs (siCTRL or siCOMMD5#1).

Cells were trypsinized, centrifuged and resuspended at  $1 \times 10^5$ , in 80  $\mu$ l Nucleofector Solution (Amaxa). Afterwards, 2  $\mu$ g of indicated plasmids (GFP and/or mCherry/dsRed) and/or 50 nM of indicated siRNA were added, and the mixture was transferred into an electroporation cuvette of the Nucleofector device (Amaxa). Immediately after nucleofection, cell's suspension was seeded into collagen coated 6-well glass-bottom dishes (Ibidi) in complete medium. After 48 h (72 h for siRNA experiments), live cell images were acquired using a Zeiss Axio Observer.Z1 inverted microscope (Zeiss).

For Alexa555-EGF stimulation experiments in Figure 2D, 2K and 3A, HK-2 cells were electroporated with 2  $\mu$ g GFP-Rab5 and 50 nM siRNAs as previously described and after 48 h,

were incubated in serum-deprived medium. After 24 h, 25 ng/ml Alexa555-EGF was added to the medium and immediately processed for live cell imaging using spinning disk confocal microscopy.

### **Spinning disk confocal images**

Live cell images were acquired using a Zeiss Axio Observer.Z1 inverted microscope coupled with a Yokogawa spinning disk scanning unit CSU-X1 (Yokogawa Electric Corporation). Cells were maintained under a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> -environment using a TokaiHit top stage chamber (TokaiHit). All images were acquired using an alpha Plan-Apochromat 100x/1.46 Oil objective and an EMCCD Evolve 512 camera (Photometrics, AZ). For excitation, a 488 nm (20mW) and 561 nm (50mW) solid state lasers (Coherent) were used for GFP and mCherry, respectively. A quadruple filter set (FF01: 446/523/600/677) was used for detection. Images were acquired using the Zen Blue software (Zeiss). Final images are 16bits, 512x512 and time scale is specified in figure's legends. Image analysis was performed using Zen 2.3 (blue edition) (Zeiss) and FIJI softwares.

### **Image processing and data analysis**

Analysis of images were performed with FIJI (NIH), Zen 2.3 (blue edition) (Zeiss) or Las-AF software (Leica Microsystems). Z-stack and projection images (Zprojection/Max intensity) were processed with FIJI. Fluorescence intensity and time-lapse snapshot were performed using Zen 2.3 (blue edition). Speed and size of mCherry-Rab5 positive endosomes were quantified by Imaris (Imaris Bitplane). Statistical significance for continuous data was determined by Student's t test.

Cell area in Figure S2B: confocal images were processed and analyzed using FIJI software. To identify single cells, nuclei were visualized using the DAPI staining. The cytoplasm was subsequently segmented based on the identified nuclei utilizing F-actin intensity. Cells touching the image border were filtered out. For each siRNA conditions, n=14 cells were measured to obtain cell area (in  $\mu\text{m}^2$ ).

Cell nuclei counting in Figure S2D: nuclei counting was automated using FIJI software. Image was converted in greyscale (8-bit) and a threshold was applied to highlight all nuclei structures. The size of particles to count was set using « Analyze Particles ».

### **Rho GTPase activity assay**

The Rho GTPase activation assay was performed using the G-LISA RhoA absorbance-based activation assay (Cytoskeleton). Briefly, HK-2 cells were grown on collagen-coated 96-well dishes (Costar), treated for 2 h with 20  $\mu\text{M}$  DMSO or MG-132 and incubated at 37°C. At the end of the incubation period, cells were washed twice with ice-cold (PBS) and resuspended in 65  $\mu\text{l}$  of G-LISA lysis buffer. Protein lysates were transferred to ice-cold 1.5-ml centrifuge tubes and clarified by centrifuging at 10,000 rpm for 2 min. Protein concentrations were determined using the Bradford protein assay, and 1 mg/ml protein was used for the Rho GTPase activation assay as per manufacturer's recommendations. Primary antibody (1:50) and HRP-conjugated secondary antibody (1:250) were sufficient to produce a RhoA-specific signal. After antibody and HRP reagent incubation, signals were detected at 490 nm on a Versamax microplate reader (Molecular devices). Data analysis was performed using Excel (Microsoft) software.

### **Wound-healing assays**

3 time-points wound-healing assays (Fig. 6A): HK-2 cells were transfected with siRNA (siCTRL, siCOMMD5#1 and siCOMMD5#2) as previously described. After 4h post-transfection, cells were replenished with complete medium for 44 h, then trypsinized and seeded to 20,000 cells/chamber in Ibidi culture double inserts on collagen treated glass coverslip. After 24 h, inserts were removed, and images were captured at T=0 h, 12 h and 24 h by digital camera connected microscope (Nikon) using a 4X objective lens.

Measure of scratch wound area: the method used was based on find edges using the MRI Wound Healing tool of FIJI software.

Time-laps wound-healing (Movie S7, Fig. 6B and 6C): HK-2 cells were plated in 12-well plates and transfected with siRNA (siCTRL and siCOMMD5#1) as previously described. After 4h of transfection, cells were replenished with complete medium for 72 h. A straight scratch was then made using a tip (2 wounds/well, 2 wells/condition). Images were captured at 5-min intervals for 24 h by digital camera connected to a Zeiss microscope using a 10X objective lens and analyzed with AxioVision software (Carl Zeiss). To analyze cell migration, the nuclear position of each cell was tracked, and cell speed and displacement rates were analyzed using Fiji and Chemotaxis softwares.

### **Yeast two-hybrid**

Table S1: The human HCaRG/COMMD5 cDNA expressed as fusion to the GAL 4 DNA-binding domain (DNA-BD), served to transform AH109 yeast strain. The transformed strain was then mated with yeast strain Y187 that contained a normal human kidney cDNA library (Clontech) expressed as fusion to the GAL 4-activation domain (AD) in pACT2 vector using Matchmaker Two-Hybrid System's instructions (Clontech). The strengths of the interactions were evaluated by  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -GAL) assay. Briefly, absorbance (OD600) of mid-log phase of fresh grown yeast was read. Culture was centrifuged, pellet was lysed and incubated at 30 °C with O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galacto-pyranoside for 1 h. The reaction was then quenched with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and optical density (OD420) was measured. Candidate clones were sub-transformed in DH5 $\alpha$ , purified and sequenced. Binding region of the smallest clone was determined by sequence blasted using NCBI database.

### **TUNEL assay**

In Figure S2D, HK-2 cells were seeded on collagen-coated glass and transfected as the same manner than described Star Method, in the 3 time-points wound assay. 3 days after transfection, TUNEL assay was done with DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega) as indicated by manufacturer's instruction. Briefly, cells were fixed with 4 % formaldehyde and permeabilized with Triton X-100. After pre-incubation with equilibration buffer, cells were labelled with a nucleotide and rTdT enzyme mixture for 1 h at 37°C. Labelling was stopped with 20X SSC, then cells were washed, mounted with Prolong containing DAPI nuclear marker and cover with coverslip. Negative controls were treated as the same manner but did not contain rTdT enzyme, while positive controls were done with pre-incubation of fixed cell with 8

units/ml DNase I (Invitrogen) in DNase buffer (40 mM tris-HCl, pH 7.9, 10 mM NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>) at room temperature for 10 minutes. DNase was extensively washed with water were performed before labelling.

### **Cell viability assay**

In Figure S2E, PrestoBlue Cell Viability Reagent (Invitrogen) was used as the manufacturer's instruction. After 2 days post-transfection, HK-2 cells were counted and re-inoculated at 2,000 cells/well in a 96 well-plate. 24 and 48 h after, prestoBlue reagent was added to washed cells for an incubation of 2 h. Fluorescence was read at (540 nm/615 nm) in the plate reader 1420 multilabel counter (Victor3V, Perkin Elmer).

### **Proliferation Assay**

In Figure S2F, HK-2 cells were seeded in a 6-well plate and transfection of 50 nM siRNA (siCTRL and siCOMMD5) was carried out using Lipofectamine RNAiMax in Opti-MEM, according to manufacturer's instructions. After transfection, cells were replenished with complete medium. The plate was placed into the IncuCyte ZOOM apparatus (Essen BioScience) at 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> and images of the collective cell spreading were recorded every 2 h for a total duration of 164 h.

### **Quantification and statistical analysis**

For quantitated data and representative images of experiments, the n values and independent experiment numbers are indicated in the figure legends. All laser scanning or spinning disk confocal imaging data presented in this study were acquired from at least three



independent experiments and multiple images or movies on multiple cells were captured. Student's t test was used for statistical analysis. The co-localization and Pearson correlation coefficient of COMMD5 with other proteins was quantified by Imaris software. Pearson co-localization is a well-established measure of correlation; +1 (perfect correlation) and values close to 0 meaning an absence of correlation.

## KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Anti-Actin antibody produced in rabbit, affinity isolated	Sigma-Aldrich	Cat#A2066; RRID:AB_476693
Rabbit polyclonal anti- $\alpha$ -tubulin	Abcam	Cat#ab4074; RRID:AB_2288001
Rabbit monoclonal anti-Rab5 (clone C8B1)	Cell Signaling	Cat#3547S; RRID:AB_10828212
Rabbit polyclonal anti-GST (clone Z-5)	Santa-Cruz	Cat#sc-459; RRID:AB_631586
Rabbit polyclonal anti-COMMD5	Proteintech Group	Cat#10393-1-AP; RRID:AB_2083555
Rabbit polyclonal anti-COMMD1	Proteintech Group	Cat#11938-1-AP; RRID:AB_2083542
Rat monoclonal anti-GFP [3H9]	Chromo Tek	Cat#3h9; RRID:AB_10773374
Rabbit polyclonal anti- $\beta$ -tubulin	Cell Signaling Technology	Cat#2146; RRID:AB_2210545
Goat polyclonal anti-rat IgG (H+L)-HRP	Jackson ImmunoResearch Labs	Cat#112-035-062; RRID:AB_2338133
Goat polyclonal anti-rabbit IgG-HRP	Santa-Cruz	Cat#sc-2004; RRID:AB_631746
Goat polyclonal anti-mouse IgG-HRP	Santa-Cruz	Cat#sc-2005; RRID:AB_631736
Donkey anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody, Alexa Fluor 594 conjugate	Thermo Fisher	Cat#A-21207; RRID:AB_141637
Chicken anti-mouse IgG (H+L) secondary antibody, Alexa Fluor 488 conjugate	Thermo Fisher	Cat#A2100; RRID:AB_2535786
Donkey anti-mouse IgG (H+L) secondary antibody, Alexa Fluor 546 conjugate	Thermo Fisher	Cat#10036; RRID:AB_2534012
Goat anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody, Alexa Fluor 488 conjugate	Thermo Fisher	Cat#A11008; RRID:AB_143165
Mouse monoclonal anti-COMMD1	R&D systems	Cat#MAB7526
Rabbit polyclonal anti-Phospho-EGFR (Tyr <sup>1086</sup> )	Invitrogen	Cat#44-790-G; RRID:AB_2533755
Goat polyclonal anti-Phospho-EGFR (Tyr <sup>1173</sup> )	Santa-Cruz	Cat#sc-12351; RRID:AB_653167
Rabbit polyclonal anti-EGFR	Cell Signaling	Cat#2232S; RRID: AB_331707

Mouse monoclonal anti-EGFR (Clone H11)	Thermo Fisher	Cat#MA5-13070; RRID:AB_10977527
Goat polyclonal anti-AKT1 (C-20)	Santa-Cruz	Cat#sc-1618; RRID: AB_630849
Rabbit polyclonal anti-Phosphor-AKT (ser473)	Cell Signaling	Cat#9271S; RRID:AB_329825
Rabbit monoclonal anti- $\beta$ -tubulin	Cell Signaling	Cat#2128; RRID:AB_823664
Goat polyclonal anti- $\beta$ -tubulin	Abcam	Cat#ab21057; RRID:AB_727043
Mouse monoclonal anti-EEA1 (1G11)	Abcam	Cat#ab70521; RRID:AB_1603734
Rabbit monoclonal anti-Insulin receptor $\beta$ (4B8)	Cell Signaling	Cat#3025 RRID:AB_2280448
Rabbit anti-Neu (C-18)	Santa Cruz	Cat#sc-284 RRID :AB_632013
Mouse anti-E-cadherin	BD Transduction Labs	Cat#610181; RRID:AB_397580
Goat anti-p20-ARC (T-15) (Arp2/3)	Santa Cruz	Cat#sc-66248; RRID:AB_2059957
Rabbit anti-NUP98 (C39A3)	Cell Signaling	Cat#2598P; RRID:AB_2267700
Alexa Fluor 594 Phalloidin	Thermo Fisher Scientific	Cat#A12381 RRID:AB_2315633
Alexa Fluor 488 Phalloidin	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-12379 RRID:AB_2315147
<b>Bacterial and Virus Strains</b>		
N/A		
<b>Biological Samples</b>		
N/A		
<b>Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins</b>		
ProLong Gold antifade reagent with Dapi	Thermo Fisher Scientific	Cat#P36935
ProLong Gold antifade Mountant	Thermo Fisher Scientific	Cat#P36934
Transferrin from Human Serum, Alexa Fluor 488 Conjugate	Thermo Fisher Scientific	Cat#T13342
Epidermal Growth Factor, Biotinylated, complexed to Alexa Fluor 555 Streptavidin (Alexa Fluo 555 EGF complex)	Thermo Fisher Scientific	Cat#E35350
Cytochalasin D from Zygosporium mansonii	Sigma-Aldrich	C8273-1MG

Epidermal Growth Factor human, recombinant expressed in <i>E. coli</i>	Sigma-Aldrich	Cat#E9644
Cycloheximide	Sigma-Aldrich	Cat#01810-1G
Nocodazole	Sigma-Aldrich	Cat#M1404-10MG
pGEX-3X	GE-Healthcare	Cat#28-9546-54
pEGFP-C1	Clontech	Cat#6084-1
mCherry-WASH1-N-18	Addgene	Cat#55067
mCherry-kinesin11-N-18	Addgene	Cat#55163
mCherry-Actin	Dr Morag Park	N/A
mCherry-tubulin	Dr Morag Park	N/A
dsRed-Rab7	Addgene	Cat#12661
GFP-Rab5	Dr Nicole Leclerc	N/A
GFP-Rab11	Dr Nicole Leclerc	N/A
mCherry-Rab5	Dr Morag Park	N/A
GFP-trap_MA	Chromotek	Cat#gtma-20
Collagen (from rat tail tendon)	Sigma-Aldrich	Cat#11179179001
<b>Critical Commercial Assays</b>		
Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells	Thermo Fisher Scientific	Cat#78840
Rapid GST inclusion body solubilization and renaturation kit	Cell Biolabs	Cat#AKR-110
Amaxa cell line nucleofector kit V	Lonza	Cat#VCA-1003
Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent - Delivery of siRNA	Thermo Fisher Scientific	Cat#13778075
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific	Cat#11668019
RhoA G-LISA Activation assay kit	Cytoskeleton	Cat#BK124
PrestoBlue Cell Viability reagent	Invitrogen	Cat#A13261
DeadEnd Fluorometric TUNEL System	Promega	Cat#G3250
Omniscript RT Kit	Qiagen	Cat#205111
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	Thermo Fisher Scientific	Cat#A25742
<b>Deposited Data</b>		
N/A		
<b>Experimental Models: Cell Lines</b>		
Human embryonic kidney HEK-293	ATCC	Cat#CRL-1573; RRID:CVCL_0045
Human kidney, cortex/proximal tubule HK-2	ATCC	Cat#CRL-2190; RRID:CVCL_0302
<b>Experimental Models: Organisms/Strains</b>		

N/A		
Oligonucleotides		
Silencer Select Pre-designed (inventoried) human siRNA COMMD5 (human siCOMMD5#1) F: 5'- GGAGCACGUUCAGAAAGUUTT-3' R: 5'-AACUUUCUGAACGUGCUCCTG-3'	Thermo Fisher Scientific	Cat#s26375
Silencer Select Pre-designed (inventoried) human siRNA COMMD5 (human siCOMMD5#2) 5'-GUAAAGCAGCUAAAACAUTT-3' 5'-AUGUUUUUAGCUGCUUUACTT-3'	Thermo Fisher Scientific	Cat#s26377
Silencer Select Pre-designed (inventoried) human siRNA COMMD1 (human siCOMMD1) 5'-AGUCUAUUGCGUCUGCAGATT-3' 5'-UCUGCAGACGCAAUAGACUTA-3'	Thermo Fisher Scientific	Cat#s225736
Silencer Select Negative Control No.1 siRNA (siCTRL)	Thermo Fisher Scientific	Cat#4390843
RT-qPCR primers for human COMMD5: F: 5'-TTCGGAGAGCTCTGGATACT-3' R: 5'-TGCTGCTGCTTCCTCTTT-3'	This study	N/A
RT-qPCR primers for human COMMD1: F-5'- GGCATTCTTGACTGCTCAAAC-3' R: 5'-CATGAGGCTCTCACGGATTT-3'	This study	N/A
RT-qPCR primers for GAPDH: F: 5'-CAAGAGCACAAAGAGGAAGAGAG-3' R :5'-CTACATGGCAACTGTGAGGAG-3'	This study	N/A
Cloning primers for pull-down assay and Co-IPs:		
For plasmid [1-224]: F: 5'-TTAGATCTGGATGTCTGCTTTGGGGGCTGCAG-3' R: 5'-TTGAATTCTCAGTCCTGCAGTTTGC-3'	This study	N/A
For plasmid [1-116]: F: 5'-TTAGATCTGGATGTCTGCTTTGGGGGCTGCAG-3' R: 5'-TTGAATTCCCAAGTTCCTGGAGCTCTT-3'	This study	N/A
For plasmid [1-172]: F: 5'-TTAGATCTGGATGTCTGCTTTGGGGGCTGCA-3' R: 5'-TTGAATTCCAGGGAGCGGGACTGAGCGCTG-3'	This study	N/A
For plasmid [52-172]: F: 5'-TTAGATCTTTGAACTTGTAGT-3' R: 5'-TTGAATTCCAGGGAGCGGGACTGAGCGCTG-3'	This study	N/A
For plasmid [64-116]: F: 5'-TTAGATCTCTGCAGAGAAGCTCT-3' R: 5'-TTGAATTCCCAAGTTCCTGGAGCTCTT-3'	This study	N/A
For plasmid [64-224]: F: 5'-TTAGATCTCTGCAGAGAAGCTCT-3' R: 5'-TTGAATTCTCAGTCCTGCAGTTTGC-3'	This study	N/A

For plasmid [64-172]: F: 5'-TTAGATCTCTGCAGAGAAGCTCT-3' R: 5'-TTGAATTCAGGGAGCGGGACTGAGCGCTG-3'	This study	N/A
For plasmid pEGFP-hCOMMD5: F: 5'-ATGTCTGCTGTGGGGGCTGCAACTCCATA-3' R: 5'-AGGGTGTGAGGTCCAACACT-3'	This study	N/A
For plasmid pGEX-3X-human COMMD5: F: 5'-TTGGATCCCCATGTCTGCTGTGGGGGCTGCAACT-3' R: 5'-TTGGGCCCTCAGTCCTGCAGTCTGCGCTC-3'	This study	N/A
For plasmid pGEX-3X-human COMMD1: F: 5'-TTGGATCCTTATGGCGGGCGGGCGAGCTTG-3' R: 5'-TTGAATTCGGTCAGTTAGGCTGGCTGATC-3'	This study	N/A
<b>Recombinant DNA</b>		
N/A		
<b>Software and Algorithms</b>		
FIJI/Image J	National Institutes of Health (NIH)	<a href="http://fiji.sc/">http://fiji.sc/</a>
Chemotaxis and Migration Tool V2.0	Ibidi	<a href="http://www.ibidi.com">www.ibidi.com</a>
Zen 2.3 (blue edition)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011	<a href="https://www.zeiss.com/microscopy/int/downloads/zen.html">https://www.zeiss.com/microscopy/int/downloads/zen.html</a>
Imaris Image Analysis Software	Bitplane	<a href="http://www.bitplane.com/">http://www.bitplane.com/</a>
Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF), Version 4.4	Leica Microsystems CMS GmbH	<a href="http://www.leica-microsystems.com">www.leica-microsystems.com</a>
Image Lab 6.0	Bio-Rad	<a href="https://app.box.com/s/z4grf20x1pd4u5df1n8">https://app.box.com/s/z4grf20x1pd4u5df1n8</a>
<b>Other</b>		
N/A		

## Supplemental experimental procedures

Information on cells, plasmids, siRNA sequences, antibodies, and additional procedures are described in the Star Method.

### Confocal microscopy

Confocal microscopy was performed using HK-2 cells as described in the Star Method using following antibodies: COMMD5 (1:50), COMMD1 (1:50),  $\beta$ -tubulin (1:50), Phalloidin (1:200), EEA1 (1:50) and Rab5 (1:50).

For Alexa<sup>488</sup>-transferrin experiments in **Figure S3**, HK-2 cells depleted of COMMD5 were seeded onto collagen coated glass coverslips and transfected with 25 nM siCTRL or siCOMMD5#1 as previously described. After 4 h of transfection, cells were replenished with complete medium for 48 h, and then incubated in 0.1 % BSA medium. After an overnight incubation, 10  $\mu$ g/ml Alexa<sup>488</sup>-transferrin was added to for 30 min and then processed for immunofluorescence staining with Rab5 specific antibody, and confocal microscopy as previously described.

For nocodazole treatment experiments in **Figure S4**, HK-2 cells were seeded onto collagen coated glass coverslips. Cells were treated with 10  $\mu$ g/ml of nocodazole for 30 min to disrupt microtubules, and then processed for immunofluorescence staining with COMMD5,  $\beta$ -tubulin or EEA1 specific antibodies, and confocal microscopy as previously described.

### Data analysis

**Cell area in Figure S2B:** confocal images were processed and analyzed using FIJI software. To identify single cells, nuclei were visualized using the DAPI staining. The cytoplasm was subsequently segmented based on the identified nuclei utilizing F-actin intensity. Cells touching the image border were filtered out. For each siRNA conditions, n=14 cells were measured to obtain cell area (in  $\mu\text{m}^2$ ).

**Cell nuclei counting in Figure S2D:** nuclei counting was automated using FIJI software. Image was converted in greyscale (8-bit) and a threshold was applied to highlight all nuclei structures. The size of particles to count was set using « Analyze Particles ».

### **Western blot**

Western blot analysis was performed using HK-2 cells as described in the Star Method using following antibodies: COMMD5 (1:2,000), COMMD1 (1:2,000), ErbB2/HER-2 (1:1,000), Insulin receptor  $\beta$  (1:1,000),  $\alpha$ -tubulin (1:10,000), EGFR (1:1,000), p-EGFR [Tyr1086] (1:1,000) and E-cadherin (1:1,000).

### **Co-immunoprecipitation**

Co-immunoprecipitation in **Figure S5A** was performed using HEK-293 cells as described in the Star Method using following antibodies: COMMD1 (1:1,000), GFP (1:90,000).

### **RT-qPCR**

In **Figure S1B**, total RNA was extracted from HK-2 cells with TRIzol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instruction. 1 $\mu\text{g}$  of total RNA was reverse transcribed using the Omniscript Reverse Transcriptase kit (Qiagen) to synthesize single-stranded cDNA with oligo-(dt)<sub>12-18</sub> primer (Invitrogen). cDNA was used to perform qPCR in



triplicate using PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) and Rotor Gene 3000 (Corbett Research) following the manufacturer's instruction. The  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method was used to analyze the relative changes in gene expression levels. Primers used in RT-qPCR are listed in the Key Resources Table.

### **Yeast two-hybrid**

**Table S1:** The human HCaRG/COMMD5 cDNA expressed as fusion to the GAL 4 DNA-binding domain (DNA-BD), served to transform AH109 yeast strain. The transformed strain was then mated with yeast strain Y187 that contained a normal human kidney cDNA library (Clontech) expressed as fusion to the GAL 4-activation domain (AD) in pACT2 vector using Matchmaker Two-Hybrid System's instructions (Clontech). The strengths of the interactions were evaluated by  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -GAL) assay. Briefly, absorbance ( $OD_{600}$ ) of mid-log phase of fresh grown yeast was read. Culture was centrifuged, pellet was lysed and incubated at 30 °C with O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galacto-pyranoside for 1 h. The reaction was then quenched with  $Na_2CO_3$  and optical density ( $OD_{420}$ ) was measured. Candidate clones were sub-transformed in DH5 $\alpha$ , purified and sequenced. Binding region of the smallest clone was determined by sequence blasted using NCBI database.

### **TUNEL assay**

In **Figure S2D**, HK-2 cells were seeded on collagen-coated glass and transfected as the same manner than described Star Method, in the 3 time-points wound assay. 3 days after transfection, TUNEL assay was done with DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega) as indicated by manufacturer's instruction. Briefly, cells were fixed with 4 % formaldehyde and

permeabilized with Triton X-100. After pre-incubation with equilibration buffer, cells were labelled with a nucleotide and rTdT enzyme mixture for 1 h at 37°C. Labelling was stopped with 20X SSC, then cells were washed, mounted with Prolong containing DAPI nuclear marker and cover with coverslip. Negative controls were treated as the same manner but did not contain rTdT enzyme, while positive controls were done with pre-incubation of fixed cell with 8 units/ml DNase I (Invitrogen) in DNase buffer (40 mM tris-HCl, pH 7.9, 10 mM NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>) at room temperature for 10 minutes. DNase was extensively washed with water were performed before labelling.

### **Cell viability assay**

In **Figure S2E**, PrestoBlue Cell Viability Reagent (Invitrogen) was used as the manufacturer's instruction. After 2 days post-transfection, HK-2 cells were counted and re-inoculated at 2,000 cells/well in a 96 well-plate. 24 and 48 h after, prestoBlue reagent was added to washed cells for an incubation of 2 h. Fluorescence was read at (540 nm/615 nm) in the plate reader 1420 multilabel counter (Victor3V, Perkin Elmer).

### **Proliferation Assay**

In **Figure S2F**, HK-2 cells were seeded in a 6-well plate and transfection of 50 nM siRNA (siCTRL and siCOMMD5) was carried out using Lipofectamine RNAiMax in Opti-MEM, according to manufacturer's instructions. After transfection, cells were replenished with complete medium. The plate was placed into the IncuCyte ZOOM apparatus (Essen BioScience) at 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> and images of the collective cell spreading were recorded every 2 h for a total duration of 164 h.

### **Legends of figures**

**Figure 1. COMMD5 is localized on early and recycling endosomes**

(A) Protein expression of COMMD5 in cytosol (C), membranes (Mb) and nucleus (N) in HK-2 and HEK-293 cells using a subcellular protein fractionation assay and western blot analysis. EGFR, NUP98 and  $\alpha$ -tubulin were used as membrane, nucleus and cytosol markers. Molecular mass markers (in kDa) are noted (n=3). (B) Confocal microscopy of immunostained endogenous COMMD5 in HK-2 and HEK-293 cells. (C-H) Immunofluorescence in HK-2 cells confirmed co-localization of endogenous COMMD5 (red) with the early endosome marker (EEA1) (green) (C), electroporated GFP-COMMD5 (green) and mCherry-Rab5 (red) (D), transiently transfected GFP-Rab11 (green) and endogenous COMMD5 (red) (E), Alexa488-transferrin (green) incubated for 30 min and endogenous COMMD5 (red) (F). Co-transfected GFP-COMMD5 (green) and dsRed-Rab7 (red) did not co-localized (G). Graph bars of Pearson's coefficient (H) of COMMD5 and endosomal pathway antibody-specific co-localizations (values are means, error bars indicate SEM, number of counted cells is indicated in the bars). DAPI stains nuclei blue. Scale bars represent 10  $\mu$ m.

**Figure 2. COMMD5 coordinates trafficking of EGFR-containing endosomes**

(A-C) Confocal microscopy of HK-2 cells showed co-localization of endogenous COMMD5 (red) with EGFR (green) (A), or phospho-EGFR [Tyr1173] (green) on EEA1-early endosomes (blue) (B) near the PM (B, box 1) and in the perinuclear region (B, box 2). Graph bars of Pearson's coefficient (C) of COMMD5 and EGFR or p-EGFR [Tyr1173] antibody-specific co-localizations (values are means, error bars indicate SEM, number of counted cells is indicated in the bars). DAPI stains nuclei blue. (D) HK-2 cells were electroporated with GFP-

COMMD5 (green) for 24 h, incubated in serum-free medium overnight and then stimulated with 25 ng/ml Alexa555-EGF (red). Cells were imaged every 3 sec during 2 min by time-lapse spinning disk confocal microscopy, and a single image extracted from the movie is shown. Right panels: superimposed curves of fluorescence intensity of EGF and COMMD5 along the dotted arrows 1 and 2. (E-G) HK-2 cells transfected with control or COMMD5 siRNA were incubated in serum-deprived medium with 10 ng/ml cycloheximide overnight and stimulated with 100 ng/ml recombinant human EGF for indicated periods, followed by whole-cell lysate extract for immunoblotting analysis of COMMD5, total EGFR and phospho-EGFR [Tyr1086] levels (E). Quantifications of relative expression of EGFR (F) and phospho-EGFR [Tyr1086]/EGFR ratio (G) (values are means, error bars indicate SEM, n=4, Student's t test, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 significant difference compared with siCTRL). Molecular mass markers (in kDa) are noted. (H-J) Immunoblot of Akt and phospho-Akt [Ser473] in HK-2 cells (H) treated as in (E). Quantifications of relative expression of Akt (I) and phospho-Akt [Ser473]/Akt ratio (J) (values are means, error bars indicate SEM, n=3, Student's t test, \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001 significant difference compared with siCTRL). Molecular mass markers (in kDa) are noted. (K) Confocal microscopy of control or COMMD5 siRNA-transfected HK-2 cells (siCOMMD5#1, siCOMMD5#2) incubated in serum-deprived medium overnight and pulsed with 25 ng/ml Alexa555-EGF (white) for 30 min. DAPI stains nuclei blue. Scale bars represent 10  $\mu$ m. See also Figure S1 and Movie S1.

***Figure 3. COMMD5 silencing induced a major re-organization of cytoskeleton***

(A) HK-2 cells were electroporated with siCTRL or siCOMMD5#1 and GFP-Rab5 (green), incubated 48 h later in serum-deprived medium overnight and then stimulated with 25 ng/ml Alexa555-EGF (red). Cells were imaged every 2 sec during 2 min by time-lapse spinning disk confocal microscopy, and a single image extracted from the movie is shown. (B-E) Immunofluorescence imaged by confocal microscopy of HK-2 cells transfected with siCTRL or siCOMMD5#1 and/or siCOMMD5#2 and/or siCOMMD1. Co-staining of COMMD5 (red), EEA1 (green) and phalloidin for F-actin (white), showed re-distribution of F-actin in COMMD5-depleted cells (B). F-actin (white) re-organization confirmed in cells transfected with two different COMMD5-siRNA (C) but not with siCOMMD1 (D). F-actin (red) and  $\beta$ -tubulin (green) were co-stained in (E). DAPI stains nuclei blue. (F-G) HK-2 cells were transfected with siRNA COMMD5 (siCOMMD5#1) or siRNA CTRL (siCTRL) for 48 h, incubated in serum-free medium overnight and then untreated or treated with 100 ng/ml EGF for 30 min, fixed and labelled with phalloidin (white) (F) and anti- $\beta$ -tubulin (white) (G). DAPI stains nuclei blue. Scale bars represent 10  $\mu$ m. See also Figure S2 and Movie S2.

***Figure 4. COMMD5 regulates cytoskeletal changes via interaction with actin proteins and facilitates endosome scission and transport***

(A) Co-immunoprecipitation of COMMD5 and actin confirmed their interaction in cells. HEK-293 cells were transfected with peGFP-C1-hCOMMD5 or its control expression vector and 2 mg of protein cell lysates were immunoprecipitated with nano GFP beads. Precipitated complexes were immunoblotted with actin and GFP antibodies. Input contained 40  $\mu$ g of total protein lysate. Molecular mass markers (in kDa) are indicated (n=3). (B and C) Pull-down assays

confirmed direct interaction of full-length rat GST-COMMD5 [1-224] with pure F-(polymerized) or G-(globular) actin (B), full-length rat GST-COMMD5 [1-224], full-length human GST-COMMD5 (224 aa) or full-length human GST-COMMD1 (190 aa) constructs interact also with G-actin (C). Molecular mass markers (in kDa) are noted (n=3). (D and E) Confocal microscopy in HK-2 cells confirmed localization of COMMD5 (red) on F-actin patch structures (arrowheads) stained by phalloidin (white) (D), and co-localization of endogenous COMMD5 (green) with F-actin labelled by phalloidin (red) on EEA1-positive endosomes (E). (F) Co-localization of COMMD5 with WASH1 or Arp2/3 complexes. Left panel: GFP-COMMD5 (green) and mCherry-WASH1 (red) were electroporated in HK-2 and imaged live every 5 sec during 3 min by spinning disk confocal microscopy. A single image extracted from the movie is shown. Right panel: endogenous COMMD5 (red) was co-stained with Arp2/3 specific antibody (green) and visualized by confocal microscopy. Graph: Pearson's coefficient of COMMD5 and WASH1 or Arp2/3 antibody-specific co-localizations (values are means, error bars indicate SEM, number of counted cells is indicated in the bars). (G) Rho GTPase activation assay in HK-2 cells transfected with siCTRL or siRNA against COMMD5 (siCOMMD5#1 and siCOMMD5#2) using the G-LISA RhoA absorbance-based activation assay (values are means, error bars indicate SEM, n=3, Student's t test, \*\*\*p < 0.001 significant difference compared with siCTRL). (H) In HK-2 cells untreated (left panels) or treated with 20  $\mu$ M cytochalasin D (right panels) for 30 min, COMMD5 (green) and EEA1 (blue) co-localized on actin filament ends (red). Images are observed by confocal microscopy.

(I-K) Cells were electroporated with siRNAs and mCherry-Rab5 (white) and were imaged every 0.9 sec during 2 min by time-lapse spinning disk confocal microscopy, and a single image extracted from the movie is shown (I). Average size ( $\mu\text{m}$ ) (J) and velocity ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) (K) of mCherry-Rab5-positive endosomes in siRNA-transfected HK-2 cells calculated using Imaris software from the Movie S4 (For analysis > 60 Rab5-positive endosomes were measured in n=3 independent experiments for each group, values are means, error bars indicate SEM, Student's t test, \*\*\*p < 0.001, significant difference compared with siCTRL). Scale bars represent 10  $\mu\text{m}$ . See also Figure S3, Table S1, Movie S3, S4 and S5.

**Figure 5. COMMD5 drives long-range endosome movement by its direct binding to tubulin**

(A) Time lapse recording using a spinning disk confocal microscopy of GFP-COMMD5 (green) and mCherry-Rab5 (red) in HK-2 cells. Images were acquired every 3.7 sec during 2 min. Left panel: projection images presenting data collected during the full-time course, processed using FIJI. Right panels: time-lapse snapshot from the two annotated boxed areas (a and b) representing the movement and the tethering of mCherry-Rab5-positive endosomes by GFP-COMMD5. (B) Interaction between peGFP-C1-hCOMMD5 and  $\alpha$ -tubulin from 2 mg of protein HEK293 cell lysates was confirmed by co-immunoprecipitation. Precipitated complexes were immunoblotted with  $\alpha$ -tubulin and GFP antibodies. Input contained 40  $\mu\text{g}$  of total protein lysate. Molecular mass markers (in kDa) are noted (n=3). (C) GST-COMMD5 [1-116], [1-172], [1-224], [52-172], [64-116], [64-224] and [64-172] were constructed as described in Experimental Procedures. (D-E) Representative western blots of GST pull-down assays using the GST-COMMD5 constructs from (C), show interaction with  $\alpha$ -tubulin (D) or Rab5 (E) (left

panels). Right panels: quantifications of  $\alpha$ -tubulin (D) revealed an interaction with the C-terminal of COMMD5 and of Rab5 with the N-terminal of COMMD5. (n=4 independent experiments). Bands were relative to their GST induction (values are means, error bars indicate SEM, Student's t test, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, significant difference compared with full length GST-COMMD5 [1-224], ns: non-significant). Molecular mass markers (in kDa) are indicated. (F, G and H) Direct interactions between C-terminal end of full length [1-224] and C-terminal [64-172] fragments of GST-COMMD5 with pure polymerized tubulin (F) and pure G-actin (H) by GST pull-down assays. The N-terminal [1-116] of COMMD5 didn't bind tubulin and actin. Direct interactions of pure polymerized tubulin with full length -human COMMD5 and -human COMMD1 were also showed. (G). Molecular mass markers (in kDa) are indicated (n=3).

Scale bars represent 10  $\mu$ m. See also Figure S4, S5, Movie S6 and S7.

***Figure 6. Disorganization of actin and tubulin cytoskeleton by COMMD5 silencing abolishes directional cell migration***

(A-C) Wound closure of siRNA control (siCTRL) and COMMD5-depleted cells (siCOMMD5#1 and siCOMMD5#2) at 3 time-points using Ibidi culture double inserts (A) and scratch assay recorded by live cell imaging (B, C and Movie S8). Graph (A): Wound closure was quantified as % of the area measurements ( $\mu$ m<sup>2</sup>) relative to siCTRL calculated using FIJI software. Values are means, error bars indicate SD, n=3. Student's t test, \*\*\*p < 0.001 compared with siCTRL. Migration tracks of 50 cells for each group analyzed using Image J and chemotaxis are shown as scatterplot (B) and as bar graphs (C) representing accumulated and euclidean distances and velocity (values are means, error bars indicate SEM, Student's t test,



\*\*\*p < 0.001). (D) Schematic representation of microtubule and actin stress fibers distribution in control and COMMD5-depleted cells. Scale bars represent 10  $\mu$ m. See also Movie S8.

***Figure 7. Schematic representation of the role of COMMD5 in endosomal trafficking***

During endocytosis, COMMD5 is recruited at the PM to Rab5-nascent endosomes containing such receptors as EGFR. Association of COMMD5 to densely polymerized actin might help to drive short-range movements of endocytic vesicles away from the PM and helps in endosomal fission by interacting with WASH and Arp2/3 complexes. COMMD5 potentially switches from actin- to microtubule-based movements via direct interactions of its C-terminal region. Binding of COMMD5 with Rab5-endosome through its N-terminal region and with microtubules via its C-terminal region may promote static endosome-microtubule interactions that ultimately lead to microtubule motor engagement. The association of COMMD5 with motor proteins might then facilitate fast and long-range movements of vesicles on microtubule tracks in both directions between the cortical and the perinuclear regions.

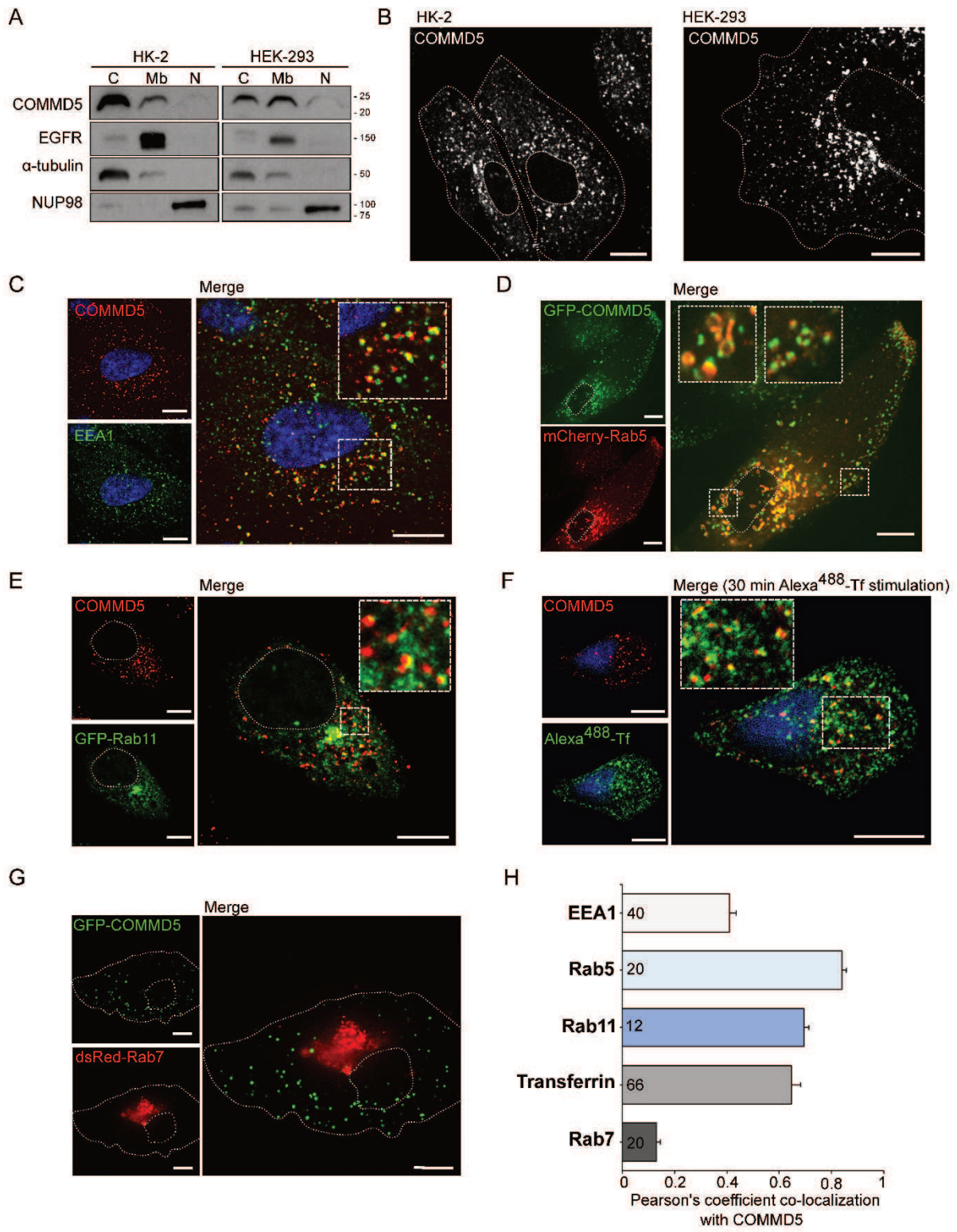


Figure 1 : COMMD5 is localized on early and recycling endosomes.

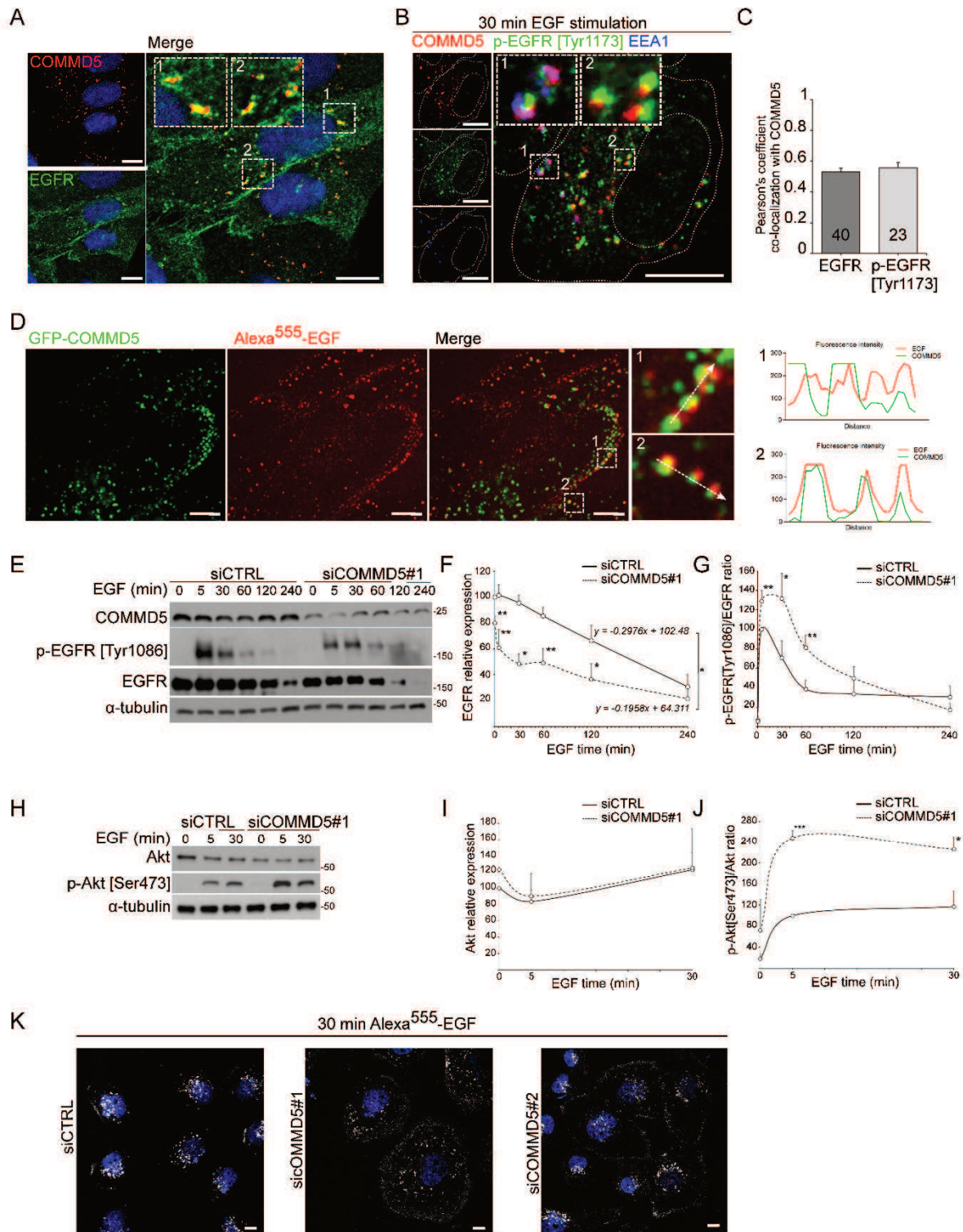


Figure 2 : COMMD5 coordinates trafficking of EGFR-containing endosomes.

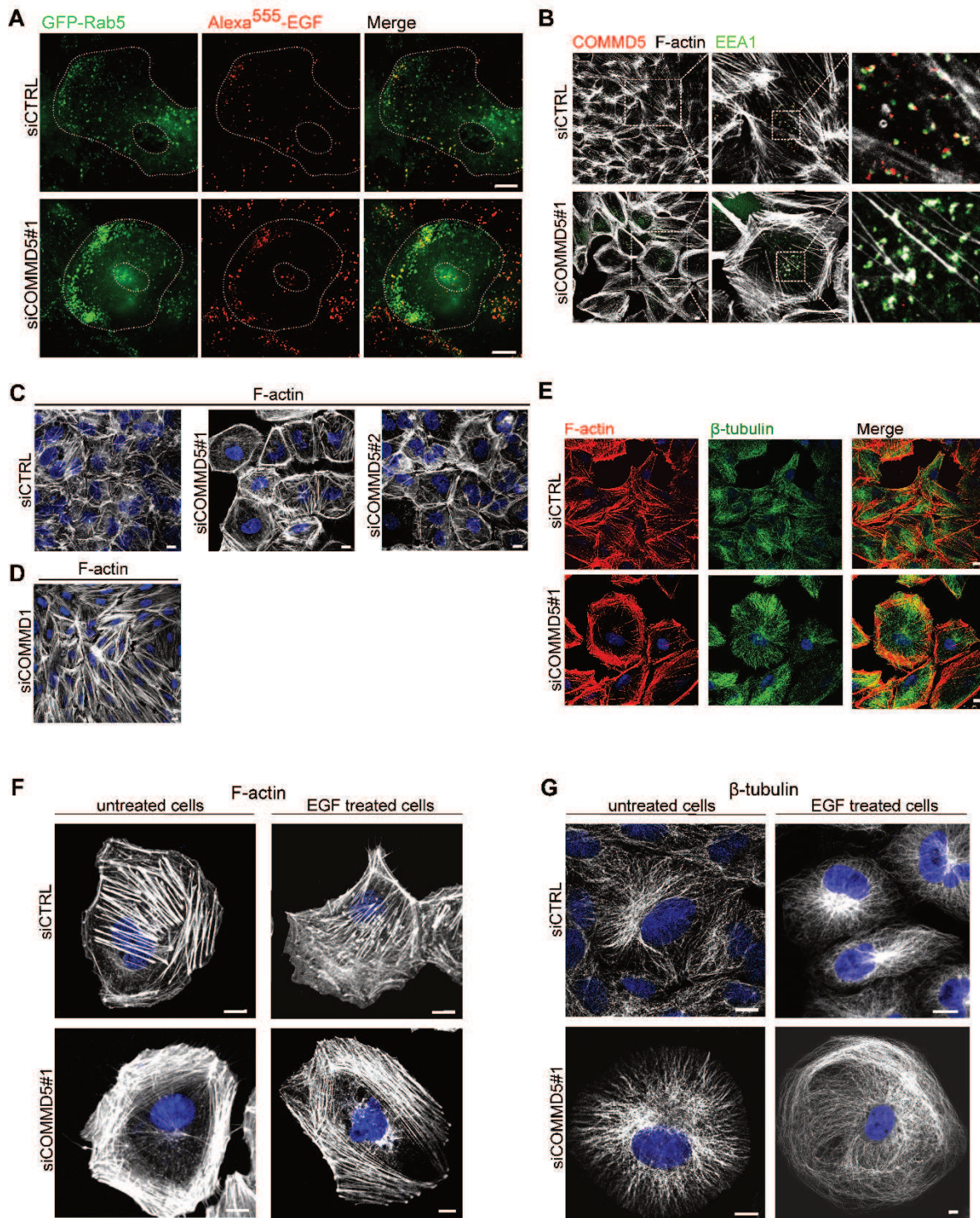
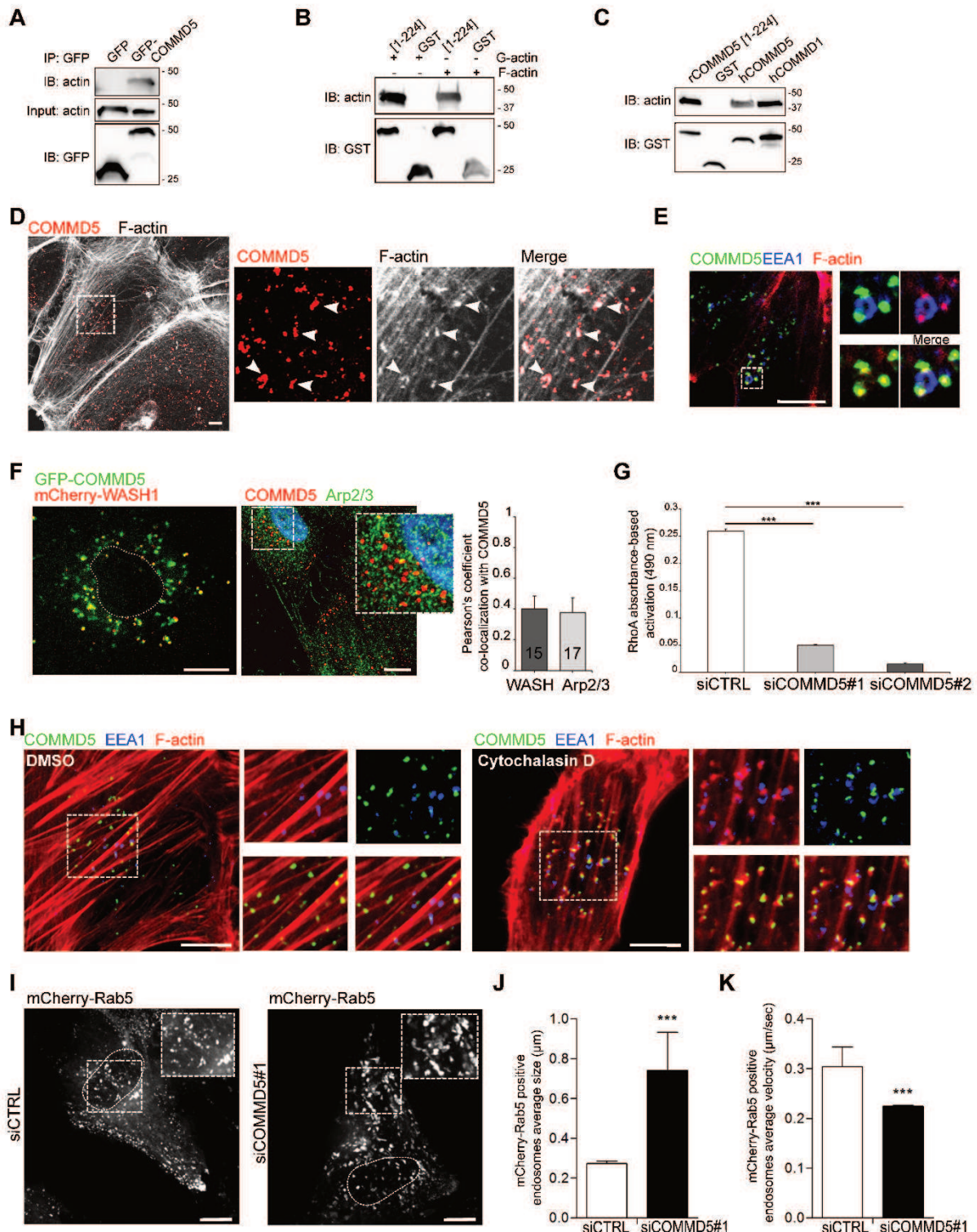


Figure 3 : COMMD5 silencing induced a major re-organization of cytoskeleton.



**Figure 4 : COMMD5 regulates cytoskeletal changes via interaction with actin proteins and facilitates endosome scission and transport.**

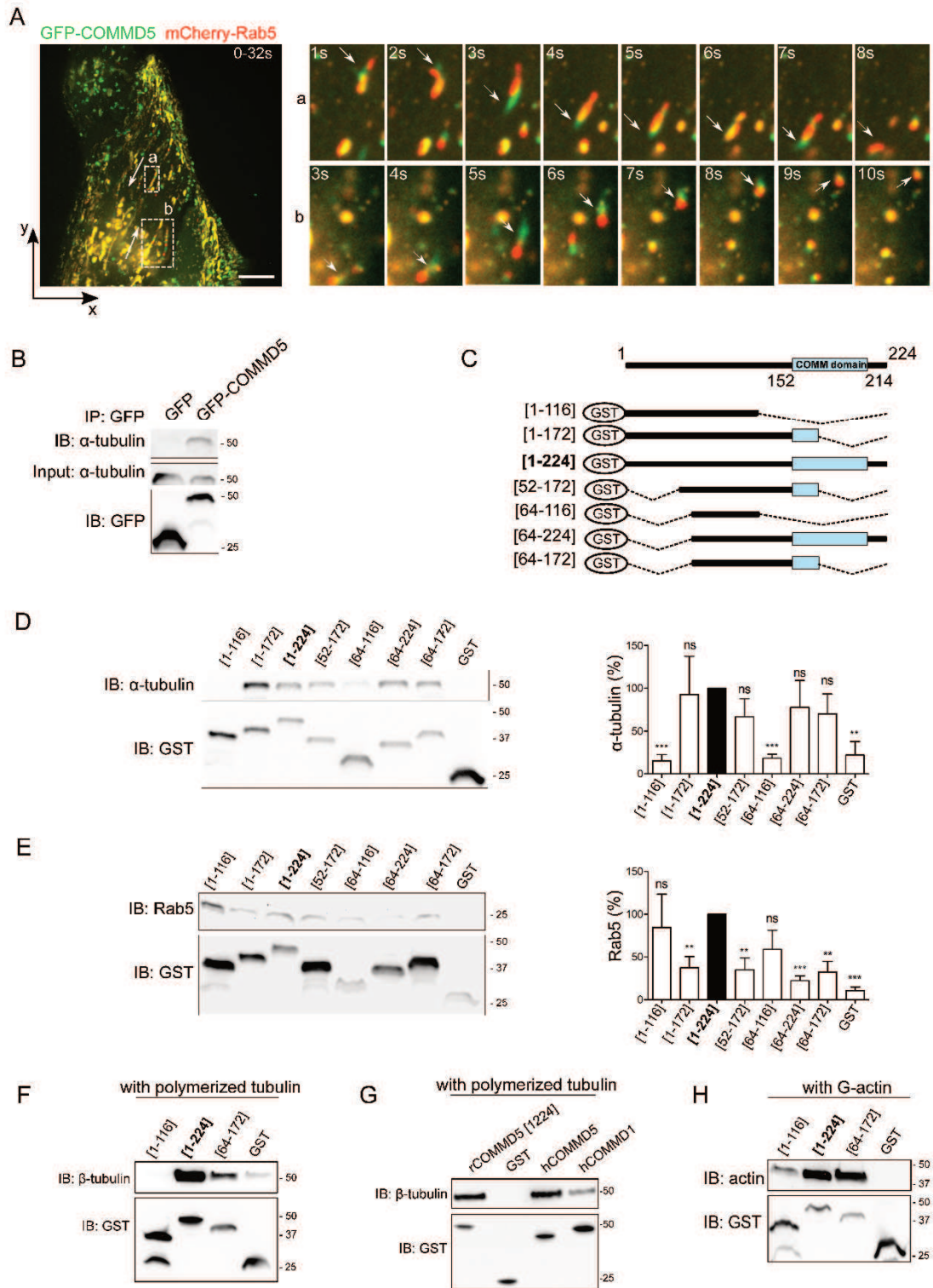
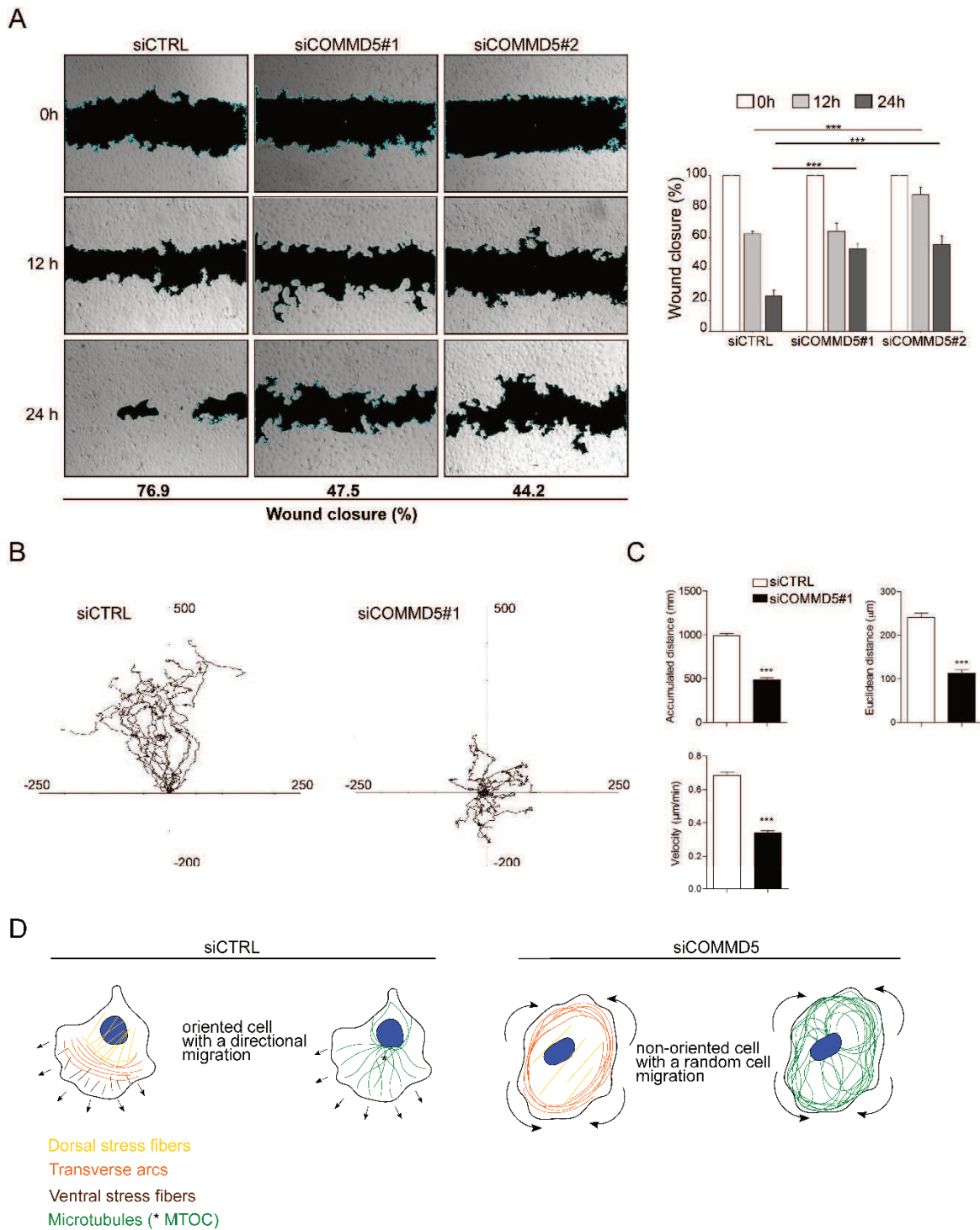


Figure 5 : COMMD5 drives long-range endosome movement by its direct binding to tubulin.



**Figure 6 : Disorganization of actin and tubulin cytoskeleton by COMMD5 silencing abolishes directional cell migration.**

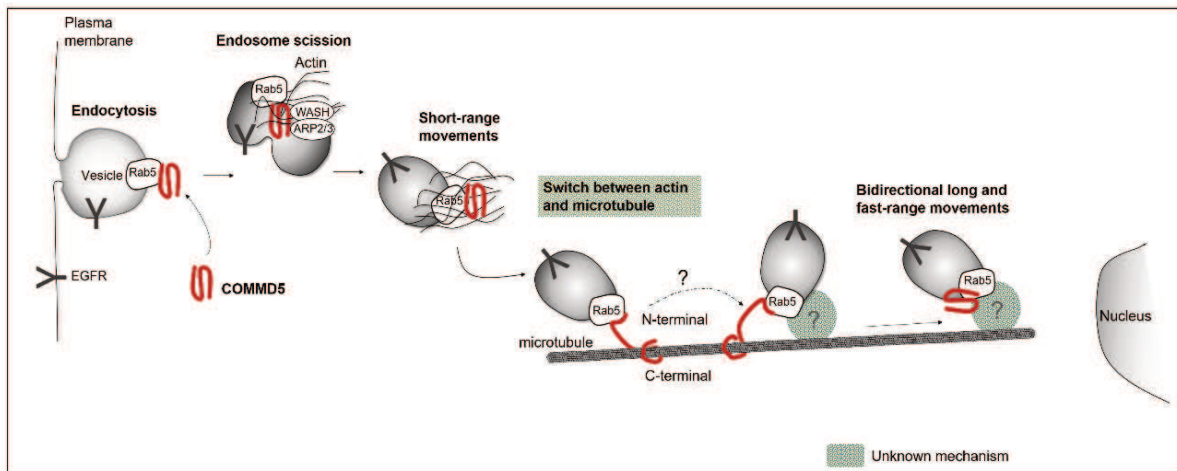


Figure 7 : Schematic representation of the role of COMMD5 in endosomal trafficking.



## Supplemental movie titles and legends

### ***Movie S1. COMMD5 dynamically associated to internalized-EGF ligand. Related to Figure 2.***

HK-2 cells were electroporated with GFP-COMMD5 for 24 h, incubated in serum-deprived medium overnight and then stimulated with 25 ng/ml Alexa555-EGF. Cells were imaged every 3 sec during 2 min by time-lapse spinning disk confocal microscopy.

### ***Movie S2. COMMD5 silencing impairs movement and morphology of Rab5-positive endosomes containing EGF. Related to Figure 3.***

COMMD5 depletion led to enlarged static Rab5-positive endosomes accumulated underneath the PM where Alexa555-EGF puncta were trapped. HK-2 cells were electroporated with siCTRL or siCOMMD5 and GFP-Rab5. 48 hours later, cells were incubated in serum-deprived medium overnight and then stimulated with 25 ng/ml Alexa555-EGF. Cells were imaged every 2 sec during 2 min by time-lapse spinning disk confocal microscopy.

### ***Movie S3. COMMD5 interacts with G-actin and localizes on actin filaments. Related to Figure 4.***

HK-2 cells were co-electroporated with GFP-COMMD5 and mCherry actin for 48 hours and then recorded by time lapse recording using a spinning disk confocal microscopy. Images were acquired every 6 sec during 2 min.

### ***Movie S4. Co localization of GFP COMMD5 and mCherry WASH1. Related to Figure 4.***

HK-2 cells were electroportated with GFP COMMD5 and mCherry WASH1 for 48 hrs and then recorded and then recorded by time lapse recording using a spinning disk confocal microscopy. Images were acquired every 5 sec during 3 min.

***Movie S5. COMMD5 silencing impairs Rab5-positive endosomes motility and scission.***

***Related to Figure 4.***

Cells depleted of COMMD5 presented large Rab5-endosomes with many tubulo-vesicular structures. HK-2 cells were co-electroporated with siRNAs (siCTRL and siCOMMD5) and with mCherry Rab5 for 72 hours and then recorded by time lapse recording using a spinning disk confocal microscopy. Images were acquired every 0.9 sec during 2 min.

***Movie S6. Co localization of GFP COMMD5 and mCherry Rab5. Related to Figure 5.***

COMMD5 associated to Rab5 early endosome at the inner surface of PM and moved together throughout the cytoplasm. HK-2 cells were electroportated with GFP COMMD5 and mCherry Rab5 for 48 hours and then recorded by time lapse recording using a spinning disk confocal microscopy. Images were acquired every 3.7 sec during 2 min.

***Movie S7. Movement of GFP COMMD5 on microtubule tracks. Related to Figure 5.***

HK-2 cells were electroportated with GFP COMMD5 and mCherry tubulin for 48 hrs and then recorded by time lapse recording using a spinning disk confocal microscopy. Images were acquired every 6.8 sec during 2 min.

***Movie S8. COMMD5 depletion impairs wound closure and abolishes directional cell migration. Related to Figure 6.***

HK-2 cells were transfected with siRNA control (siCTRL) or siRNA COMMD5 (siCOMMD5) for 72 hours and a straight scratch was made using a tip. Wound closure was recorded at 5-min intervals for 24 hrs by live cell imaging.

**Table I : Summary of yeast two-hybrid screening. Related to Figure 4 (S1).**

Functional group	Gene symbol	Number of clones	Gene accession number	Sequenced fragment position (aa from-to)/ total	Strength of interaction (arb. u.)
Intracellular transport	<b>NKCC2/SLC12A1</b>	3	nm_000338.2	(1-1099)/1099	2.78
	<b>ATP1B1</b>	2	nm_001677.3	(214-303)/303	2.05
	<b>AGT1/ SLC7A13</b>	2	nm_138817.2	(33-58)/470	n.d.
Cytoskeleton	<b>CCT5</b>	2	BC035499.2	(422-533)/541	2.34
	<b>ACTB</b>	1	nm_001101.3	(251-375)/375	0.88
Enzyme	<b>PREPL</b>	1	nm_001042386.2	(446-661)/661	1.46
	<b>BIRC6</b>	1	nm_016252.3	(4133-4169)/4857	0.84
	<b>ECHS1</b>	2	nm_004092.3	(1-19)/290	0.66
Transcription	<b>NFY-C</b>	1	nm_014223.4	(1-240)/336	2.74
	<b>DAZAP2</b>	1	nm_014764.3	(1-168)/168	0.82
	<b>COMMD8</b>	3	nm_017845.3	(5-183)/183	n.d.
Metabolism	<b>POMP</b>	1	nm_015932.5	(1-142)/142	2.53
	<b>PSAP</b>	1	nm_002778.2	(439-462)/524	0.81

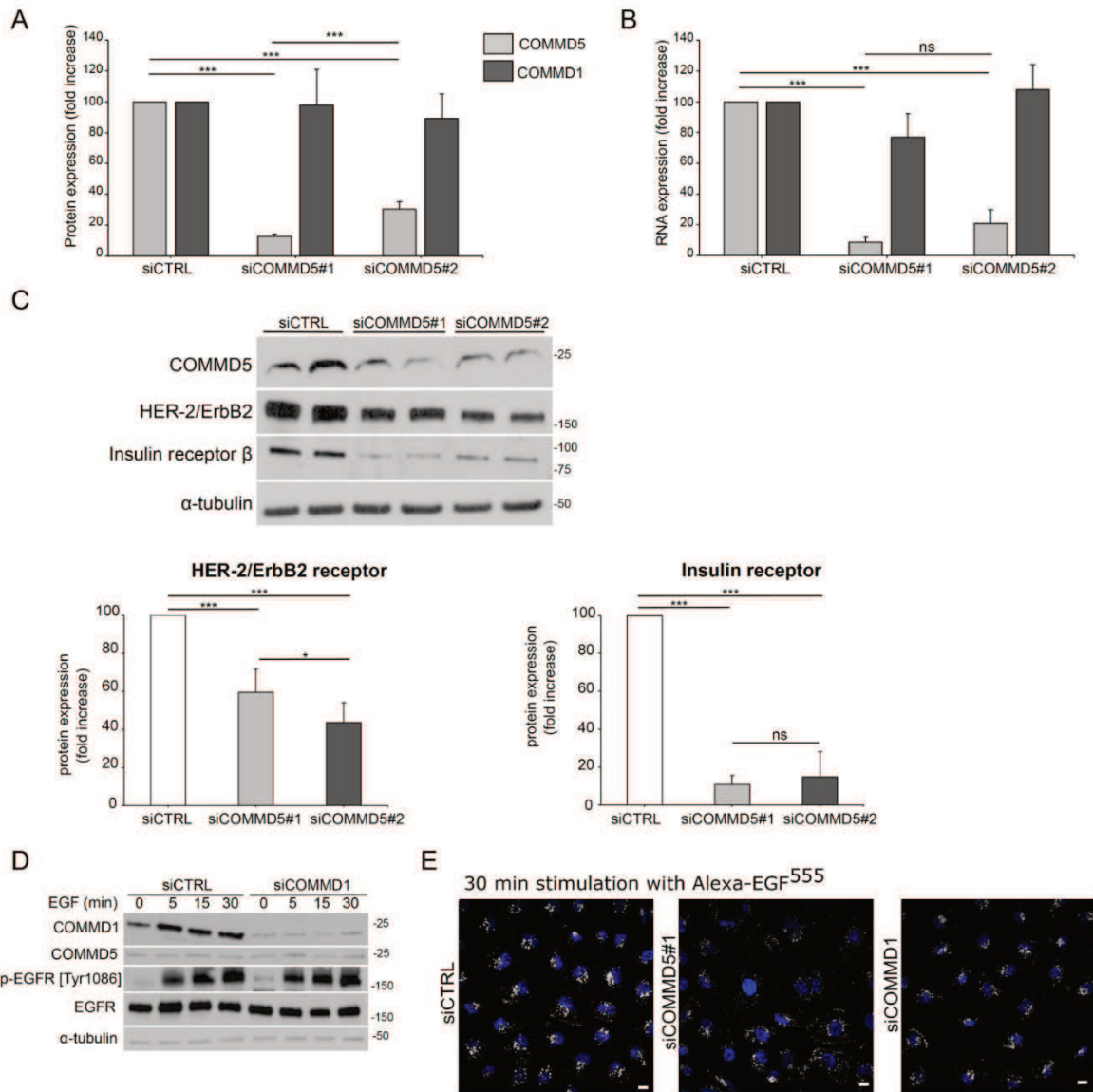
Sequenced fragment position: amino acids position of the shortest clone relative to its total length (translated from sequenced DNA). Strength of interaction: determined by  $\beta$ -GAL activity. Arbitrary unit (arb.un.) =  $1000 \times [\text{OD}_{420}/\text{time of incubation (min)} \times \text{volume of culture (mL)} \times \text{OD}_{600}]$ . n.d.: not determined.

**Table II : RT-qPCR primers used in this study. Related to Figure 2 (S2).**

Name	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')
human COMMD5	TTCGGAGAGCTCTGGATACT	TGCTGCTGCTTCCTCTTT
human COMMD1	GGCATTCTTGACTGCTCAAAC	CATGAGGCTCTCACGGATTT
GAPDH	CAAGAGCACAAAGAGGAAGAGAG	CTACATGGCAACTGTGAGGAG

**Table III : Cloning primers for pull-down assay and Co-IPs. Related to Figure 4 and 5 (S3).**

Plasmids	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')
[1-224]	TTAGATCTGGATGTCTGCTTTGGGGGCTGCA G	TTGAATTCTCAGTCCTGCAGTTTGCG
[1-116]	TTAGATCTGGATGTCTGCTTTGGGGGCTGCA G	TTGAATCCCAAGTTCCTGGAGCTCTT
[1-172]	TTAGATCTGGATGTCTGCTTTGGGGGCTGCA	TTGAATCCAGGGAGCGGGACTGAGCGC TG
[52-172]	TTAGATCTTTGAACTTGTAGT	TTGAATCCAGGGAGCGGGACTGAGCGC TG
[64-116]	TTAGATCTCTGCAGAGAAGCTCT	TTGAATCCCAAGTTCCTGGAGCTCTT
[64-224]	TTAGATCTCTGCAGAGAAGCTCT	TTGAATTCTCAGTCCTGCAGTTTGCG
[64-172]	TTAGATCTCTGCAGAGAAGCTCT	TTGAATCCAGGGAGCGGGACTGAGCGC TG
pEGFP- hCOMMD5	ATGTCTGCTGTGGGGGCTGCAACTCCATA	AGGGTGTGAGGTCCAACACT
pGEX-3X- human COMMD5	TTGGATCCCATGTCTGCTGTGGGGGCTGCA ACT	TTGGGCCCTCAGTCCTGCAGTCTGCGCT C
pGEX-3X- human COMMD1	TTGGATCCTTATGGCGGCGGGCGAGCTTG	TTGAATTCGGTCAGTTAGGCTGGCTGAT C



**Figure S1. Effect of COMMD5 or COMMD1 depletion on receptor protein expression. Related to Figure 2.**

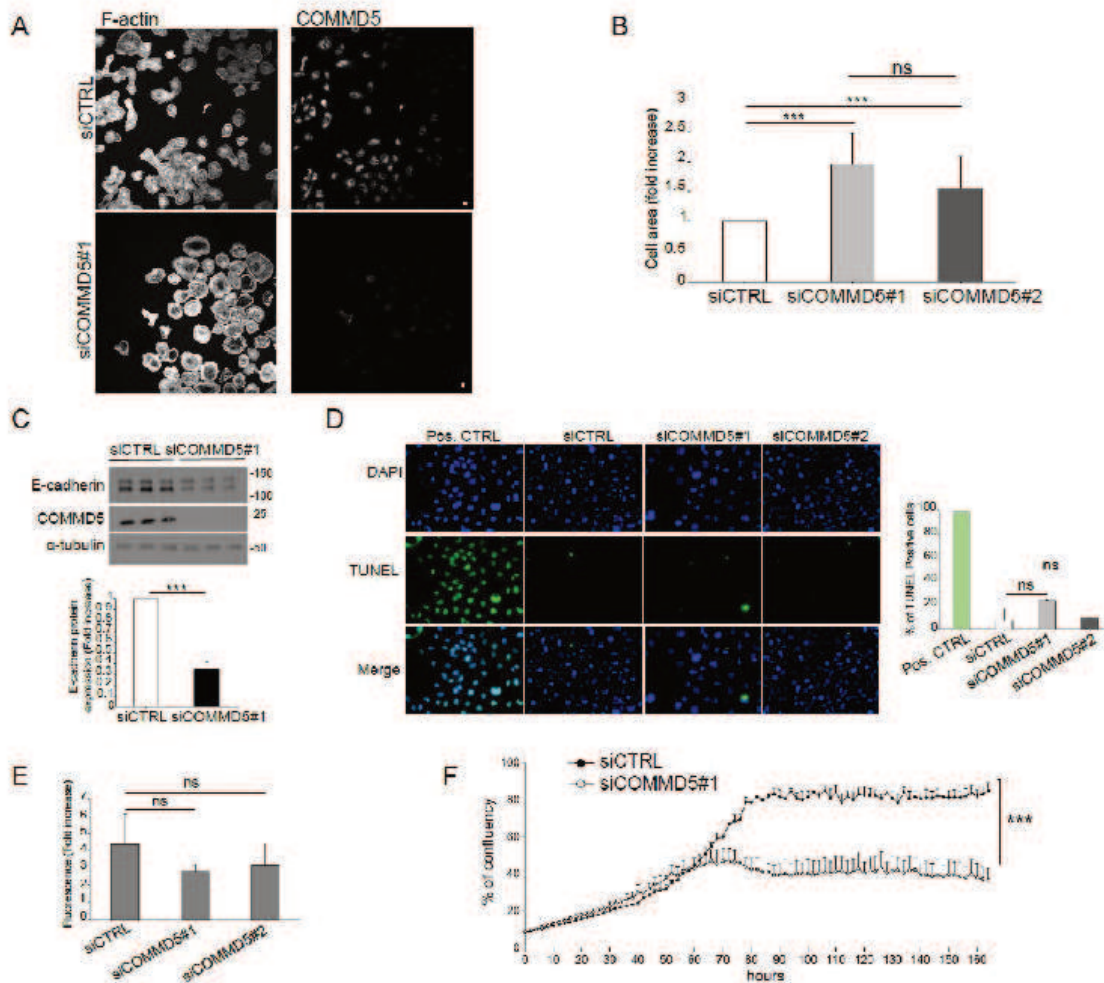
(A-B) HK-2 cells were transfected with two different siRNA against COMMD5 (siCOMMD5#1 or siCOMMD5#2) and with a scramble siRNA as negative control (siCTRL). COMMD5 siRNA specifically reduced COMMD5 protein expression relative to  $\alpha$ -tubulin (A) and mRNA levels relative to GAPDH (B), by western blot analysis (n=3) and real-time PCR (n=3) respectively (values are means, error bars indicate SEM, Student's t test, ns: non-significant, \*\*\*p < 0.001, significant difference compared with siCTRL).

(C) COMMD5, HER-2/ErbB2 and Insulin receptor  $\beta$  protein expressions were analyzed by western blots in HK-2 cells transfected with the siRNA control (siCTRL) or with two COMMD5 siRNA (siCOMMD5#1 and siCOMMD5#2). Lower panels: bar graphs of quantification of protein expression relative to  $\alpha$ -tubulin (values are means, error bars indicate SEM, n=3, Student's t test, ns: non-significant, \*\*\*p < 0.001, significant difference compared with siCTRL). Molecular mass markers (in kDa) are noted.

(D) HK-2 cells transfected with control or COMMD1 siRNA were incubated in serum-deprived medium with 10 ng/ml cycloheximide overnight and stimulated with 100 ng/ml recombinant human EGF for indicated periods, followed by whole-cell lysate extract for immunoblotting analysis of COMMD1, COMMD5, total EGFR and phospho-EGFR [Tyr1086] levels. Molecular mass markers (in kDa) are noted.

(E) Control, COMMD5 or COMMD1 siRNA-transfected HK-2 cells (siCTRL, siCOMMD5#1, siCOMMD1) were incubated in serum-deprived medium overnight, pulsed with 25 ng/ml Alexa<sup>555</sup>-EGF (white) for 30 min, washed, fixed and imaged by confocal microscopy. DAPI stains nuclei blue.

Scale bar represents 10  $\mu$ m.



**Figure S2. Impact of COMMD5 silencing on cell morphology, viability and proliferation. Related to Figure 3.**

(A) HK-2 cell-depleted of COMMD5 (siCOMMD5#1) or not (siCTRL) were fixed and stained for F-actin and COMMD5 and imaged by confocal microscopy.

(B) Measure of cell area in cells transfected with siCTRL or two siRNA against COMMD5 (siCOMMD5#1 and siCOMMD5#2) (values are means, error bars indicate SD, n=3 and 14 cells were measured in each siRNA conditions, Student's *t* test, ns: non-significant, \*\*\**p* < 0.001, significant difference compared with siCTRL).

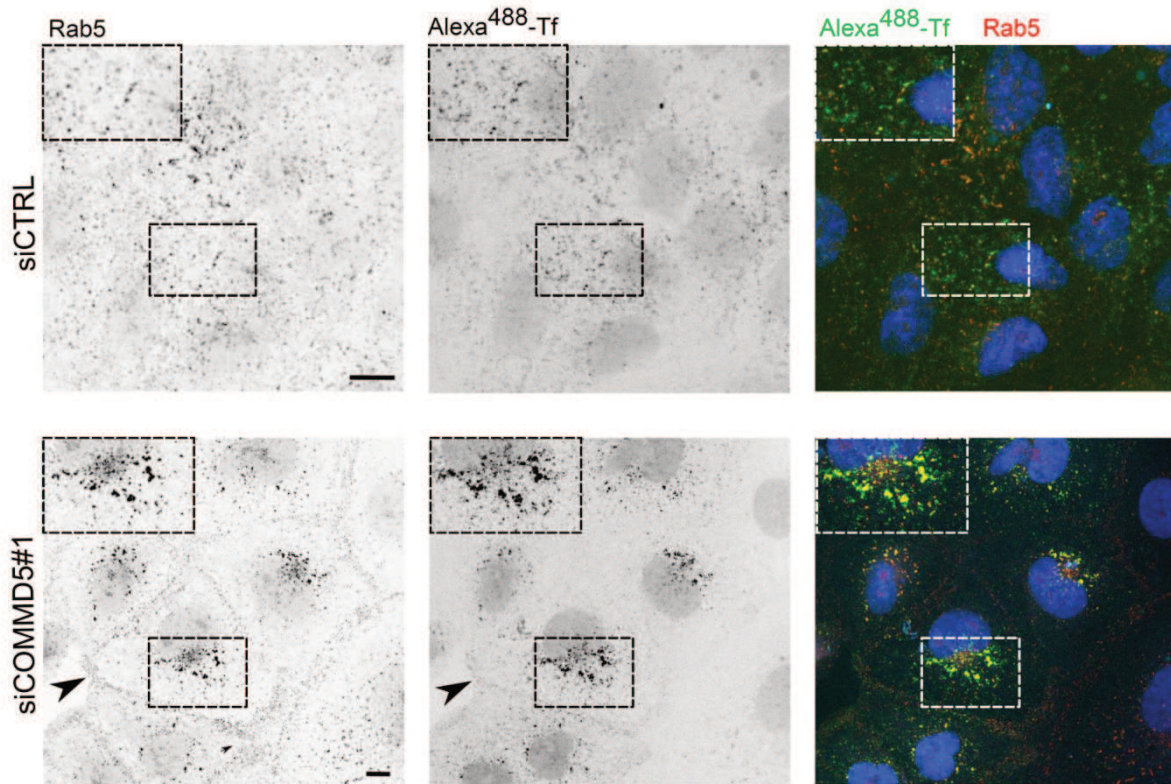
(C) E-cadherin is downregulated in cells depleted of COMMD5 (siCOMMD5#1) compared to control cells (siCTRL). Lower panel: quantification of E-cadherin protein expression from western blot analysis (values are means, error bars indicate SEM, n=3, Student's *t* test, \*\*\**p* < 0.001, significant difference compared with siCTRL). Molecular mass markers (in kDa) are noted.

(D) TUNEL assay of HK-2 cells transfected with siCTRL, siCOMMD5#1 or siCOMMD5#2. Cells were transfected with siRNA as noted for 72 h and labelled with DAPI (blue) and fluorescein-12-dUTP at 3'-OH DNA ends using Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) (green). DNA fragmentation is evaluated by counting TUNEL positive cells incorporating fluorescein-12-dUTP (green) in their nucleus relative to their DAPI total nucleus staining (blue). Bar graph (right panel) shows TUNEL positive cells of siRNA transfected cells compared to DNase treated apoptotic-positive cells (Pos. CTRL) using FIJI software (> 170 nuclei were counted per condition). Data are means ± SD, n=3, ns: non-significant, compared with control. TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling.

(E) PrestoBlue cell viability assay of HK-2 transfected with siCTRL, siCOMMD5#1 and siCOMMD5#2. Data are means ± SD, n=3, ns: non-significant, compared with control.

(F) Graph showing proliferation of siRNAs-transfected HK-2 cells plotted over time. HK-2 cells were transfected with siCTRL and siCOMMD5 and the plate was placed into the IncuCyte ZOOM<sup>PM</sup> apparatus at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 164 hours. Cell proliferation was monitored over time by analyzing images of the occupied area (% of confluency) (values are means, error bars indicate SEM, n=3, Student's *t* test, \*\*\**p* < 0.001, significant difference compared with siCTRL).

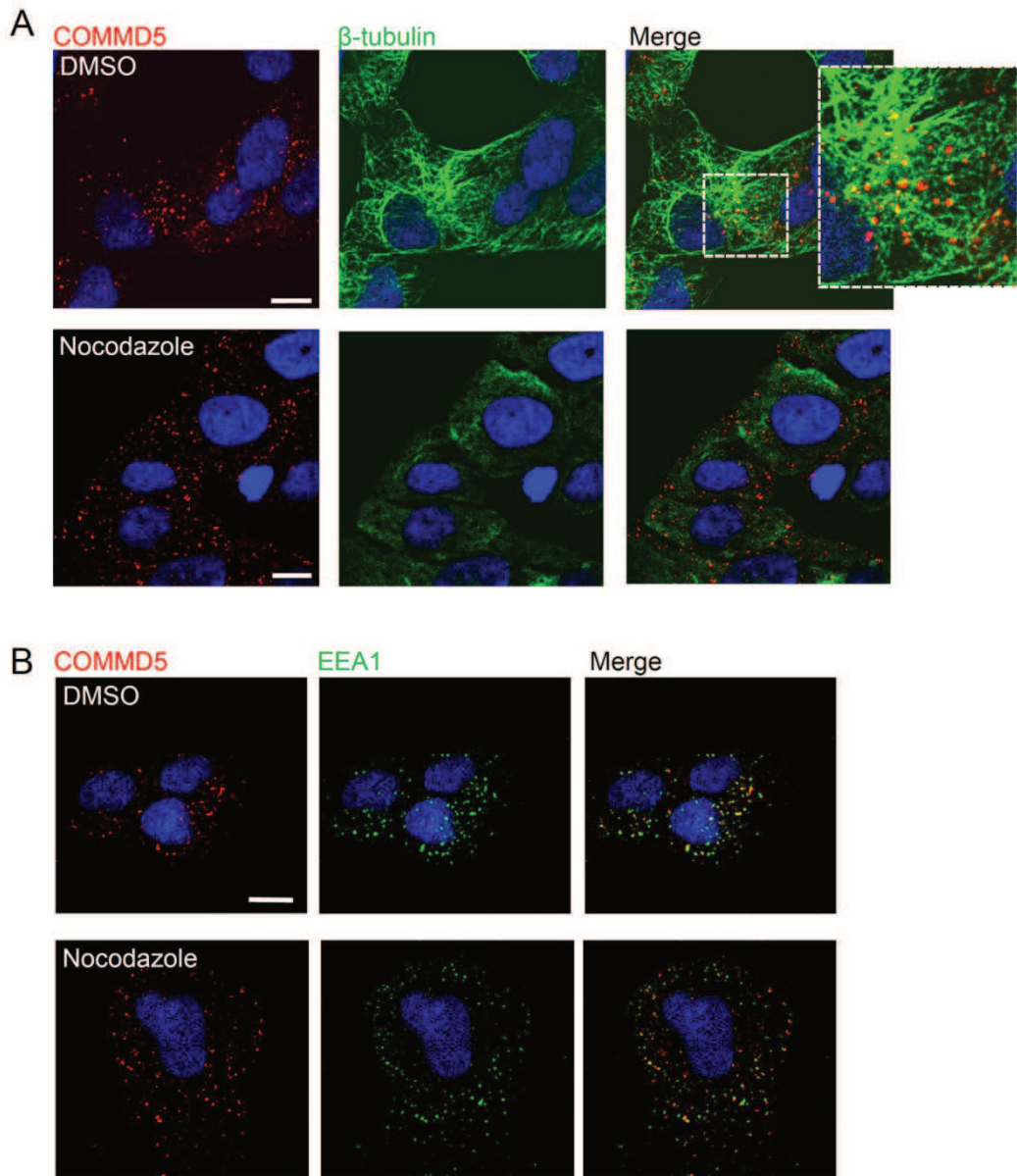
Scale bar represents 10 μm.



**Figure S3. COMMD5 depletion impaired transferrin recycling. Related to Figure 4.**

siRNA-transfected cells were incubated with Alexa<sup>488</sup>-transferrin (Tf) (green), fixed, labelled with anti-Rab5 (red) and observed by epifluorescence with confocal microscopy. Accumulation of small Rab5 and Tf puncta at plasma membrane (arrowheads) and large Rab5 containing Tf (boxes) in the perinuclear space were observed upon COMMD5 cell depletion. DAPI stains nuclei blue. Scale bar represents 10  $\mu$ m.



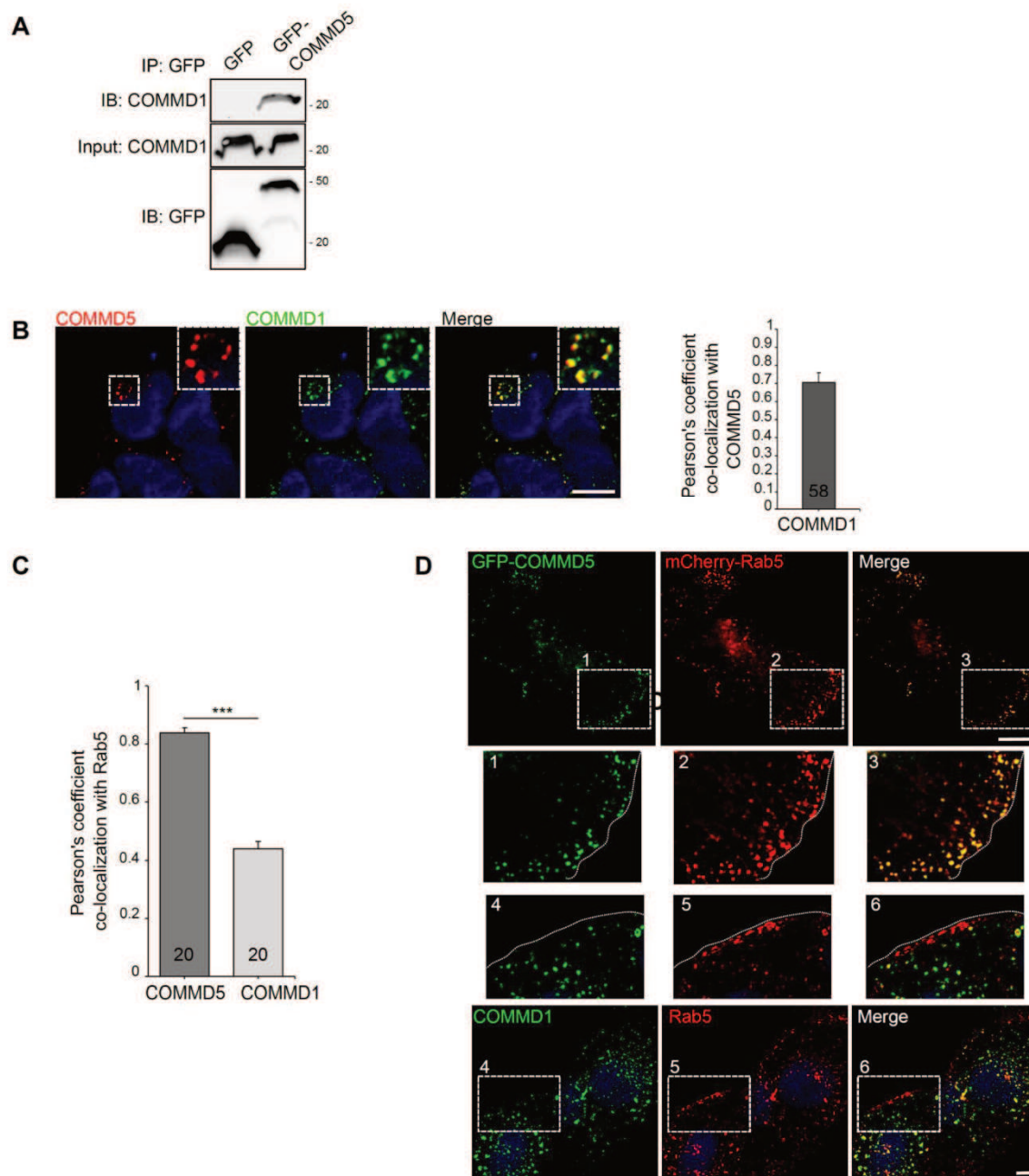


**Figure S4. COMMD5 associates to microtubules. Related to Figure 5.**

(A) Endogenous COMMD5 (red) and  $\beta$ -tubulin (green) localization in HK-2 cells observed by confocal microscopy. In control cells pretreated with DMSO, COMMD5 puncta are enriched near the perinuclear region where it co-localized with  $\beta$ -tubulin at the MTOC (upper panel). In cells pretreated with 10  $\mu$ g/ml nocodazole for 30 min to disrupt microtubules, COMMD5 is dispersed near the plasma membrane and co-localization with  $\beta$ -tubulin is lost (lower panel). DAPI stains nuclei blue.

(B) COMMD5 (red) co-localized with EEA1 early endosomes (green) near the perinuclear region in cells pretreated with DMSO (upper panel), and after 30 min of 10  $\mu$ g/ml nocodazole, COMMD5/EEA1 complexes are detected at the PM (lower panel). DAPI stains nuclei blue.

Scale bar represents 10  $\mu$ m.



**Figure S5. Interaction of COMMD5 and COMMD1 on endosomes. Related to Figure 5.**

(A) Co-immunoprecipitation of COMMD1 and COMMD5 in a HEK-293 protein cell lysate transfected with GFP-COMMD5 or peGFP-C1 empty vector. Molecular mass markers (in kDa) are noted ( $n=3$ ).

(B) Endogenous COMMD5 (red) and COMMD1 (green) co-localized in vesicle-like structures near the perinuclear region in HEK-293 cells. Graph: Pearson's coefficient of COMMD5 and COMMD1 specific antibodies co-localization (value is mean, error bar indicates SEM, cell number counted is indicated in the bars). DAPI stains nuclei blue.

(C) Pearson's coefficient of Rab5 and COMMD5 or COMMD1 antibody specific co-localizations (values are means, error bars indicate SEM, Equal number of nuclei ( $n=20$ ) were counted to compared Rab5 co-localization with COMMD5 or COMMD1). Student's  $t$  test, \*\*\* $p < 0.001$ .

(D) Confocal images of HK-2 co-transfected cells with GFP-COMMD5 (green) and mCherry-Rab5 (red) (upper panels) or with endogenous COMMD1 (green) and Rab5 (red) (lower panels). Box 1-6 represented PM regions. DAPI stains nuclei blue. Scale bar represents 10  $\mu\text{m}$ .

## C - Conclusion de l'article

La première étude portant sur le rôle de COMMD5 dans le contrôle du récepteur EGFR avait démontré une régulation négative de la transcription de ce récepteur. De nouveau, comme les autres COMMD auparavant, COMMD5 possède aussi la capacité de réguler le trafic endosomal. Dans cette étude, nous avons montré une nouvelle facette de COMMD5 : la modulation du récepteur EGFR par l'intermédiaire du cytosquelette et le tri endosomal. COMMD5 se montre indispensable dans le maintien de l'organisation du cytosquelette permettant une bonne régulation endosomal. La perte de COMMD5 entraîne *de facto* une activation prolongée du récepteur et donc une sur-activation des processus de prolifération et de survie cellulaire. Les résultats confirment, une fois de plus, que COMMD5 possède un rôle suppresseur de tumeur.

## **Chapitre VI : Discussion**

## A - COMMD5 est sous-exprimée dans les carcinomes de rein

Les protéines COMMD ont été caractérisées comme étant impliquées dans de nombreux processus biologiques. Dès la découverte de cette famille, des études ont permis de mettre en évidence leurs rôles dans la régulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B<sup>(231), (75), (8), (10)</sup> dans l'homéostasie du cuivre <sup>(232), (39), (35)</sup> et plus récemment, dans le trafic endosomal par l'intermédiaire du complexe CCC<sup>(13), (12)</sup>. Les analyses expressionnelles des différentes protéines COMMD ont révélé qu'elles étaient modulées dans le cancer <sup>(89), (95), (97)</sup> dont COMMD5, qui est fortement diminuée dans les tumeurs du cerveau<sup>(1)</sup>, du poumon<sup>(89)</sup> et de l'estomac<sup>(96)</sup>. À partir d'échantillons de biopsies rénales, nous avons démontré dans cette thèse que COMMD5 était également sous-exprimée dans les tumeurs de rein humain (**Chapitre 2 : Figure 1**). L'analyse immunohistologique de 117 échantillons de RCC a permis de mettre en évidence le lien entre la taille des tumeurs et les niveaux d'expression de COMMD5. La taille étant un critère essentiel dans l'évaluation du stade tumoral, nous avons constaté que plus la tumeur était grande, moins il y avait de COMMD5 exprimée. Notre équipe a également montré pour la première fois, l'association entre l'expression de COMMD5 et la survie des patients sans récurrence de cancer (**Chapitre 3 : Figure 6**). Le cancer du rein représente 3 % de l'ensemble des cancers<sup>(116)</sup> et affecte environ 300 000 nouvelles personnes dans le monde chaque année<sup>(116)</sup> dont 6600 au Canada. Dans la majorité des cas, le diagnostic est tardif et les patients présentent des tumeurs à des stades avancés (17 % des cas découverts sont associés à des tumeurs métastatiques<sup>(233)</sup>). En dépit des améliorations dans la compréhension des mécanismes moléculaires du RCC et de l'introduction de nouveaux inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI), la survie à cinq ans des patients métastatiques reste inférieure à 10 %<sup>(234)</sup>. C'est

pourquoi il est donc nécessaire de développer de nouveaux outils de détection et thérapeutiques permettant d'augmenter la survie de ces patients diagnostiqués trop tardivement.

### **B - La rétrorégulation de COMMD5 et du facteur de transcription HIF1 $\alpha$**

L'hypoxie est l'une des principales caractéristiques des tumeurs solides. La diminution de la concentration en O<sub>2</sub> régule l'expression transcriptionnelle de certains gènes cibles permettant à la cellule de s'adapter et de survivre. L'absence d'O<sub>2</sub> induit une stabilisation du facteur de transcription HIF1 $\alpha$  initiée par l'inactivation de la proline hydroxylase 2 (PHD-2)<sup>(215)</sup>. Dans la grande majorité des RCC, la mutation du gène VHL favorise également l'accumulation de la protéine HIF1 $\alpha$ <sup>(131), (218), (224)</sup>. Le rôle cellulaire de la protéine VHL étant l'ubiquitination de HIF1 $\alpha$ , toute mutation de celle-ci dans les carcinomes rénaux, accentue l'accumulation de HIF1 $\alpha$  et induit *de facto* une régulation génique permettant aux cellules de survivre et de proliférer.

Le mécanisme cellulaire permettant l'inhibition de COMMD5 dans les tumeurs n'étant pas élucidé, nous avons utilisé des cellules de tubules proximaux de rein HK-2 comme modèle de cellules précurseuses de tumeur afin de l'identifier. Nous avons observé que l'absence d'O<sub>2</sub> pendant 24 h a réprimé l'expression transcriptionnelle de COMMD5 (**Chapitre 2 : Figure 2**). De même, nous avons également constaté une diminution de la transcription de COMMD5 parallèlement à l'augmentation protéique de HIF1 $\alpha$  (**Chapitre 2 : Figure 2**) dans les cellules HK-2 exposées pendant 24 h avec un agent chimique mimant l'hypoxie. Ces observations nous ont poussé à investiguer le rôle possible du facteur de transcription HIF1 $\alpha$  dans la modulation de

l'expression de COMMD5. Dans les cellules HK-2 en condition d'hypoxie, l'inhibition de HIF1 $\alpha$  à l'aide d'un Si ARN spécifique, a fortement augmenté l'expression génique de COMMD5 (**Chapitre 2 : Figure 3**). Nos données permettent d'affirmer pour la première fois, que le facteur de transcription HIF1 $\alpha$  est impliqué dans la régulation négative de COMMD5 sans toutefois confirmer son rôle direct sur le promoteur du gène de COMMD5. Une étude du promoteur de COMMD5 sera donc nécessaire afin de déterminer le rôle exact de HIF1 $\alpha$  et de préciser ce mécanisme. Les précédentes études du laboratoire du Dr Tremblay, ont déjà permis de déterminer que COMMD5 était réprimée en l'absence d'O<sub>2</sub> sans pour autant avoir caractérisé ce phénomène. En effet, dans un modèle d'ischémie-reperfusion rénale chez le rat, nous avons remarqués qu'après 50 min d'ischémie le niveau d'ARNm de COMMD5 avait diminué d'environ 50 % durant les six premières heures, suivies par une forte ré-augmentation de ce taux<sup>(1)</sup>. COMMD5 ne semble pas être la seule protéine de la famille des COMMD à être sensible à l'absence d'O<sub>2</sub> puisqu'une étude récente a identifié par analyse *in silico*, une régulation négative de COMMD1 par l'hypoxie dans des macrophages dérivés de sang humain utilisés comme précurseurs des ostéoclastes<sup>(235)</sup>. Parallèlement à ces observations, nous avons mis en évidence la régulation négative de COMMD5 sur la protéine HIF1 $\alpha$  dans les cellules HK-2 exposées au CoCl<sub>2</sub> pendant 24 h (**Chapitre 3 : Figure 5**). Ce phénomène a été également observé dans notre modèle de tumeurs rénales sous-cutanées chez la souris où la surexpression de COMMD5 a nettement diminué l'expression de la protéine HIF1 $\alpha$  (**Chapitre 4 : Figure 3**). Le mécanisme d'inhibition de HIF1 $\alpha$  par COMMD5 n'étant pas encore identifié, nous pouvons émettre l'hypothèse que COMMD5 accélérerait la dégradation de HIF1 $\alpha$  *via* le protéasome. Les études portant sur les protéines COMMD ont montré qu'elles

participaient à l'ubiquitination et à la dégradation *via* le protéasome des protéines impliquées dans la voie de signalisation NF- $\kappa$ B<sup>(8)</sup>. De plus, une étude a permis d'identifier un mécanisme impliquant COMMD1 dans la régulation de la protéine HIF1 $\alpha$ . À partir d'un modèle de souris *KO* COMMD1, les auteurs ont observé un arrêt du développement embryonnaire et une augmentation de la stabilité de HIF1 $\alpha$ <sup>(6)</sup>. Ils ont également constaté que dans les cellules HEK-293, COMMD1 s'associait physiquement à la partie amino-terminale de HIF1 $\alpha$  et empêchait sa dimérisation avec HIF1 $\beta$ <sup>(95)</sup>. Cette déstabilisation, induisant une dégradation de HIF1 $\alpha$  par le protéasome, empêche la régulation des gènes cibles du facteur de transcription. Néanmoins, afin de confirmer notre hypothèse sur la régulation de HIF1 $\alpha$  par COMMD5, il sera nécessaire de réaliser certaines expériences supplémentaires. Toutefois, l'activation soutenue de HIF1 $\alpha$  est un élément important dans le développement tumoral et sa régulation négative par COMMD5 présente un intérêt majeur dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

### **C - COMMD5 contrôle le récepteur EGFR selon deux mécanismes différents**

Les récepteurs de la famille ErbB sont connus pour leurs rôles dans la prolifération, la migration et la différenciation cellulaires. En condition normale, l'activation de ces récepteurs survient après l'interaction avec leurs ligands provoquant leurs dimérisations<sup>(185)</sup>. Une fois le signal transmis, les récepteurs sont endocytés puis inactivés par dégradation ou recyclés à la MP<sup>(185)</sup>. En condition pathologique, la surexpression et la suractivation de ces récepteurs et plus particulièrement celle d'EGFR, favorisent le développement tumoral dans différents cancers, dont ceux du sein et du poumon<sup>(184), (189), (197), (236)</sup>. Dans la majorité des cas, ces



anomalies ont pour origine des mutations ou une amplification du gène codant pour EGFR. Dans le carcinome du rein, les études immunohistologiques ont montré la présence d'une augmentation de l'expression du récepteur EGFR<sup>(237)</sup> mais les analyses génomiques n'ont pu identifier de mutations connues affectant la liaison du ligand au récepteur (mutations dans les exons 2 à 7) ou les sites catalytiques (mutations dans les exons 18 à 24) du récepteur EGFR<sup>(238), (237)</sup>. L'absence de mutations et les modifications post-traductionnelles permettant la surexpression du récepteur EGFR dans les carcinomes de rein, rendent les inhibiteurs des tyrosines kinases (TKI) relativement peu efficaces. C'est pourquoi il est donc nécessaire d'identifier d'autres mécanismes permettant de réguler l'expression pathologique du récepteur EGFR. Dans les cellules de carcinomes et dans les tumeurs rénales sous-cutanées, notre équipe a mis en évidence l'hyperméthylation des promoteurs des gènes codant pour EGFR et ErbB-3 par COMMD5, réprimant ainsi leurs expressions respectives (**Chapitre 4 : Figure 3 et Figure 4**). Cette répression des membres de la famille ErbB par COMMD5 a permis d'inhiber la voie de signalisation sous-jacente Pi3K/AKT responsable de la prolifération cellulaire et de la croissance cellulaire (**Chapitre 4 : Figure 3 et Figure 4**). La régulation négative des membres de la famille ErbB par COMMD5 a mené à la diminution de la prolifération cellulaire et la réduction de la taille des tumeurs suite au ralentissement du cycle cellulaire, passant ainsi de 8 h à 12 h médiée par l'allongement de la phase G2/M (**Chapitre 4 : Figure 1**). Cette régulation du cycle cellulaire avait déjà été identifiée dans les précédentes études du groupe du Dr Tremblay débutées en 2000, marquées par l'observation, dans les cellules HEK-293 surexprimant COMMD5, d'une inhibition de la prolifération cellulaire par l'arrêt en phase G2/M<sup>(1), (101)</sup>. Plus récemment, notre équipe avait également démontré la diminution de

la prolifération des cellules des tubules proximaux de rein de souris transgéniques surexprimant COMMD5 après une ischémie-reperfusion<sup>(108)</sup>.

Néanmoins, les mutations du gène EGFR ne sont plus seulement la principale cause de surexpression du récepteur EGFR. De plus en plus d'études rapportent le rôle majeur de la régulation endosomale du récepteur EGFR dans le développement tumoral. En effet, la dérégulation favorisant un ralentissement de la progression du récepteur EGFR entraîne une activation prolongée du signal et conduit à une prolifération, une différenciation et une migration cellulaires accrues et ainsi qu'une activation de l'EMT. Nous avons démontré dans cette thèse, le rôle crucial de COMMD5 dans le tri endosomal, le transport et le recyclage du récepteur EGFR. Malgré une dégradation rapide du récepteur EGFR dans les cellules appauvries en COMMD5, la phosphorylation du récepteur a persisté plus longtemps, médiée par son accumulation au niveau des endosomes précoces (**Chapitre 5 : Figure 1 et Figure 2**). L'importance de COMMD5 dans le trafic endosomal a été mise en évidence par son interaction avec le cytosquelette et les endosomes précoces. Pour la première, notre laboratoire a démontré que COMMD5 interagissait directement avec l' $\alpha$ -Tubuline et l'Actine *via* sa partie carboxy-terminale contenant le domaine COMM (**Chapitre 5 : Figure 5**). De plus, en association avec son domaine amino-terminal, nous avons également identifié que COMMD5 interagissait avec Rab5, un marqueur protéique d'endosomes précoces (**Chapitre 5 : Figure 5**).

## **D - COMMD5 est un élément crucial dans le maintien de la différenciation cellulaire et dans l'inhibition de la progression tumorale**

La transition épithélio-mésenchymateuse est un processus majeur dans la progression tumorale et dans le développement métastatique. La dé-différenciation cellulaire induite par l'EMT se caractérise par la perte du marqueur des jonctions cellulaires E-cadhérine, une modification du cytosquelette et l'acquisition de propriétés mésenchymateuses permettant l'invasion et l'angiogenèse. Nous avons identifié dans cette thèse, l'importance de la présence de COMMD5 dans le maintien du phénotype épithélial des cellules. L'absence de COMMD5 dans les cellules épithéliales HK-2 a fortement diminué l'expression de protéine E-cadhérine et induit une réorganisation du cytosquelette par la présence de fibres de stress et d'actine corticale (**Chapitre 2 : Figure 4**). Le phénomène inverse a été observé dans des cellules dé-différenciées de carcinomes rénaux où la restauration de COMMD5 a permis de rétablir l'expression de la protéine E-cadhérine et la diminution des marqueurs mésenchymateux  $\alpha$ SMA et Vimentine (**Chapitre 3 : Figure 1**). COMMD5 participe à la régulation de l'EMT par l'intermédiaire des facteurs de transcription SNAIL, TWIST et ZEB. En effet, après 72 h d'inhibition de COMMD5, nous avons constaté une forte augmentation des facteurs de transcription TWIST et ZEB (**Chapitre 2 : Figure 6**). Différentes études immunohistologiques ont permis de mettre en évidence les liens entre ces facteurs de transcription et le stade tumoral puisque la présence élevée de SNAIL, TWIST et ZEB ont été retrouvée dans des tumeurs de stade très avancés et associé à un pronostic de survie très défavorable<sup>(239)</sup>,  
(176), (177).

Le contrôle de ces protéines constitue donc une stratégie innovante et probante quant à son potentiel à ralentir l'évolution de la maladie. Dans les cellules de carcinomes de rein et les tumeurs rénales sous-cutanées chez la souris, nous avons observé une forte diminution de l'expression de SNAIL par la surexpression de COMMD5 (**Chapitre 3 : Figure 2 et Figure 3**) par l'intermédiaire de deux mécanismes différents. Tel que décrit précédemment, COMMD5 a entraîné une diminution de l'expression de HIF1 $\alpha$  ayant pour gène cible SNAIL puis nous avons mis en évidence pour la première fois, le rôle de COMMD5 dans la translocation nucléaire du facteur de transcription qui, dans les carcinomes de rein, a empêché la translocation de SNAIL vers le noyau (**Chapitre 3 : Figure 6**). Notre étude a permis d'identifier une interaction entre la partie carboxy-terminale, contenant le domaine COMM, de COMMD5 et SNAIL, (**Chapitre 3 : Figure 6**) ce qui pourrait confirmer le rôle séquestreur de COMMD5 sur la protéine SNAIL au niveau du cytoplasme empêchant ainsi l'activation des gènes cibles permettant entre autres, l'invasion cellulaire. Parmi les gènes cibles de SNAIL, les métalloprotéases MMP2 et MMP9, responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire, sont associées à un mauvais pronostic de survie et à l'apparition de métastases dans le cancer du rein<sup>(226)</sup>. La surexpression de COMMD5 a permis d'abolir l'expression de ces 2 métalloprotéases et d'inhiber l'invasion cellulaire (**Chapitre 3 : Figure 8**).

#### **E - Impact clinique de COMMD5 dans le traitement du carcinome à cellules rénales**

Le rôle suppresseur de tumeur de COMMD5 dans les carcinomes à cellules rénales a clairement été identifié dans cette thèse. Nos résultats ont montré que COMMD5 était important dans le maintien des propriétés épithéliales des cellules puisque la perte de

COMMD5 a favorisé la dé-différenciation cellulaire et l'activation de gènes tumoraux par l'intermédiaire de l'EMT. Le maintien du niveau d'expression de COMMD5 dans les tubules proximaux est donc essentiel afin d'empêcher le développement de carcinomes rénaux. Nos travaux ont mis en évidence que la restauration de COMMD5 dans les tumeurs de rein inhibait la prolifération, l'angiogenèse et l'invasion cellulaire, démontrant ainsi l'intérêt thérapeutique que suscite les actions et répercussions de COMMD5 et tant qu'agent potentiel de la lutte contre le cancer du rein; les stratégies actuelles se basant essentiellement sur l'inhibition de l'angiogénèse restent très peu efficaces. Des nombreuses études restent encore à réaliser afin d'arriver à l'élaboration finale d'une thérapie ciblée notamment, en ce qui concerne le mode d'administration de COMMD5.

## **Chapitre VII : Conclusions et perspectives**

L'ensemble des résultats présenté en schéma bilan rassemble les différents mécanismes de COMMD5 observés au cours de ce projet. Cette thèse permet de proposer un nouveau rôle de la protéine COMMD5 dans le rein. En effet, nos études précédentes avaient mises en avant la capacité réparatrice et plus précisément, l'accélération de la réparation rénale de COMMD5 après un dommage aigu<sup>(108)</sup>. Dans cette thèse, nous démontrons pour la première fois que la protéine COMMD5 agit également dans le développement et la progression du carcinome à cellules rénales. L'expression de COMMD5 étant étroitement corrélée à la taille de la tumeur et à la survie du patient, nous avons identifié la sous-unité  $\alpha$  du facteur de transcription HIF1 comme un des acteurs majeurs impliqué dans la régulation négative de COMMD5. La perte de COMMD5 semble être une étape importante dans la tumorigenèse rénale, puisqu'elle emmène une dé-différenciation des cellules épithéliales, l'activation de la transition épithélio-mésenchymateuse, une déstructuration du cytosquelette d'actine ainsi qu'une perturbation du trafic endosomal menant à une activation prolongée d'EGFR (**Figure : schéma bilan**).

Nous démontrons également que la restauration de la protéine de COMMD5 dans les cellules de carcinome rénal permet d'inhiber tumorigenèse et la progression tumorale par l'intermédiaire de deux différents processus. D'un côté, COMMD5 agit directement sur les promoteurs des membres de la famille ErbB en les hyperméthylant, abolissant leurs expressions et bloquant les voies de signalisation sous-jacentes. D'un autre côté, COMMD5 inhibe le facteur de transcription HIF1 et séquestre la protéine SNAIL au niveau du cytoplasme des cellules (**Figure : schéma bilan**).

La conclusion générale à cette étude est que COMMD5 peut être considérée comme un gène suppresseur de tumeurs dans le rein. Cette étude ouvre la voie à plusieurs projets de recherche. Dans un premier temps, il serait essentiel d'identifier si le rôle anti-oncogénique de COMMD5 est retrouvé dans d'autres types de cancers comme celui du cerveau, du foie et du poumon. En effet, ils présentent des niveaux réduits de COMMD5 laissant penser que cette protéine puisse également y jouer un rôle important.

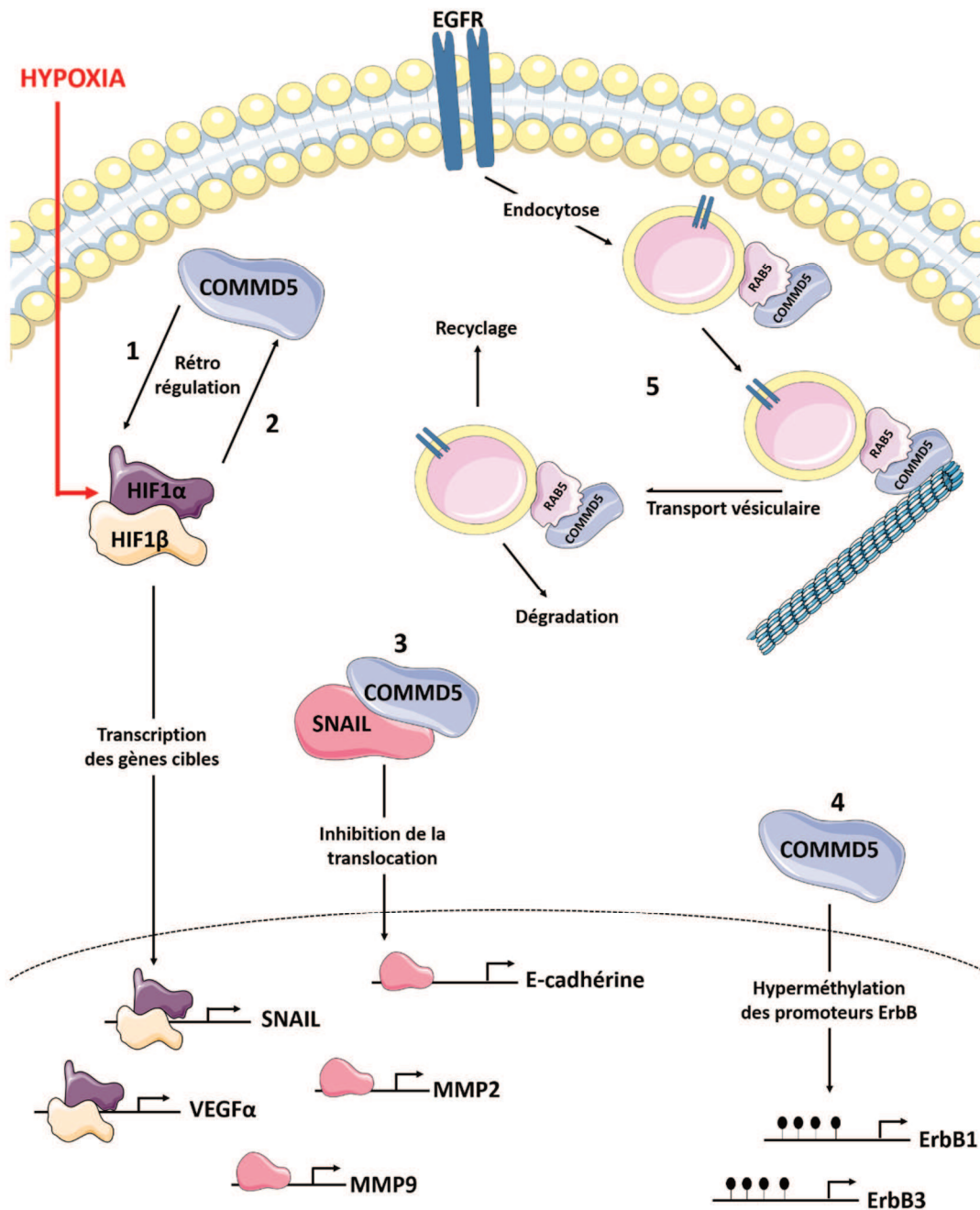
Le second projet serait en lien avec un rôle thérapeutique potentiel de COMMD5 contre le carcinome à cellules rénales. En effet, le cancer du rein est souvent diagnostiqué tardivement avec la présence de métastases. Les traitements actuels sont relativement peu efficaces, il serait nécessaire de développer d'autres stratégies thérapeutiques. La première étape serait d'identifier un mécanisme d'administration de COMMD5 au cœur de la tumeur afin de réduire ou inhiber le développement. Nos études préliminaires démontrent la présence de COMMD5 au niveau des exosomes; il serait donc possible de les enrichir en COMMD5, de les purifier, puis d'aller les injecter aux seins des tumeurs. Actuellement, de plus en plus d'études s'intéressent à ce nouveau vecteur de transmission et les premiers résultats sont prometteurs.

Enfin, le dernier projet de recherche, pourrait être l'étude plus large du rôle de COMMD5 dans les maladies rénales. En effet, la protéine COMMD5 ayant un rôle important dans la réparation après un dommage aigu et dans le cancer, il serait intéressant d'évaluer son rôle potentiel dans un modèle de dommage rénal chronique tel que la néphropathie diabétique. La néphropathie diabétique est une des complications les plus fréquentes chez les



patients souffrant de diabète, elle entraîne une fibrose rénale par l'activation du processus de transition épithélio-mésenchymateuse et réduit progressivement la fonction filtrante du rein.

De nombreuses pistes restent encore à explorer mais nos résultats actuels montrent déjà le fort potentiel thérapeutique de COMMD5.



**Schéma bilan du mécanisme de régulation de COMMD5 dans les cellules rénales**

**1 :** Durant l'hypoxie, la sous-unité  $\alpha$  du facteur de transcription HIF1 entraîne une diminution de COMMD5. La perte de COMMD5 induit une dé-différenciation des cellules épithéliales (**Chapitre 2**). **2 :** COMMD5 rétrocontrôle la sous-unité  $\alpha$  de HIF1 et inhibe la voie de signalisation sous-jacente empêchant le contrôle transcriptionnel des gènes VEGF $\alpha$  et SNAIL (**Chapitre 3**). **3 :** COMMD5 agit parallèlement sur la translocation nucléaire de la protéine SNAIL, bloquant ainsi la transcription des MMP2 et MMP9 et supprimant la répression d'E-cadhérine (**Chapitre 3**). **4 :** COMMD5 agit au niveau du promoteur des membres de la famille ErbB en les hyperméthylant, empêchant ainsi leurs expressions (**Chapitre 4**). **5 :** COMMD5 participe à la régulation du trafic endosomal du récepteur EGFR au niveau de l'endocytose (**Chapitre 5**).

## Bibliographie

1. Solban N, Jia HP, Richard S, Tremblay S, Devlin AM, Peng J, et al. HCaRG, a novel calcium-regulated gene coding for a nuclear protein, is potentially involved in the regulation of cell proliferation. *J Biol Chem*. 2000;275(41):32234-43.
2. Solban N, Dumas P, Gossard F, Sun Y, Pravenec M, Kren V, et al. Chromosomal mapping of HCaRG, a novel hypertension-related, calcium-regulated gene. *Folia Biol (Praha)*. 2002;48(1):9-14.
3. Nabetani A, Hatada I, Morisaki H, Oshimura M, Mukai T. Mouse U2af1-rs1 is a neomorphic imprinted gene. *Mol Cell Biol*. 1997;17(2):789-98.
4. Burstein E, Hoberg JE, Wilkinson AS, Rumble JM, Csomos RA, Komarck CM, et al. COMMD proteins, a novel family of structural and functional homologs of MURR1. *J Biol Chem*. 2005;280(23):22222-32.
5. Maine GN, Burstein E. COMMD proteins: COMMMing to the scene. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(15):1997-2005.
6. van de Sluis B, Muller P, Duran K, Chen A, Groot AJ, Klomp LW, et al. Increased activity of hypoxia-inducible factor 1 is associated with early embryonic lethality in Commd1 null mice. *Mol Cell Biol*. 2007;27(11):4142-56.
7. Li H, Koo Y, Mao X, Sifuentes-Dominguez L, Morris LL, Jia D, et al. Endosomal sorting of Notch receptors through COMMD9-dependent pathways modulates Notch signaling. *J Cell Biol*. 2015;211(3):605-17.
8. Bartuzi P, Hofker MH, van de Sluis B. Tuning NF-kappaB activity: a touch of COMMD proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(12):2315-21.
9. Healy MD, Hospenthal MK, Hall RJ, Chandra M, Chilton M, Tillu V, et al. Structural insights into the architecture and membrane interactions of the conserved COMMD proteins. *Elife*. 2018;7.
10. de Bie P, van de Sluis B, Burstein E, Duran KJ, Berger R, Duckett CS, et al. Characterization of COMMD protein-protein interactions in NF-kappaB signalling. *Biochem J*. 2006;398(1):63-71.
11. Starokadomskyy P, Gluck N, Li H, Chen B, Wallis M, Maine GN, et al. CCDC22 deficiency in humans blunts activation of proinflammatory NF-kappaB signaling. *J Clin Invest*. 2013;123(5):2244-56.

12. Phillips-Krawczak CA, Singla A, Starokadomskyy P, Deng Z, Osborne DG, Li H, et al. COMMD1 is linked to the WASH complex and regulates endosomal trafficking of the copper transporter ATP7A. *Mol Biol Cell*. 2015;26(1):91-103.
13. Fedoseienko A, Wijers M, Wolters JC, Dekker D, Smit M, Huijkman N, et al. The COMMD Family Regulates Plasma LDL Levels and Attenuates Atherosclerosis Through Stabilizing the CCC Complex in Endosomal LDLR Trafficking. *Circ Res*. 2018;122(12):1648-60.
14. Bartuzi P, Billadeau DD, Favier R, Rong S, Dekker D, Fedoseienko A, et al. CCC- and WASH-mediated endosomal sorting of LDLR is required for normal clearance of circulating LDL. *Nat Commun*. 2016;7:10961.
15. Wang J, Fedoseienko A, Chen B, Burstein E, Jia D, Billadeau DD. Endosomal receptor trafficking: Retromer and beyond. *Traffic*. 2018;19(8):578-90.
16. Huttlin EL, Bruckner RJ, Paulo JA, Cannon JR, Ting L, Baltier K, et al. Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature*. 2017;545(7655):505-9.
17. Huttlin EL, Ting L, Bruckner RJ, Gebreab F, Gygi MP, Szpyt J, et al. The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome. *Cell*. 2015;162(2):425-40.
18. Harrison MD, Jones CE, Solioz M, Dameron CT. Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem Sci*. 2000;25(1):29-32.
19. Festa RA, Thiele DJ. Copper: an essential metal in biology. *Curr Biol*. 2011;21(21):R877-83.
20. Roberts EA, Sarkar B. Liver as a key organ in the supply, storage, and excretion of copper. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(3):851S-4S.
21. Kim H, Son HY, Bailey SM, Lee J. Deletion of hepatic Ctr1 reveals its function in copper acquisition and compensatory mechanisms for copper homeostasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296(2):G356-64.
22. Kim BE, Nevitt T, Thiele DJ. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol*. 2008;4(3):176-85.
23. Kuo YM, Gybina AA, Pyatskowitz JW, Gitschier J, Prohaska JR. Copper transport protein (Ctr1) levels in mice are tissue specific and dependent on copper status. *J Nutr*. 2006;136(1):21-6.
24. Prohaska JR. Role of copper transporters in copper homeostasis. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(3):826S-9S.

25. Moore SD, Helmle KE, Prat LM, Cox DW. Tissue localization of the copper chaperone ATOX1 and its potential role in disease. *Mamm Genome*. 2002;13(10):563-8.
26. Yu CH, Yang N, Bothe J, Tonelli M, Nokhrin S, Dolgova NV, et al. The metal chaperone Atox1 regulates the activity of the human copper transporter ATP7B by modulating domain dynamics. *J Biol Chem*. 2017;292(44):18169-77.
27. Hung IH, Suzuki M, Yamaguchi Y, Yuan DS, Klausner RD, Gitlin JD. Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1997;272(34):21461-6.
28. de Bie P, van de Sluis B, Klomp L, Wijmenga C. The many faces of the copper metabolism protein MURR1/COMMD1. *J Hered*. 2005;96(7):803-11.
29. Sternlieb I, Van den Hamer CJ, Morell AG, Alpert S, Gregoriadis G, Scheinberg IH. Lysosomal defect of hepatic copper excretion in Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). *Gastroenterology*. 1973;64(1):99-105.
30. Beinhardt S, Leiss W, Stattermayer AF, Graziadei I, Zoller H, Stauber R, et al. Long-term outcomes of patients with Wilson disease in a large Austrian cohort. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12(4):683-9.
31. Hardy KJ, Bryan SE. Localization and uptake of copper into chromatin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1975;33(1):62-9.
32. Haywood S, Fuentealba IC, Kemp SJ, Trafford J. Copper toxicosis in the Bedlington terrier: a diagnostic dilemma. *J Small Anim Pract*. 2001;42(4):181-5.
33. Wijmenga C, Klomp LW. Molecular regulation of copper excretion in the liver. *Proc Nutr Soc*. 2004;63(1):31-9.
34. van De Sluis B, Rothuizen J, Pearson PL, van Oost BA, Wijmenga C. Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population. *Hum Mol Genet*. 2002;11(2):165-73.
35. Forman OP, Boursnell ME, Dunmore BJ, Stendall N, van den Sluis B, Fretwell N, et al. Characterization of the COMMD1 (MURR1) mutation causing copper toxicosis in Bedlington terriers. *Anim Genet*. 2005;36(6):497-501.
36. Klomp AE, van de Sluis B, Klomp LW, Wijmenga C. The ubiquitously expressed MURR1 protein is absent in canine copper toxicosis. *J Hepatol*. 2003;39(5):703-9.
37. Stuehler B, Reichert J, Stremmel W, Schaefer M. Analysis of the human homologue of the canine copper toxicosis gene MURR1 in Wilson disease patients. *J Mol Med (Berl)*. 2004;82(9):629-34.

38. Muller T, van de Sluis B, Zhernakova A, van Binsbergen E, Janecke AR, Bavdekar A, et al. The canine copper toxicosis gene MURR1 does not cause non-Wilsonian hepatic copper toxicosis. *J Hepatol.* 2003;38(2):164-8.
39. de Bie P, van de Sluis B, Burstein E, van de Berghe PV, Muller P, Berger R, et al. Distinct Wilson's disease mutations in ATP7B are associated with enhanced binding to COMMD1 and reduced stability of ATP7B. *Gastroenterology.* 2007;133(4):1316-26.
40. Canessa CM, Horisberger JD, Rossier BC. Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature.* 1993;361(6411):467-70.
41. Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, et al. Amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channel is made of three homologous subunits. *Nature.* 1994;367(6462):463-7.
42. Ji HL, Zhao RZ, Chen ZX, Shetty S, Idell S, Matalon S. delta ENaC: a novel divergent amiloride-inhibitable sodium channel. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;303(12):L1013-26.
43. Giraldez T, Rojas P, Jou J, Flores C, Alvarez de la Rosa D. The epithelial sodium channel delta-subunit: new notes for an old song. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;303(3):F328-38.
44. Garty H, Palmer LG. Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev.* 1997;77(2):359-96.
45. Pavlov TS, Staruschenko A. Involvement of ENaC in the development of salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017;313(2):F135-F40.
46. Liu YF, Swart M, Ke Y, Ly K, McDonald FJ. Functional interaction of COMMD3 and COMMD9 with the epithelial sodium channel. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013;305(1):F80-9.
47. Biasio W, Chang T, McIntosh CJ, McDonald FJ. Identification of Murr1 as a regulator of the human delta epithelial sodium channel. *J Biol Chem.* 2004;279(7):5429-34.
48. Chang T, Ke Y, Ly K, McDonald FJ. COMMD1 regulates the delta epithelial sodium channel (deltaENaC) through trafficking and ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;411(3):506-11.
49. Ke Y, Butt AG, Swart M, Liu YF, McDonald FJ. COMMD1 downregulates the epithelial sodium channel through Nedd4-2. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;298(6):F1445-56.
50. Zhou R, Patel SV, Snyder PM. Nedd4-2 catalyzes ubiquitination and degradation of cell surface ENaC. *J Biol Chem.* 2007;282(28):20207-12.

51. Manning JA, Henshall TL, Kumar S. NEDD4-2-dependent control of Na(+) homeostasis and renal disease. *Cell Cycle*. 2018;17(1):1-2.
52. Ware AW, Cheung TT, Rasulov S, Burstein E, McDonald FJ. Epithelial Na(+) Channel: Reciprocal Control by COMMD10 and Nedd4-2. *Front Physiol*. 2018;9:793.
53. Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene*. 2006;25(51):6758-80.
54. Dev A, Iyer S, Razani B, Cheng G. NF-kappaB and innate immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2011;349:115-43.
55. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2.
56. Sanchez-Lopez E, Rayego S, Rodrigues-Diez R, Rodriguez JS, Rodrigues-Diez R, Rodriguez-Vita J, et al. CTGF promotes inflammatory cell infiltration of the renal interstitium by activating NF-kappaB. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(7):1513-26.
57. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(6):a001651.
58. Brantley DM, Chen CL, Muraoka RS, Bushdid PB, Bradberry JL, Kittrell F, et al. Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) regulates proliferation and branching in mouse mammary epithelium. *Mol Biol Cell*. 2001;12(5):1445-55.
59. Plumpe J, Malek NP, Bock CT, Rakemann T, Manns MP, Trautwein C. NF-kappaB determines between apoptosis and proliferation in hepatocytes during liver regeneration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;278(1):G173-83.
60. Chen F, Castranova V, Shi X. New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am J Pathol*. 2001;159(2):387-97.
61. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann TG, Hehner SP, Droge W, Schmitz ML. The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur J Biochem*. 2000;267(12):3828-35.
62. Qin JZ, Bacon P, Chaturvedi V, Nickoloff BJ. Role of NF-kappaB activity in apoptotic response of keratinocytes mediated by interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Invest Dermatol*. 2001;117(4):898-907.
63. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 2006;441(7092):431-6.

64. Karin M. NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets. *Mol Carcinog.* 2006;45(6):355-61.
65. Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors.* 2007;29(1):19-35.
66. Shih VF, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A. A single NFkappaB system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res.* 2011;21(1):86-102.
67. Schutze S, Wiegmann K, Machleidt T, Kronke M. TNF-induced activation of NF-kappa B. *Immunobiology.* 1995;193(2-4):193-203.
68. Stylianou E, O'Neill LA, Rawlinson L, Edbrooke MR, Woo P, Saklatvala J. Interleukin 1 induces NF-kappa B through its type I but not its type II receptor in lymphocytes. *J Biol Chem.* 1992;267(22):15836-41.
69. Bonizzi G, Dejardin E, Piret B, Piette J, Merville MP, Bours V. Interleukin-1 beta induces nuclear factor kappa B in epithelial cells independently of the production of reactive oxygen intermediates. *Eur J Biochem.* 1996;242(3):544-9.
70. Andreakos E, Sacre SM, Smith C, Lundberg A, Kiriakidis S, Stonehouse T, et al. Distinct pathways of LPS-induced NF-kappa B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. *Blood.* 2004;103(6):2229-37.
71. Sharif O, Bolshakov VN, Raines S, Newham P, Perkins ND. Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages. *BMC Immunol.* 2007;8:1.
72. Israel A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(3):a000158.
73. Dejardin E, Droin NM, Delhase M, Haas E, Cao Y, Makris C, et al. The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity.* 2002;17(4):525-35.
74. Coope HJ, Atkinson PG, Huhse B, Belich M, Janzen J, Holman MJ, et al. CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J.* 2002;21(20):5375-85.
75. Taura M, Kudo E, Kariya R, Goto H, Matsuda K, Hattori S, et al. COMMD1/Murr1 reinforces HIV-1 latent infection through IkappaB-alpha stabilization. *J Virol.* 2015;89(5):2643-58.
76. Maine GN, Mao X, Komarck CM, Burstein E. COMMD1 promotes the ubiquitination of NF-kappaB subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase. *EMBO J.* 2007;26(2):436-47.



77. Tran K, Merika M, Thanos D. Distinct functional properties of IkappaB alpha and IkappaB beta. *Mol Cell Biol.* 1997;17(9):5386-99.
78. Ganesh L, Burstein E, Guha-Niyogi A, Louder MK, Mascola JR, Klomp LW, et al. The gene product Murr1 restricts HIV-1 replication in resting CD4+ lymphocytes. *Nature.* 2003;426(6968):853-7.
79. Esposito E, Napolitano G, Pescatore A, Calculli G, Incoronato MR, Leonardi A, et al. COMMD7 as a novel NEMO interacting protein involved in the termination of NF-kappaB signaling. *J Cell Physiol.* 2016;231(1):152-61.
80. Yang SS, Li XM, Yang M, Ren XL, Hu JL, Zhu XH, et al. FMNL2 destabilises COMMD10 to activate NF-kappaB pathway in invasion and metastasis of colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2017;117(8):1164-75.
81. Fuchs SY, Chen A, Xiong Y, Pan ZQ, Ronai Z. HOS, a human homolog of Slimb, forms an SCF complex with Skp1 and Cullin1 and targets the phosphorylation-dependent degradation of IkappaB and beta-catenin. *Oncogene.* 1999;18(12):2039-46.
82. McNally KE, Cullen PJ. Endosomal Retrieval of Cargo: Retromer Is Not Alone. *Trends Cell Biol.* 2018;28(10):807-22.
83. Wijers M, Kuivenhoven JA, van de Sluis B. The life cycle of the low-density lipoprotein receptor: insights from cellular and in-vivo studies. *Curr Opin Lipidol.* 2015;26(2):82-7.
84. Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* 1990;265(6):3116-23.
85. Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* 2009;137(2):216-33.
86. Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ, et al. A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell.* 2000;5(2):197-206.
87. Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, et al. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell.* 2000;5(2):207-16.
88. Borggreffe T, Oswald F. The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(10):1631-46.

89. Zhan W, Wang W, Han T, Xie C, Zhang T, Gan M, et al. COMMD9 promotes TFDP1/E2F1 transcriptional activity via interaction with TFDP1 in non-small cell lung cancer. *Cell Signal.* 2017;30:59-66.
90. Korkola JE, Houldsworth J, Chadalavada RS, Olshen AB, Dobrzynski D, Reuter VE, et al. Down-regulation of stem cell genes, including those in a 200-kb gene cluster at 12p13.31, is associated with in vivo differentiation of human male germ cell tumors. *Cancer Res.* 2006;66(2):820-7.
91. Sperger JM, Chen X, Draper JS, Antosiewicz JE, Chon CH, Jones SB, et al. Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(23):13350-5.
92. Buchholz M, Braun M, Heidenblut A, Kestler HA, Kloppel G, Schmiegel W, et al. Transcriptome analysis of microdissected pancreatic intraepithelial neoplastic lesions. *Oncogene.* 2005;24(44):6626-36.
93. Lancaster JM, Dressman HK, Whitaker RS, Havrilesky L, Gray J, Marks JR, et al. Gene expression patterns that characterize advanced stage serous ovarian cancers. *J Soc Gynecol Investig.* 2004;11(1):51-9.
94. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, et al. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med.* 2008;14(5):518-27.
95. van de Sluis B, Mao X, Zhai Y, Groot AJ, Vermeulen JF, van der Wall E, et al. COMMD1 disrupts HIF-1alpha/beta dimerization and inhibits human tumor cell invasion. *J Clin Invest.* 2010;120(6):2119-30.
96. Chen BL, Yu J, Zeng ZR, Chu WK, Wong CY, Cheng YY, et al. Rosiglitazone suppresses gastric carcinogenesis by up-regulating HCaRG expression. *Oncol Rep.* 2008;20(5):1093-7.
97. Zheng L, Liang P, Li J, Huang XB, Liu SC, Zhao HZ, et al. ShRNA-targeted COMMD7 suppresses hepatocellular carcinoma growth. *PLoS One.* 2012;7(9):e45412.
98. Zheng L, Deng CL, Wang L, Huang XB, You N, Tang YC, et al. COMMD7 is correlated with a novel NF-kappaB positive feedback loop in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(22):32774-84.
99. Fernandez Masso JR, Oliva Arguelles B, Tejeda Y, Astrada S, Garay H, Reyes O, et al. The Antitumor Peptide CIGB-552 Increases COMMD1 and Inhibits Growth of Human Lung Cancer Cells. *J Amino Acids.* 2013;2013:251398.
100. Fedoseienko A, Wieringa HW, Wisman GB, Duiker E, Reyners AK, Hofker MH, et al. Nuclear COMMD1 Is Associated with Cisplatin Sensitivity in Ovarian Cancer. *PLoS One.* 2016;11(10):e0165385.

101. Devlin AM, Solban N, Tremblay S, Gutkowska J, Schurch W, Orlov SN, et al. HCaRG is a novel regulator of renal epithelial cell growth and differentiation causing G2M arrest. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;284(4):F753-62.
102. Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2016;42:63-71.
103. Kurosaka S, Kashina A. Cell biology of embryonic migration. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2008;84(2):102-22.
104. Reig G, Pulgar E, Concha ML. Cell migration: from tissue culture to embryos. *Development*. 2014;141(10):1999-2013.
105. Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J. Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17(5):559-64.
106. Li L, He Y, Zhao M, Jiang J. Collective cell migration: Implications for wound healing and cancer invasion. *Burns Trauma*. 2013;1(1):21-6.
107. El Hader C, Tremblay S, Solban N, Gingras D, Beliveau R, Orlov SN, et al. HCaRG increases renal cell migration by a TGF-alpha autocrine loop mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289(6):F1273-80.
108. Matsuda H, Lavoie JL, Gaboury L, Hamet P, Tremblay J. HCaRG accelerates tubular repair after ischemic kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(11):2077-89.
109. Kumar S. Cellular and molecular pathways of renal repair after acute kidney injury. *Kidney Int*. 2018;93(1):27-40.
110. Chang-Panesso M, Humphreys BD. Cellular plasticity in kidney injury and repair. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(1):39-46.
111. Tsuchiya T, Okada M, Ueda M, Yasukochi Y. Activation of the erythropoietin promoter by a point mutation from GATA to TATA in the -30 region. *J Biochem*. 1997;121(2):193-6.
112. Imagawa S, Nakano Y, Obara N, Suzuki N, Doi T, Kodama T, et al. A GATA-specific inhibitor (K-7174) rescues anemia induced by IL-1beta, TNF-alpha, or L-NMMA. *FASEB J*. 2003;17(12):1742-4.
113. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1995;270(3):1230-7.
114. Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production. *J Physiol*. 2011;589(Pt 6):1251-8.

115. Jeon US. Kidney and calcium homeostasis. *Electrolyte Blood Press.* 2008;6(2):68-76.
116. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7-30.
117. Capitanio U, Bensalah K, Bex A, Boorjian SA, Bray F, Coleman J, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol.* 2019;75(1):74-84.
118. Thompson RH, Ordonez MA, Iasonos A, Secin FP, Guillonneau B, Russo P, et al. Renal cell carcinoma in young and old patients--is there a difference? *J Urol.* 2008;180(4):1262-6; discussion 6.
119. Chow WH, Gridley G, Fraumeni JF, Jr., Jarvholm B. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *N Engl J Med.* 2000;343(18):1305-11.
120. Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, et al. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(2):99-106.
121. Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer.* 2005;114(1):101-8.
122. Bjorge T, Tretli S, Engeland A. Relation of height and body mass index to renal cell carcinoma in two million Norwegian men and women. *Am J Epidemiol.* 2004;160(12):1168-76.
123. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(8):579-91.
124. Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA.* 2006;295(13):1549-55.
125. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet.* 2008;371(9612):569-78.
126. Grossman E, Messerli FH, Boyko V, Goldbourt U. Is there an association between hypertension and cancer mortality? *Am J Med.* 2002;112(6):479-86.
127. Weikert S, Boeing H, Pischon T, Weikert C, Olsen A, Tjonneland A, et al. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol.* 2008;167(4):438-46.
128. Nayan M, Juurlink DN, Austin PC, Macdonald EM, Finelli A, Kulkarni GS, et al. Medication use and kidney cancer risk: A population-based study. *Eur J Cancer.* 2017;83:203-10.

129. Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol.* 2010;7(5):245-57.
130. Cote ML, Colt JS, Schwartz KL, Wacholder S, Ruterbusch JJ, Davis F, et al. Cigarette smoking and renal cell carcinoma risk among black and white Americans: effect modification by hypertension and obesity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012;21(5):770-9.
131. Ashouri K, Mohseni S, Tourtelot J, Sharma P, Spiess PE. Implications of Von Hippel-Lindau Syndrome and Renal Cell Carcinoma. *J Kidney Cancer VHL.* 2015;2(4):163-73.
132. Maher ER, Kaelin WG, Jr. von Hippel-Lindau disease. *Medicine (Baltimore).* 1997;76(6):381-91.
133. Lonser RR, Glenn GM, Walther M, Chew EY, Libutti SK, Linehan WM, et al. von Hippel-Lindau disease. *Lancet.* 2003;361(9374):2059-67.
134. Maher ER, Iselius L, Yates JR, Littler M, Benjamin C, Harris R, et al. Von Hippel-Lindau disease: a genetic study. *J Med Genet.* 1991;28(7):443-7.
135. Barontini M, Dahia PL. VHL disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010;24(3):401-13.
136. Muglia VF, Prando A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiol Bras.* 2015;48(3):166-74.
137. Lopez-Beltran A, Carrasco JC, Cheng L, Scarpelli M, Kirkali Z, Montironi R. 2009 update on the classification of renal epithelial tumors in adults. *Int J Urol.* 2009;16(5):432-43.
138. Delahunt B, Eble JN. Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod Pathol.* 1997;10(6):537-44.
139. Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2003;27(5):612-24.
140. Gunawan B, von Heydebreck A, Fritsch T, Huber W, Ringert RH, Jakse G, et al. Cytogenetic and morphologic typing of 58 papillary renal cell carcinomas: evidence for a cytogenetic evolution of type 2 from type 1 tumors. *Cancer Res.* 2003;63(19):6200-5.
141. Zini L, Leroy X, Lemaitre L, Devos P, Aubert S, Biserte J, et al. Tumour necrosis in chromophobe renal cell carcinoma: clinical data to distinguish aggressive variants. *Eur J Surg Oncol.* 2008;34(6):687-91.
142. Vera-Badillo FE, Conde E, Duran I. Chromophobe renal cell carcinoma: a review of an uncommon entity. *Int J Urol.* 2012;19(10):894-900.

143. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2005;353(23):2477-90.
144. Outwater EK, Bhatia M, Siegelman ES, Burke MA, Mitchell DG. Lipid in renal clear cell carcinoma: detection on opposed-phase gradient-echo MR images. *Radiology*. 1997;205(1):103-7.
145. Lim J, Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development*. 2012;139(19):3471-86.
146. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420-8.
147. Lee CH, Chang JS, Syu SH, Wong TS, Chan JY, Tang YC, et al. IL-1beta promotes malignant transformation and tumor aggressiveness in oral cancer. *J Cell Physiol*. 2015;230(4):875-84.
148. Yadav A, Kumar B, Datta J, Teknos TN, Kumar P. IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway. *Mol Cancer Res*. 2011;9(12):1658-67.
149. Rokavec M, Oner MG, Li H, Jackstadt R, Jiang L, Lodygin D, et al. IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis. *J Clin Invest*. 2014;124(4):1853-67.
150. Fu XT, Dai Z, Song K, Zhang ZJ, Zhou ZJ, Zhou SL, et al. Macrophage-secreted IL-8 induces epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells by activating the JAK2/STAT3/Snail pathway. *Int J Oncol*. 2015;46(2):587-96.
151. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(3):178-96.
152. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*. 2009;19(2):156-72.
153. Willis BC, Borok Z. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293(3):L525-34.
154. Zhang W, Shi X, Peng Y, Wu M, Zhang P, Xie R, et al. HIF-1alpha Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis through Direct Regulation of ZEB1 in Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129603.
155. Yang SW, Zhang ZG, Hao YX, Zhao YL, Qian F, Shi Y, et al. HIF-1alpha induces the epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer stem cells through the Snail pathway. *Oncotarget*. 2017;8(6):9535-45.

156. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, et al. Direct regulation of TWIST by HIF-1 $\alpha$  promotes metastasis. *Nat Cell Biol.* 2008;10(3):295-305.
157. Huang RY, Guilford P, Thiery JP. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 19):4417-22.
158. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* 2007;7(6):415-28.
159. De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(2):97-110.
160. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(2):131-42.
161. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28(1-2):15-33.
162. Nistico P, Bissell MJ, Radisky DC. Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(2).
163. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development.* 2005;132(14):3151-61.
164. Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(3):155-66.
165. Ayyanathan K, Peng H, Hou Z, Fredericks WJ, Goyal RK, Langer EM, et al. The Ajuba LIM domain protein is a corepressor for SNAG domain mediated repression and participates in nucleocytoplasmic shuttling. *Cancer Res.* 2007;67(19):9097-106.
166. Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol.* 2004;24(1):306-19.
167. Hou Z, Peng H, Ayyanathan K, Yan KP, Langer EM, Longmore GD, et al. The LIM protein AJUBA recruits protein arginine methyltransferase 5 to mediate SNAIL-dependent transcriptional repression. *Mol Cell Biol.* 2008;28(10):3198-207.
168. Herranz N, Pasini D, Diaz VM, Franci C, Gutierrez A, Dave N, et al. Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor. *Mol Cell Biol.* 2008;28(15):4772-81.

169. Martinez-Estrada OM, Culleres A, Soriano FX, Peinado H, Bolos V, Martinez FO, et al. The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem J.* 2006;394(Pt 2):449-57.
170. Miyoshi A, Kitajima Y, Kido S, Shimonishi T, Matsuyama S, Kitahara K, et al. Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 2005;92(2):252-8.
171. Vandewalle C, Van Roy F, Berx G. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(5):773-87.
172. Postigo AA, Dean DC. ZEB represses transcription through interaction with the corepressor CtBP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(12):6683-8.
173. Fu J, Qin L, He T, Qin J, Hong J, Wong J, et al. The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis. *Cell Res.* 2011;21(2):275-89.
174. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
175. Baulida J. Epithelial-to-mesenchymal transition transcription factors in cancer-associated fibroblasts. *Mol Oncol.* 2017;11(7):847-59.
176. Harb OA, Elfeky MA, El Shafaay BS, Taha HF, Osman G, Harera IS, et al. SPOP, ZEB-1 and E-cadherin expression in clear cell renal cell carcinoma (cc-RCC): Clinicopathological and prognostic significance. *Pathophysiology.* 2018;25(4):335-45.
177. Ohba K, Miyata Y, Matsuo T, Asai A, Mitsunari K, Shida Y, et al. High expression of Twist is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(6):3158-65.
178. Mikami S, Katsube K, Oya M, Ishida M, Kosaka T, Mizuno R, et al. Expression of Snail and Slug in renal cell carcinoma: E-cadherin repressor Snail is associated with cancer invasion and prognosis. *Lab Invest.* 2011;91(10):1443-58.
179. Saitoh M. Involvement of partial EMT in cancer progression. *J Biochem.* 2018;164(4):257-64.
180. Mendes O, Kim HT, Stoica G. Expression of MMP2, MMP9 and MMP3 in breast cancer brain metastasis in a rat model. *Clin Exp Metastasis.* 2005;22(3):237-46.
181. Schmalfeldt B, Prechtel D, Harting K, Spathe K, Rutke S, Konik E, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7(8):2396-404.



182. Shay G, Lynch CC, Fingleton B. Moving targets: Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis. *Matrix Biol.* 2015;44-46:200-6.
183. Banyard J, Bielenberg DR. The role of EMT and MET in cancer dissemination. *Connect Tissue Res.* 2015;56(5):403-13.
184. Roskoski R, Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res.* 2014;79:34-74.
185. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;59(2 Suppl):21-6.
186. Kim J, Kong J, Chang H, Kim H, Kim A. EGF induces epithelial-mesenchymal transition through phospho-Smad2/3-Snail signaling pathway in breast cancer cells. *Oncotarget.* 2016;7(51):85021-32.
187. Anand M, Van Meter TE, Fillmore HL. Epidermal growth factor induces matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) expression and invasion in glioma cell lines via the MAPK pathway. *J Neurooncol.* 2011;104(3):679-87.
188. Chen XC, Wei XT, Guan JH, Shu H, Chen D. EGF stimulates glioblastoma metastasis by induction of matrix metalloproteinase-9 in an EGFR-dependent mechanism. *Oncotarget.* 2017;8(39):65969-82.
189. Masuda H, Zhang D, Bartholomeusz C, Doihara H, Hortobagyi GN, Ueno NT. Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;136(2):331-45.
190. Singh B, Carpenter G, Coffey RJ. EGF receptor ligands: recent advances. *F1000Res.* 2016;5.
191. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene.* 2000;19(21):2474-88.
192. Oliva JL, Griner EM, Kazanietz MG. PKC isozymes and diacylglycerol-regulated proteins as effectors of growth factor receptors. *Growth Factors.* 2005;23(4):245-52.
193. Sorkin A, Goh LK. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res.* 2009;315(4):683-96.
194. Sousa LP, Lax I, Shen H, Ferguson SM, De Camilli P, Schlessinger J. Suppression of EGFR endocytosis by dynamin depletion reveals that EGFR signaling occurs primarily at the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(12):4419-24.

195. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(7):505-16.
196. Stadlmann S, Gueth U, Reiser U, Diener PA, Zeimet AG, Wight E, et al. Epithelial growth factor receptor status in primary and recurrent ovarian cancer. *Mod Pathol.* 2006;19(4):607-10.
197. Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene.* 2009;28 Suppl 1:S24-31.
198. Xu H, Zong H, Ma C, Ming X, Shang M, Li K, et al. Epidermal growth factor receptor in glioblastoma. *Oncol Lett.* 2017;14(1):512-6.
199. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem.* 1979;48:193-216.
200. Gan HK, Cvrljevic AN, Johns TG. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. *FEBS J.* 2013;280(21):5350-70.
201. Nishino M, Suda K, Kobayashi Y, Ohara S, Fujino T, Koga T, et al. Effects of secondary EGFR mutations on resistance against upfront osimertinib in cells with EGFR-activating mutations in vitro. *Lung Cancer.* 2018;126:149-55.
202. Grandal MV, Zandi R, Pedersen MW, Willumsen BM, van Deurs B, Poulsen HS. EGFRvIII escapes down-regulation due to impaired internalization and sorting to lysosomes. *Carcinogenesis.* 2007;28(7):1408-17.
203. Keller S, Schmidt MHH. EGFR and EGFRvIII Promote Angiogenesis and Cell Invasion in Glioblastoma: Combination Therapies for an Effective Treatment. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6).
204. Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, Ramirez G, Gunn G, Zoltick PW, et al. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res.* 1995;55(23):5536-9.
205. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med.* 2005;2(3):e73.
206. Challapalli A, Carroll L, Aboagye EO. Molecular mechanisms of hypoxia in cancer. *Clin Transl Imaging.* 2017;5(3):225-53.
207. Liao D, Johnson RS. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26(2):281-90.
208. Vaupel P, Mayer A, Hockel M. Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol.* 2004;381:335-54.

209. Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.* 1996;56(19):4509-15.
210. Rankin EB, Giaccia AJ. Hypoxic control of metastasis. *Science.* 2016;352(6282):175-80.
211. Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med.* 2007;80(2):51-60.
212. Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2014;49(1):1-15.
213. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(12):5510-4.
214. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem.* 1997;272(36):22642-7.
215. Metzen E, Ratcliffe PJ. HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing. *Biol Chem.* 2004;385(3-4):223-30.
216. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* 2001;107(1):43-54.
217. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science.* 2001;292(5516):464-8.
218. Mole DR, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing. *IUBMB Life.* 2001;52(1-2):43-7.
219. Wenger RH, Gassmann M. Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem.* 1997;378(7):609-16.
220. Semenza GL. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:551-78.
221. Luo D, Wang J, Li J, Post M. Mouse snail is a target gene for HIF. *Mol Cancer Res.* 2011;9(2):234-45.

222. Rednam SP, Erez A, Druker H, Janeway KA, Kamihara J, Kohlmann WK, et al. Von Hippel-Lindau and Hereditary Pheochromocytoma/Paraganglioma Syndromes: Clinical Features, Genetics, and Surveillance Recommendations in Childhood. *Clin Cancer Res.* 2017;23(12):e68-e75.
223. Wu D, Yotnda P. Induction and testing of hypoxia in cell culture. *J Vis Exp.* 2011(54).
224. Schodel J, Grampp S, Maher ER, Moch H, Ratcliffe PJ, Russo P, et al. Hypoxia, Hypoxia-inducible Transcription Factors, and Renal Cancer. *Eur Urol.* 2016;69(4):646-57.
225. Klatte T, Seligson DB, Riggs SB, Leppert JT, Berkman MK, Kleid MD, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007;13(24):7388-93.
226. Cho NH, Shim HS, Rha SY, Kang SH, Hong SH, Choi YD, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase 9 correlates with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2003;44(5):560-6.
227. Sumi T, Nakatani T, Yoshida H, Hyun Y, Yasui T, Matsumoto Y, et al. Expression of matrix metalloproteinases 7 and 2 in human renal cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2003;10(3):567-70.
228. Abdel-Wahed MM, Asaad NY, Aleskandarany M. Expression of matrix metalloproteinase-2 in renal cell carcinoma. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2004;16(3):168-77.
229. Kallakury BV, Karikehalli S, Haholu A, Sheehan CE, Azumi N, Ross JS. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2001;7(10):3113-9.
230. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9(6):669-76.
231. Zheng L, You N, Huang X, Gu H, Wu K, Mi N, et al. COMMD7 Regulates NF-kappaB Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma Stem-like Cells. *Mol Ther Oncolytics.* 2019;12:112-23.
232. Vonk WI, Bartuzi P, de Bie P, Kloosterhuis N, Wichers CG, Berger R, et al. Liver-specific Commd1 knockout mice are susceptible to hepatic copper accumulation. *PLoS One.* 2011;6(12):e29183.
233. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(1):9-29.

234. Noone AM, Hn, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015. SEER web site. 2018.
235. Murata K, Fang C, Terao C, Giannopoulou EG, Lee YJ, Lee MJ, et al. Hypoxia-Sensitive COMMD1 Integrates Signaling and Cellular Metabolism in Human Macrophages and Suppresses Osteoclastogenesis. *Immunity*. 2017;47(1):66-79 e5.
236. Morgillo F, Della Corte CM, Fasano M, Ciardiello F. Mechanisms of resistance to EGFR-targeted drugs: lung cancer. *ESMO Open*. 2016;1(3):e000060.
237. Minner S, Rump D, Tennstedt P, Simon R, Burandt E, Terracciano L, et al. Epidermal growth factor receptor protein expression and genomic alterations in renal cell carcinoma. *Cancer*. 2012;118(5):1268-75.
238. Cossu-Rocca P, Muroli MR, Sanges F, Sotgiu G, Asunis A, Tanca L, et al. EGFR kinase-dependent and kinase-independent roles in clear cell renal cell carcinoma. *Am J Cancer Res*. 2016;6(1):71-83.
239. Harada K, Miyake H, Kusuda Y, Fujisawa M. Expression of epithelial-mesenchymal transition markers in renal cell carcinoma: impact on prognostic outcomes in patients undergoing radical nephrectomy. *BJU Int*. 2012;110(11 Pt C):E1131-7.
240. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger, et al. Renal cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Mar 9;3:17009.
241. Vergara D, Simeone P, Franck J, Trerotola M, Giudetti A, Capobianco, et al. Translating epithelial mesenchymal transition markers into the clinic: Novel insights from proteomics. *EuPA Open Proteom*. 2016 Jan 6;10:31-41.

**Annexe : Role of HCaRG/COMMD5 in tumor suppression and  
cell differentiation and its subtelomeric position to  
chromosome 8: Coincidence or consequence?**

Carole G. Champion, Thomas Verissimo, Suzanne Cossette and Johanne Tremblay

*Article en préparation*

## **A - Résumé de la revue**

Les différentes études sur les protéines COMMD ont montré qu'elles étaient des facteurs impliqués dans la régulation de nombreux processus cellulaires et physiologiques. Plus récemment, de nombreuses études ont montré que certains membres de la famille de protéines COMMD sont des modulateurs polyvalents de la progression tumorale. Dans la plupart des cancers, la diminution de l'expression de COMMD est associée à une progression tumorale et à un mauvais pronostic. Cependant, des altérations génétiques conduisant à une amplification des protéines COMMD ont été observées dans certains cas de cancers et en particulier pour COMMD5. De manière intéressante, COMMD5 est le seul membre de cette famille qui se situe à l'extrémité du chromosome 8 chez l'homme, dans la région subtélomérique.

Cette revue présente le lien potentiel entre la position subtélomérique de COMMD5 et son association avec la progression du cancer, la différenciation cellulaire et la sénescence. Enfin, nous discutons de l'équilibre entre l'expression de COMMD5, ses propriétés fonctionnelles et sa susceptibilité aux maladies.

### **Participations des auteurs**

Dre Carole G. Campion et Dre Johanne Tremblay ont rédigé le manuscrit. Dre Carole G Campion a effectué l'ensemble de la recherche bibliographie. Thomas Verissimo a participé à

l'organisation de la revue et à sa correction. Suzanne Cossette a également participé à l'organisation et à la correction de la revue.



# **Role of HCaRG/COMMD5 in tumor suppression and cell differentiation and its subtelomeric position to chromosome 8: Coincidence or consequence?**

Carole G. Campion<sup>1,2</sup>, Thomas Verissimo<sup>1,2</sup>, Suzanne Cossette<sup>1</sup> and Johanne Tremblay<sup>1,2</sup>

Running title: Subtelomeric position of HCaRG/COMMD5 to chromosome 8

Authors' affiliations:

<sup>1</sup>Centre de Recherche, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada, H2X 0A9

<sup>2</sup>Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4

Correspondence to: Dr. J. Tremblay, CRCHUM, Room R14.400, 900 Saint-Denis Street, Montréal, Québec, Canada H2X 0A9. Telephone: +1 514-890-8000 (23607); Fax: +1 514-412-7655; Email: [johanne.tremblay@umontreal.ca](mailto:johanne.tremblay@umontreal.ca)

**Keywords: COMMD5/HCaRG,**

## **Abstract**

COMMD proteins are pleiotropic factors involved in the regulation of many cellular and physiological processes. Several members of the COMMD protein family have emerged as versatile modulators of tumor progression. In most cancers, downregulation of COMMD expression is associated with tumor progression and poor prognosis. However, genetic alterations leading to amplification of COMMD proteins have been observed in some cases of cancers and particularly for COMMD5. Interestingly, COMMD5 is the only member of this family that is located at the extremity of chromosome 8 in humans, in the telomeric region. This review presents the potential link between the subtelomeric position of COMMD5 and its association with cancer progression, cell differentiation and senescence. Finally, we discuss the balance between COMMD5 expression, its functional properties and disease susceptibility.

## COMMDs proteins and cancer

COMMD proteins are part of a large multiprotein complex named Commander that contains up to 15 subunits including the CCC complex: COMMD proteins (1-10), CCDC22, and CCDC93, and three other components: C16orf62, SH3GLB1, and DSCR31. This complex is highly conserved in vertebrates suggesting that it is of central importance for vital cellular functions<sup>1–3</sup>. COMMD proteins have pleiotropic functions including in copper metabolism<sup>4,5</sup>, ubiquitination<sup>6–8</sup>, adaptation to hypoxia<sup>9,10</sup>, pro-inflammatory signaling<sup>8,11,12</sup>, electrolyte transport<sup>13</sup> and endocytic sorting and recycling of various membrane proteins<sup>4,14–16</sup>. Only few studies have recognized COMMD proteins as potential therapeutic targets in cancer and most of them suggested that COMMDs had tumor suppressor properties (Figure 1). COMMD1 has been the most studied in cancer and decreased COMMD1 expression was shown to be associated with increased tumor invasion and worse survival<sup>9</sup>. COMMD1 expression is reduced in ovarian cancer<sup>9,17</sup>, neuroblastoma<sup>18</sup>, prostate cancer<sup>9,19</sup>, head and neck squamous-cell carcinoma (HNSCC)<sup>20</sup>, lung cancer<sup>21</sup> and colitis-associated cancer progression<sup>22</sup>. As COMMD1 is a suppressor of both the NF- $\kappa$ B and HIF pathways which are transcriptional regulators of inflammation that play important roles in oncogenesis, it is not surprising that COMMD1 expression was correlated with patients' survival in these cancers<sup>9</sup>. Expression of nuclear COMMD1 has been related to ovarian cancer cell sensitivity to cisplatin-induced cytotoxicity by modulating cell cycle and controlling the expression of genes involved in DNA repair and apoptosis<sup>17</sup>. The nuclear complex composed of F-actin, DRR1 and COMMD1 has also been associated to NF- $\kappa$ B degradation and cell cycle suppression in neuroblastoma cells<sup>18</sup>. Down-regulation of COMMD1 inversely correlated with the upregulation of NF- $\kappa$ B-regulated

pro-inflammatory genes during acquisition of stemness in head and neck squamous-cell carcinoma (HNSCC) cells<sup>20</sup>. In colorectal cancer cells, COMMD10 also targeted NF- $\kappa$ B (p65 subunit) and reduced its nuclear translocation, thereby leading to the inactivation of NF- $\kappa$ B pathway promoting cancer cell invasion and metastasis<sup>23</sup>. The mRNA levels of COMMD3, COMMD4, COMMD5, COMMD6 and COMMD8 are significantly lower in non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines, whereas COMMD9 is up-regulated and promotes the development of NSCLC by interacting with the TFDP1/E2F1 through its COMM domain<sup>24</sup>.

COMMD5/HCaRG is the second member of COMMD protein family most frequently related to cancer in the literature. Our studies strongly supported a role for COMMD5 in the acquisition and maintenance of the epithelial cell phenotype, and suggested a tumor suppressor gene function<sup>16,25–29</sup>. COMMD5 levels are low in various cancer cell lines in rodents and humans<sup>25–28</sup>. We found that COMMD5 was underexpressed in human clear-cell renal cell carcinomas (CCRCCc) from 117 patients<sup>29</sup>. Its expression was maintained in normal tissues adjacent to small renal tumors, while low expression was observed in normal adjacent tissues of larger size RCCs in patients with poor prognosis. Low COMMD5 levels in tissues adjacent to tumors were associated with worse clinical outcome (recurrence-free survival curves/5 years of patients)<sup>29</sup>. COMMD5/HCaRG overexpression inhibited tumor growth and angiogenesis in a homograft renal carcinoma mouse model by promoting de-phosphorylation of ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 and EGFR, leading to inhibition of ErbB signaling pathways<sup>29</sup>. A significant down-regulation of COMMD5 was also observed in human gastric cancerous tissues

compared with their adjacent normal gastric mucosa<sup>30</sup>. In this study, COMMD5 up-regulation by rosiglitazone was shown to suppress the growth of gastric cancer in the rat model.

Even if most studies reported lower COMMD expression levels in a variety of cancers and correlated them with tumor progression, a few publications reported some oncogenic properties (Figure 1). Interestingly, their potential involvement in tumor progression was always associated to chromosomal abnormalities and genetic alterations. Several studies investigated the genetic basis of variations in gene expression with cancer susceptibility by performing whole genome array, single-nucleotide polymorphism array, and next-generation sequencing analyses. Molecular events were identified and associated with increased risk of malignancy, tumor relapse, and poor survival. Recurrent DNA amplifications, and gain of chromosome material at COMMD1, COMMD5 and COMMD3 loci have been reported in lymphoma<sup>31–34</sup>, leukemia<sup>35,36</sup>, colorectal cancer<sup>37</sup>, hepatocellular carcinoma<sup>38</sup> and oral squamous cell carcinoma<sup>39</sup>. We noted that COMMD5 was the most frequently altered gene among the COMMD members that was associated to tumor progression.

### **The unique COMMD5 subtelomeric position**

COMMD5 is the only COMMD family member located at the extreme end of chromosome 8, 8q24.3 (Figure 2). COMMD5 is the fourth protein-coding gene from the end of the chromosome. The extreme ends of eukaryotic chromosomes, the telomeres, are special structures that provide protection from enzymatic end-degradation and are crucial to the maintenance of chromosome integrity and genomic stability<sup>40</sup>. Many studies suggested that

shortened telomeres is linked not only to a risk of cancer susceptibility<sup>41–43</sup>, but also to the maintenance of malignancy by regulating cancer cell differentiation<sup>40,44</sup>.

### **Chromosome 8q24.3 alterations and cancer susceptibility**

Genome wide association studies (GWAS) have identified a large number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and the majority of common risk variants discovered to date lie outside coding regions (e.g., intronic and intergenic regions). However, a particularly interesting set of risk loci is clustered within the 8q24 region (chr.8q24) and is linked to susceptibility to prostate<sup>45–47</sup>, breast<sup>48–50</sup>, colon<sup>51–53</sup>, ovarian<sup>54,55</sup>, and bladder<sup>56</sup> cancers and chronic lymphocytic leukemia<sup>57</sup>. In addition, the 8q24 region has recently been identified in a large-scale study across human cancers as the most frequently amplified region<sup>58</sup>. One gene found within this chr.8q24 region, MYC, is the most frequently amplified protein-coding gene across all cancer types<sup>58</sup>. Some genetic studies have related CNV-associated COMMD5 transcripts to cancer progression. Using Affymetrix SNP 6.0 and Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 ST arrays, Peng et al. identified recurrent DNA amplifications scattered from 8q22.2 to 8q24.3 loci in 112 Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) specimens<sup>39</sup>. COMMD5 was found within the amplicons that could be critical to OSCC progression and these DNA amplifications were associated with poor survival, and possible early development of second primary tumors. An integrative genomic analysis of a large set of patients with fibrolamellar hepatocellular carcinoma (FLC) that used next-generation sequencing, SNP-array and whole-transcriptome analysis, showed that the most frequent focally amplified locus was at 8q24.3 in 4/32 patients (12.5%) spanned several genes including

COMMD538. High-resolution cytogenetic techniques that combine laser capture microdissection with microarray-based comparative genomic hybridization technology provided new opportunities to investigate genome-wide DNA alterations in limited-sized lesions<sup>59,60</sup>. Using these technologies, Slovak et al. compared the Hodgkin lymphoma molecular karyotypes to the genomic profiles of germinal center B cells and treatment outcome (chemotherapy responsive vs. primary refractory disease). Among the most frequent gains (>65%), they identified the 8q24.3 region that includes genes associated with growth and proliferation and COMMD5 was among them. A recent study examined copy number aberrations in the subtelomeric regions of a patient with de novo acute monocytic leukemia<sup>36</sup>. COMMD5 was located within 33.7 % of subtelomeric regions which presented segmental duplications.

As described in literature, gain of 8q24 region is recurrent in genome-wide association study of cancer. Through its position on chromosome 8q24.3, COMMD5 is clearly a target for copy-number alteration, and thus a candidate gene for cancer susceptibility.

### **COMMD5, a future genetic biomarker for cancer prognosis?**

We analyzed the type and frequency of mutations and copy number variations (CNV) in the COMMD protein family reported in the cBioPortal database. This analysis included data from 71,614 samples of different tumor types from 231 studies. We found that only COMMD2, COMMD5 and COMMD9 presented >10% CNV or mutations (Figure 3A). COMMD5 alterations were detected in eight cancer studies as compared to four for COMMD2 and only one for COMMD9. The majority of COMMD5 genetic variations corresponded to amplifications with a very low frequency of gene mutations and deep deletions. High-level amplification of

COMMD5 was observed in prostate and ovarian cancers. To determine the impact of COMMD5 amplification on its expression, we investigated cancer studies that reported mRNA expression profiles. We found that copy-number gain of COMMD5 strongly correlated with its mRNA upregulation in prostate and ovarian cancers (Figure 3B). None of the other COMMD members showed high mRNA levels in these two types of cancers. It is not surprising, as chromosome 8q24 has emerged as an important susceptibility region for several cancers, including prostate<sup>46,61–63</sup> and ovarian cancers<sup>54,55,64</sup>. Three studies also suggested that 8q24 DNA methylation levels may be associated with prostate cancer risk<sup>65–67</sup>. COMMD5 could become a new prostate and ovarian cancer susceptibility locus on chromosome 8q24.

We also screened COMMD5 mutations in the 231 studies used below and evaluated their consequence on COMMD5 functions. Among the 44 reported mutations associated to cancer, 34 were located on within the COMMD5-specific sequence, and only 10 were located in the COMM domain, a highly conserved 70-85 long residue domain near the C-terminal end of all COMMDs members (Figure 3C). We used PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) tool to predict possible impact of amino acid substitution on the structure and function of human proteins. We found that ~14% of mutations in COMMD5 specific region were probably damaging (high confidence) and ~9% were possibly damaging (low confidence) for COMMD5 functions. Among cancer-associated COMMD5 mutations, we found prostate, breast, lung carcinoma, leukemia and renal clear cell carcinoma (RCC). We previously showed that COMMD5 is associated to differentiated cell phenotype and is downregulated in different cancer cell lines and RCC<sup>29,68</sup>. We can hypothesize that these COMMD5 mutations disrupt



COMMD5 gene or damage COMMD5 functions, leading to malignant cell conversion. We propose that screening for COMMD5 expression levels and somatic mutations in cancer should be initiated. Its particular chromosomal location and crucial cellular functions make COMMD5 a potential biomarker of cancer progression and prognosis.

### **Is COMMD5 role in cell differentiation and cancer associated to telomeric length?**

Studies to date on COMMD5 clearly demonstrated the essential role of COMMD5 in the establishment and maintenance of the epithelial cell phenotype. COMMD5 is ubiquitously expressed in adult epithelial tissues, and its levels correlate with the differentiation state of cells: they are low in fetal tissues and various cancer cell lines in rodents and humans, and are downregulated during the de-differentiation phase of tissue injury<sup>25–28</sup>. Furthermore, we showed that COMMD5 overexpression in kidneys of transgenic mice accelerated tubular repair after ischemic injury by modulating cell proliferation and migration, and by facilitating cell re-differentiation<sup>69,70</sup>. In addition, cancer cells overexpressing COMMD5 maintain a more differentiated phenotype and RCC development and tumor angiogenesis is inhibited by inactivation of the proto-oncogene, ErbB2, and gene silencing of EGFR and ErbB3<sup>29</sup>. We found that tumor size and recurrence are higher in patients with low COMMD5/HCaRG levels in normal tissues than in patients with high levels of COMMD5/HCaRG<sup>29</sup>.

It is tempting to suppose that COMMD5 functions would be associated with its subtelomeric position as a studies suggested that telomere length influences cell differentiation<sup>40,44</sup>. Hirashima et al. used PC-3 cells (prostate cancer) which have short telomeres and forced telomere elongation by enhancing their telomerase activity. They found

that telomere elongation in cancer cells resulted in the formation of duct-like structures and induced well-differentiated tumors in vivo. We decided to examine COMMD5 expression in this study by using data from Gene expression omnibus (GEO) profile GSE41559 (Figure 4). We found that high level of COMMD5 significantly correlated with 1) telomere elongation (by hTERT overexpression and by hTERT+CRE), and 2) cancer cell differentiation-induced by telomere elongation. Indeed, COMMD5 expression inversely correlated with expression of N-cadherin, a mesenchymal marker and with STAT1, an immune response-related gene in the tumor microenvironment. The expression of COMMD9, that is not located in the telomere region, did not correlate with cancer cell differentiation status. Pucci et al. also showed that functional telomeres are important for the stability of stem cell differentiation as short telomeres in embryonic stem cells led to unstable differentiation<sup>44</sup>.

Cancer cells have shorter telomeres than cells in the surrounding normal tissues. We showed that higher COMMD5 levels in normal tissue around the tumors favored the maintenance of cell differentiation, thus inhibiting tumor growth and enlargement, and COMMD 5 levels correlated with better survival rate of patients with ccRCC29. These data support an association of COMMD5 telomeric position with its function in cell differentiation.

### **COMMD5 loss and cellular senescence**

When the telomere length is reduced to a critical point, a signal is sent to stop further cell division, the hallmark of cellular senescence. The subtelomeric position of COMMD5 raises the question of whether loss of COMMD5 by telomere shortening could induce cellular senescence. Cellular senescence refers to the irreversible arrest of cell proliferation

(growth)<sup>71,72</sup>. We previously showed<sup>16</sup> that the proliferation of renal cell lines (HK-2) depleted of COMMD5, using two siRNA, was stopped without DNA fragmentation or mortality. Increase in cell, nuclear and nucleolar size, multinucleation, prominent Golgi apparatus, high number of vacuoles in the endoplasmic reticulum and cytoplasm, high number of cytoplasmic microfilaments, and large lysosomal bodies are known features of senescent cells<sup>73,74</sup>. Senescent cells can sometimes double their size compared to non-senescent counterparts<sup>75</sup>. We observed that COMMD5 loss led to important morphological changes that includes high number of cytoplasmic vacuoles, a rounded cell shape with a two-fold increase in cell size and of nuclear size by 50% fold (Figure 6 and 16). We also showed that COMMD5 depletion led to a strong cytoskeletal re-organization with an enrichment of actin stress fibers and a disorganized microtubules distribution with a non-oriented and equal radial distribution of microtubules (Figure 6 and 16). These characteristic have also been reported in the study of Xu et al.<sup>76</sup> who showed that miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. They found a significant difference in cell size (up to 1.6-fold) between senescent cells induced by miR-22-treatment and other cells. In addition, miR-22-treated cells contain enhanced actin stress fiber and this miR-22-induced senescence morphology in cancer cells could be attributed to the suppression of cell motility. They also observed that senescent fibroblasts and Lenti-Pre22-infected cancer cells exhibited large flattened senescence-like morphology that decreased cell movement. We have also observed these features after COMMD5 depletion in HK-2 cell lines. Indeed, COMMD5-depleted cells had flattened and enlarged cell shapes and these cells exhibited a random migration, and most of them seemed to spin around themselves<sup>16</sup>. Cells depleted of COMMD5 lost their directional movement

leading to a shorter distance of migration and reduced cell motility. As also suggested by Xu et al.<sup>76</sup> in their study, the strong accumulation of actin stress fibers in the cortical region and the loss of microtubule orientation observed in COMMD5-depleted cells probably caused their rounded shape, thus abolishing their directional movement.

These morphological characteristics induced by COMMD5 depletion strongly suggest that cells underwent a senescent phenotype. Further investigations are needed to demonstrate that COMMD5 loss is associated to carcinogenesis, a hallmark of senescence.

## Conclusion

### COMMD5 properties: A question of balance

The observation that COMMD5 could be differently regulated by its locus alterations, amplifications or mutations raised several questions with regards to its function and its association to cancer. Is COMMD5 overexpression or downregulation good or bad? Is COMMD5 an oncogenic factor or a tumor suppressor gene? Is COMMD5 a promising therapeutic target for cancer therapy? All data on COMMD5 reported in this review suggest that it is a question of balance (Figure 6). COMMD5 is expressed in all tissues and COMMD5 is involved in crucial cellular function such as cell differentiation by regulating cytoskeleton organization and membrane receptor trafficking. We showed that cellular COMMD5 loss by siRNA induced strong cellular dysfunctions, suggesting that COMMD5 mutations could have strong impact on cancer susceptibility and could be used as a predictive marker for some specific cancers. Ectopic COMMD5 expression in renal tissue was beneficial for tissue repair after ischemic injury or in suppressing renal tumor progression, while duplication of its locus and de novo overexpression of COMMD5 was associated to cancer susceptibility. Whole-genome duplications, in which every chromosome winds up with an extra copy, pave the way for new proteins, traits, and species, depending on the patterns of gene loss and changes that follow. It is small differences in individual genes that are likely to provide insights into important questions such as variations in disease susceptibility in different populations. So, small differences in COMMD5 expression could induce variations in disease susceptibility, and

we propose that its functional properties are strongly related to its expression level: it is a question of balance.

## References

1. Mallam, A. L. & Marcotte, E. M. Systems-wide Studies Uncover Commander, a Multiprotein Complex Essential to Human Development. *Cell Systems* 4, 483–494 (2017).
2. Burkhead, J. L., Morgan, C. T., Shinde, U., Haddock, G. & Lutsenko, S. COMMD1 forms oligomeric complexes targeted to the endocytic membranes via specific interactions with phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 284, 696–707 (2009).
3. Healy, M. D. et al. Structural insights into the architecture and membrane interactions of the conserved COMMD proteins. *Elife* 7, (2018).
4. Phillips-Krawczak, C. A. et al. COMMD1 is linked to the WASH complex and regulates endosomal trafficking of the copper transporter ATP7A. *Mol. Biol. Cell* 26, 91–103 (2015).
5. van De Sluis, B. et al. Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population. *Hum. Mol. Genet.* 11, 165–73 (2002).
6. Dré villon, L. et al. Commd1-mediated ubiquitination regulates CFTR trafficking. *PLoS One* 6, (2011).
7. Ganesh, L. et al. The gene product Murr1 restricts HIV-1 replication in resting CD4 + lymphocytes. *Nature* 426, 853–857 (2003).
8. Maine, G. N. & Burstein, E. COMMD proteins: COMMing to the scene. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64, 1997–2005 (2007).
9. van de Sluis, B. et al. COMMD1 disrupts HIF-1 $\alpha$ /beta dimerization and inhibits human tumor cell invasion. *J. Clin. Invest.* 120, 2119–30 (2010).
10. van de Sluis, B. et al. Increased activity of hypoxia-inducible factor 1 is associated with early embryonic lethality in Commd1 null mice. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4142–56 (2007).
11. Burstein, E. et al. COMMD proteins, a novel family of structural and functional homologs of MURR1. *J. Biol. Chem.* 280, 22222–32 (2005).
12. Starokadomskyy, P. et al. CCDC22 deficiency in humans blunts activation of proinflammatory NF- $\kappa$ B signaling. *J. Clin. Invest.* 123, 2244–2256 (2013).
13. Biasio, W., Chang, T., Joy McIntosh, C. & McDonald, F. J. Identification of Murr1 as a Regulator of the Human  $\delta$  Epithelial Sodium Channel. *J. Biol. Chem.* 279, 5429–5434 (2004).
14. Bartuzi, P. et al. CCC- and WASH-mediated endosomal sorting of LDLR is required for normal clearance of circulating LDL. *Nat. Commun.* 7, 10961 (2016).

15. Li, H. et al. Endosomal sorting of Notch receptors through COMMD9-dependent pathways modulates Notch signaling. *J. Cell Biol.* 211, 605–617 (2015).
16. Champion, C. G. et al. COMMD5/HCaRG Hooks Endosomes on Cytoskeleton and Coordinates EGFR Trafficking. *Cell Rep.* 24, 670–684.e7 (2018).
17. Fedoseienko, A. et al. Nuclear COMMD1 is associated with cisplatin sensitivity in ovarian cancer. *PLoS One* 11, (2016).
18. Mu, P., Akashi, T., Lu, F., Kishida, S. & Kadomatsu, K. A novel nuclear complex of DRR1, F-actin and COMMD1 involved in NF- $\kappa$ B degradation and cell growth suppression in neuroblastoma. *Oncogene* (2017). doi:10.1038/onc.2017.181
19. Zoubeydi, A. et al. Clusterin Facilitates COMMD1 and I- $\beta$  Degradation to Enhance NF- $\kappa$ B Activity in Prostate Cancer Cells. *Mol. Cancer Res.* 8, 119–130 (2010).
20. Yeh, D. W. et al. Downregulation of COMMD1 by MIR-205 promotes a positive feedback loop for amplifying inflammatory- and stemness-associated properties of cancer cells. *Cell Death Differ.* 23, 841–852 (2016).
21. Fernández Massó, J. R. et al. The Antitumor Peptide CIGB-552 Increases COMMD1 and Inhibits Growth of Human Lung Cancer Cells. *J. Amino Acids* 2013, 1–13 (2013).
22. Li, H. & Burstein, E. COMMD1 regulates inflammation and colitis-associated cancer progression. *Oncoimmunology* 3, (2014).
23. Yang, S. S. et al. FMNL2 destabilises COMMD10 to activate NF- $\kappa$ B pathway in invasion and metastasis of colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 117, 1164–1175 (2017).
24. Zhan, W. et al. COMMD9 promotes TFDP1/E2F1 transcriptional activity via interaction with TFDP1 in non-small cell lung cancer. *Cell. Signal.* 30, 59–66 (2017).
25. Solban, N. et al. Chromosomal mapping of HCaRG, a novel hypertension-related, calcium-regulated gene. *Folia Biol* 48, 9–14 (2002).
26. Solban, N. et al. HCaRG, a novel calcium-regulated gene coding for a nuclear protein, is potentially involved in the regulation of cell proliferation. *J Biol Chem* 275, 32234–32243 (2000).
27. Devlin, A. M. et al. HCaRG is a novel regulator of renal epithelial cell growth and differentiation causing G2M arrest. *Am J Physiol Ren. Physiol* 284, F753–F762 (2003).
28. El Hader, C. et al. HCaRG increases renal cell migration by a TGF- $\alpha$  autocrine loop mechanism. *Am J Physiol Ren. Physiol* 289, F1273–F1280 (2005).



29. Matsuda, H. et al. HCaRG/COMMD5 inhibits ErbB receptor-driven renal cell carcinoma. *Oncotarget* 8, (2017).
30. Chen, B. L. et al. Rosiglitazone suppresses gastric carcinogenesis by up-regulating HCaRG expression. *Oncol. Rep.* 20, 1093–1097 (2008).
31. Slovak, M. L. et al. Molecular karyotypes of hodgkin and reed-sternberg cells at disease onset reveal distinct copy number alterations in chemosensitive versus refractory hodgkin lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 17, 3443–3454 (2011).
32. Taskinen, M. et al. Deregulation of COMMD1 is associated with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *PLoS One* 9, (2014).
33. Kwiecinska, A. et al. Amplification of 2p as a genomic marker for transformation in lymphoma. *Genes Chromosom. Cancer* 53, 750–768 (2014).
34. Dai, H. et al. Genomic landscape of primary mediastinal B-cell lymphoma cell lines. *PLoS One* 10, (2015).
35. Mulaw, M. A. et al. CALM/AF10-positive leukemias show upregulation of genes involved in chromatin assembly and DNA repair processes and of genes adjacent to the breakpoint at 10p12. *Leukemia* 26, 1012–1019 (2012).
36. Kjeldsen, E. Duplication of subtelomeric regions in an adult with acute monocytic leukemia with an acquired jumping translocation involving 3q13.31-qter. *Data Br.* 13, 675–682 (2017).
37. Barresi, V. et al. Transcriptome analysis of copper homeostasis genes reveals coordinated upregulation of SLC31A1, SCO1, and COX11 in colorectal cancer. *FEBS Open Bio* 6, 794–806 (2016).
38. Cornella, H. et al. Unique genomic profile of fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 148, 806–818.e10 (2015).
39. Peng, C. H. et al. A novel molecular signature identified by systems genetics approach predicts prognosis in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 6, (2011).
40. Hirashima, K. et al. Telomere Length Influences Cancer Cell Differentiation In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2988–2995 (2013).
41. Wentzensen, I. M., Mirabello, L., Pfeiffer, R. M. & Savage, S. A. The association of telomere length and cancer: A meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* (2011). doi:10.1158/1055-9965.EPI-11-0005

42. Zhu, X. et al. The association between telomere length and cancer risk in population studies. *Sci. Rep.* (2016). doi:10.1038/srep22243
43. Willeit, P. et al. Telomere length and risk of incident cancer and cancer mortality. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* (2010). doi:10.1001/jama.2010.897
44. Pucci, F., Gardano, L. & Harrington, L. Short telomeres in ESCs lead to unstable differentiation. *Cell Stem Cell* 12, 479–486 (2013).
45. Yeager, M. et al. Genome-wide association study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24. *Nat. Genet.* 39, 645–649 (2007).
46. Gudmundsson, J. et al. Genome-wide association study identifies a second prostate cancer susceptibility variant at 8q24. *Nat. Genet.* 39, 631–637 (2007).
47. Ghossaini, M. et al. Multiple loci with different cancer specificities within the 8q24 gene desert. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 962–966 (2008).
48. Turnbull, C. Genome-wide association study identifies five new breast cancer susceptibility loci. *Nat. Genet.* 42, 504–507 (2010).
49. Pei, Y. L., Zhang, H. L. & Han, H. G. Polymorphism of 8q24 rs13281615 and breast cancer risk : A meta-analysis. *Tumor Biol.* 34, 421–428 (2013).
50. Easton, D. F. et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 447, 1087–1093 (2007).
51. Ahmadiyeh, N. et al. 8q24 prostate, breast, and colon cancer risk loci show tissue-specific long-range interaction with MYC. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 9742–9746 (2010).
52. Hutter, C. M. et al. Characterization of the association between 8q24 and colon cancer: Gene-environment exploration and meta-analysis. *BMC Cancer* 10, (2010).
53. Zanke, B. W. et al. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nat. Genet.* 39, 989–994 (2007).
54. Han, J. et al. Genetic variants within the cancer susceptibility region 8q24 and ovarian cancer risk in Han Chinese women. *Oncotarget* 8, 36462–36468 (2017).
55. White, K. L. et al. Variation at 8q24 and 9p24 and risk of epithelial ovarian cancer. *Twin Res. Hum. Genet.* 13, 43–56 (2010).
56. Kiemeny, L. A. et al. Sequence variant on 8q24 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat. Genet.* 40, 1307–1312 (2008).

57. Crowther-Swanepoel, D. et al. Common variants at 2q37.3, 8q24.21, 15q21.3 and 16q24.1 influence chronic lymphocytic leukemia risk. *Nat. Genet.* 42, 132–136 (2010).
58. Beroukhim, R. et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463, 899–905 (2010).
59. Nowak, N. J. et al. Challenges in array comparative genomic hybridization for the analysis of cancer samples. *Genet. Med.* 9, 585–595 (2007).
60. Moore, S. R. et al. Detection of copy number alterations in metastatic melanoma by a DNA fluorescence in situ hybridization probe panel and array comparative genomic hybridization: a southwest oncology group study (S9431). *Clin. Cancer Res.* 14, 2927–2935 (2008).
61. Thomas, G. et al. Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nat. Genet.* 40, 310–315 (2008).
62. Eeles, R. a et al. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat. Genet.* 40, 316–21 (2008).
63. Freedman, M. L. et al. Admixture mapping identifies 8q24 as a prostate cancer risk locus in African-American men. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 14068–14073 (2006).
64. Goode, E. L. et al. A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ovarian cancer at 2q31 and 8q24. *Nat. Genet.* 42, 874–879 (2010).
65. Barry, K. H. et al. DNA methylation levels at chromosome 8q24 in peripheral blood are associated with 8q24 cancer susceptibility loci. *Cancer Prev. Res.* 7, 1282–1292 (2014).
66. FitzGerald, L. M. et al. Genome-Wide Measures of Peripheral Blood Dna Methylation and Prostate Cancer Risk in a Prospective Nested Case-Control Study. *Prostate* 77, 471–478 (2017).
67. Barry, K. H. et al. Prospective study of DNA methylation at chromosome 8q24 in peripheral blood and prostate cancer risk. *Br. J. Cancer* 116, 1470–1479 (2017).
68. Solban, N. et al. HCaRG, a novel calcium-regulated gene coding for a nuclear protein, is potentially involved in the regulation of cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 275, 32234–32243 (2000).
69. Matsuda, H., Hamet, P. & Tremblay, J. Hypertension-related, calcium-regulated gene (HCaRG/COMMD5) and kidney diseases: HCaRG accelerates tubular repair. *J. Nephrol.* 27, 351–60 (2014).

70. Matsuda, H., Lavoie, J. L., Gaboury, L., Hamet, P. & Tremblay, J. HCaRG accelerates tubular repair after ischemic kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 2077–2089 (2011).
71. Campisi, J. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo* 14, 183–188 (2000).
72. Campisi, J. & D’Adda Di Fagagna, F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 729–740 (2007).
73. Cristofalo, V. J. & Pignolo, R. J. Molecular markers of senescence in fibroblast-like cultures. *Exp. Gerontol.* 31, 111–123 (1996).
74. Cristofalo, V. J. & Pignolo, R. J. Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. *Physiol. Rev.* 73, 617–638 (1993).
75. Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37, 614–636 (1965).
76. Xu, D. et al. miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. *J. Cell Biol.* 193, 409–424 (2011).

## Legends of figures

### ***Figure 1. Associated studies to tumor suppressor or oncogenic properties of COMMD proteins.***

Few studies suggested that COMMDs had tumor suppressor properties, especially for COMMD1 and COMMD5 who have been the most studied in cancer. Most of these studies reported lower COMMD expression levels in a variety of cancers and correlated them with tumor progression. However, a few publications reported also some oncogenic properties and interestingly, their potential involvement in tumor progression was always associated to chromosomal abnormalities and genetic alterations. Recurrent DNA amplifications and gain of chromosome material at COMMD1, COMMD5 and COMMD3 loci have been reported in various cancers. COMMD5 was the most frequently altered gene among the COMMD members that was associated to tumor progression.

### ***Figure 2. Chromosomal location of the human COMMD family members.***

Location of COMMD genes were found by searching the homo sapiens genome view of the National Center for Biotechnology Information (Gene ID: 150684 for COMMD1; 51122 for COMMD2; 23412 for COMMD3; 54939 for COMMD4; 28991 for COMMD5; 170622 for COMMD6; 149951 for COMMD7; 54951 for COMMD8; 29099 for COMMD9 and 51397 for COMMD10). COMMD5 is the only COMMD family member located at the extreme end of chromosome. Using The Human Protein Atlas database, we showed that COMMD5 is the fourth protein-coding gene from the end of 8q24.3 chromosome.

**Figure 3. Genetic alterations and tissue expression profile of the COMMD protein family and their association to different types of carcinoma.**

A. cBioportal database was used to analyze mutations and copy number alterations of COMMD proteins in 231 studies (71,641 samples). Only COMMD2, COMMD5 and COMMD9 presented >10% CNV or mutations and were presented in this figure. Genetic alterations of COMMD5 in different types of cancer showed the most alteration frequency of COMMD5 in prostate and ovarian cancers. B. Heatmap and copy number alterations of COMMD proteins related to the available ovarian cancer prostate adenocarcinoma TCGA data (n=46 and n = 316, respectively) obtained from cBioPortal. C. Graphical summary of COMMD5 mutations from TCGA carcinoma studies mapped across the gene.

**Figure 4. Analysis of mRNA expression profiles derived from PC-3 prostate cancer cells in the presence of exogenous human telomerase reverse transcriptase (hTERT).**

Forced elongation of telomeres and correlates with COMMD5 expression. Data were extracted from the geoprofile database (GSE41559), plotted in an excel file and analyzed. Hirashima et al. established a PC-3 subline that overexpressed exogenous hTERT (hTERT) and upregulation of telomerase activity and substantial telomere elongation in these PC-3/hTERT cells was compared with control cells (Mock). To examine whether the formation of the duct-like structures resulted from telomere elongation and not from increased levels of hTERT protein, they removed the hTERT transgene after telomere elongation using the Cre/loxP system. They added the loxP sequence at both the 5' and 3' ends of the wild-type hTERT cDNA and established the stable PC-3/LhTERTL cell line (hTERT+CRE) or control cells (Mock-CRE). They

subcutaneously injected these four PC-3 cell lines, mock, hTERT, mock-CRE, and hTERT+CRE, into nude mice and collected the resultant xenograft tumors to monitor gene expression profiling that might be important for the differentiation of PC-3 cells in vivo using a microarray approach. Forced elongation of telomeres in cancer cells promotes PC-3 cell differentiation and the expression of N-cadherin, STAT1 and COMMD5 but not COMMD9.

***Figure 5. Loss of COMMD5 leads to important morphological changes including cytoskeleton organization.***

HK-2 cells were transfected with siRNACOMMD5 (siCOMMD5) or siRNA CTRL (siCTRL), fixed, and labeled with fluorescein-deoxyribonuclease 1 (for G-actin),  $\beta$ -tubulin, phalloidin (for F-actin) or DAPI (for nuclei blue staining). Cell size or nucleus area in cells transfected with siCTRL or siCOMMD5 were processed and analyzed using FIJI software (values are means, error bars indicate SD, n=3). Student's t test, \*\*\* $p < 0.001$ , significant difference compared with siCTRL.

***Figure 6. Proposed model suggesting that COMMD5 expression balances epithelial vs mesenchymal state***

COMMD5/HCaRG play an essential role in the establishment and maintenance of the epithelial cell phenotype acting as a tumor suppressor gene. Downregulation of COMMD5 leaves cells vulnerable to intermediate phenotype. At this step, upregulation of COMMD5 by transient transfection enable restoration of epithelial properties. Complete loss of COMMD5 expression or function (by mutation) leads to irreversible transition to mesenchymal state. However, too much COMMD5 is not a good thing. Indeed, COMMD5 is involved in crucial

cellular function such as cell differentiation, proliferation and migration, cellular processes that must be fine controlled.



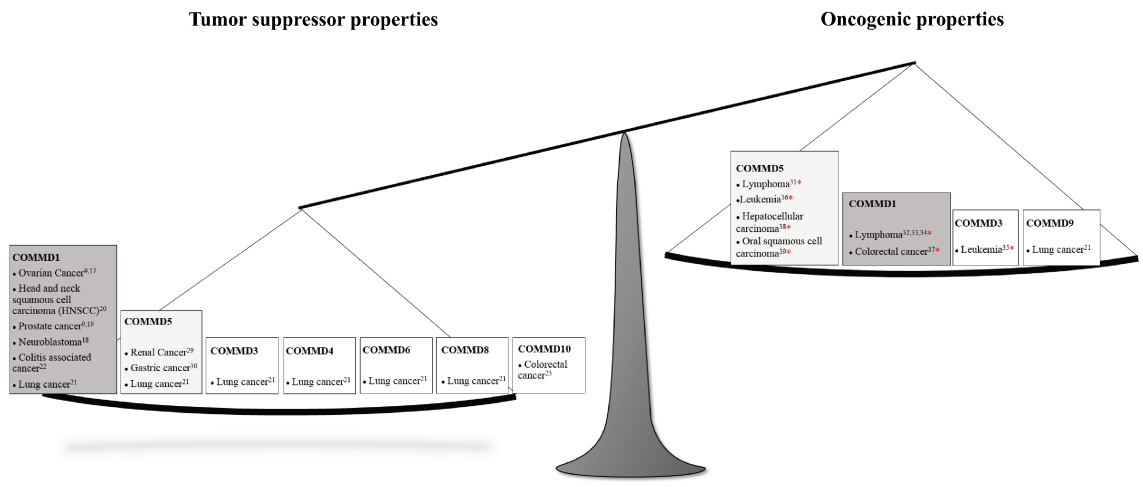


Figure 1 : Associated studies to tumor suppressor or oncogenic properties of COMMD proteins.

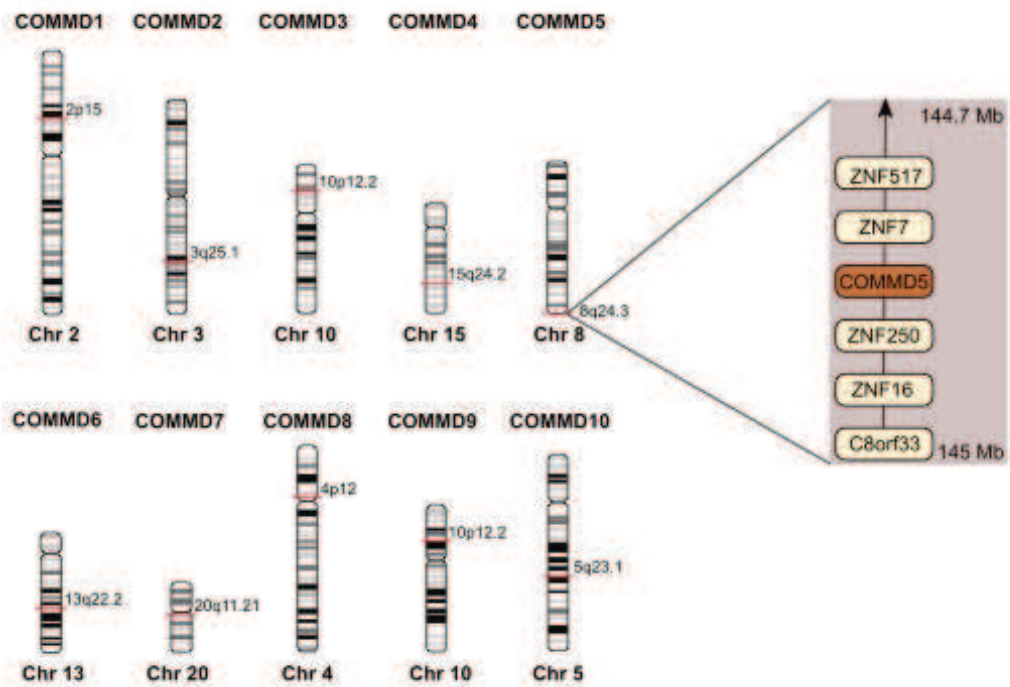
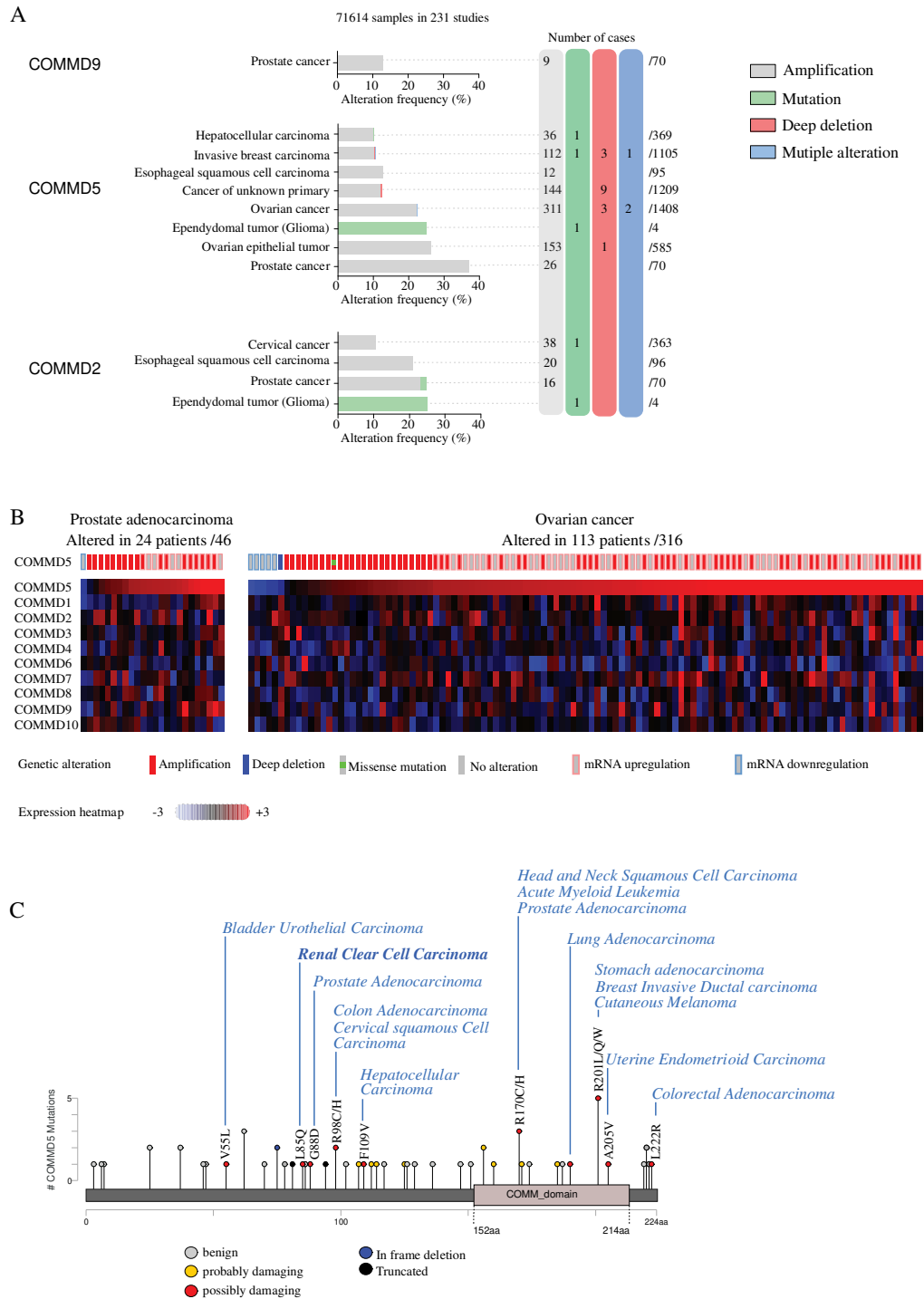
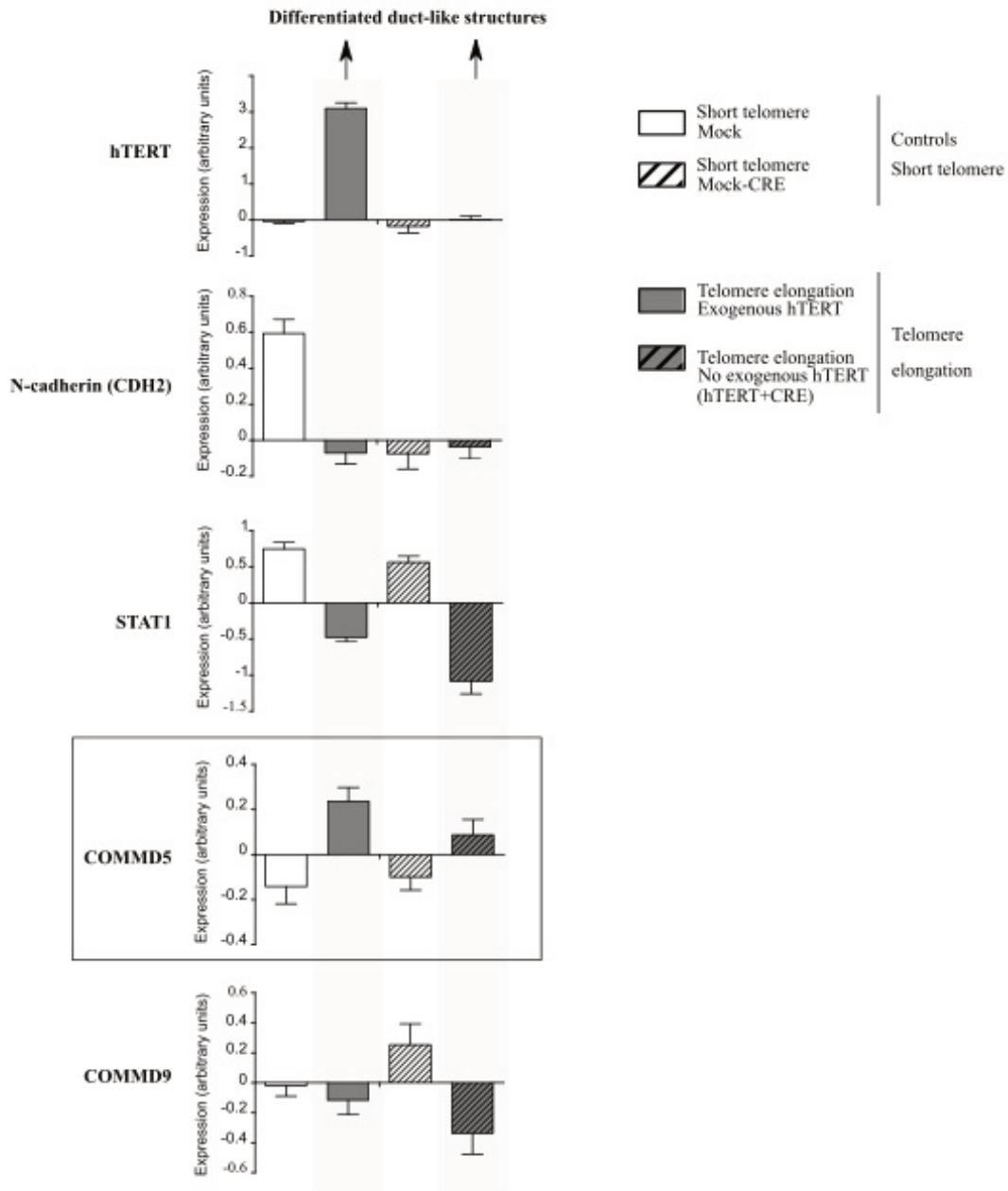


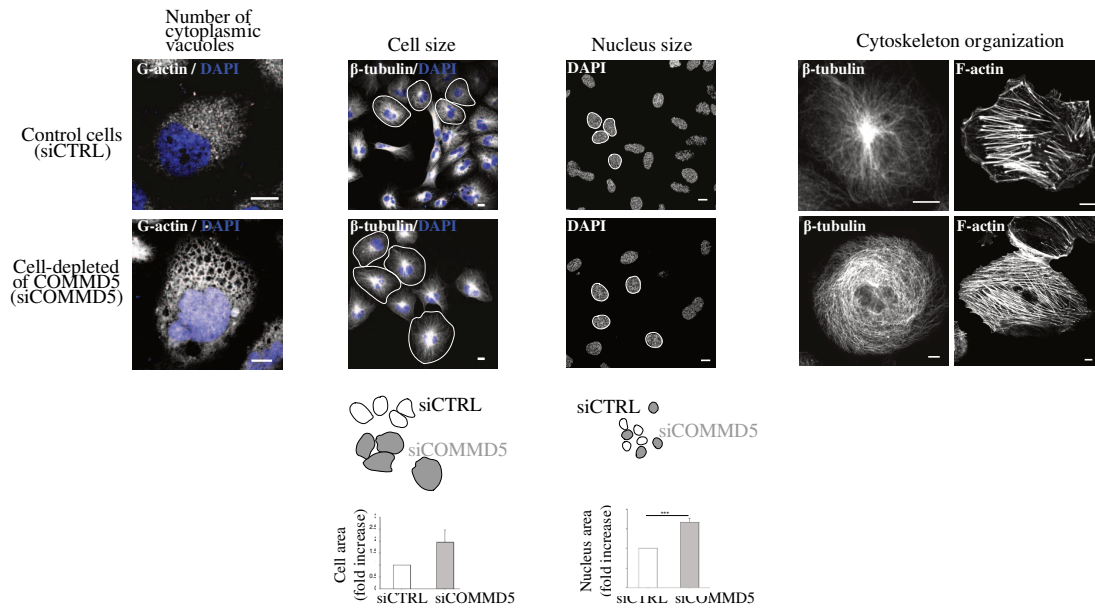
Figure 2 : Chromosomal location of the human COMMD family members.



**Figure 3 : Genetic alterations and tissue expression profile of the COMMD protein family and their association to different types of carcinoma.**



**Figure 4 : Analysis of mRNA expression profiles derived from PC-3 prostate cancer cells in the presence of exogenous human telomerase reverse transcriptase (hTERT).**



**Figure 5 : Loss of COMMD5 leads to important morphological changes including cytoskeleton organization.**

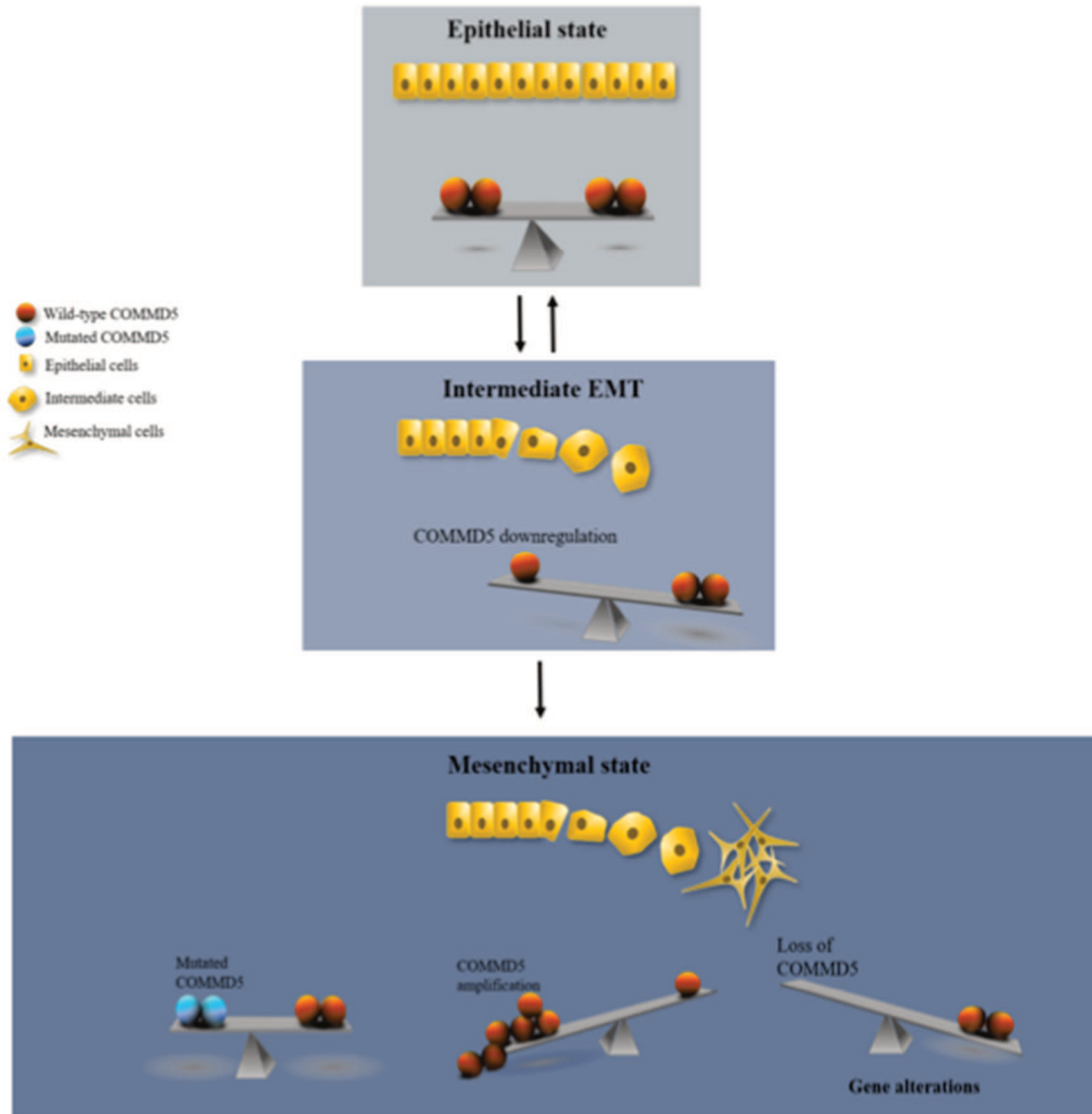


Figure 6 : Proposed model suggesting that COMMD5 expression balances epithelial vs mesenchymal state.

## **C – Conclusion de la revue**

Cette revue montre que COMMD5 semble être régulée différemment par ses altérations, amplifications ou mutations dans le locus et soulève plusieurs questions quant à sa fonction et à son association au cancer.

Les données rapportées dans cette revue montrent que l'équilibre expressionnelle de COMMD5 est très importante. En effet, COMMD5 étant exprimée dans l'ensemble des tissus, elle est impliquée dans des fonctions cellulaires importantes telles que la différenciation cellulaire en régulant l'organisation du cytosquelette et le trafic des récepteurs membranaires. La perte de l'expression de COMMD5 entraîne des dysfonctionnements cellulaires, ce qui suggère que des mutations de COMMD5 pourraient avoir un impact important sur la susceptibilité au cancer et pourraient être utilisées comme marqueur prédictif. Nous avons observé que l'expression ectopique de COMMD5 dans le tissu rénal était bénéfique pour la réparation du tissu après une lésion ischémique ou pour la suppression de la progression tumorale. Néanmoins, la duplication de son locus et la surexpression de novo de COMMD5 semblent qu'en à elle être associées à la survenu du cancer. Des petites différences dans l'expression de COMMD5 pourraient donc induire des variations dans la susceptibilité à la maladie, et nous proposons que ses propriétés fonctionnelles soient fortement liées à son niveau d'expression.