

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**HCaRG « Hypertension-related Calcium Regulated Gene», un gène candidat de la  
réparation rénale; caractérisation de son interaction avec le cytosquelette et son  
expression génique**

par

Christian Croisetière

Programme de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise en sciences (M. Sc.)  
en sciences biomédicales

Décembre 2007

© Christian Croisetière, 2007



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse est intitulée :

HCaRG « Hypertension-related Calcium Regulated Gene », un gène candidat de la  
réparation rénale; caractérisation de son  
interaction avec le cytosquelette et son expression génique

présenté par :

Christian Croisetière

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Emmanuelle Brochiero, président-rapporteur,  
Tremblay, Johanne, directeur de recherche,  
Madhu Anand Srivastava, membre du jury.

## Sommaire

HCaRG « Hypertension-related calcium regulated gene », un gène découvert par notre groupe, est régulé de façon négative par le calcium extracellulaire et est plus exprimé chez les rats génétiquement hypertendus que leurs contrôles normotendus. Nous avons identifié un élément nCARE « negative calcium response element » dans le promoteur de HCaRG qui répond aux variations de calcium extracellulaire. Nous avons démontré que l'activité transcriptionnelle du promoteur ainsi que ses niveaux de mRNA sont plus élevés lorsque les cellules de rein humain sont incubées avec de l'EGTA. Nous avons caractérisé les interactions entre HCaRG et l'actine et deux transporteurs ioniques, la NKCC2 et la Na,K-ATPase  $\beta$ , identifiés préalablement par la technique du double hybride, et avons précisé leurs sites d'interaction. Un motif putatif de liaison à l'actine, semblable à celui présent dans la thymosine  $\beta$ 4 et la profiline, a été retrouvé dans la séquence de HCaRG. Nos données suggèrent que HCaRG inhibe la polymérisation de l'actine filamenteuse par sa liaison à l'actine monomérique. Récemment, HCaRG a été classé dans la famille des COMMDs dont les membres sont des protéines pouvant former de nombreux complexes protéiques. Or, nos analyses ont montré la présence d'un domaine COMM dans HCaRG ainsi que son interaction avec la protéine COMMD8. Finalement, nous avons confirmé l'importance de HCaRG dans la migration cellulaire à l'aide de ShRNAs dirigés contre sa région codante. Notre travail a permis de mieux comprendre la régulation transcriptionnelle de HCaRG ainsi que son mécanisme d'action sur la migration cellulaire qui implique son interaction avec l'actine et les transporteurs ioniques.

Mots-clés : protéine liant l'actine, migration, transporteurs ioniques, hypertension.

## Summary

The Hypertension-related calcium regulated gene (HCaRG), identified in our laboratory, is negatively regulated by extracellular calcium and its expression levels are higher in the spontaneously hypertensive rat compared to the normotensive strains. We identified a nCARE “negative calcium respond element” in the promoter of HCaRG which responds to extracellular calcium. We found that the highest transcriptional activity of HCaRG promoter fragments and its mRNA levels are in human kidney cells incubated in the presence of EGTA. Next, we confirmed the interaction of HCaRG with several proteins previously identified by yeast two hybrids, such as the NKCC2, actin- $\beta$  and Na,K-ATPase  $\beta_1$  and we localized their interaction sites. For instance, HCaRG interacts with the C-terminal end of actin and we identified a putative actin binding motif in HCaRG similar to the one present in thymosin  $\beta_4$  and profilin. Our initial results suggest that HCaRG inhibits the polymerisation of filamentous actin via its interaction with the monomeric form of actin. Finally, HCaRG has been classified to the COMMD family, whose members are known to be highly interacting proteins in cell nucleus and cytoplasm. The identification of the COMM domain in HCaRG sequence and of COMMD8 as one of its protein partner support the assignment of HCaRG to this family. Our work has contributed to a better understanding of the transcriptional regulation of HCaRG and of its mechanism of action on cell migration which occurs in part through its interaction with actin and ionic transporters.

**Keywords:** actin binding protein, migration, ionics transporters, hypertension.

## Tables des matières

Sommaires.....	iii
Tables des matières.....	vi
Listes des tableaux.....	x
Listes des figures.....	xi
Listes des abréviations .....	xiii
Dédicace.....	xvi
Remerciements.....	xvii
<b>Chapitre 1- Introduction</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1 Le cytosquelette</b> .....	<b>19</b>
1.1.1 Les protéines filamenteuses .....	19
1.1.2 Les filaments d'actine .....	20
1.1.3 L'effet de toxines sur la polymérisation de l'actine .....	21
1.1.4 Les propriétés accessoires essentielles .....	22
1.1.5 Le complexe Arp2/3 .....	23
1.1.6 Extension de la membrane.....	23
1.1.7 Les « capping proteins » ou protéines de coiffe .....	24
<b>1.2 La migration cellulaire</b> .....	<b>30</b>
1.2.1 La migration cellulaire dirigée : La chemotaxie.....	30
1.2.2 Les récepteurs couplés aux protéines G.....	31
1.2.3 L'adénosine monophosphate cyclique (AMPc).....	33

1.2.4 La voie de signalisation liée au phospholipide inositol .....	34
1.2.5 Régulation du réseau de filaments d'actine .....	36
1.2.6 Mécanisme de motilité de la cellule entière.....	38
1.2.7 Implication des canaux dans la migration cellulaire.....	41
1.2.8 Élément de régulation de l'expression génique.....	43
1.2.9 Élément négatif de régulation par le calcium.....	45
1.2.10 Éléments du cycle cellulaire.....	46
<b>1.3 HCaRG.....</b>	<b>47</b>
1.3.1 Introduction de l'hypertension et de HCaRG.....	47
1.3.1 La découverte de HCaRG .....	50
1.3.2 HCaRG pour « <i>Hypertension-related Calcium-Regulated Gene</i> ».....	51
1.3.3 Caractérisation de la protéine HCaRG.....	51
1.3.4 Les niveaux d'expression de HCaRG.....	52
1.3.5 HCaRG et la prolifération cellulaire.....	52
1.3.6 HCaRG et la différenciation cellulaire.....	53
1.3.7 HCaRG et la migration cellulaire.....	54
1.3.8 HCaRG est une protéine de la famille COMMD.....	55
1.3.9 Les protéines COMMDs interagissent avec d'autres COMMDs.....	56
1.3.10 Dimérisation entre les COMMDs.....	57
1.3.11 Les COMMDs inhibent la voie de transcription médiée par $\kappa$ B.....	58
1.3.12 Caractérisation de l'interaction COMMD-COMMD de la voie NF- $\kappa$ B...	60
1.3.13 COMMD pour « <i>Copper metabolism gene... </i> ».....	61
1.3.14 Structure de N-COMMD1.....	62

1.3.15 Capacité de liaison du cuivre.....	63
1.3.16 « Knock-out » chez la souris et déficience de COMMD1.....	63
1.3.17 Résumé du travail.....	64
<b>Chapitre 2 Régulation de l'expression de HCaRG.....</b>	<b>66</b>
2.0 Introduction du chapitre.....	67
2.1 Méthodologie.....	67
2.1.1 Clonage et séquençage de la région 5'UTR de HCaRG.....	67
2.1.2 Construction des plasmides pour les études d'activité luciférase.....	68
2.1.3 Alignement et analyse des facteurs de transcription.....	68
2.1.4 Transfections.....	69
2.1.5 RT-PCR quantitatif.....	69
2.2 Résultats.....	70
2.2.1 Clonage et caractérisation du promoteur de HCaRG.....	70
2.2.2 Effet du calcium sur l'activité promotrice du gène de HCaRG.....	72
<b>Chapitre 3 HCaRG et ses partenaires protéiques.....</b>	<b>79</b>
3.0 Introduction au chapitre.....	80
3.1 Méthodologie.....	80
3.1.1 Double hybride chez la levure.....	80
3.1.2 Co-immunoprécipitation.....	81
3.1.3 Immunofluorescence.....	81
3.2 Résultats.....	84

3.2.1 HCaRG et les protéines COMMDs.....	84
3.2.2 Les partenaires potentiels de HCaRG.....	84
3.2.3 Interactions entre HCaRG et certains de ses partenaires.....	85
<b>Chapitre 4 HCaRG et la migration cellulaire.....</b>	<b>88</b>
4.0 Introduction au chapitre.....	89
4.1 Méthodologie.....	89
4.1.1 Pull-down avec l'actine.....	89
4.1.2 Essais spindown.....	90
4.1.3 Déséquilibre G et F actine.....	90
4.1.4 Développement des ShRNA et validation du KO.....	91
4.1.5 Essais de guérison de plaies.....	92
4.2 Résultats.....	93
4.2.1 Interaction entre hHCaRG et l'actine.....	93
4.2.2 Effet de HCaRG sur la polymérisation de l'actine.....	95
4.2.3 Effet du « knockdown » de HCaRG sur la migration.....	98
<b>Chapitre 5 Discussion.....</b>	<b>103</b>
5.1 La régulation de l'expression de HCaRG.....	104
5.2 Les partenaires protéiques de HCaRG.....	108
5.3 HCaRG, actine et migration cellulaire.....	111
5.4 Conclusion.....	115

<b>Bibliographie</b> .....	117
<b>Annexes</b> .....	131
Anexes 1: Manuscrit en préparation.....	131

## **Liste des tableaux**

### *Chapitre 3 HCaRG et ses partenaires protéiques*

3.1 Information relative aux gènes, transcrits et protéines des COMMDs.....	82
3.2 : Partenaires protéiques.....	85

## Liste des figures

### Chapitre 1- Introduction

Figure 1.1 : Schématisation de la cellule et ses filaments.....	19
Figure 1.2 : Représentation structurale de l' $\alpha$ -actine.....	21
Figure 1.3 : Représentation de la polymérisation de l'actine.....	22
Figure 1.4 : Représentation de l'effet tapis roulant.....	23
Figure 1.5 : La <i>Amanita phalloid</i> et la molécule phalloïdine.....	24
Figure 1.6 : Représentation de la polymérisation des microfilaments d'actine.....	26
Figure 1.7 : Représentation du modèle de l'extension de la membrane.....	28
Figure 1.8 : Représentation structurale de la rhodopsine de bœuf.....	31
Figure 1.9 : Modèle de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G.....	32
Figure 1.10 : Schématisation de l'activation de la voie de signalisation AMPc.....	33
Figure 1.11 : Modélisation et domaine de la protéine WASp.....	37
Figure 1.12 : Structure et modèle des fibres d'actine.....	39
Figure 1.13 : Repliement du lamellipode.....	39
Figure 1.14 : Rotation et avancement de la cellule.....	40
Figure 1.15 : Modèle de motilité cellulaire avec l'intégration des flux ioniques.....	42
Figure 1.16 : Schématisation du cycle cellulaire.....	46
Figure 1.17 : Détérioration des cellules tubulaires proximales (RPTC).....	48

## **Chapitre 2 Régulation de l'expression de hCaRG**

Figure 2.1 : Séquence du promoteur de rCaRG.....	71
Figure 2.2 : Comparaison des nCaREs.....	72
Figure 2.3 : Effet du NaCl et du mannitol.....	73
Figure 2.4 : Effet du CaCl <sub>2</sub> et de l'EGTA.....	75
Figure 2.5 : Effet de doses croissantes de CaCl <sub>2</sub> .....	76

## **Chapitre 3 hCaRG et ses partenaires protéiques**

Figure 3.1 : Schématisation de la technique du double hybride.....	80
Figure 3.2 : Alignement de hCaRG sur COMMD1.....	83
Figure 3.3 : Expériences de coimmunoprécipitation.....	86
Figure 3.4 : Immunofluorescence.....	87

## **Chapitre 4 hCaRG et la migration cellulaire**

Figure 4.1 : Confirmation de l'interaction entre rCaRG et l'actine.....	93
Figure 4.2 : Alignement des motifs de liaison à l'actine.....	94
Figure 4.3 : Essais de spin-down avec rCaRG.....	95
Figure 4.4 : Immunobuvardage d'un essai spin-down de l'actine <i>in vivo</i> .....	96
Figure 4.5 : Graphique essais spin-down de l'actine <i>in vivo</i> .....	97
Figure 4.6 : Knockdown de hCaRG par les ShRNAs.....	100
Figure 4.7 : Effet du KD de hCaRG.....	102

**Listes des abréviations**

ABP	« Actin binding protein»
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
Asn	Asparagine
BN	« Brown-Norway»
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcique
Caco-2	Cellules de carcinome humain du colon
CDE	Élément du cycle cellulaire
CDK	Kinases dépendantes de la cycline
CHR	Région homologue aux gènes du cycle cellulaire
Cl <sup>-</sup>	Ion chlore
COIP	Coimmunoprécipitation
COMMD	« copper metabolism gene MURR1 domain-containing »
COS-7	Fibroblastes de rein de singe
CRAC	Régulateur de l'adénylate cyclase
Cys	Cystéine
DAG	diacylglycérol
EMSA	« Electrophoretic mobility shift assay »
EGF	« Early growth factor »
FRET	«Fluorescence resonance energy transfert »
GDB	« GTPase binding domain »

GFP	«Green fluorescent protein »
H <sup>+</sup>	Ion hydrogène
HCaRG	« Hypertension-related, Calcium-Regulated Gene »
Hela	Cellules leucémiques humaines
HEK293	Cellules de rein humain embryonnaire
HEGP2	Cellules humaine hépatique
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trisphosphate
IK1	Canaux K <sup>+</sup> activés par le Ca <sup>2+</sup> de conductance intermédiaire
IRF	« Interferon regulatory factor »
K <sup>+</sup>	Ion potassique
KD	« Knock-down »
KO	« Knock-out »
Leu	Leucine
MDCK	« Madin-Darby Canine Kidney Cells»
Met	Méthionine
Na <sup>+</sup>	Ion sodique
NCARE	«Negative calcium response element»
NHE	Échangeur Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
NMDA	Canaux Ca <sup>2+</sup> de type N
PAF	Facteur d'activation plaquettaire
PAK	Kinase p21
PCR	« Polymerase chain reaction »
Phe	Phénylalanine

PI(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidyinositol 4,5-biphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PTH	Hormone parathyroïdienne
PTEN	« Phosphatase and tensin homologue »
RE	Réticulum endoplasmique
RGS	Protéines régulatrices
SHR	« Spontaneous hypertensive rat »
ShRNA	Petit ARN interférence avec un « hairpin »
TFII	Facteurs de transcription généraux
TIEG	« TGF- $\beta$ -inductible early gene »
TGF- $\beta$	« Transforming growth factor beta »
TNF- $\alpha$	« Spontaneous tumor necrosis factor alpha »
YFP	« Yellow fluorescent protein »

**À mes parents**

## Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, Dre Johanne Tremblay Ph.D qui m'a accueilli dans son laboratoire. Elle m'a guidé dans mon projet de maîtrise avec patience et rigueur. Grâce à elle, j'ai eu l'occasion d'avoir un projet avec une grande liberté qui se résume en trois années inoubliables au sein de son équipe de laboratoire exceptionnel. La qualité de l'enseignement reçue ainsi que la grande diversité de mon projet m'ont formé, sans aucun doute, pour une carrière prometteuse.

J'aimerais évidemment remercier mes collègues de travail avec qui j'ai eu l'occasion de partager de nombreux souvenirs. Notamment, Suzanne Cossette, l'assistante de recherche qui a su être patiente face à mes ardeurs. De plus, un merci particulier à Nathalie Boursier qui m'a formé à mon arrivée ainsi qu'à Sandra Tremblay. Je voudrais remercier les étudiants que j'ai côtoyés (Guy Martel, Évelyne Morin, Carlos El Hader, Valérie Forté-Fillion). J'ai pu compter sur ces personnes lors des innombrables moments de doutes et remises en questions.

Je remercie mes parents qui m'ont donné l'opportunité d'étudier et qui ont soutenus mes efforts tout au long de ma formation universitaire. Merci à Mikael Dumoulin, David Boutin, Marceline Côté et Amélie Fradet Turcotte, mes meilleurs amis qui ont su me changer les idées et m'encourager.

# **Chapitre 1**

## **Introduction**

## 1.1 LE CYTOSEQULETTE

### 1.1.1 Les protéines filamenteuses

La plupart des cellules sont capables de changer leur forme, de se diviser et de se déplacer. L'échafaudage de la cellule est représenté par le cytosquelette qui est formé d'un réseau dense et dynamique de polymères protéiques responsables du maintien de l'intégrité des fonctions cellulaires. Le cytosquelette est impliqué dans bon nombre de processus biologiques dont la division des chromosomes lors de la mitose, le trafic des organelles et le transport des macromolécules. De plus, il est essentiel à la motilité cellulaire à l'aide de flagelles, à la contraction musculaire et au « homing » des globules blancs. Le cytosquelette est omniprésent dans la cellule puisqu'on le retrouve à la fois dans le cytoplasme associé à certaines structures membranaires et dans le noyau. Trois familles de protéines filamenteuses (filaments d'actine, microtubules et filaments intermédiaires) sont responsables du fonctionnement et de la structure du cytosquelette en plus de posséder des propriétés mécaniques et dynamiques différentes. Ainsi, les filaments intermédiaires procurent la force et la résistance au stress du réseau, les microtubules déterminent la position des organelles et le transport intracellulaire et les filaments d'actine, quant à eux, sont responsables de la forme de la cellule et de sa locomotion (Holmes et al., 1990; Mitchison, 1997).

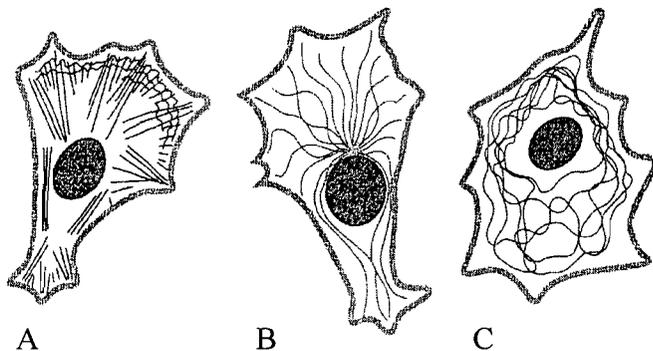


Figure 1.1 : Schématisation de la cellule et ses filaments (Alberts et al, 2001).

- A. Filaments d'actine
- B. Microtubules
- C. Filaments intermédiaires

Chaque type de filament est formé de précurseurs protéiques unitaires. Ces sous-unités sont très petites et grâce à leur petite taille elles sont capables de diffuser rapidement dans le cytoplasme. La cellule est capable d'orchestrer ce grand réservoir de sous-unités en le polymérisant à un endroit de la cellule et en le dépolymérisant à un autre. Les sous-unités de filaments intermédiaires sont allongées et fibreuses tandis que celles des filaments d'actine et des microtubules sont plus compactes et globulaires (Herrmannet Aebi, 1998; Hill et Kirschner, 1998). Ces filaments d'actine ont besoin d'un large éventail de protéines accessoires afin d'assurer le contrôle spatial et dynamique de chacun d'entre eux pour qu'ils soient fonctionnels. Les polymères du cytosquelette sont assemblés simultanément à partir de plusieurs protofilaments. Un protofilament est une petite chaîne de sous-unités qui seule est thermodynamiquement instable. L'enchaînement des protofilaments se fait de façon longitudinale et latérale dans le cas des microtubules. Ainsi, le bris d'un protofilament n'entraîne pas un arrêt de la polymérisation puisqu'il est stabilisé par les protofilaments voisins. De ce fait, ils possèdent une grande capacité d'adaptation (Hill and Kirschner, 1982; Pollard and Borisy, 2003).

Les sous-unités s'assemblent spontanément en petits oligomères lesquels peuvent se désassembler aussitôt. La formation d'un nouveau filament requiert la concentration des sous-unités en agrégats afin de favoriser l'élongation. Ce phénomène se nomme la nucléation et sa vitesse est l'étape limitante du processus de polymérisation (Pollard and Borisy, 2003). Une fois les agrégats formés, l'élongation du polymère est rapide et atteint un état d'équilibre où la vitesse d'addition ( $K_{on}$ ) de sous-unités à une extrémité du filament est égale à la vitesse de leur dissociation ( $K_{off}$ ) à l'autre extrémité. La quantité de

sous-unités libres à ce moment est appelée la concentration critique ( $C_c$ ) où  $C_c = K_{off}/K_{on}$  (Pollard and Borisy, 2003). Afin de faciliter la première étape, la cellule utilise des protéines qui catalysent la réaction de nucléation à des sites spécifiques nécessitant l'assemblage des filaments d'actine (Hill and Kirschner, 1982).

### 1.1.2 Les filaments d'actine

L'actine est la protéine la plus abondante des cellules eucaryotes ; l'actine musculaire constitue environ 10% du poids protéique alors que l'actine non musculaire, 1-5%. Son poids est d'environ 43 kDa chez l'humain. Six gènes codent pour quatre formes d'actine musculaire et deux formes d'actine non musculaire soit :

- $\alpha$ -actine du muscle cardiaque
- $\alpha$ -actine du muscle squelettique
- $\alpha$ -actine du muscle lisse
- $\gamma$ -actine du muscle lisse
- $\beta$ -actine cytoplasmique
- $\gamma$ -actine cytoplasmique.

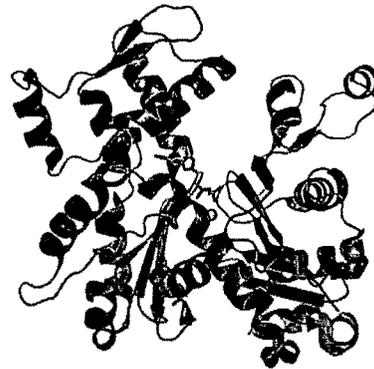


Figure 1.2 : Représentation structurale de l' $\alpha$ -actine du muscle squelettique. (Protein Data Bank(PDB) 1j6z)

L'homologie de la région N-terminale est d'environ 50-80% entre les isoformes tandis que la partie C-terminale est similaire à plus de 95%. L'actine est une protéine essentielle à la vie de la cellule et cette redondance est nécessaire à sa survie. De plus, l'expression des isoformes d'actine change au cours du développement et montre une spécificité tissulaire (Mitchison, 1995).

Un filament d'actine est composé de deux protofilaments parallèles torsadés. Le filament est flexible mais dans la cellule, il est entrecroisé et lié à diverses protéines accessoires. Chaque sous-unité s'assemble de la tête à la queue pour ainsi créer une polarité structurale différente entre les deux extrémités, soit positive (+) et négative (-). On distingue ainsi l'extrémité pointue ou (-) et l'extrémité barbée ou (+). *In vivo*, seulement 2% des collisions entre les sous-unités sont correctement orientées et mènent à leur liaison (Pollard and Borisy, 2003). Chaque monomère possède une poche de fixation pour un nucléotide d'ATP ou d'ADP. Le monomère T-ATP s'assemble avec un autre monomère, (Figure 1.3). Le monomère D-ADP a moins d'affinité pour les sous-unités et donc est sujet à quitter le polymère plus rapidement que son homologue de la forme T (Holmes et al., 1995).

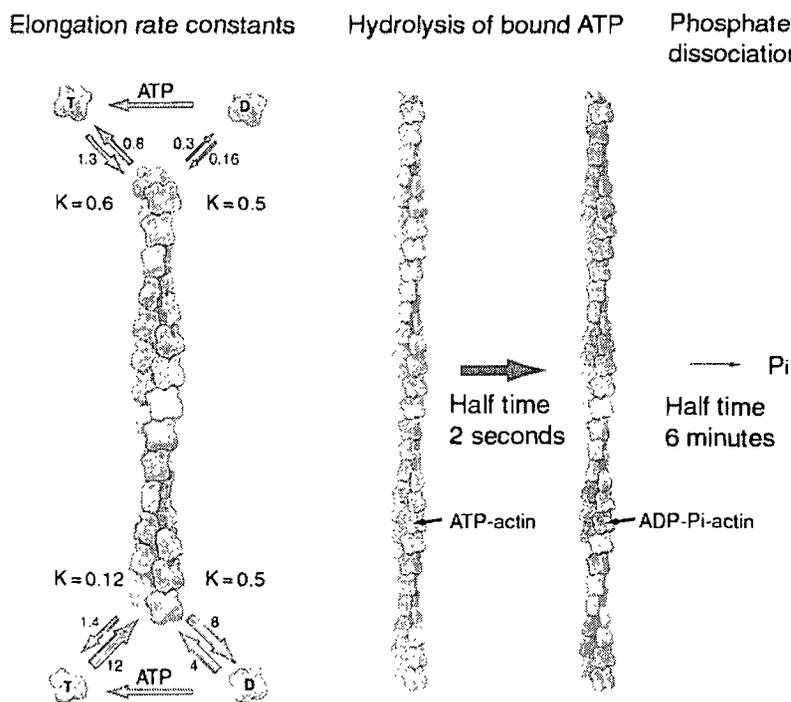


Figure 1.3 : Représentation de la polymérisation de l'actine *in vivo*. Le phénomène de la polymérisation du monomère d'ATP (T) et du monomère d'ADP (D) possède une constante K d'association différente. (Alberts et al, 2001).

La vitesse d'élongation peut être plus rapide que la vitesse d'hydrolyse et ce phénomène génère une coiffe de monomère T et une queue de monomère D. Deux situations sont générées par l'hydrolyse de l'ATP, soit l'instabilité dynamique et l'effet tapis roulant. L'instabilité dynamique est l'alternance entre l'élongation lente et le désassemblage rapide, celui-ci étant principalement provoqué par la dépolymérisation plus rapide de la queue de monomère D. L'effet tapis roulant, quant à lui, est le changement de la concentration critique pour une valeur inférieure de l'extrémité positive (+) comparativement à l'extrémité négative (-) [ $Cc(-) > Cc(+)$ ] (Hill and Kirschner, 1982). À cet état d'équilibre, la longueur du filament ne varie pas mais l'ajout d'un nouveau monomère T se retrouve rapidement éjecté en passant de la coiffe à la queue (Figure 1.4). Même si ces deux situations requièrent beaucoup d'énergie, elles assurent le recyclage constant des monomères. Les monomères des microtubules possèdent un processus de polymérisation semblable à celui des filaments d'actine puisqu'ils utilisent le GTP (Desai and Mitchison, 1997). Toute cette énergie dépensée permet au cytosquelette d'être très dynamique afin de répondre rapidement et adéquatement à ses multiples fonctions.

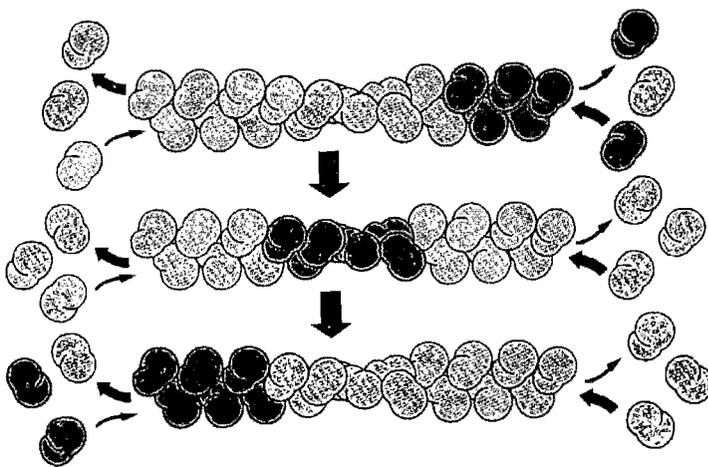


Figure 1.4 : Représentation de l'effet tapis roulant. La longueur de polymère ne varie pas cependant les monomères nouvellement associés sont rapidement éjectés à l'autre bout. (Alberts et al, 2001)



#### 1.1.4 Les protéines accessoires essentielles

Le comportement du réseau de filaments d'actine au « leading edge » est particulier. La rapidité de son élongation ponctuelle ainsi que de sa dépolymérisation sont les mécanismes qui poussent la membrane de la cellule à changer de forme. Ces processus demandent un contrôle fin provenant de l'environnement de la cellule ainsi que de son propre milieu intérieur. La cellule possède une panoplie de capteurs et de protéines capables de se lier à l'actine, appelées « actin binding proteins » (ABP). Il existe plus de 60 classes d'ABP et plusieurs de ces protéines sont nécessaires à la migration de la cellule. L'actine, l'« actin depolymerisation factor » (ADF) et coffiline, les protéines de coiffe, le complexe « actin related protein » (ARP) soit ARP2/3 et la profiline sont capables à elles seules de reconstituer la migration bactérienne dans un système isolé (Loisel et al., 1999). La cellule possède un réservoir de monomères d'actine liés à la profiline et séquestrés par la thymosine  $\beta$ 4. La polymérisation des nouveaux filaments est sous le contrôle de la voie de signalisation de l'activation de la nucléation de la famille « Wiskott-Aldrich Syndrome protein » (WASp) et Scar. Ce sont des facteurs de nucléation qui stimulent le complexe Arp2/3 à initier l'assemblage d'un nouveau filament à partir d'un filament existant (Figure 1.6). De nouveaux embranchements polymérisent de façon transitoire et leur élongation est terminée par des protéines de coiffe. L'ATP présent dans le nouvel embranchement est hydrolysé en ADP et la libération lente du phosphate inorganique initie la dépolymérisation de l'embranchement à l'aide de l'ADF/coffiline qui soutient le retrait des monomères D. Ensuite, la profiline catalyse l'échange d'ADP pour de l'ATP sur les monomères D libres et le cycle recommence (Pollard and Borisy, 2003).

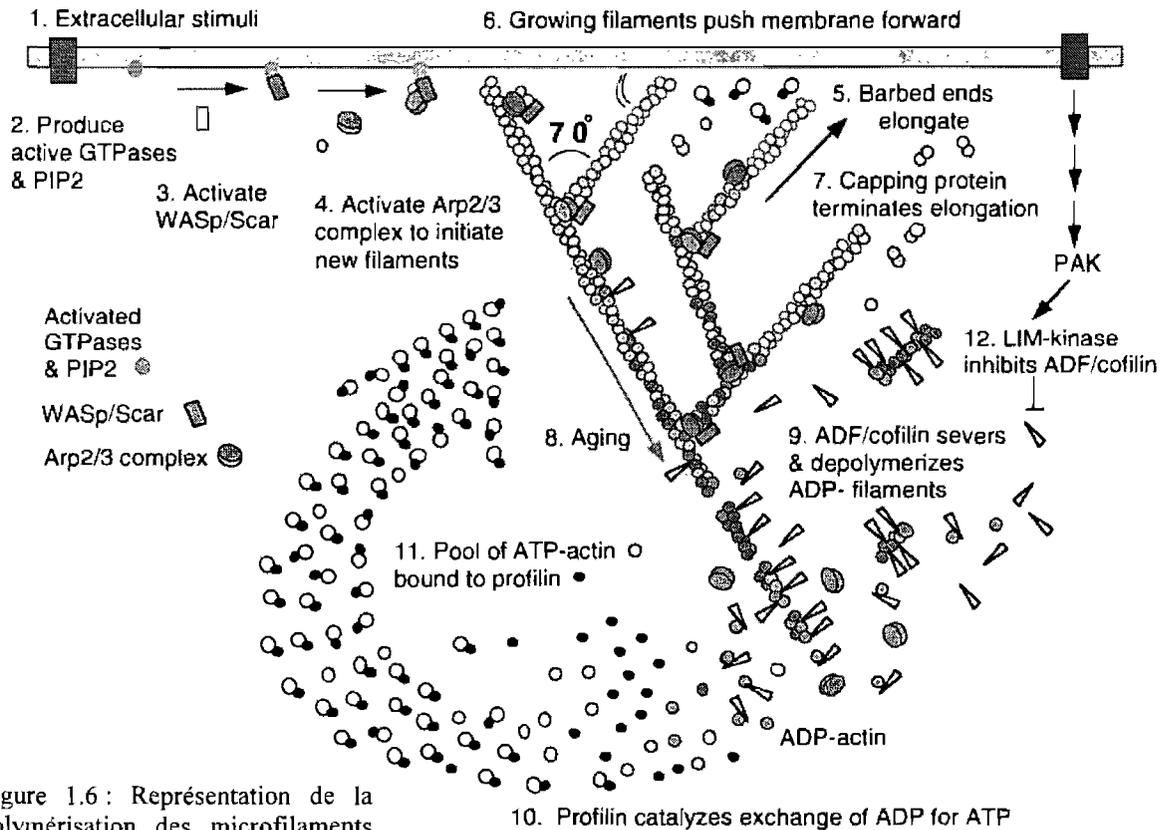


Figure 1.6 : Représentation de la polymérisation des microfilaments d'actine *in vivo*. Les facteurs de nucléation WASp/Scar participe à la formation de nouveaux embranchements. (Pollard and Borisy, 2003)

Le complexe ADF/coffiline joue aussi un autre rôle : il favorise l'initiation de protubérances en sectionnant le filament pour exposer sa coiffe afin de permettre la polymérisation (Zebda et al., 2000). La croissance rapide de l'actine est favorisée par l'échange de l'ADP pour l'ATP catalysé par la profiline. Cependant, cette dernière empêche la nucléation spontanée. De plus, la profiline est aussi capable de lier des domaines riches en proline comme ceux retrouvés dans les protéines VASP et N-WASp (Figure 1.6). Le second mécanisme qui favorise l'élongation rapide est l'association du monomère T avec la thymosine  $\beta 4$ . Dans les plaquettes et les lymphocytes, la réserve de monomères est supérieure à la quantité de profiline. Ainsi, la thymosine  $\beta 4$  lie le reste des

monomères libres mais avec une affinité moindre que celle de la profiline. Cette dernière empêche aussi la nucléation et la polymérisation. En résumé, la profiline permet de maintenir une réserve adéquate de monomères d'actine pour l'élongation des coiffes tandis que la thymosine  $\beta$ 4 assure l'intégrité de la réserve. Ainsi, ce système de double tampons permet une réponse plus dynamique du réseau d'actine (Pollard and Borisy, 2003).

### **1.1.5 Le complexe Arp2/3**

Celui-ci est constitué des protéines Arp2 et Arp3. Sa concentration est relativement élevée dans le cytoplasme, soit environ 10  $\mu$ M dans les lymphocytes (May et al., 1999). Par microscopie et biochimie, on a montré que le complexe liait l'extrémité pointue du filament et initiait la polymérisation d'un autre brin avec un angle de 70 degrés (Mullins, Heuser, and Pollard, 1998). Le complexe agit comme nucléateur sur un embranchement déjà établi avec une faible activité. Par contre, son activité de nucléation diminue à mesure que le complexe est purifié. Ainsi, ce dernier dépend d'autres facteurs d'activation intrinsèques. Plusieurs activateurs ont été identifiés tels que ActA (Welch et al., 1998), WASp/Scar (Machesky and Insall, 1998), cortactine (Weed et al., 2000). Ceux-ci stabilisent le complexe d'embranchement et/ou activent la nucléation avec Arp2/3.

### 1.1.6 Extension de la membrane

Le « leading edge » des cellules motiles est très mince (0,1-0,2  $\mu\text{m}$ ) et comprend un réseau très dense de filaments d'actine (Abraham et al., 1999). Les longs filaments d'actine à l'intérieur de la cellule ne sont pas flexibles et l'impact d'une pression entraînerait leur déformation. Afin d'éviter ce problème la cellule construit en bordure des « leading edges » des filaments très courts et très denses d'actine (Figure 1.7). La densité du réseau branché à la membrane s'appuie sur une section de remodelage. Ainsi, les petits filaments forcent la membrane à s'étendre et ceci constitue la structure de mécanisation de base pour la formation de protubérances (Pollard and Borisy, 2003). L'extension de la membrane se poursuit jusqu'à ce que les embranchements soient terminés par les protéines de coiffe.

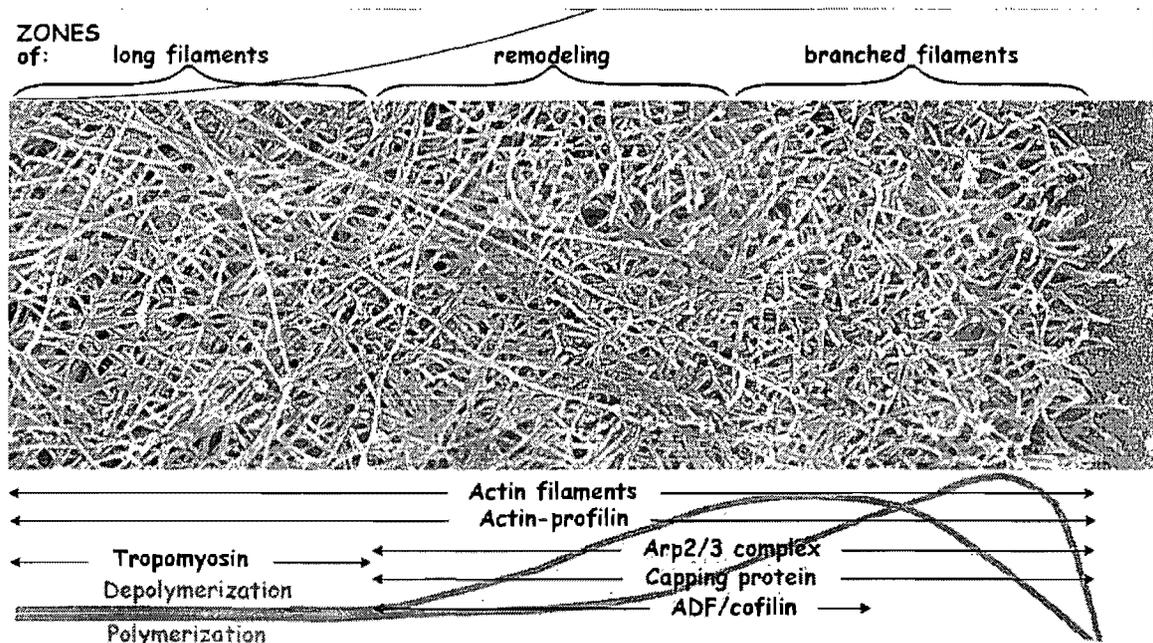


Figure 1.7 : Représentation du modèle de l'extension de la membrane. Les différents niveaux des protéines accessoires de la polymérisation varient dans le temps en fonction du type de filament. (Pollard and Borisy, 2003)

### **1.1.7 Les « capping proteins » ou protéines de coiffe**

Les protéines CapZ dans le muscle sont des protéines de coiffe hétérodimériques ubiquitaires et leur concentration dans le cytoplasme est d'environ 1  $\mu$ M (Cooper and Schafer, 2000). Il existe d'autres protéines de coiffe telles que la Gelsoline chez les eucaryotes supérieurs (Sun et al. 1999). L'encapsulation peut sembler contre-productive puisqu'elle freine l'élongation. Cependant, cette étape est essentielle pour assurer la dynamique d'assemblage et de désassemblage des filaments. D'une part, elle limite la taille des filaments, paramètre important pour pousser la membrane avec une bonne efficacité. Ensuite, elle contrôle le moment et l'endroit où ces microfilaments doivent s'allonger. Seule une coiffe dénudée possède assez de force pour pousser la membrane ; les protéines de coiffe, quant à elles, permettent de restreindre le nombre nécessaire de brins d'actine pour la cohésion de ce mécanisme de migration à un site précis (Pollard and Borisy, 2003). Ainsi, les protéines de coiffe rendent disponible au bon endroit la réserve de monomère d'actine pour la polymérisation en inhibant les brins non productifs (Cooper and Schafer, 2000).

En conclusion, la concentration de monomères d'actine non polymérisés est maintenue par des protéines de séquestration des monomères (profiline et thymosine  $\beta$ 4) et des protéines de découpage (gelsoline, villine). Ainsi, le système est toujours prêt à répondre lorsque de nouvelles coiffes nues sont créées. Plusieurs stimuli externes via différentes voies de signalisation telles que les récepteurs couplés aux protéines G, dictent à la cellule comment agir. Finalement, l'activation du complexe Arp2/3 est un élément clé de

la régulation du réseau d'actine et plusieurs protéines accessoires et régulatrices restent encore à identifier.

## **1.2 MIGRATION CELLULAIRE**

### **1.2.1 La migration cellulaire dirigée : La chemotaxie**

L'accumulation de certaines molécules de signalisation incite la cellule à former des pseudopodes à son « leading edge ». La réorganisation du cytosquelette permet à la cellule de se déplacer dans la direction souhaitée. De cette façon, les procaryotes sont capables de trouver leurs nutriments et les neutrophiles de leur côté, sont capables de suivre à la trace des bactéries responsables de certaines infections (Iijima, Huang, and Devreotes, 2002). Les bactéries sont trop petites pour analyser l'environnement spatial. Elles naviguent de façon saccadée à l'aveuglette dans toutes les directions. Lorsque les bactéries rencontrent un gradient de chemotaxie, elles diminuent leur saccadement et prolongent leur mouvement vers le gradient (Weiner, 2002). En comparaison, les cellules eucaryotes sont beaucoup plus volumineuses et possèdent la capacité de répondre à leur environnement spatial et à l'information temporelle. Elles peuvent ainsi détecter un gradient de concentration entre les deux extrémités de la cellule. Elles sont capables de détecter une différence de 2 à 10% autour d'elles (Janetopoulos et al., 2004).

Les défauts de migration peuvent contribuer à plusieurs pathologies comme par exemple l'ostéoporose, les maladies cardiovasculaires, le cancer et le retard mental. De plus, ce phénomène est essentiel à la vie. Si la cellule n'est pas capable de se rendre à destination, elle meurt. Ainsi, les mécanismes contrôlant la migration se sont grandement

complexifiés avec l'évolution. Pour les cellules eucaryotes, la navigation dans un gradient croissant augmente la formation de pseudopodes à l'avant de la cellule. Au même moment, les pseudopodes de l'arrière de la cellule se rétractent et la polarisation de la cellule augmente (Weiner, 2002). Ce phénomène d'extension-rétraction permet la motilité de la cellule vers le gradient. La formation du pseudopode, l'établissement de la polarité et la perception directionnelle sont les trois étapes importantes de la migration cellulaire.

### 1.2.2 Les récepteurs couplés aux protéines G

Cette famille de récepteurs est responsable, entre autres, de la migration dirigée en réponse à des nutriments, au facteur d'activation plaquettaire (PAF) et son complément, à l'AMPc, au Met-Leu-Phe formylée et aux chemokines relâchées au site d'inflammation (Van Haastert and Devreotes, 2004). Les récepteurs couplés aux protéines G font partie de la plus grande famille de récepteurs membranaires. La rhodopsine et les récepteurs ophtalmiques en font partie. Une panoplie de molécules les activent et ils diffèrent énormément par leur structure et fonction (acides aminés et acides gras). Cependant, ces récepteurs partagent une structure similaire constituée d'un long polypeptide transmembranaire qui traverse sept fois la membrane (Figure 1.8). La famille possède aussi la même orientation et le même groupe de molécules de signalisation intracellulaire s'y lie.

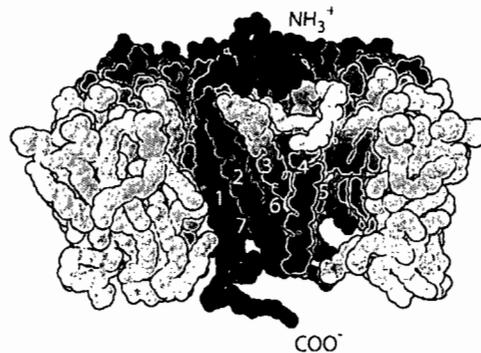


Figure 1.8 :

Réprésentation structurale de la rhodopsine de bœuf (numéros de référence protein data bank 1hzh)

La transduction du signal s'effectue en six étapes (Figure 1.9). Par exemple, lorsque le ligand lie le récepteur serpentin, un changement de conformation permet d'activer le trimère de protéines liant le GTP (protéines G). Plusieurs types de protéines G existent et lient spécifiquement leurs récepteurs avec une fonction similaire. Les protéines G se composent de trois sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Dans l'état inactif (étape 1), le GDP lie la sous-unité  $\alpha$ . Une fois le ligand lié (étape 2), le récepteur activé relâche le GDP en permettant au GTP de se lier avec plus d'affinité (étapes 3 et 4). Cet échange a pour conséquence le relâchement de la sous-unité  $\alpha$  sous l'impact du changement de conformation de cette dernière (étape 5). Le changement structural de la sous-unité  $\alpha$  lui permet d'interagir avec de nouvelles cibles. La sous-unité  $\alpha$  est une GTPase qui, une fois le GTP hydrolysé en GDP, peut se réassocier au complexe  $\beta\gamma$  et renverser le processus d'activation (étape 6). La sous-unité  $\alpha$  hydrolyse lentement le GTP qui reste ainsi activé longtemps. Une série de protéines régulatrices (RGS) permet la modulation de la sous-unité  $\alpha$  afin d'arrêter rapidement la réponse du récepteur couplé aux protéines G (Bourne, 1997).

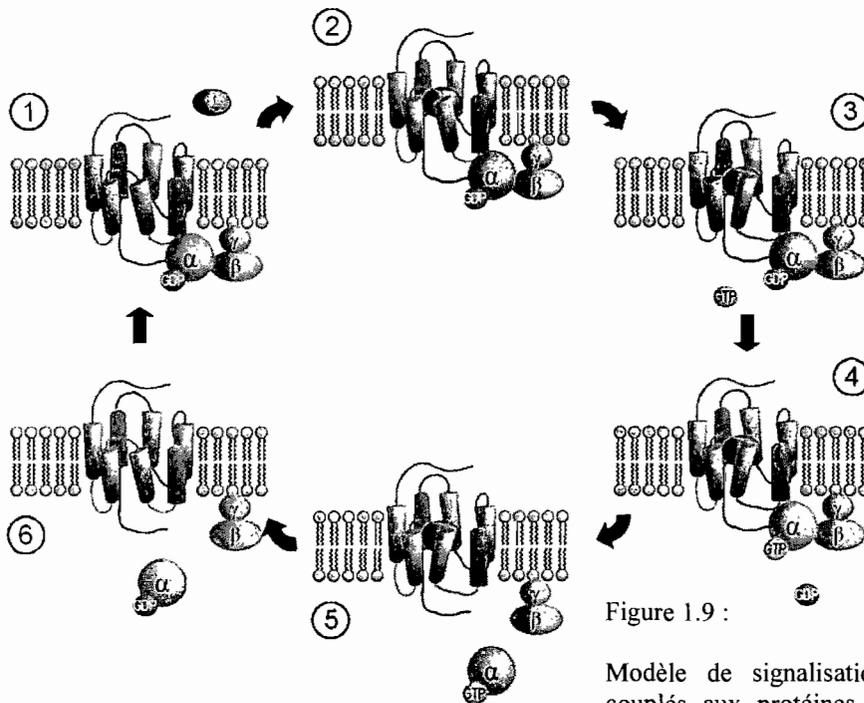


Figure 1.9 :

Modèle de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G (Alberts et al, 2001 .

### 1.2.3 L'adénosine monophosphate cyclique (AMPc)

L'AMPc est un petit médiateur intracellulaire identifié il y a plus de cinquante ans. Les concentrations normales d'AMPc sont de  $10^{-7}$  M à l'intérieur de la cellule et peuvent augmenter de plus de vingt fois en quelques secondes suite à un stimulus (Montminy, 1997). Cette réponse vive demande une synthèse et une dégradation très rapide. L'AMPc est synthétisée à partir de l'ATP par une enzyme liée à la membrane appelée adénylate cyclase et est dégradée continuellement par plusieurs phosphodiesterases des nucléotides cycliques. L'adénylate cyclase est une protéine transmembranaire dont le domaine catalytique réside dans le cytosol.

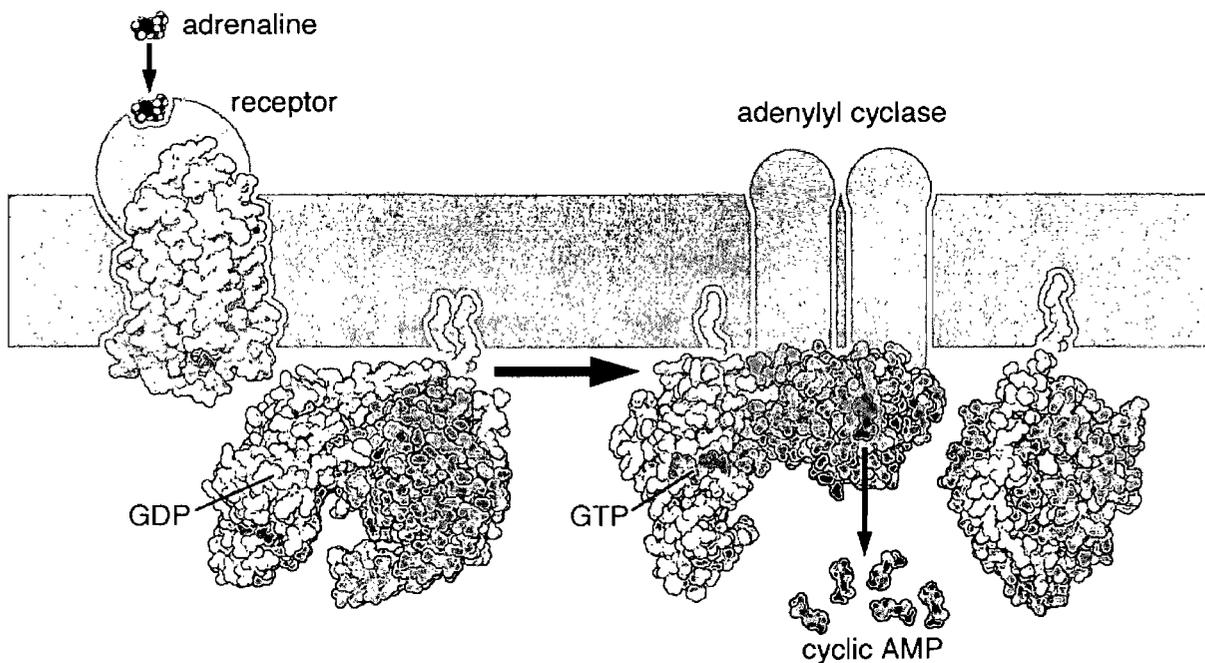


Figure 1.10 : Schématisation de l'activation de la voie de signalisation AMPc. (référence pour protein data bank 1f88, 1got, 1cul et 1btg) Récepteur beta-adrénergique.

Tous les récepteurs liés à l'AMPc par la sous-unité activatrice ( $G_s$ ) ou inhibitrice ( $G_i$ ) de l'adénylate cyclase sont couplés aux protéines G. Bien que l'AMPc active directement plusieurs types de canaux ioniques, l'effet principal est l'activation de protéines kinases dépendantes de l'AMPc (PKA). Les substrats des PKA diffèrent d'un type cellulaire à l'autre ce qui permet à l'AMPc de contrôler plusieurs fonctions cellulaires comme la lipolyse, la glycogénèse et la vasodilatation. Puisque l'effet de l'AMPc est transitoire, la cellule déphosphoryle les cibles de la PKA par quatre groupes de phosphatases qui ciblent les sérines/thréonines des protéines phosphorylées (Montminy, 1997).

Dans le *D. discoideum*, quatre récepteurs pour l'AMPc répondant au gradient chemotactique ont été identifiés. Bien que le complexe  $\beta\gamma$  soit essentiel à la chemotaxie, des études génétiques et de « fluorescence resonance energy transfert » (FRET) ont permis d'identifier la sous-unité  $\alpha$  comme l'élément clé des récepteurs liés à l'AMPc. Ces récepteurs sont distribués de façon homogène parmi les cellules polarisées (Van Haastert and Devreotes, 2004). Cette distribution permet à la cellule de répondre rapidement à son environnement.

#### **1.2.4 La voie de signalisation liée au phospholipide inositol**

Plusieurs récepteurs couplés aux protéines  $G_q$  activent l'enzyme phospholipase C- $\beta$ . Le phosphatidyinositol 4,5-biphosphate [ $PI(4,5)P_2$ ] est présent en petite quantité dans la couche interne de la bi-couche lipidique de la membrane. Cette phospholipase génère le diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1,4,5-trisphosphate ( $IP_3$ ) à partir du  $PI(4,5)P_2$ . L' $IP_3$  est une petite molécule soluble qui diffuse rapidement dans le cytosol. Lorsqu'il rejoint le

réticulum endoplasmique (RE), il se lie et ouvre des canaux calciques. Les réservoirs de  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum endoplasmique libèrent le calcium séquestré ce qui augmente rapidement la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  libre dans le cytosol. Le calcium propage ensuite le signal. Afin d'arrêter le signal, l' $\text{IP}_3$  doit être rapidement déphosphorylé en  $\text{IP}_2$  par des 5-phosphatases spécifiques et le « phosphatase and tensin homologue » PTEN ou phosphorylé en  $\text{IP}_4$  par des kinases (Van Haastert and Devreotes, 2004). De plus, le calcium est rapidement pompé vers l'extérieur de la cellule. Quant au diacyl glycérol, DAG, celui-ci possède des propriétés différentes : il peut être métabolisé en acide arachidonique qui devient à son tour un messager ou encore participer à la synthèse de petits messagers lipidiques appelés eicosanoïdes comme par exemple les prostaglandines. Cependant, le rôle le plus important pour le DAG consiste à activer la protéine kinase C (PKC), une sérine/thréonine kinase. L'élévation initiale du calcium intracellulaire active la PKC qui se déplace du cytosol à la membrane. La présence de  $\text{Ca}^{2+}$ , du DAG et de phosphatidylserine active la PKC qui phosphoryle ses cibles protéiques (Nishizuka, 1992).

Pendant la chemotaxie, plusieurs protéines possédant des domaines homologues à la plexstrine (PH) se déplacent vers la membrane. Ces protéines incluent le régulateur cytosolique de l'adénylate cyclase (CRAC) et la PKB. Dans les *D. discoideum* qui sont déficients en PTEN, l'absence de la phosphatase permet à l' $\text{IP}_3$  d'augmenter la polymérisation de l'actine-F et la formation de pseudopodes au site de recrutement de CRAC et PKB (Van Haastert and Devreotes, 2004). Dans un gradient d'AMPc, ces mêmes cellules sans PTEN forment simultanément plusieurs pseudopodes qui empêchent

la motilité dirigée (Postma et al., 2004). Dans des cellules normales exposées à un gradient d'AMPc, PKB est recrutée à l'avant et PTEN à l'arrière. On remarque les mêmes phénomènes dans des neutrophiles mais les mécanismes d'action n'ont pas été encore déterminés (Van Haastert and Devreotes, 2004). Plusieurs évidences suggèrent un lien entre PIP3, la polymérisation de l'actine et l'extension du pseudopode. Il y a deux phases distinctes, la première, correspondant à l'hérissément de la cellule par le recrutement des protéines PH à sa limite membranaire. À cet instant, il y a une forte polymérisation de l'actine afin de préparer l'extension cellulaire. La deuxième phase correspond à l'extension du pseudopode par un autre recrutement de protéines à domaines PH plus concentrés à l'extrémité membranaire. Expérimentalement, les protéines PH-GFP marquent le pseudopode et possèdent environ la même durée de vie que cette structure. Les inhibiteurs de PKB bloquent complètement la seconde phase de polymérisation mais pas la première. Apparemment, en l'absence presque complète de la voie de signalisation PI3K, les cellules répondent au gradient par d'autres mécanismes encore inconnus. Ces mêmes mécanismes pourraient être responsables de la polymérisation initiale du pseudopode (Soll et al., 2002; Postma et al., 2004).

### **1.2.5 Régulation du réseau de filaments d'actine**

Puisque le complexe Arp2/3 possède une faible activité de nucléation, les facteurs de stabilisation et d'activation de l'embranchement semblent être responsables de toute l'activité dynamique du cytosquelette. L'environnement cellulaire a un impact sur la régulation de ces protéines d'embranchement pour le contrôle de la chemotaxie. Le principal mécanisme de soutien sont les protéines WASp et NWASp que nous avons

décrit dans le chapitre précédent. Ces protéines sont intrinsèquement inactives car elles possèdent une importante capacité d'auto-inhibition (Figure 1.11). Plusieurs données biochimiques et structurales supportent l'idée que la région N-terminale de WASp et de NWASP inhibent l'activité de nucléation du domaine « verprolin, cofilin and acidic domains » (VCA) C-terminale. Le domaine « GTPase binding domain » GBD lie le domaine VCA mais cette interaction est contrecarrée par la compétition de protéines de la famille Rho GTPase,  $PIP_2$ , profiline, les domaines SH3 de Grb2 et Nck (Higgs and Pollard, 2001) pour le domaine GBD de façon plus ou moins similaire. Ainsi, le domaine VCA serait libre pour activer le complexe Arp2/3.

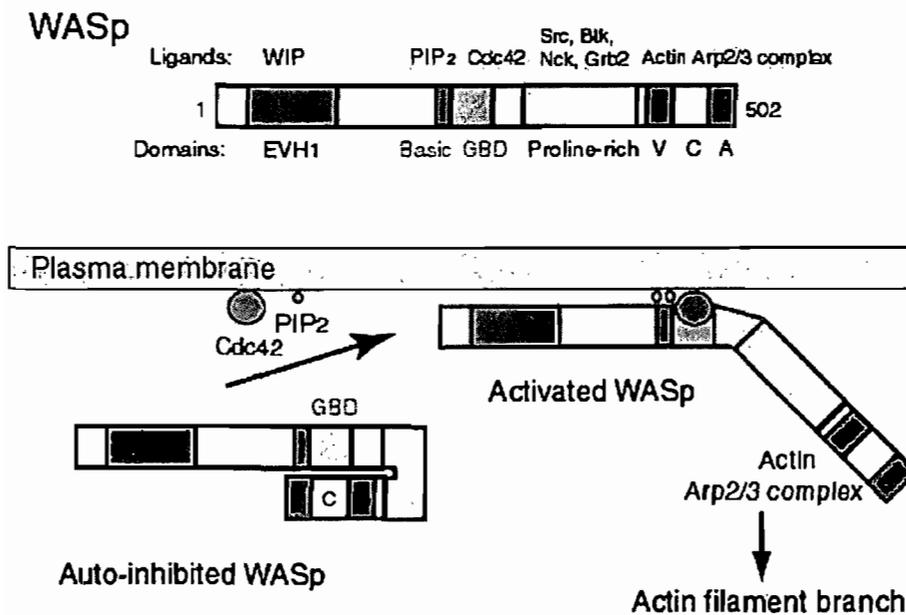


Figure 1.11 : Modélisation et domaine de la protéine WASp(Higgs and Pollard, 2001)

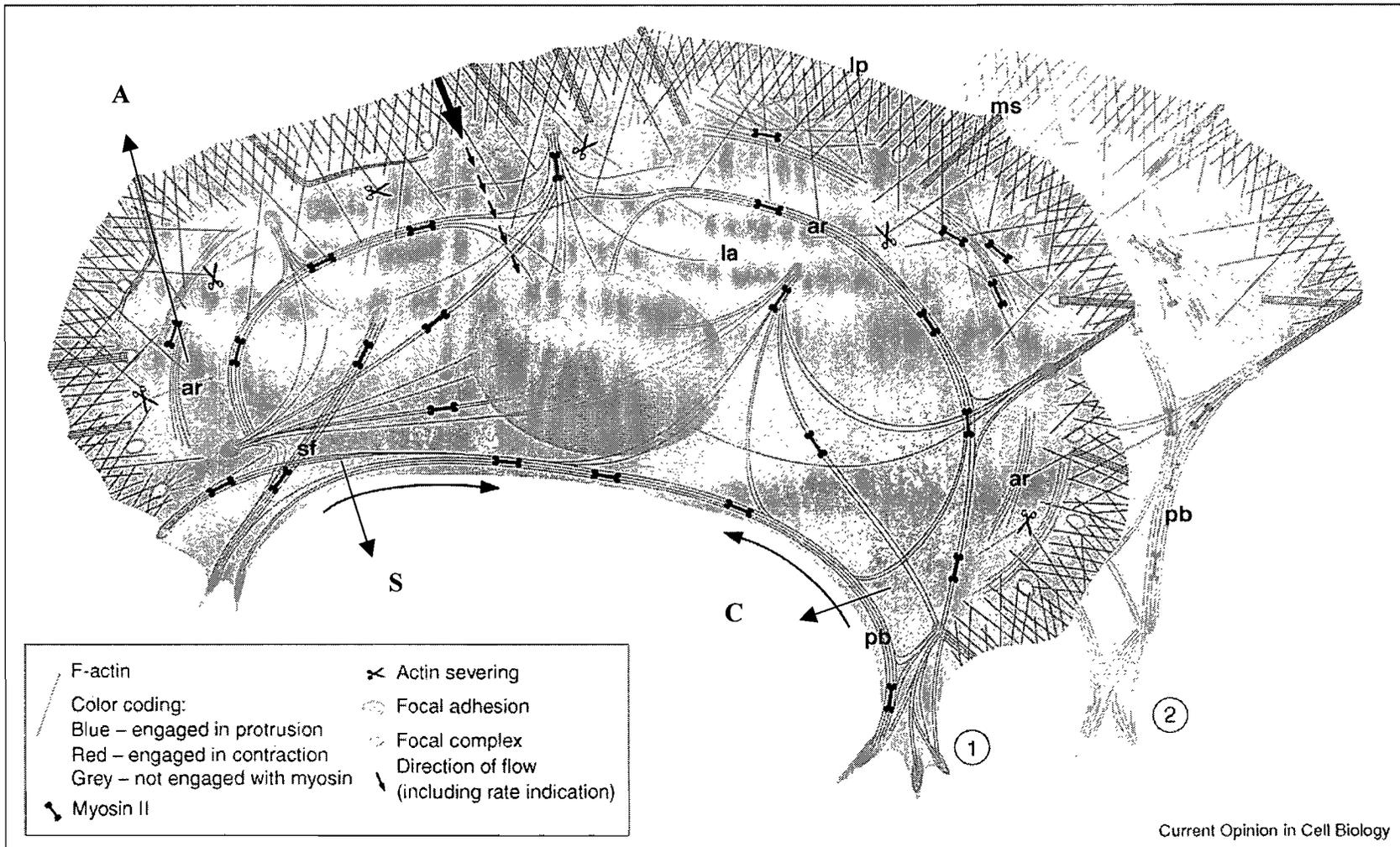
De plus, il a été suggéré que le complexe Scar/WAVE pourrait transmettre le signal de la Rho GTPase Rac-activée pour la formation de lamellipode. Ce complexe permet d'activer aussi Arp2/3 de concert avec WASp/NWASP (Machesky and Insall, 1997). Il

n'est pas clair de ce qu'il advient de ces protéines après l'initiation du nouvel embranchement. Il est présumé qu'elles se lient de façon transitoire à l'activateur ancré à la membrane. La protéine Rac stimule la kinase p21 (PAK) à activer la kinase LIM qui phosphoryle le complexe ADF/coffiline. L'inactivation de l'ADF/coffiline prolonge la demi-vie du filament et ainsi, active les petites GTPase pour stabiliser les nouveaux brins. Ainsi, la famille de Rho GTPase peut influencer le désassemblage des filaments d'actine (Edwards et al., 1999).

### **1.2.6 Mécanisme de motilité de la cellule entière**

L'insertion des filaments d'actine à travers le « leading edge » est orchestrée par la signalisation complexe des protéines accessoires et permet l'extension de la membrane sous la forme de lamellipode. Cependant, l'assemblage et le désassemblage du réseau de filaments d'actine n'expliquent pas à eux seuls comment la cellule entière peut se déplacer. Beaucoup d'études de marquage fluorescent couplées à des études de FRET ont permis de mieux comprendre récemment les mécanismes de recyclage des filaments d'actine.

Il existe trois types de classes de fibres contractiles ; des arches (A), des réseaux de périphéries concaves (C) et des fibres linéaires de stress (S) (Figure 1.12). Les arches sont prédominantes à la base du lamellipode où la polymérisation de l'actine est minimale alors que les fibres concaves sont présentes du côté où il y a rétraction des filaments d'actine. Ces deux types de fibres sont le produit de l'activité des lamellipodes (Small and Resch, 2005).



Current Opinion in Cell Biology

Figure 1.12 : Structure et modèle des fibres d'actine. Les trois classes de fibres contractiles ; les arches(A), les réseaux de périphries concaves(C) et les fibres lin.aires de stress(S) permettent la migration de la cellule via les points d'adhésion focales(cercle gris) (Verkhovsky, Svitkina, and Borisy, 1997).

Les sites d'adhésion focaux sont des endroits de polymérisation de l'actine qui produisent un étalage unipolaire. Ils peuvent se contracter seulement lors du recrutement de filaments de polarités opposées qui proviennent de filaments pré-existants (Machesky and Hall, 1997). Le recrutement de microfilaments à doubles hélices anti-parallèles provient du mouvement latéral des filaments du lamellipode mais surtout de l'endroit très dynamique du « leading edge » (Verkhovsky, Svitkina, and Borisy, 1997). Ainsi, la cellule serait capable de s'étendre vers l'avant avec des filaments parallèles pour ainsi replier son extension sur elle même avec les points d'adhésion focale (Figure 1.13). À cet endroit, la fibre de stress s'associe avec le filament anti-parallèle et la contraction de cette dernière avance la cellule au delà du point d'adhésion à la matrice extracellulaire.

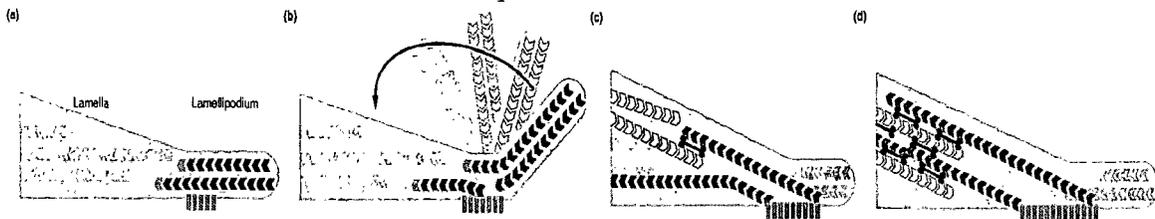


Figure 1.13 : Repliement du lamellipode avec des filaments d'actine anti-parallèle au foyer d'adhésion. (Verkhovsky, Svitkina, and Borisy, 1997)

filaments d'actine et la polymérisation de ces derniers sont effectuées à l'avant de la cellule. La polymérisation diagonale causée par l'angle des branchements accroît la surface de la cellule vers l'avant. Les filaments qui rejoignent les côtés latéraux se rétractent par la suite dans le cortex de la cellule. L'interaction avec la myosine et le réseau d'actine permet à la cellule de garder sa forme tout en grandissant. Ainsi, une force nette ( $F$ ) est créée par des points d'adhésion qui forcent la cellule à avancer en causant la rotation et le repliement de la cellule sur elle même. À la base du lamellipode, le dépolymérisation des filaments retourne les monomères d'actine au réservoir permettant au cycle de se poursuivre (Anderson, Wang, and Small, 1996).

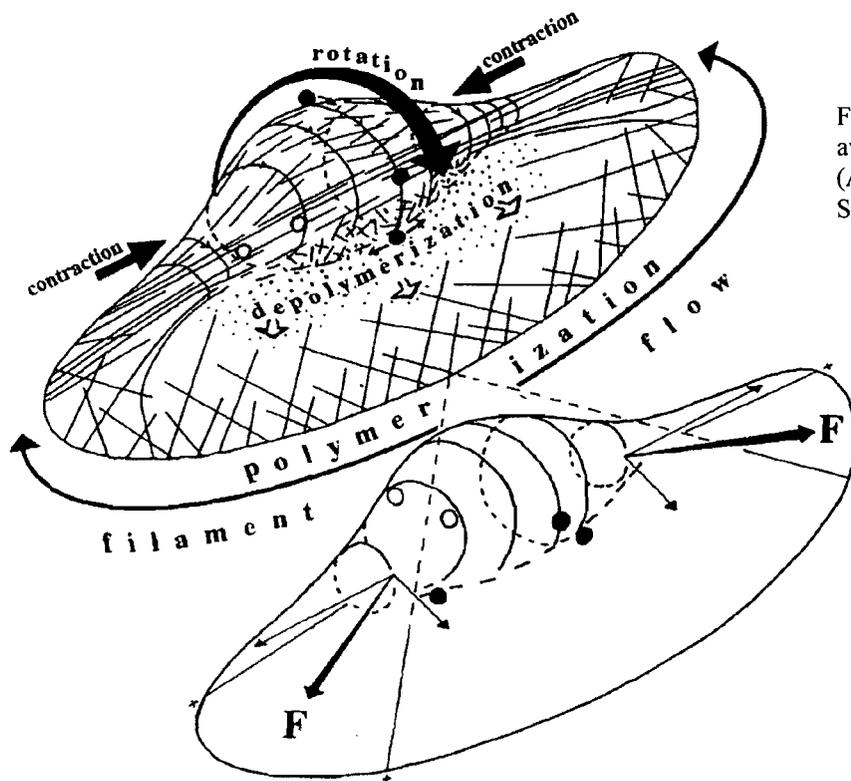


Figure 1.14 : Rotation et avancement de la cellule (Anderson, Wang, and Small, 1996).

### 1.2.7 Implication des canaux et transporteurs ioniques dans la migration cellulaire

La rétraction à l'arrière et la projection de la membrane à l'avant confèrent une polarité importante à la cellule. La myosine II est plus concentrée à l'arrière de la cellule dans certaines lignées. Afin d'avoir une polarité fonctionnelle, la cellule a besoin de mécanismes de support pour maintenir cette différence. La concentration de calcium est plus importante à l'arrière qu'à l'avant de la cellule et ce gradient calcique est responsable entre autre du maintien de la polarité. La fonction des canaux et des transporteurs ioniques est sous le contrôle du cytosquelette. D'un côté, l'activité des transporteurs est régulée par l'actine principalement via le contrôle du volume cellulaire. D'un autre côté, le volume cellulaire régule lui-même l'activité du cytosquelette. Pour un

volume cellulaire donné, les transporteurs et canaux ioniques créent le milieu adéquat pour optimiser la machinerie du cytosquelette. Ainsi, il est important de réaliser que l'activité de ces derniers est importante dans la migration de la cellule (Schwab, 2001).

De nombreux canaux et transporteurs ioniques sont nécessaires à la migration cellulaire comme par exemple, les canaux  $K^+$  sensibles au  $Ca^{2+}$  (IK1), l'échangeur  $Na^+/H^+$  (NHE) et le cotransporteur  $Na^+ -K^+ -2Cl^-$  (Cantiello et al., 1993; Ritter, 1998). Chaque canal ou transporteur modifie soit la concentration calcique soit le volume de la cellule. Plusieurs types cellulaires ont besoin de voir leur concentration de calcium fluctuer pour leur migration et cette dernière peut être modulée par l'activité de canaux  $Ca^{2+}$  de type N soit les récepteurs NMDA (Komuro and Rakic, 1997). Le glutamate est le ligand de ce récepteur et la liaison de ce dernier entraîne l'ouverture d'un canal ionique non spécifique. Les ions  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$  entrent dans la cellule via le canal ionique avec la sortie des ions  $K^+$  (Komuro and Rakic, 1997). Chez les kératynocytes de poisson, l'élévation de  $Ca^{2+}$  coïncide avec une augmentation de la tension membranaire (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Ainsi, l'augmentation de la tension à l'arrière de la cellule suite à l'extension du « leading edge » active les canaux perméables au  $Ca^{2+}$  qui augmentent la concentration de calcium intracellulaire afin d'activer par la suite la rétraction des filaments à cet endroit. Ainsi, les canaux contrôlent indirectement le cytosquelette des cellules migratoires. Ensuite, l'augmentation calcique active les canaux IK1 et un rétrécissement de la cellule s'en suit (Grinstein et al., 1993). L'inhibition des canaux IK1, diminue le volume cellulaire et donc, la migration. Les transporteurs NHE1 et AE2 sont

nécessaires à une migration optimale. Ces deux transporteurs se trouvent concentrés au « leading edge » des cellules migratoires (Ritter, 1998).

Le modèle de la figure 1.15 résume le mécanisme proposé du rôle des transporteurs et canaux ioniques dans la migration cellulaire. Alors que la concentration calcique augmente de façon transitoire, le volume cellulaire est à son plus petit et l'activité du canal IK1 est à son niveau minimal. La concentration ionique et l'osmolarité obligent la cellule à augmenter son apport d'eau via les échangeurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$

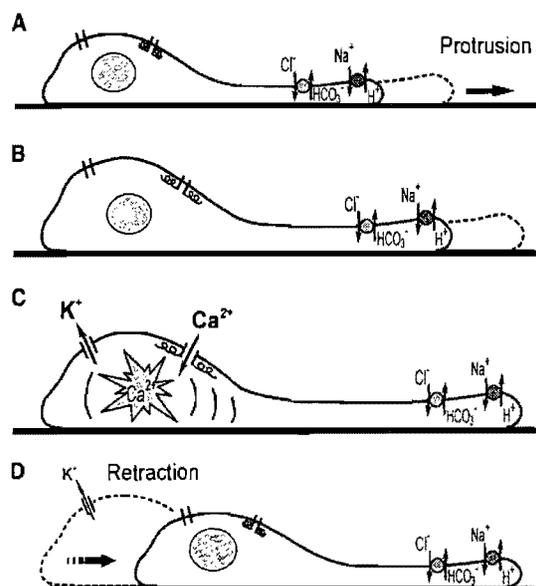


Figure 1.15 : Modèle de motilité cellulaire avec l'intégration des flux ioniques (Schwab, 2001)

et  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  à l'avant de la cellule favorisant ainsi l'extension du lamellipode (panneaux A et B). L'augmentation de la tension causée par la polymérisation de l'actine augmente l'activité des canaux perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  entraînant une augmentation de la concentration calcique à l'arrière de la cellule (panneau C). La rétraction des filaments d'actine est induite par l'élévation du calcium à l'arrière de la cellule accompagnée d'une expulsion massive des ions  $\text{K}^+$  (panneau D) (Schwab, 2001).

### 1.2.8 Élément de régulation de l'expression génique

L'environnement de la cellule et les facteurs intrinsèques dictent à cette dernière les changements signalétiques à adopter pour s'adapter à des changements. Une des

conséquences de l'activation des protéines G est l'activation des PKA à agir sur les protéines régulatrices de la transcription et à modifier l'expression de certains gènes. Le génome de la cellule n'agit pas directement sur la synthèse des protéines. La cellule utilise l'ARN comme intermédiaire afin de maintenir un contrôle serré sur sa régulation. Plusieurs types d'ARN existent et possèdent des fonctions différentes. Ils sont transcrits par une machinerie cellulaire différente. L'ARN polymérase permet la transcription de l'ADN en ARN à l'aide de nombreuses protéines accessoires. Par exemple, l'ARN polymérase II nécessite des facteurs généraux de transcription (TFII). Ces derniers permettent à l'ARN polymérase II de s'ancrer et de se positionner correctement à l'endroit du site d'initiation de la transcription. L'assemblage commence par la reconnaissance de la boîte TATA riche en nucléotides T et A par les TFII liant cet élément. La boîte TATA est typiquement située à  $-25$  bases du site d'initiation de la transcription. Ensuite, le complexe d'initiation de transcription se forme par le positionnement adéquat de la polymérase. L'élongation du transcrit d'ARN est alors initié et le complexe d'initiation de la transcription est généralement relâché. D'autres mécanismes d'initiation et d'autres signaux de transcription existent comme, par exemple, la boîte CAAT retrouvée à environ  $-75$  bases du site d'initiation de la transcription (Alberts et al, 2001).

Le site d'initiation de la transcription peut être régulé de plusieurs façons. Par exemple, des protéines inhibitrices peuvent empêcher l'appariement des TFII. La chromatine elle-même peut induire une conformation défavorable en rendant inaccessible le site physiquement. De leur côté, « les enhanceurs » sont des séquences d'ADN liant des

protéines qui peuvent agir comme des facteurs cis ou trans de transcription. Certains « enhancers » ont été retrouvés à plus de 10 KB en amont ou en aval du site d'initiation de la transcription. Ainsi, plusieurs gènes sont régulés de différentes façons par de nombreux facteurs de transcription. La protéine Ref-1, par exemple, réprime la transcription du gène de l'hormone parathyroïdienne (PTH) en se liant à un élément négatif de régulation par le calcium appelé nCARE (Bhakat et al., 2003). Quant au calcium, il est un second messenger important en plus de maintenir l'intégrité du métabolisme osseux de l'adhésion cellulaire, de la contraction musculaire, de la sécrétion endocrinienne et de la fonction rénale.

### **1.2.9 Élément négatif de régulation par le calcium**

Notre groupe a identifié et caractérisé un élément nCARE dans le promoteur du gène « Hypertension-related, Calcium-Regulated Gene » HCaRG. Tel qu'abordé dans l'introduction, les niveaux de l'ARNm de HCaRG sont moins élevés dans des cellules de parathyroïdes de rat dans un milieu riche en calcium. L'élément nCARE est à l'origine de cette régulation négative. Cet élément a été découvert initialement dans le gène de la PTH qui est sous contrôle négatif du calcium extracellulaire (Okazaki et al., 1991). La répression de la transcription se fait par l'intermédiaire de l'élément nCARE : il s'agit d'une séquence palindromique d'ADN précédée d'une séquence riche en thymidines (T). Pour la PTH humaine, la séquence est TCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAG-ACAGGGTCTCA. Dans le cas de la PTH deux éléments, nCARE-A et nCARE-B, semblent réguler l'expression du gène via la même protéine Ref-1 qui peut se lier à ces deux éléments. Selon des expériences de « electrophoretic mobility shift assay »

(EMSA), la région riche en T est importante pour la liaison du facteur de transcription (Okazaki et al., 1991). L'élément nCARE a été aussi retrouvé dans les gènes de la vasopressine, de la rénine et de Ref-1 (Bhakat et al.). En plus de Ref-1 liant cet élément, Ku70 et hnRNP-L sont les protéines majeures qui possèdent aussi cette particularité (Kuninger et al. 2002).

### 1.2.10 Éléments du cycle cellulaire

De plus, tel qu'introduit, l'expression de HCaRG est soumise au cycle cellulaire : les niveaux d'ARNm diminuent lors de la prolifération cellulaire et augmentent lors de la différenciation cellulaire. La division de la cellule et la mort de cette dernière sont sans doute les événements les plus importants qui assurent l'intégrité des fonctions de la cellule mais aussi d'un tissu, d'un organe et d'un organisme entier. La cellule régule, entre autre, ces processus via des facteurs de transcription. La duplication de la cellule est un cycle composé de deux grandes phases dans le processus de la mitose (Figure 1.16). La réplication de l'ADN a lieu dans la phase S pendant une période d'environ 10 à 12 heures. Ensuite, les chromosomes se séparent et la membrane cellulaire se divise dans la phase M. La phase G1 correspond à la phase pendant laquelle la cellule se prépare en augmentant son volume et son contenu protéique (Alberts et al, 2001).

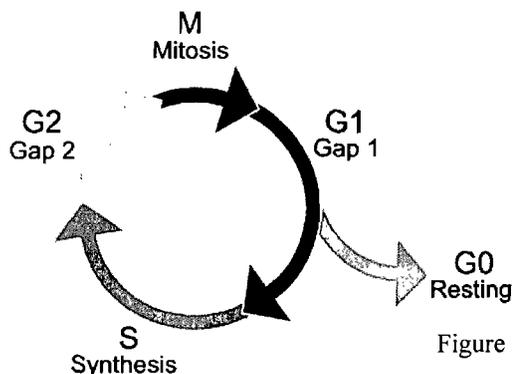


Figure 1.16 : Schématisation du cycle cellulaire

Il y a aussi un temps d'arrêt à la fin de la phase G1 pour permettre à l'environnement de devenir favorable à la duplication et un arrêt à la fin de la phase G2 afin de permettre à tout l'ADN de se répliquer. De plus, un arrêt vers la fin de la phase M assure que les chromosomes soient attachés correctement pour permettre la division. Les protéines qui contrôlent ces différentes phases sont les kinases dépendantes de la cycline (CDK). Les cyclines sont des protéines qui sont synthétisées et dégradées pendant le cycle cellulaire. Elles agissent comme l'horloge dictant chaque phase du cycle cellulaire. Le mécanisme de base de l'expression des cyclines dépend de la présence d'éléments cis dépendants du cycle cellulaire (CDE) et des régions homologues aux gènes du cycle cellulaire (CHR). Par exemple, la répression du gène de la cycline B2 est régulée par un tandem CDE/CHR qui désactive le « nuclear facteur-Y » (NF-Y) au début du cycle cellulaire (Haugwitz, 2001). Le NF-Y est un facteur de transcription ubiquitaire liant la séquence CCAAT (Alberts et al, 2001).

### **1.3 HCaRG**

#### **1.3.1 Introduction de l'hypertension et de HCaRG**

Le rein est l'un des organes les plus importants dans la régulation de la pression artérielle. D'autre part, l'hypertension est l'un des principaux facteurs de risque de l'insuffisance rénale chronique. Le gène HCaRG découvert dans notre laboratoire, code pour une protéine intracellulaire possiblement impliquée dans la fonction et la régénération du rein par son rôle sur la prolifération, la différenciation et la migration des cellules tubulaires rénales. Le contrôle du volume sanguin est l'un des principaux mécanismes de régulation

de la pression artérielle à long terme. Lorsque la pression artérielle augmente, le rein augmente le débit de filtration glomérulaire pour favoriser la diminution de la volémie par l'augmentation de la natriurèse. Ainsi, l'augmentation du volume urinaire se fait par l'excrétion d'eau et d'électrolytes (Grabowski, 2000). Le système rénine-angiotensine-aldostérone module la relation pression-natriurèse lors d'une diminution de la pression artérielle par ses effets sur la vasoconstriction et la réabsorption du sodium et de l'eau. Par ce fait, ce système est une cible importante pour le traitement de l'hypertension artérielle. L'hypertension systémique est un facteur de risque important de la perte des fonctions rénales. La perte progressive de la fonction du rein mène aussi à une pression artérielle élevée. Ainsi, la combinaison de l'un et de l'autre mène à la potentialisation de leurs effets destructeurs. La réponse des cellules tubulaires rénales suite à une ischémie mène entre autre à l'augmentation du volume de ces cellules et l'augmentation de la concentration de leur calcium cytosolique. D'une part, les changements morphologiques des cellules apportent des modifications structurales importantes provoquant un dysfonctionnement du tubule. L'augmentation du calcium intracellulaire active la calpaïne qui dégrade les protéines impliquées dans l'interaction du cytosquelette avec la membrane plasmique. La perte de la polarité des cellules conduit, entre autre, à une diminution de la localisation de la pompe Na,K ATPase à la membrane basolatérale. De plus, les membranes de bordures en brosse du tubule proximal se dissocient et les cellules épithéliales mortes s'accumulent, causant l'obstruction des tubules distaux (Schier, 2004; Lameire, 2001). L'obstruction des tubules distaux par les débris cellulaires diminue aussi le taux de filtration glomérulaire. La régénération et la réparation tubulaire requièrent les étapes successives suivantes : la dédifférenciation, la prolifération, la migration et la re-

différentiation de cellules tubulaires pour le rétablissement de la fonction rénale (Paul A Nony et al, 2003).

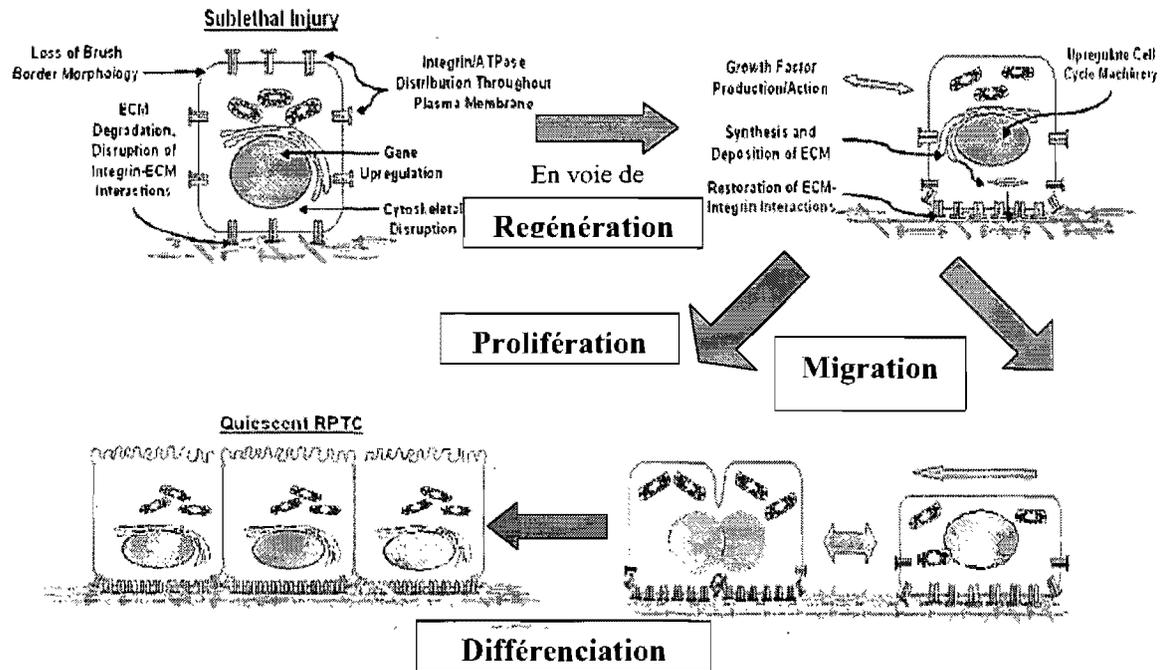


Figure 1.17 Détérioration des cellules tubulaires proximales (RPTC). Les principaux événements cellulaires sont encadrés (Paul A Nony et al, 2003).

Les principaux organes de régulation du calcium sont la glande thyroïdienne et les parathyroïdes (Grabowski, 2000). L'élévation de la concentration sanguine de calcium stimule les glandes parafolliculaires de la glande thyroïde qui libèrent la calcitonine. Cette hormone freine le processus de résorption osseuse et favorise le dépôt de calcium dans la matrice osseuse ce qui entraîne une diminution de la calcémie. En hypocalcémie, les cellules principales des parathyroïdes sécrètent la parathormone (PTH) qui stimule la réabsorption rénale et la libération de calcium de la matrice osseuse. De plus, la PTH

stimule aussi la libération de calcitriol par le rein, ce qui augmente l'absorption de calcium provenant des aliments au niveau du tube digestif.

Dans certaines formes d'hypertension, la concentration de calcium intracellulaire est élevée tandis que la concentration de calcium extracellulaire est faible (Sowers et al, 1991). L'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et de la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase est responsable de la sortie du calcium de la cellule. L'activité des mécanismes de transport de calcium est diminuée dans l'hypertension, menant ainsi à la contraction des cellules musculaires lisses, ce qui augmente la pression artérielle (Touyz, 1995). D'autre part, dans l'hypertension, d'autres ions sont débanancés comme les ions sodiques. L'expression constitutive du canal ENaC et l'activation permanente de la pompe Na,K-ATPase ont démontré l'importance de la réabsorption du sodium dans l'hypertension sensible au sel (Hatton, 1994).

### **1.3.1 La découverte de HCaRG**

Le gène HCaRG a été cloné dans le laboratoire d'accueil par la technique de 3'-RACE avec une librairie d'ARN de cellules de parathyroïdes de rats SHR stimulées par un milieu faible en calcium. Sept fragments se chevauchant ont été repêchés pour reconstituer un ADNc de 1100pb. Cette séquence contient un cadre de lecture codant pour une petite protéine de 224 acides aminés. Avec l'hybridation d'une sonde radio-marquée sur de l'ARNm, deux bandes ont été détectées, suggérant l'existence de deux gènes ou la présence d'épissage alternatif (Solban et al., 2000).

### **1.3.2 HCaRG pour « Hypertension-related Calcium-Regulated Gene »**

Dans des cellules de parathyroïdes de rats WKY (normotendu) et SHR (hypertendu), les niveaux d'ARNm de HCaRG augmentent dans un milieu faible en calcium entre 2h et 48h de stimulation. En comparant les souches normotendues (BN, BN.lx ou WKY) et hypertendues (SHR), le niveau d'expression de HCaRG est significativement plus élevé dans les cellules des parathyroïdes ou les reins des rats hypertendus pour la même concentration normale en calcium (Solban et al., 2000).

### **1.3.3 Caractérisation de la protéine HCaRG**

Cette petite protéine possède un poids moléculaire de 22,4 kDa ainsi qu'un pI de 6,0. Elle est composée à 67% d'hélice-alpha. Elle possède deux cystéines (Cys<sup>64</sup>-Cys<sup>218</sup>) pouvant potentiellement former un pont disulfure intra- ou intermoléculaire. Sur un gel de polyacrylamide en condition non dénaturante, on remarque deux bandes à 27kDa et 43 kDa, ce qui suggère une homodimérisation possible. HCaRG possède aussi plusieurs sites de phosphorylation putatifs pour les protéines kinases A et C ainsi qu'un site de glycosylation (Asn<sup>76</sup>). La protéine de fusion GFP-HCaRG se retrouve dans le noyau dans les cellules COS-7 ainsi que dans le cytosol et les lamellipodes des HEK293. La présence de quatre motifs de type « leucine-zipper » ainsi qu'un motif de liaison aux récepteurs nucléaires pourraient être impliqués dans sa localisation nucléaire. De plus, huit acides aminés sur dix sont homologues au motif EF-hand de liaison au calcium (Solban et al., 2000).

### **1.3.4 Les niveaux d'expression de HCaRG**

Des études d'expression du gène de HCaRG montrent une expression plus importante dans le coeur, l'estomac, le jejunum, le rein, le foie et les glandes surrénales dans des tissus adultes humains. HCaRG est très peu exprimé dans les tissus foetaux. De plus, les niveaux de HCaRG sont plus faibles dans la plupart des lignées cellulaires cancéreuses étudiées et aussi dans certains carcinomes de rein et tumeurs de foie. Dans le rein, l'expression est plus forte dans le cortex et est concentrée dans la région tubulaire mais absente dans les glomérules. Dans des expériences d'ischémie-reperfusion de reins de rat, les taux d'ARNm de HCaRG décroissent rapidement entre 3 et 6h de reperfusion pour remonter par la suite au-dessus des niveaux de base pendant plus de 48h. Le profil d'expression du proto-oncogène c-myc est l'inverse de celui de HCaRG. Dans ce modèle, l'apoptose des cellules tubulaires est accrue et stimule la régénération de ces dernières. Ainsi, les niveaux d'ARNm de HCaRG diminuent lors de la dédifférenciation et la prolifération et augmentent pendant la phase de re-différenciation (Solban et al., 2000).

### **1.3.5 HCaRG et la prolifération cellulaire**

La transfection de HCaRG dans des cellules HEK293 a permis la génération de lignées cellulaires surexprimant de façon stable notre gène. Les clones H8 et H9 surexpriment HCaRG et les clones N1 et N6 sont les contrôles transfectés avec le plasmide sans insert (Devlin et al., 2003). Dans cette étude, l'incorporation de thymidine tritiée est environ 2,5 fois moins importante dans les cellules surexprimant HCaRG (Solban et al., 2000). Il y a une diminution de la prolifération cellulaire marquée par un arrêt du cycle cellulaire en G2M observée par cytométrie de flux. En fait, les cellules sont arrêtées en G2M et sont

environ deux fois plus grosses comparativement aux contrôles. En comparant les profils d'expression différentielles de 111 gènes régulateurs du cycle cellulaire entre les lignées stables, les cellules surexprimant HCaRG présentent une expression plus élevée de l'inhibiteur kinase dépendant cycline P21<sup>Cip1/WAF1</sup> (2,5 fois), cyclin D1 (1,7 fois), Jun-B (2 fois), Big MAPK/ERK5 (1,6 fois) et plusieurs autres. Les niveaux des protéines spécifiques à G1/S ont été analysés par immunobuvardage ; l'expression de l'inhibiteur p27Kip1 est diminuée et celle de p53 demeure identique. Les phénotypes des cellules des clones ont été caractérisés, les H9 possèdent un contenu protéique et un volume cellulaire jusqu'à deux fois plus élevés. De plus, elles synthétisent et sécrètent plus d'ANP, le peptide natriurétique des oreillettes (Devlin et al., 2003).

### **1.3.6 HCaRG et la différenciation cellulaire**

L'analyse par microscopie électronique à transmission a révélé la présence de structures cellulaires plus différenciées dans les clones HCaRG. Ainsi, les cellules H9 possèdent des jonctions semblables à des desmosomes, des complexes de formation de jonction semblable aux glandes et plusieurs microvillis tandis que les N1 ne possédaient que des jonctions étroites. De plus, il a déjà été mentionné que les gènes les plus induits par la surexpression de HCaRG sont P21<sup>Cip1/WAF1</sup>, Big MAPK/ERK5 et Jun-B et que ces derniers sont aussi associés au processus de différenciation (Devlin et al., 2003).

### **1.3.7 HCaRG et la migration cellulaire**

La surexpression de HCaRG dans les HEK293 augmente la motilité cellulaire de 3,5 fois. En fait, après avoir infligé une plaie aux cellules, les cellules H9 ferment 50% de cette plaie en 24h tandis que les N1 ne referment que 6% (essai de guérison de plaie). Cet effet a aussi été observé dans nos lignées stables de MDCK-C7 sur-exprimant HCaRG. L'adhésion cellulaire est aussi plus marquée puisque les cellules H9 s'attachent de façon maximale à une matrice de fibronectine après 20 minutes tandis que seulement 45% des N1 étaient attachées. On a pu observer aussi un changement morphologique des cellules; les cellules H9 projettent des lamellipodes et possèdent des domaines riches en actine contrairement aux cellules N1 ayant une forme de type polygonale (El et al.). L'analyse de « genechips » d'expression de tout le génome d'Affymetrix a permis de comparer les profils d'expression des N1 et H9. Les gènes d'intérêt induits par la surexpression de HCaRG sont l'autotaxine (4,3 fois), le TGF-alpha (3,5 fois), le précurseur de la fibronectine 1 (2,7 fois), la dynéine (2,5 fois) et la galectine (1,7). Ces protéines sont toutes nécessaires à la migration et à l'adhésion cellulaire. D'autre part, la protéine d'adhésion vinculine détectée par immunofluorescence est plus concentrée à la membrane des H9 que des N1. La localisation de la vinculine est plus diffuse pour les N1 et ce même si les niveaux d'ARNm sont semblables dans les deux lignées cellulaires (El et al., 2005).

La surexpression de HCaRG stimule la sécrétion de plusieurs facteurs motogéniques comme le TGF-alpha. Le milieu conditionné des cultures de H9 ajouté aux cellules N1

permet d'augmenter la motilité de ces dernières. Les cellules N1 auxquelles on ajoute le milieu conditionné des H9 ferment 18% de la plaie en 24 heures comparativement à seulement 5% en présence de leur propre milieu. L'analyse du milieu conditionné de H9 montre une concentration accrue de TGF-alpha (1,8 fois). L'incubation de N1 avec du TGF-alpha augmente de façon dose-dépendante la motilité de ces cellules sans changer la morphologie cellulaire, et l'ajout d'un inhibiteur de TGF-alpha bloque la migration des H9. Le TGF-alpha se liant au récepteur « early growth factor » (EGF) stimule aussi la prolifération cellulaire. Cependant, au temps de 24 heures, la prolifération cellulaire a été testée via l'incorporation de thymidines tritiées et l'état prolifératif des cellules H9 étaient semblables à leur contrôle N1. Ainsi, la voie du TGF-alpha est un mécanisme important pour la migration des cellules surexprimant HCaRG via un effet paracrine et/ou autocrine (El et al, 2005.).

### **1.3.8 HCaRG est une protéine de la famille COMMD**

En 2005, HCaRG a été classé dans une nouvelle famille de protéines par son analogie de structure avec la protéine Murr1. La protéine Murr1 est la protéine fondatrice de cette nouvelle famille et a été appelée (COMMD1) pour « copper metabolism gene MURR1 domain-containing ». Les protéines de la famille COMMD ont une séquence en acides aminés en C-terminal très conservée, ce qui a permis de classer 10 protéines humaines incluant Murr1 (Burstein et al., 2005) dans cette nouvelle famille. L'analyse des protéines orthologues de différentes espèces a permis de caractériser davantage le motif COMM conservé, lequel est composé d'une région riche en leucines (acides aminés 70-85) qui prédit la structure secondaire en feuillet  $\beta$ . Cependant, la majorité des protéines

identifiées codent pour des protéines encore hypothétiques non caractérisées à l'exception de COMMD5 qui correspond à la séquence de HCaRG. De plus, les gènes COMMD sont conservés dans l'évolution des vertébrés et cinq de ces gènes sont retrouvés chez la *Drosophila melanogaster* (COMMD2, -3, -4, -5, -10) et le *Dictyostelium discoideum* (COMMD4, -5, -7, -8, -10). Huit des COMMDs sont retrouvés dans les métazoaires primitifs à l'exception de COMMD1 et COMMD9 qui sont restreintes à l'espèce humaine (Burstein et al., 2005.). Malgré leur motif conservé, les régions hors du domaine COMM sont très divergentes à l'intérieur de la famille suggérant des fonctions différentes. L'analyse de l'expression des gènes dans les HEK293 par RT-PCR montre que tous les gènes COMMD sont exprimés dans cette lignée cellulaire dérivée d'un rein embryonnaire humain. De plus, l'analyse de tissus multiples a confirmé l'expression de COMMD5 avec prépondérance dans le cœur, le foie et le cerveau (Burstein et al., 2005.).

### **1.3.9 Les protéines COMMDs interagissent avec d'autres COMMDs**

La purification de COMMD1-TAP par chromatographie à partir d'un extrait cellulaire de HEK293 transfecté de façon transitoire avec cette protéine de fusion a permis d'identifier certains partenaires protéiques de COMMD1 (Burstein et al., 2005.). Ainsi, suite à une analyse par spectrométrie de masse COMMD-3, -4 et -6 se retrouvent aussi dans les fractions d'élution. L'évaluation de l'interaction entre COMMD1 et les autres COMMDs a été faite par système de « pull-down » sur COMMD-GST pour les dix protéines de la famille en fusion transfectées dans des HEK293. L'immunobuvardage contre COMMD1 a montré que toutes les COMMD à l'exception de COMMD9 interagissent avec COMMD1. Afin de déterminer si le domaine COMM est nécessaire à

cette interaction, une série de délétions des séquences de COMMD1 ont été testées. Ainsi, la partie carboxy-terminale de COMMD1 (exon 2-3) qui contient le domaine COMM est suffisante pour l'interaction entre COMMD1 et COMMD3 (Burstein et al., 2005.).

### **1.3.10 Dimérisation entre les COMMDs**

COMMD6 a été utilisé comme prototype de la famille des COMMDs puisqu'il ne possède pas un N-terminal aussi variable que les autres membres. Ainsi, il est un bon candidat dans l'étude du domaine COMM. Les études de COMMD6 et le fondateur de la famille, COMMD1, ont montré des interactions directes à travers toute la cellule. Le gène de COMMD6 code pour deux isoformes exprimées de façon ubiquitaire (isoformes a et b) (de et al.). Des co-immunoprécipitations entre COMMD1 et COMMD6 endogène ont montré que les deux protéines sont des partenaires réciproques. Des études de pull-down avec GST ont démontré que COMMD1 peut interagir avec les deux isoformes de COMMD6. Cependant, COMMD6 b ne peut dimériser qu'avec lui-même et ne peut pas lier l'isoforme a (de et al., 2006). De plus, la transcription *in vitro* de COMMD1 et COMMD6 marquée à la méthionine S35 montre un lien direct et spécifique entre ces deux membres de la famille (de et al.). La délétion de l'exon 3 de COMMD1 (domaine COMM) abolit l'interaction avec COMMD6 dans un système de double hybride. Étonnement, les trente-neuf acides aminés en position C-terminale de COMMD6 sont suffisants pour lier COMMD1. Les protéines de fusion COMMD1-N-YFP et COMMD6-C-YFP ont été transfectées dans des HEK293. Le signal de fluorescence de YFP étant seulement détectable lorsque les deux portions sont à proximité, l'expérience a pu

montrer que le signal de YFP est spécifique à l'interaction entre COMMD1 et COMMD6 et ce au niveau du cytoplasme et du noyau (de et al., 2006).

### **1.3.11 Les COMMDs inhibent la voie de transcription médiée par $\kappa$ B**

Récemment, la protéine COMMD1/MURR1 a été rapportée comme pouvant inhiber la voie de transcription médiée par NF- $\kappa$ B. Le knockdown de Murr1 augmente l'activité de NF- $\kappa$ B et diminue la concentration de I $\kappa$ B -a en facilitant la dégradation du phospho- I $\kappa$ B -a par le protéasome (Ganesh et al.). La transfection d'un rapporteur 2 $\kappa$ B -luciférase additionné d'un vecteur codant pour les protéines COMMDs a été stimulée par du TNF pendant 12 heures dans des HEK293. Les résultats de cette expérience montrent que la surexpression des COMMDs inhibe l'activité du rapporteur 2 $\kappa$ B -luciférase conférant à cette famille la possibilité de contrôler la transcription de  $\kappa$ B au niveau basal ou stimulé par le TNF. Dans cette expérience, il a été démontré que COMMD5 est capable d'inhiber d'environ 50% le niveau basal et de 70% le niveau stimulé de NF-  $\kappa$ B par TNF (Figure 1.19) (Burstein et al., 2005.). Aucun effet synergique ou additif entre les COMMD6 et COMMD1 n'a été observé sur l'inhibition du rapporteur 2 $\kappa$ B -luciférase (de pie et al., 2006).

L'évaluation du contrôle de la transcription des gènes répondant au  $\kappa$ B a été réalisée par l'expression du gène c-IAP2 en réponse au TNF. Les « knockdown » des COMMD1, -4 et -6 augmentent la transcription du gène C-IAP2 avec un effet plus marqué pour COMMD6 (Burstein et al., 2005.). Cependant HCaRG/COMMD5 n'a pas été testé dans cette expérience. L'association de COMMD1 avec le complexe NF- $\kappa$ B a été confirmée

par immunoprécipitation de RelA et C-Rel endogène (Burstein et al., 2005.). Un pull-down des GST-COMMD suivi de l'immunobuvardage contre les sous-unités de NF- $\kappa$ B RelA, c-Rel, RelB, NF- $\kappa$ B1/p105 et NF- $\kappa$ B2/p100 a montré que la plupart des COMMD sont co-précipitées avec ces complexes et ce avec des affinités différentes. COMMD3 et -9 sont retrouvées préférentiellement avec RelB et NF- $\kappa$ B1/p105, COMMD6 -7 avec RelA. COMMD1, -2, -4, -5, -8 et -10 peuvent s'associer de façon moins spécifique avec les divers complexes. HCaRG/COMMD5 a été co-immunoprécipité avec RelA, RelB et NF- $\kappa$ B1/p105. De plus, l'interaction entre COMMD1 et RelA nécessite la protéine complète. Dans ces expériences, le domaine COMM n'est pas suffisant. Cependant, les 180 premiers acides aminés de RelA sont suffisants pour lier COMMD1 seulement. Le motif RHD « Rel homology domain » couvre la région N-terminale entre les acides aminés 1 et 305 et il est hautement conservé entre les cinq sous-unités de NF- $\kappa$ B (Burstein et al., 2005.).

Dans la plupart des cellules, NF- $\kappa$ B est retenu au cytoplasme par les membres de la famille I $\kappa$ B. La surexpression de COMMD1 n'affecte pas la distribution du complexe NF- $\kappa$ B à travers le cytoplasme et le noyau. De plus, la sur- ou la sous-expression de COMMD1 n'a pas changé la capacité de liaison de  $\kappa$ B à des extraits nucléaires stimulés ou non au TNF par EMSA (Burstein et al., 2005.). Ainsi, le contrôle de la transcription de  $\kappa$ B par COMMD1 est indépendant de la translocalisation nucléaire de NF- $\kappa$ B. L'utilisation d'essais de précipitation de chromatine (ChIP) a permis de déterminer le rôle de COMMD1 au site de recrutement de RelA du promoteur de c-IAP2. Suite à la stimulation au TNF, RelA est capable d'occuper plus longtemps le site de recrutement

lorsque COMMD1 est sous-exprimé. Ainsi COMMD1, est recruté à ce site. De plus, en sur-exprimant COMMD1 et en augmentant le recrutement de RelA par une adhésion cellulaire soutenue à la lamilline, l'association RelA au site de recrutement est diminuée (Burstein et al., 2005.). Ainsi COMMD1 affecte la demi-vie du complexe RelA-chromatine suite à une activation NF- $\kappa$ B en déplaçant le complexe au site de recrutement du promoteur.

### **1.3.12 Caractérisation de l'interaction COMMD-COMMD de la voie NF- $\kappa$ B**

À l'intérieur du domaine COMM, les acides aminés TRP24 et Pro41 sont absolument conservés. La mutation de l'un ou de l'autre n'affecte pas l'activité du rapporteur 2 $\kappa$ B-luciférase avec COMMD6. Cependant, lorsque les deux sont mutés en même temps la répression de COMMD6 induite par la stimulation de TNF sur la voie NF- $\kappa$ B est complètement abolie. Le double mutant COMMD6 W24A/P41A augmente le niveau basal est stimulé par le TNF de NF- $\kappa$ B. Il agit donc comme un activateur superdominant de la voie NF- $\kappa$ B (de pie et al., 2006). Des études de pull-down ont montré que COMMD1 peut interagir avec les COMMD6 mutés et que ces derniers peuvent s'homodimériser. De plus, les mutants COMMD6 sont capables de lier avec la même force, RelA. Cependant, COMMD6 et les COMMD6 mutés ne sont pas capables de lier Ik-Ba contrairement à COMMD1 (de pie et al., 2006). Ces évidences suggèrent un rôle différent de COMMD6 dans l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B. La séquestration de COMMD1 par la sur-expression de COMMD6 peut être un des mécanismes de contrôle de la voie NF- $\kappa$ B.

### 1.3.13 COMMD pour « Copper metabolism gene... »

Le cuivre est un élément important pour les fonctions enzymatiques. Par contre, il devient rapidement très toxique en excès car il produit des radicaux hydroxylés par les réactions Haber-Weiss (Valko, Morris, and Cronin, 2005). La régulation de l'homéostasie du cuivre est assurée de façon transcriptionnelle et post-transcriptionnelle par l'internalisation des transporteurs (de pie et al., 2006). Une pathologie importante du cuivre est la maladie de Wilson causée par des mutations du gène ATP7B (Tao et al., 2003). Le gène code pour un transporteur de cuivre ATPase de type P (Bull et al., 1993). L'accumulation de cuivre dans le foie provoque des lésions et une excrétion accrue de bile (Tao et al., 2003). Récemment, l'absence de la protéine COMMD1 causée par une délétion génomique de l'exon 2 a été observée chez des chiens terrier Bedlington entraînant une intoxication au cuivre (de et al., 2006). Dans des cellules de foie HepG2 traitées avec 100  $\mu$ M de cuivre, l'ARNm de COMMD1 diminue après 8 heures. Dans cette étude, l'ARNm de la plupart des COMMDs sauf COMMD9 a aussi diminué après 18 ou 24 heures mais de façon moins importante que COMMD1 (Muller et al., 2007). Dans cette expérience, les niveaux d'ARNm de COMMD5/HCaRG étaient diminués d'environ 50% après 24 heures de stimulation.

Il est bien connu que le stress oxydatif induit par un métal augmente l'activité de NF- $\kappa$ B (Shi et al., 1999). La stimulation par le cuivre a un effet semblable au TNF sur le rapporteur 2 $\kappa$ B -luciférase. La surexpression de COMMD1 en présence de cuivre inhibe la stimulation de la voie NF- $\kappa$ B comme avec les expériences du TNF (Muller et al., 2007). NF- $\kappa$ B augmente la transcription de plusieurs gènes tels certains facteurs de

croissance et des cytokines. L'Il-8, HMOX1 et la ferritine ont été identifiés comme des gènes de réponse tardive à une incubation au cuivre et sont des cibles de la voie NF- $\kappa$ B (Muller et al., 2007). Cette voie participe à de nombreux processus biologiques tels la réponse immunitaire (Ghosh, May, and Kopp, 1998), l'apoptose (Shen et al., 2004), le cycle cellulaire (Joyce et al., 2001) et l'oncogénèse (Baldwin, 2001). Les expériences avec COMMD1 et COMMD6 suggèrent que ces gènes doivent être réprimés pour avoir une réponse soutenue de la voie NF- $\kappa$ B.

#### **1.1.14 Structure de N-COMMD1**

La région impliquée dans la dimérisation des COMMD est le domaine COMM qui agit comme interface. Cependant, la contribution majeure provient de la région C-terminale. Quant à la région N-terminale, elle a été cristallisée pour fins d'étude de structure de la séquence 1-108. N-COMMD est très compacte, monomérique et est constituée seulement d'hélices-alpha. La tyrosine phosphatase SptP, la protéine vésiculaire de transport Sec17 et la geranylgeranyl-transférase Rab possèdent une structure à triple hélice semblable à celle de N-COMMD1. La triple hélice est une structure ubiquitaire retrouvée dans plusieurs types de protéines. Ensuite, la région Arg49, Lys54, Arg56, Lys60 et Lys82 forme aussi des hélices avec une surface positive. Cette région peut servir d'interface de liaison avec d'autres protéines puisqu'il semble y avoir une compatibilité de charge et de positionnement des résidus avec les partenaires protéiques des COMMD1 tel que cullin1 et XIAP (Sommerhalter, Zhang, and Rosenzweig, 2007).

### **1.3.15 Capacité de liaison du cuivre**

Selon des études de spectrofluorescence, COMMD1 est capable de lier le cuivre avec un  $K_d$  de 3 à 5  $\mu\text{M}$  mais pas les autres ions divalents tels que le zinc, le nickel et le cobalt. De plus, l'exon 2 est capable de lier le cuivre de façon similaire à la protéine native. Les résidus H134 et M110 ont été identifiés comme le site de liaison du cuivre et sont situés dans l'exon 2. Ainsi, cette région semble très importante pour la liaison du cuivre et la délétion de cette séquence cause une intoxication au cuivre chez les chiens (Narindrasorasak et al., 2007).

### **1.3.16 « KO » chez la souris et déficience de COMMD1**

Afin d'étudier le rôle de COMMD1, l'exon 2 par recombinaison homologue chez la souris pour rendre la protéine déficiente. Les souris avec cette délétion meurent à l'état d'embryon contrairement au chien. De plus, les expériences ont permis d'identifier COMMD1 comme une nouvelle protéine de régulation du facteur inductible par l'hypoxie 1 (HIF-1). La perte de COMMD1 mènerait donc à une expression aberrante de ce facteur au début de l'embryogenèse. Ainsi, la dérégulation du métabolisme énergétique et le manque de vascularisation du placenta seraient responsables de la mort précoce des souriceaux (van de et al., 2007).

### 1.3.17 Résumé du travail

Le but de ce travail de maîtrise était de poursuivre la caractérisation de HCaRG, un gène découvert dans le laboratoire et dont les effets sur la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire suggèrent qu'il pourrait jouer un rôle important dans la pathophysiologie rénale. De plus, les niveaux d'expression de HCaRG sont plus élevés dans les parathyroïdes et les reins de rats génétiquement hypertendus (SHR) comparativement aux rats normotendus Brown-Norway (BN). Ceci laisse entrevoir un lien possible entre HCaRG et les anomalies de calcium retrouvées dans certaines formes d'hypertension essentielle.

Ce mémoire comporte trois chapitres de résultats. Dans le premier, nous avons poursuivi nos études sur la régulation de l'expression de HCaRG par le calcium. Nos résultats antérieurs démontrent une inhibition de la transcription de l'ARNm de rHCaRG par le NaCl et le mannitol. La présence d'un élément nCARE dans le promoteur semble important dans ce processus de régulation. Puisque le nCARE est un élément de régulation négatif par le calcium, nous avons investigué davantage l'effet du calcium *in vitro* sur une construction plasmidique du promoteur rHCaRG ainsi que sur l'ARNm de hHCaRG suite aux traitements de cellules HEK293 par l'EGTA et le CaCl<sub>2</sub>.

Dans le deuxième chapitre, nous abordons l'interaction de HCaRG avec ses partenaires protéiques potentielles. Suite à la réalisation de la technique du double hybride chez la levure, nombreux clones positifs d'interaction avec HCaRG ont été séquencés. Plusieurs transporteurs et canaux ioniques ont été identifiés ainsi que COMMD8, un membre de la

même famille de HCaRG. Afin de confirmer l'interaction de HCaRG avec certaines protéines, des expériences de co-immunoprécipitation et d'immunofluorescence ont été effectuées.

Nos résultats précédents démontrent une augmentation de la migration des cellules épithéliales rénales. De plus, avec la technique du double hybride, la  $\beta$ -actine est capable d'interagir avec HCaRG. Nous avons supposés que HCaRG est une protéine liant l'actine capable d'influencer la polymérisation de cette dernière afin d'augmenter la migration cellulaire. Nous avons démontré l'interaction par « pull-down » et son pouvoir dépolymérisant de l'actine filamenteuse par des études de « spin-down ». De plus, nous avons confirmé le rôle de HCaRG dans la migration cellulaire par l'approche de « knock-down » par ShRNA de la protéine, les études précédentes ayant été restreintes aux conditions de sur-expression de HCaRG *ex vivo* (El Hader et al., 2005, Devlin et al., 2002 Solban et al., 2001).

**Chapitre 2**

**Régulation de l'expression**

**de HCaRG**

## **2.0 Introduction du chapitre**

Tel que rapporté dans la revue de la littérature précédente, les niveaux d'expression de HCaRG varient en fonction de la concentration de calcium et de l'état prolifératif des cellules. Plusieurs éléments de réponses tels que les CDE et CHR sont en partie responsables de la régulation de certains gènes impliqués dans le cycle cellulaire (Section 1.2.8). De plus, le clonage d'une région du promoteur de HCaRG de rat a montré la présence d'un élément nCARE. Afin d'évaluer l'effet du calcium sur la régulation du promoteur, nous avons cloné le promoteur avec l'exon non traduit et testé ces constructions dans les cellules HEK293 incubées avec diverses concentrations de calcium. De plus, nous avons effectué des transfections avec un agent lipidique plutôt que la technique classique de précipitation au phosphate de calcium.

## **2.1 Méthodologie**

### **2.1.1 Clonage et séquençage de la région 5'UTR de HCaRG**

L'amplification de la région 5'UTR du gène de HCaRG a été faite à partir de 100 ng d'ADN génomique de rat Brown-Norway. Les amorces ont été dessinées à partir de la séquence retrouvée dans Ensembl en amont du gène. Un adaptateur avec le site de restriction SmaI a été utilisé pour l'amorce sens et XhoI pour l'antisens soit 5'AAGGGCCCTAGGACTTGAGGATTCCAAG'3 et 5'TTCTCGAGCCTTTCTTCCCGTTTCTTGA'3 respectivement. Ces amorces correspondent aux sites -2073 à -2053 et -21 à -1 de la figure 2.1. La réaction de PCR a été faite dans les conditions normales établies par le manufacturier (Invitrogen) dans un milieu supplémenté avec 1% de DMSO. Les conditions du PCR étaient les suivantes : (95°C/5min), (95°C/30sec, 55°C/30sec, 72°C/2 min) 32 cycles et 72°C/8min. L'amplicon a été isolé sur gel

d'agarose excisé avec GFX (Amersham) et sous-cloné dans pGL3b (Promega) préalablement digéré avec SmaI et XhoI. Le clone positif, 2073, a été séquencé pour s'assurer de l'intégrité de la séquence du fragment obtenu. Le clone 1618 a été amplifié et cloné avec les amorces du système gateway (Invitrogen) avec les adaptateurs BamHI et XhoI dans pGL3b.

### **2.1.2 Construction des plasmides pour les études d'activité luciférase**

Les autres constructions ont été faites avant mon arrivée au laboratoire et sont décrites dans la thèse de doctorat de Sandra Tremblay. Ainsi, un promoteur plus court de 1618 pb ne contenant pas l'exon non traduit a été cloné dans pGL3b. Les éléments nCARE de HCaRG et de la PTH ont aussi été clonés dans pGL3p, un vecteur contenant un promoteur minimal.

### **2.1.3 Alignement et analyse des facteurs de transcription**

L'alignement de séquences a été fait à l'aide de Jalview, un programme d'alignement basé sur ClustalW. Les séquences des promoteurs COMMDs ont été trouvées avec Ensembl. L'analyse des sites d'initiation de la transcription a été faite avec TSSW (Softberry) et Dragon Promoter Finder. De plus, l'analyse des îlots cpg par Methprimer a permis de confirmer qu'il pourrait s'agir d'une région promotrice. Finalement, l'analyse des facteurs de transcription a été faite à l'aide de MathInspector.

#### **2.1.4 Transfections**

Les cellules HEK293 ont été transfectées par la méthode utilisant du FuGENE6 (Roche). Brièvement, 100 000 cellules par puits ont étéensemencées le matin dans une plaque de 12 puits avec du DMEM contenant 10% FBS et 1X P/S. En fin de journée, elles ont été transfectées en suivant les recommandations du fabricant avec une construction plasmidique donnée et un vecteur de contrôle d'efficacité de transfection pRL-CMV (Promega) en proportion de 1 :100). La réaction de 50 µl de transfection a été ajoutée aux cellulesensemencées le matin. Le lendemain matin, le milieu a été changé pour du milieu de stimulation DMEM+ sans calcium (Invitrogen) supplémenté ou non avec du CaCl<sub>2</sub>, du NaCl, de l'EGTA ou du mannitol. Après stimulation, les cellules ont été lysées avec du « renilla lysis passive buffer » (Promega) et les lysats ont été quantifiés avec un essai à double lecture de luciférase pour la Renilla et la Firefly. Ainsi, les unités relatives de luminescence sont les unités de la [Firefly/Renilla].

#### **2.1.5 RT-PCR quantitatif**

Les cellules HEK293 ont étéensemencées à 200 000 cellules par puits dans une plaque de 6 puits. Vingt-quatre heures plus tard, elles ont été stimulées avec du CaCl<sub>2</sub>, du NaCl, du mannitol ou de l'EGTA pendant 4 heures. L'ARN a été extrait avec du Trizol (Invitrogen) et rétro-transcrit avec une transcriptase inverse MLV (Invitrogen) avec 1,5 µg d'ARN. L'amplification a été faite avec les amorces pour hHCaRG 5'GTCAGCATAACCGCTTTGAGGT'3 et 5'TCCAAGCCGGATCTGAATG'3 ainsi que pour le GADPH 5'TCAACGGATT-TGGTCGTATTG '3 et 5'TCTCGCTCCTGGAAGTATGG'3. Ces amorces ont été utilisées par un autre groupe

de recherche pour le qPCR et amplifie le codant du gène en 3' (Muller, 2007). L'appareil utilisé est un RotorGene 3000 (Corbett Life Science) avec les réactifs SybrGreen (Qiagen). Les résultats ont été analysés avec le programme RotorGene 6.

## **2.2 Résultats**

### **2.2.1 Clonage et caractérisation du promoteur de HCaRG**

L'amplification par PCR à partir de l'ADN génomique de rat Brown-Norway a permis de cloner une séquence de 2073 bp en amont de l'ATG de la région codante du gène rHCaRG de rat. Cette séquence inclut l'exon non traduit de 455 pb en amont du site d'initiation de la traduction (voir figure 2.1). De nombreux facteurs de transcription putatifs ont été identifiés dans cette région avec l'outil d'analyse informatique MathInspector. Ces derniers sont représentatifs d'éléments communs identifiés pour la transcription de gènes tel que les nombreux sites Sp1 présents dans les promoteurs qui ne contiennent pas de boîte TATA. De plus, l'absence de boîte TATA et la présence de NF-Y liant la boîte inversée CCAAT est une caractéristique des gènes régulés pendant le cycle cellulaire (Haugwitz et al., 2002). On remarque aussi la présence des éléments CDE et CHR qui peuvent agir en tandem dans l'expression des gènes dont l'expression est contrôlée par le cycle cellulaire. Ensuite, l'élément nCARE retrouvé initialement dans le promoteur de HCaRG du rat est conservé entre les espèces. L'alignement de la séquence du nCARE de la PTH sans la région riche en T a permis d'identifier un nouvel élément nCARE dans la région promotrice de HCaRG humain (Figure 2.2). La séquence du nCARE présent dans le promoteur de HCaRG humain est plus homologue à la séquence du gène de la PTH que la séquence trouvée par l'étudiante précédente. Ce nouveau



hPTH	<i>TCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT<b>GAGACAGGGTCTCA</b></i>
rVasopressin	<i>TTTTTATTCTTTTAATATC<b>GAGACAGGGTCTCA</b></i>
mVasopressin	<i>TTTTTTATGTTTTTTAATAT<b>GAGACAGTGTCTCA</b></i>
hVasopressin	<i>TAATCAGAAAGCTC<b>AGAGATGGTCTCC</b></i>
hEndothelin-1	<i>TAATCAGAAAGCG<b>GAGACAGAGTGAGA</b></i>
rANP	<i>TTCTTTTTATTTTG<b>GAGACAGGGTCTCA</b></i>
rHCaRG	<i>TTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTTTTTTCC<b>AGACAGGGTATGT</b></i>
mHCaRG	<i>TTGTTTGGGTTTGTGTTTGTGTTT<b>GAGACAGGGTATG</b></i>
hHCaRG(Sandra Tremblay)	<i>CCATCC<b>GGGAAGCCTCCGA</b></i>
hHCaRG	<i>AAAAAAAAAAAACTGTCTA<b>AGACGAGGTCTGG</b></i>

Figure 2.2 : Comparaison des nCAREs présents dans plusieurs hormones. Les bases en caractères gras sont identiques à celles du nCARE de la PTH. Un autre élément nCARE a été identifié dans le promoteur humain de HCaRG.

### 2.2.2 Effet du calcium sur l'activité promotrice du gène de HCaRG

La caractérisation de l'élément nCARE de la région promotrice de -2073 à -455 (promoteur 1618) de rHCaRG avait été faite initialement dans des conditions de transfection utilisant la précipitation au calcium phosphate. Cependant, ces expériences n'ont révélé aucun effet du calcium sur le promoteur de HCaRG 1618. Afin d'étudier l'effet du calcium sur l'activité promotrice, la technique de transfection a été changée pour celle utilisant le FuGENE6 qui est un agent lipidique. La précipitation avec le phosphate de calcium interférait avec les expériences de variations de calcium extracellulaire. Du milieu DMEM+ sans calcium a été utilisé comme milieu de base pour les traitements. De plus, la région promotrice de HCaRG contenant l'exon non traduit (promoteur 2073) a aussi été analysée car l'exon peut aussi contenir des éléments

régulateurs. Dans cette section, les unités relatives de luminescence du gène rapporteur représentent les unités de la luciférase « Firefly » de la construction donnée/les unités de la luciférase « Renilla » du contrôle d'efficacité de transfection. La concentration la plus faible de calcium dans un milieu d'incubation sans calcium avec 10% de FBS est de 0,3mM car la quantité de calcium ajoutée par le sérum est d'environ 0,3 mM selon la compagnie Invitrogen.

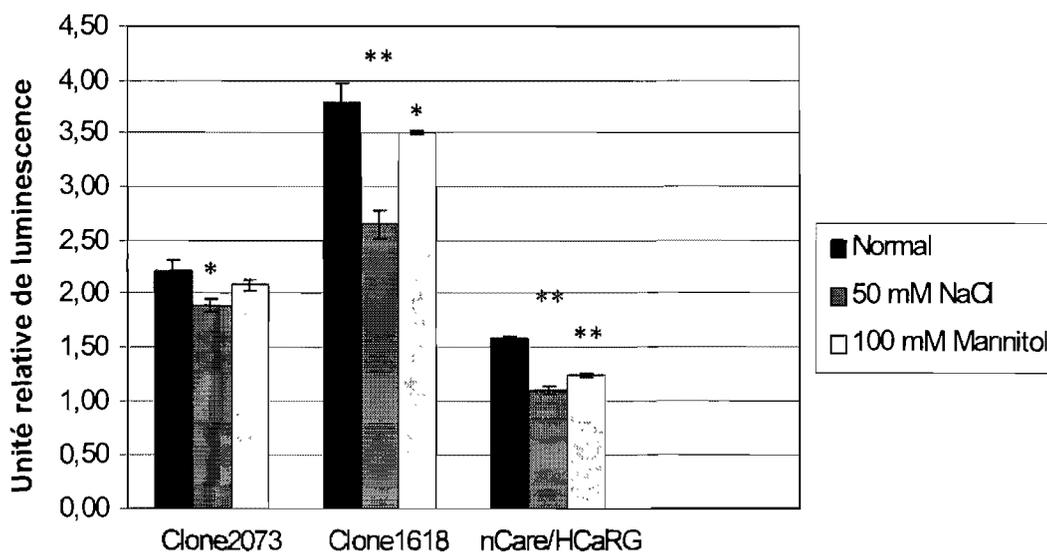


Figure 2.3 : Effet du NaCl et du mannitol sur l'activité des constructions de promoteur de HCaRG de rat. Des HEK293 ont été transfectées et ensuite traitées pendant 4 heures avec 50mM de NaCl ou 100 mM de mannitol(n=4). Le clone 2073 contient un exon non traduit de 455 pb. Le clone 1618 ne contient pas cet exon. \* =  $p < 0.05$  et \*\* =  $p < 0.01$

Nous avons étudié l'effet du NaCl et du mannitol sur l'activité promotrice de HCaRG (voir figure 2.3). Les résultats d'inhibition au NaCl et au mannitol confirment les résultats obtenus précédemment dans le laboratoire c'est-à-dire une diminution de l'activité luciférase du promoteur 1618 après 4 heures de stimulation avec 50 mM NaCl ou 100 mM de mannitol. Le mannitol a été utilisé afin de distinguer l'effet d'hyperosmolarité du NaCl de l'effet spécifique des ions  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Cl}^-$ . Ainsi, le mannitol entraîne seulement un changement de pression osmotique tandis que le NaCl provoque aussi un effet de tonicité.

La construction 1618 a été utilisée pour les expériences de traitement au calcium puisqu'un effet négatif du calcium est observé pour ce fragment après seulement 4 heures d'incubation (voir figure 2.4). Afin de diminuer davantage la concentration de calcium dans le milieu, l'EGTA a été utilisé pour séquestrer le  $\text{Ca}^{2+}$ . L'addition de 0,5 mM d'EGTA, a augmenté de façon significative l'activité du gène rapporteur luciférase du promoteur 1618 ( $p < 0.01$ ). Ainsi le promoteur de HCaRG répond à l'inhibition par le calcium extracellulaire de façon dose-dépendante. Une concentration de 3 mM de  $\text{CaCl}_2$  inhibe de façon significative ( $p < 0.05$ ) l'activité promotrice de HCaRG bien que le maximum d'inhibition soit atteint avec une concentration de 20 mM de  $\text{CaCl}_2$  ( $p < 0.01$ ). On remarque également que l'activité luciférase de la construction 2073 est plus faible que celle du fragment 1618. Le promoteur 2073 semble moins sensible aux stimulations puisque la différence de l'activité luciférase entre le contrôle et la stimulation est beaucoup plus faible qu'avec le promoteur 1618 (voir figure 2.3).

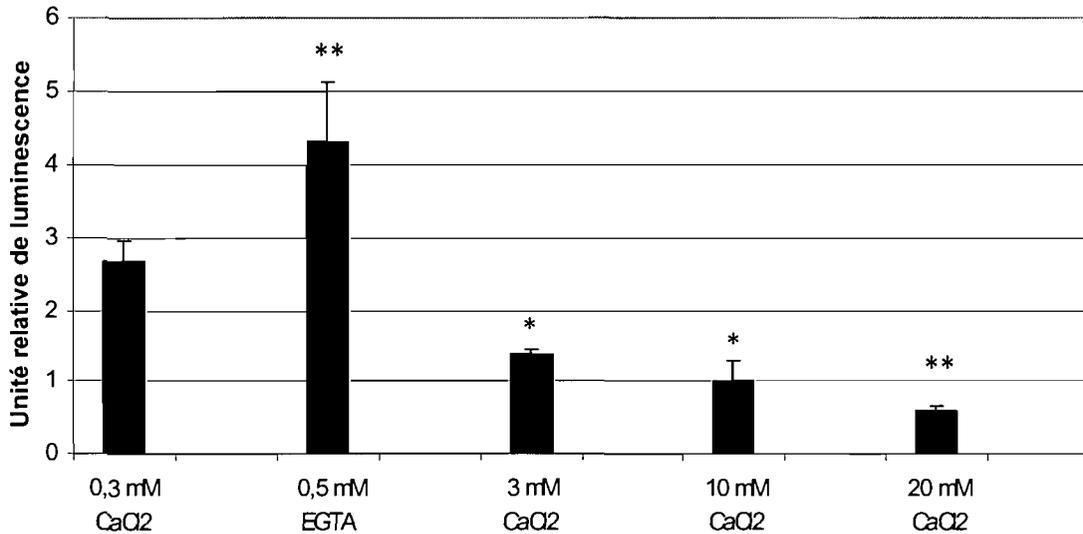


Figure 2.4 : Effet du CaCl<sub>2</sub> et de l'EGTA sur le fragment 1618 du promoteur de HCaRG. Des HEK293 ont été transfectées avec le clone 1618 et ensuite traitées pendant 4 heures avec 0,5mM d'EGTA ou avec des concentrations croissantes de CaCl<sub>2</sub>(n=4). \* = p<0.05 et \*\* = p<0.01

Nous avons ensuite voulu savoir si l'effet négatif du calcium observé sur la construction du promoteur de rat pouvait être, d'une part reproduite *ex vivo* et d'autre part, observée aussi pour le promoteur humain. Pour ce faire, des HEK293 ont été stimulées pendant 4 heures avec des concentrations croissantes de CaCl<sub>2</sub>, l'ARN a été extrait et rétrotranscrit pour être dosé par qPCR. Les résultats sont présentés (voir figure 2.5) sous forme de données relatives normalisées par l'ARNm de GADPH ainsi que comparées aux conditions normales lesquelles consistent en l'incubation des cellules en présence de 0,3 mM CaCl<sub>2</sub>, (R=1.00). On remarque que dans ces conditions, l'ARNm de hHCaRG n'est pas diminué de façon significative par l'ajout de 3 à 10 mM CaCl<sub>2</sub> (0.91±0.04) ni par 50 mM de NaCl (1.04±0.13). Cependant, on a pu confirmer l'effet activateur de la chélation de calcium sur l'expression de HCaRG. Ainsi, l'ajout de 0,3 mM d'EGTA augmente de

façon significative ( $1.62 \pm 41$ ,  $p < 0.05$ ) l'ARNm de hCaRG dans ces cellules. On remarque que seul le promoteur de rat est régulé par des hausses et des baisses de calcium. Afin de confirmer cette différence avec le promoteur humain, il faudrait traiter d'autres lignées cellulaires humaines. La différence du promoteur entre les deux espèces reflète sans doute la présence d'éléments régulateurs additionnelles, déplacés ou absents. De plus, il est à noter que nous n'avons pas vu d'effet du  $\text{CuCl}_2$  sur l'expression de hCaRG tel que rapporté pour les COMMDs dans les HEPPG2 (Muller P., 2007). Il est possible que les conditions de stimulation ne soient pas encore optimales pour chacun des ions étudiés. Il est aussi probable que les cellules rénales HEK293 ne soient pas le bon hôte pour vérifier l'inhibition par le  $\text{CuCl}_2$  car l'effet observé est dans des cellules de foie.

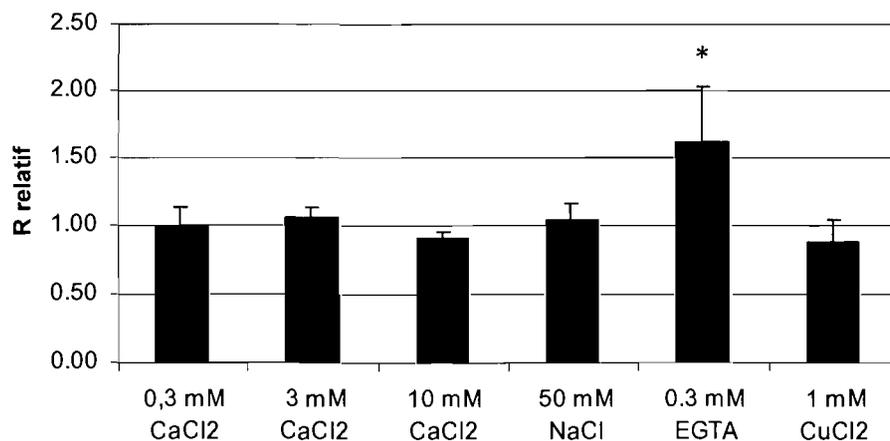


Figure 2.5 : Effet de doses croissantes de  $\text{CaCl}_2$ , de 0,3mM d'EGTA, de 50 mM NaCl et de 1 mM  $\text{CuCl}_2$  sur les niveaux d'ARNm de hCaRG. Des HEK293 ont été stimulées pendant 4 heures et l'ARN a été extrait et mesuré par PCR en temps réel ( $n=4$ ). \* =  $p < 0.05$

En conclusion, mes études ont permis de mieux caractériser la région promotrice du gène HCaRG. La présence des éléments Sp1 et NF-Y liant la boîte inversée CCAAT sont des éléments retrouvés dans les gènes régulés pendant le cycle cellulaire. On remarque aussi les éléments CDE et CHR qui peuvent agir en tandem dans l'expression des gènes dont l'expression est contrôlée par le cycle cellulaire (Section 1.1.3). De plus, nos données ont confirmé la régulation négative de l'expression de HCaRG par le calcium extracellulaire et ont montré pour la première fois l'importance de l'élément nCARE pour cette régulation. HCaRG a été renommé COMMD5 et cette nouvelle famille de protéines est régulée par la  $\text{Cu}^{2+}$ . Puisque HCaRG est aussi régulé par le stress osmotique, les ions  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  ainsi que par le calcium, nous avons émis l'hypothèse que les promoteurs des COMMDs possèdent des éléments de régulation communs. Les régions promotrices des 10 COMMDs ont donc été analysées. Environ 4000 pb en amont du site putatif d'initiation de la transcription ont été alignés et analysés pour trouver les facteurs de transcription communs ou spécifiques aux COMMDs. Plus de 400 facteurs de transcription ont été comparés. Cependant, la présence d'un nCARE n'a pas été retrouvée pour les autres COMMDs dans les conditions et avec les outils d'analyses employés. On remarque la présence de l'élément de liaison pour le NFY (COMMD-2-5-6-7-8-10), de nombreux éléments CDE/CHR, « interferon regulatory factor » (IRF), Sp1 et E2F dans tous les promoteurs de COMMDs ainsi que le site de liaison pour une protéine « myb-like » interagissant avec la Cycline D (COMMD-1-2-5-6-7-10). Tous ces éléments sont présents dans les gènes régulés par le cycle cellulaire et y possèdent une fonction de régulation. Le facteur E2F a déjà été démontré pour agir en coopération avec Sp1 pour

lier les éléments CHR (Haugwitz et al., 2002). Le facteur IRF-1 est un inhibiteur de la croissance cellulaire (Coroadinha, 1999). Plus particulièrement, pour hCOMMD5, Smad4 est retrouvé et impliqué dans la voie de signalisation de TGF- $\beta$  ainsi que l'élément « TGF- $\beta$ -inductible early gene » (TIEG). Smad4 est un répresseur de tumeur et TGF- $\beta$  contrôle la prolifération cellulaire. Ces deux sites putatifs retrouvés dans le promoteur humain de HCaRG/COMMD5 pourraient être responsables de l'effet de ce gène sur la prolifération cellulaire.

## **Chapitre 3**

### **HCaRG et ses partenaires protéiques**

### 3.0 Introduction au chapitre

HCaRG a été récemment classé dans la famille des protéines possédant un domaine COMM et a été nommé COMMD5. Une interaction entre HCaRG/COMMD5 et COMMD1 a été rapportée (Burstein, 2005). De plus, HCaRG/COMMD5 serait régulé négativement par le cuivre dans les cellules HEPG2. Par la suite, les protéines COMMDs ont été décrites comme ayant de nombreux partenaires protéines et ce autant dans le cytoplasme que dans le noyau de la cellule. Dans ce chapitre, nous avons identifié plusieurs partenaires potentiels de HCaRG par la technique du double hybride et confirmé certaines des interactions par essais de co-localisation et de liaison *in vitro*.

### 3.1 Méthodologie

#### 3.1.1 Double hybride chez la levure

La technique du double hybride chez la levure a été réalisée par Nicolas Solban, un autre étudiant du laboratoire qui a criblé une librairie de rein humain avec une sonde rHCaRG (voir figure 3.1). L'ADN des clones positifs avait été séquencé partiellement et j'ai procédé au séquençage complet et à l'analyse de la région codante de certains clones d'intérêt.

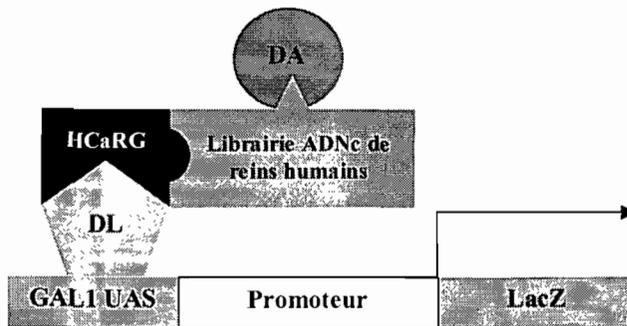


Figure 3.1

Schématisme de la technique du double hybride. Lors de l'interaction de l'appât (HCaRG) et de la proie, le domaine de liaison de l'ADN(DL) et le domaine d'activation(DA) se rejoignent pour ainsi permettre la transcription du reporteur LacZ.

### **3.1.2 Co-immunoprécipitation**

50 µg de « Pansorbin cells » (Calbiochem) ont été ajoutés à 1mg/ml d'extraits de protéines totales de cellules HEK293 et incubés pendant 15 minutes sur un support rotatif. Après une centrifugation de 3 minutes à 10000g, 5 µg d'anticorps polyclonaux anti-HCaRG de lapin (ProteinTech Group) ou d'anticorps monoclonaux de souris anti-Na,K-ATPase  $\beta_1$  (Santa Cruz) ou d'anticorps polyclonaux anti-NKCC produits chez le lapin (Santa Cruz) ont été ajoutés au surnageant des cellules pour une incubation sur support rotatif pendant toute la nuit. De la protéine A-sépharose (pour les NKCC et HCaRG) ou de la protéine G-sépharose (pour la Na,K-ATPase  $\beta_1$ ) a été ajoutée pour 1 heure au surnageant. Après une centrifugation, les billes ont été lavées 2 fois en suivant le protocole du fabricant. Les échantillons ont été séparés par électrophorèse et puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. Un immunobuvardage a été fait selon le protocole du fabricant avec l'anti-HCaRG 1:2000, l'anti-NKCC 1:500 ou l'anti-Na,K-ATPase  $\beta_1$  1:500.

### **3.1.3 Immunofluorescence**

Des cellules HEK293 ont été transfectées avec les plasmides contenant GFP ou HCaRG-GFP en présence du FuGENE6 (Roche). Les cellules ont été cultivées dans du DMEM+/10% FBS/1X P/S (« Fetal bovine serum » et de l'antibiotique penicilline et streptavidine) et fixées avec de la paraformaldéhyde 4% pendant 15 minutes. Elles ont été perméabilisées avec une solution de saponine 0.075% pendant 10 minutes et bloquées avec une solution de BSA 2% et de gélatine 0.2%. L'hybridation avec l'anticorps anti-Na,K-ATPase  $\beta_1$  1:100 (Santa Cruz) a été faite selon les directives de la compagnie.

L'anticorps secondaire utilisé est un anticorps dirigé contre la souris produit chez le poulet et couplé au « Texas Red » (TR) 1 :200. Ensuite, les lamelles ont été montées avec du « Vectashield » et regardées avec un microscope fluorescent « Zeiss Axioskop » équipé d'un objectif « 40X-planachromat » et de filtres sélectifs pour la fluorescéine isothiocyanate, le DAPI et le Texas Red.

## 3.2 Résultats

### 3.2.1 HCaRG et les protéines COMMDs

L'alignement de hHCaRG avec la protéine COMMD1 de la famille des COMMDs a permis d'identifier le domaine COMM dans hHCaRG (Figure 3.1). Les parties qui diffèrent le plus entre COMMD1 et HCaRG sont les régions N-terminale et centrale des protéines. On remarque que le domaine COMM de COMMD1 est la région la plus homologue avec hHCaRG, que plusieurs acides aminés sont identiques et que cette région est la mieux conservée entre les deux. Plusieurs acides aminés chargés sont conservés et ces derniers pourraient être les sites d'interaction entre les COMMDs. Le classement récent de HCaRG dans cette nouvelle famille va nous permettre de progresser plus rapidement dans la compréhension du rôle physiopathologique de HCaRG. On remarque que la famille des COMMDs est composée de petites protéines dont la longueur des gènes varie énormément (Tableau 3.1). De plus, chacun de ces gènes est localisé sur un chromosome différent dans une orientation sens ou anti-sens.

Gène	Longueur du gène /kb	Nombre d'exons	Longueur du transcrit /bp	Longueur de la protéine /aa	Numeros d'accession NCBI	Position	Direction
COMMD1	230.41	3	717	190	NM_152516	2p15	S
COMMD2	11.95	5	1423	199	NM_016094	3q25.1	AS
COMMD3	3.94	6	818	177	NM_012071	10pter-q22.1	S
COMMD4	5.85	8	1751	140	NM_017828	15q24.2	S
COMMD5	15.04	4	3112	224	NM_014066	8q24-qter	AS
COMMD6	11.38	5	468	98	NM_203497	13	AS
COMMD7	41.3	9	1888	200	NM_053041	20q11.21	AS
COMMD8	12.86	5	1409	183	NM_017845	4p12	AS
COMMD9	15.92	6	1737	198	NM_014186	11p13	AS
COMMD10	208.26	7	1433	202	NM_016144	5q23.1	S

Tableau 3.1 :  
Information relative aux gènes, transcrits et protéines des COMMDs

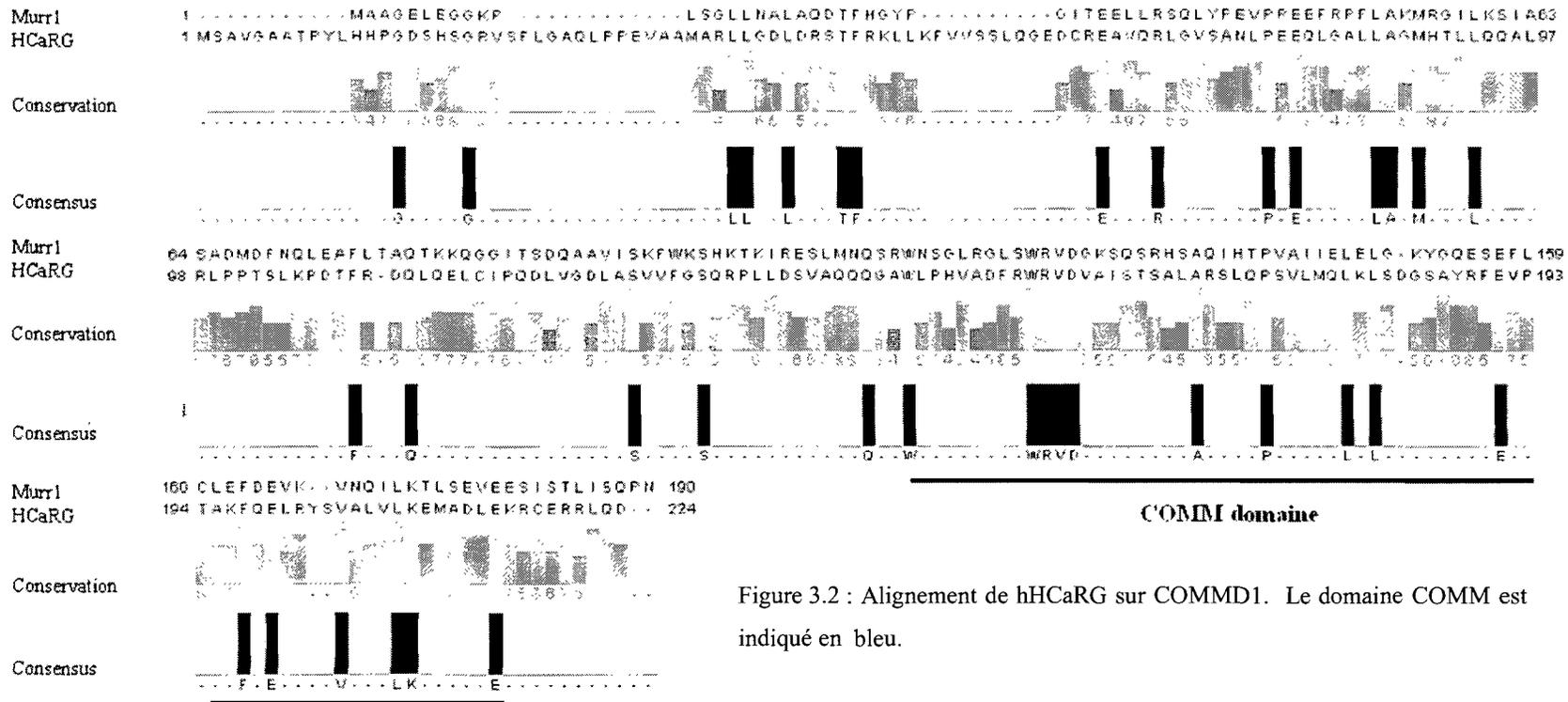


Figure 3.2 : Alignement de hHCaRG sur COMMD1. Le domaine COMM est indiqué en bleu.

### 3.2.2 Les partenaires potentiels de HCaRG

Avec la technique du double hybride chez la levure plusieurs clones positifs avaient été obtenus avant mon arrivée dans le laboratoire (voir tableau 3.2). J'ai poursuivi ce travail en procédant au séquençage complet de plusieurs de ces clones. Ceci a permis d'identifier les régions potentielles d'interaction avec HCaRG. Ainsi pour la Na,K-ATPase  $\beta_1$ , la région probable de liaison à rHCaRG se retrouve dans les derniers 89 acides aminés de la partie C-terminale de la protéine. Les régions d'interaction avec rHCaRG de la  $\beta$ -actine, de NKCC2, de la Na,K-ATPase  $\beta_1$ , du canal potassique voltage dépendant et du transporteur d'acides aminés ont été confirmées expérimentalement par essais pull-down couplés à la transcription *in vitro* des clones. Le tableau suivant présente les protéines qui interagissent avec HCaRG identifiées par la technique de double hybride, la longueur du fragment et la région contenant le domaine d'interaction avec HCaRG. Bien que plusieurs de ces clones avaient déjà été identifiés, mon travail a pu préciser la région contenant le domaine d'interaction ainsi que d'identifier de nouvelles protéines, dont, entre autres, la protéine COMMD8. On remarque aussi que HCaRG interagit la plupart du temps avec la partie C-terminale de ses partenaires.

Clone	Gene name	Accession	Length of fragment in a.a	(a.a from-to)/total	Characteristic
6	NKCC2	NM_000338	1099	(1-1099)/1099	Full length
18	Nuclear transcription factor Y $\gamma$	BC005003	240	(1-240)/336	N-terminal end
8	Voltage-gated K channel $\beta$	NM_015932	142	(1-142)/142	Full length
5	Chaperonin containing TCP1, subunit 5	NM_012073	111	(422-533)/533	C-terminal end
7	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting $\beta$	BC000006	89	(214-303)/303	C-terminal end
23	idem	idem	134	(189-303)/303	C-terminal end
25	Putative L-type neutral a.a transporter	NM_001042386	215	(446-661)/661	C-terminal end
28	Actin- $\beta$	XM_037239	124	(251-375)/375	C-terminal end
14	Appolon/Bruce	XM_029483	ND	ND	ND
15	DAZ associated protein 2	BC007900	169	(1-168)/168	Full length
32	Prosaposin	NM_001042466	86	(441-526)/526	C-terminal end
1	COMMD8	BC008371	172	(5-183)/183	Near full length

Tableau 3.2 : Partenaires protéiques identifiés par la technique du double hybride dans une librairie de rein normal humain. Les caractéristiques définissent la région d'interaction du clone dans le codant de la protéine.

### 3.2.3 Confirmation des interactions entre HCaRG et certains de ses partenaires

Les expériences de co-immunoprécipitation (COIP) ont permis de confirmer l'interaction entre HCaRG et la Na,K-ATPase  $\beta_1$  (Figure 3.3). Ainsi la Na,K-ATPase  $\beta_1$  et hHCaRG sont des partenaires qui peuvent être immunoprécipités par leurs anticorps réciproques. De plus l'immunoprécipitation de NKCC a permis de détecter HCaRG dans le précipitat. Cependant l'immunoprécipitation de HCaRG n'entraîne pas celle de NKCC. Dans ces conditions, NKCC n'a pu être détecté. Ensuite, l'immunoprécipitation de la Na,K-ATPase  $\beta_1$  ou de NKCC a permis de détecter hHCaRG. Par immunofluorescence, on

remarque que dans les cellules HEK293, hHCaRG-GFP se concentre près du noyau (Figure 3.4A). On a observé la même localisation pour la construction de rat rHCaRG-GFP (résultat non montré) et la localisation de COMMD1, a aussi été rapportée en un point dans le noyau (De pie et al., 2006, 2005). De plus, par immunofluorescence, nous avons aussi co-localisé la Na,K-ATPase  $\beta_1$  et hHCaRG près du noyau (Figure 3.4B). La séquence d'interaction avec la Na,K-ATPase  $\beta_1$  est la partie C-terminale du transporteur qui est la partie extracellulaire lorsque incorporée dans la membrane. HCaRG pourrait être une protéine nécessaire à son insertion correcte dans la membrane.

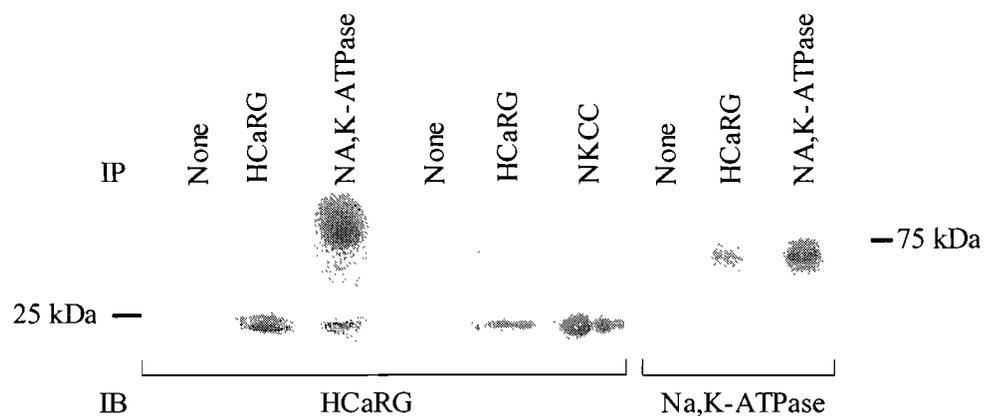


Figure 3.3 : Expériences de coimmunoprécipitation entre HCaRG, NKCC et la Na,K-ATPase  $\beta_1$ . L'immunoprécipitation (IP) des différentes protéines à démontré certains partenaires dans par immunoblot(IB)

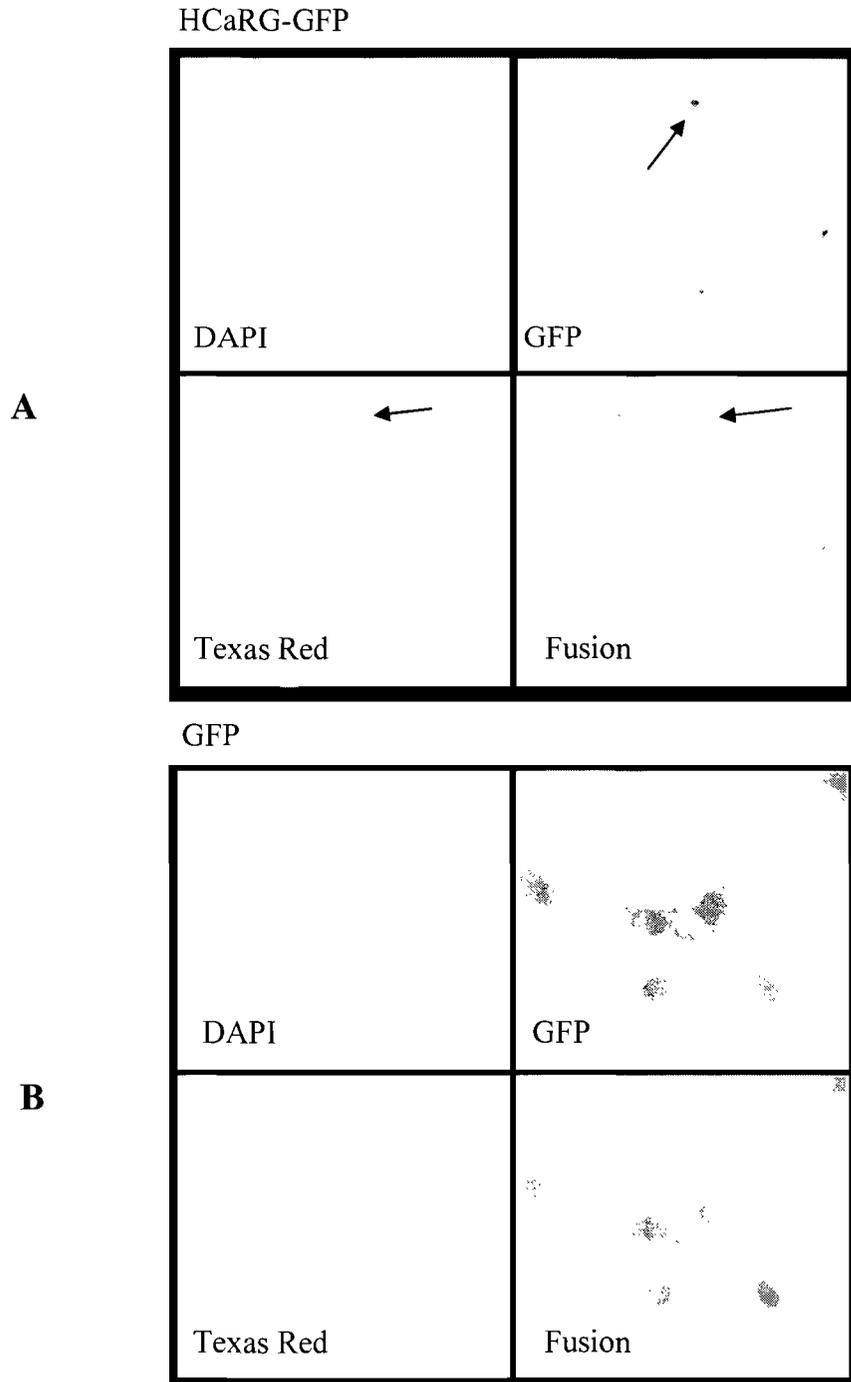


Figure 3.4 : Immunofluorescence de HCaRG-GFP dans les HEK293. Des cellules HEK293 transfectées avec A)HCaRG-GFP et B)GFP et hybridées avec un anticorps contre la Na,K-ATPase  $\beta_1$  sont révélées avec un anticorps secondaire couplé au Texas Red. Le DAPI est un colorant qui révèle le noyau et la fusion est la superposition des images DAPI, GFP et Texas Red.

## **Chapitre 4**

### **HCaRG et la migration cellulaire**

## **4.0 Introduction au chapitre**

Nous avons démontré une migration accrue des cellules sur-exprimant rHCaRG (Section 1.3.7). La migration cellulaire nécessite l'interaction de nombreuses protéines dont plusieurs sont des partenaires de HCaRG. La migration est un processus important pour la survie de la cellule ; elle requiert un remodelage constant de l'actine ainsi que la participation de plusieurs transporteurs et canaux ioniques. L'interaction entre HCaRG et NKCC2, la Na,K-ATPase  $\beta_1$  et le canal potassique voltage dépendant pourrait être une étape clé dans le processus de migration. De plus, nous savons selon les résultats du double hybride, que HCaRG est capable d'interagir avec la  $\beta$ -actine. Dans ce chapitre, nous allons nous concentrer sur l'interaction entre HCaRG et l'actine et étudier son impact sur la migration cellulaire.

## **4.1 Méthodologie**

### **4.1.1 Pull-down avec l'actine**

L'interaction entre HCaRG et l'actine a été confirmée par essais pull-down. La protéine de fusion HCaRG-GST a été induite pendant 2 heures d'incubation avec 1mM IPTG dans des bactéries BL21 et purifiée avec des billes de sépharose-gluthation selon le protocole du manufacturier. Après deux lavages des billes avec un tampon PBS, celles-ci ont été incubées avec 0, 5 et 20  $\mu$ g d'actine de muscle de lapin (Cytoskeleton) ou un extrait protéique total de cellules HEK293 pendant 2 heures à 4°C. Les billes ont par la suite été lavées 3 fois avec du PBS et déposées sur gel d'électrophorèse. L'immunobuvardage a été fait avec un anticorps polyclonal anti-actine de lapin (Sigma) 1 :500.

#### **4.1.2 Essais spindown**

Les protéines GST et GST-HCaRG ont été purifiées (Section 4.1.1) puis concentrées sur colonne AMICON de pores de 10 kDa pendant 1 heure à 10 000g. Elles ont été ajoutées à une concentration finale de 1  $\mu$ M à des tubes contenant de l'actine polymérisant à l'aide d'un kit « spindown » (Cytoskeleton). Brièvement, après une incubation de 30 minutes, les protéines ont été centrifugées à 100 000g dans une « airfuge » pendant 2 heures. Les surnageants (G-actine) et les culots (F-actine) ont été re-suspendus dans du tampon de chargement 1X du fabricant, soumis à une électrophorèse et colorés au Bleu de Coomassie (Sigma).

#### **4.1.3 Déséquilibre G et F actine**

Le protocole du fabricant a été suivi (Cytoskeleton) avec le kit de « spindown *in vivo* ». Brièvement, des lignées stables MDCK-C7 surexprimant HCaRG (H15) et des cellules contrôles (N3) ont étéensemencées à 100 000 cellules par puits dans une plaque de 12 puits. Le lendemain, elles ont été traitées avec de la Latrunculine B (Sigma), de la Jasplakinolide (Sigma), du DMSO 0.02% ou du DMEM+/10% FBS/1X P/S pour 30 minutes. Toutes les étapes ont été effectuées à 37°C. Les cellules ont été lysées avec le tampon de la compagnie pendant 15 minutes avec un supplément de PMFS 1 mM et des inhibiteurs de protéases « complete mini » 1X (Roche). Après 15 minutes, la lyse a été vérifiée avec du Bleu trypan et elle était complète. Les échantillons ont été centrifugés pendant 5 minutes à 4000 g pour être ensuite ultra-centrifugés à 100 000g pendant 60 minutes. Les culots et les surnageants ont été resuspendus dans du tampon de chargement

1X. Les surnageants ont été dilués 5 fois et les échantillons ont été migrés. Finalement, un immunobuvardage a été effectué contre l'actine tel que décrit par le manufacturier.

#### **4.1.4 Développement des ShRNA et validation du KO**

Nous avons dessiné des oligos de 19-mers qui peuvent théoriquement inhiber la production de l'ARNm de hHCaRG. Selon les règles de Tuschl (Tusch et al, 2002) et les algorithmes des compagnies (Promega, Ambion, Dharmacon, Invivogen et Invitrogen, et IDT), seulement trois candidats sur plus d'une trentaine ont été retenus pour être clonés dans le vecteur pSilencer 3.0-H1 venant du laboratoire du Dr Prentki au Centre de recherche du CHUM. Le Dr Prentki a aussi fourni le contrôle négatif aléatoire (scramble). Le contrôle possède le même pourcentage G/C que notre séquence d'intérêt et les mêmes caractéristiques de clonage tels que les sites de restriction et la longueur de l'insert. Les trois ShRNAs ainsi que le contrôle scramble ne correspondent à aucune séquence tel que démontré par un « BLAST » du génome humain. Les oligos sont :

Pour le ShRNA 33 (5'GATCCGCATCATCCTGGTGATAGTAAGTTCTCTACTATC-ACCAGGATGATGCTTTTTTGGAAA-3' et 5'AGCTTTTCCAAAAAAGCATCATC-CTGGTGATAGTAAGTTCTCTACTATCACCAGGATGATGCG-3') pour 134 (5'-GATCCGGAGCACGTTTCAGAAAGTTAAGTTCTCTAACTTTCTGAACGTGCTCCTTTTTGGAAA-3' et 5'-AGCTTTTCCAAAAAAGGAGCACGTTTCAGAAAGTTA-AGTTCTCTAACTTTCTGAACGTGCTCCG-3') pour 608 (5'GATCCGCGTGGCCC-TGGTCCTAAATTCAAGAGATTTAGGACCAGGGCCACGCTT-TTTTTGGAAA-3'et

5' AGCTTTTCCAAAAAAGCGTGGCCCTGGTCCTAAATCTCTTGAATTTAGGACCAGGGCCACGCG-3').

Les SHRNAs ont été transfectés dans des HEK293 avec du FuGENE6 (Roche) tel que décrit précédemment. L'ARN a été extrait et rétro-transcrit. L'inhibition des niveaux d'ARNm de hHCaRG a été démontrée par PCR semi-quantitatif en utilisant le kit Classic I (Ambion) normalisés par rapport à ceux de la 18S ainsi que par PCR quantitatif en temps réel (section 2.1.5). De plus, la sous-expression de la protéine hHCaRG a été confirmée par immunobuvardage d'extraits de cellules HEK293 transfectées avec hHCaRG-GFP ou GFP ainsi que par microscopie à fluorescence. Finalement, un kit de Mission ShRNA pour hHCaRG (Sigma) a été testé. Celui-ci contenait 5 clones pouvant inhiber l'expression de notre gène d'intérêt. La compagnie a fourni une petite librairie de ShRNA potentiel contre hHCaRG. Les « stock » glycérols des bactéries contenant les plasmides ShRNA ont été amplifiés et purifiés.

#### **4.1.5 Essais de guérison de plaies**

Une plaie a été infligée, avec une pointe de pipette, à des HEK293 à confluence entre 70 et 80% (El Hader, 2005). Ainsi, 200 000 cellules par puits ont étéensemencées dans une plaque 6 puits. Huit heures plus tard, elles ont été transfectées avec les constructions d'intérêt à l'aide du transfectant FuGENE6. Le lendemain, la plaie a été infligée et une photographie a été prise aux temps de 0 et 24 heures. La distance entre les bordures a été mesurée avec une microrègle.

## 4.2 Résultats

### 4.2.1 Interaction entre hHCaRG et l'actine

Le pull-down avec de l'actine a permis de confirmer l'interaction entre HCaRG et l'actine *in vitro* (Figure 4.1A). De plus, on peut observer cette interaction avec de l'actine cytosolique ( $\beta$ -actine) provenant d'un extrait protéique total de HEK293 (Figure 4.1B). Ainsi, HCaRG est capable d'interagir avec l'actine globulaire (G-actine). L'analyse d'alignements de séquences, a permis d'identifier trois motifs de liaison à l'actine (Figure 4.2ABC) dans la séquence de HCaRG. Ces motifs sont conservés entre les espèces. Étonnement, les trois motifs se suivent dans la région N-terminale de HCaRG comprise entre les acides aminés 50 et 80. Le motif le plus simple est le KLLK semblable au motif KLKK de la thymosine  $\beta$ 4. Or, il est connu que la thymosine  $\beta$ 4 se lie à l'actine monomérique (Section 1.1.4). La présence d'hélice alpha (Figure 4.2D) devant le motif KLKK agit comme interface de liaison et est nécessaire pour la liaison de la thymosine  $\beta$ 4 à l'actine (M Van et al., 1996).

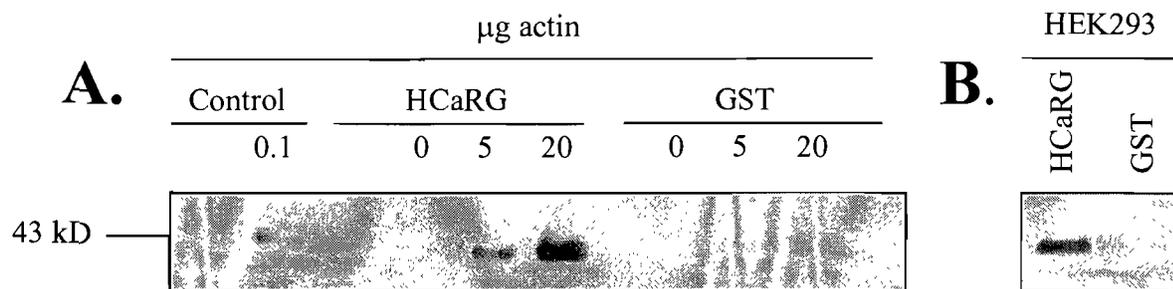


Figure 4.1 : Confirmation de l'interaction entre rHCaRG et l'actine par essai pull-down. A) avec l'actine de muscle de lapin purifiée B) avec un extrait de protéines totales provenant des HEK293(n=2). Le control est de l'actine purifiée. HCaRG est HCaRG en fusion avec l'étiquette GST et GST seul est le contrôle d'interaction.

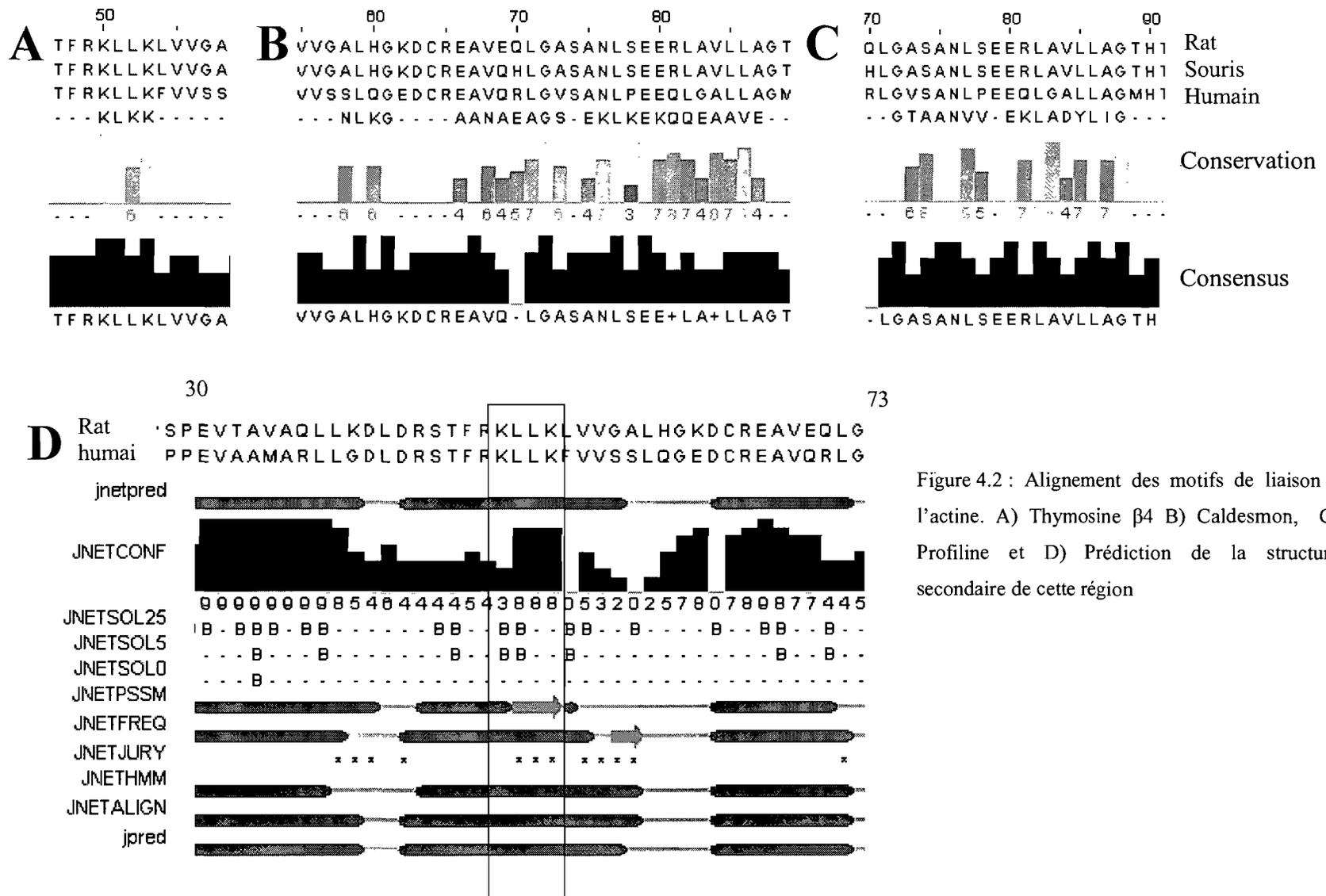


Figure 4.2 : Alignement des motifs de liaison à l'actine. A) Thymosine  $\beta 4$  B) Caldesmon, C) Profiline et D) Prédiction de la structure secondaire de cette région

#### 4.2.2 Effet de HCaRG sur la polymérisation de l'actine

Lorsque HCaRG est ajouté à l'actine en polymérisation, on le retrouve, suite à une ultracentrifugation, aussi bien dans le surnageant contenant la G-actine que dans le culot contenant la F-actine (Figure 4.3). Cependant, lorsque l'actine est déjà polymérisée, on ne semble pas retrouver HCaRG dans le culot (résultat non montré). Ainsi, HCaRG pourrait être séquestré pendant la polymérisation de l'actine.

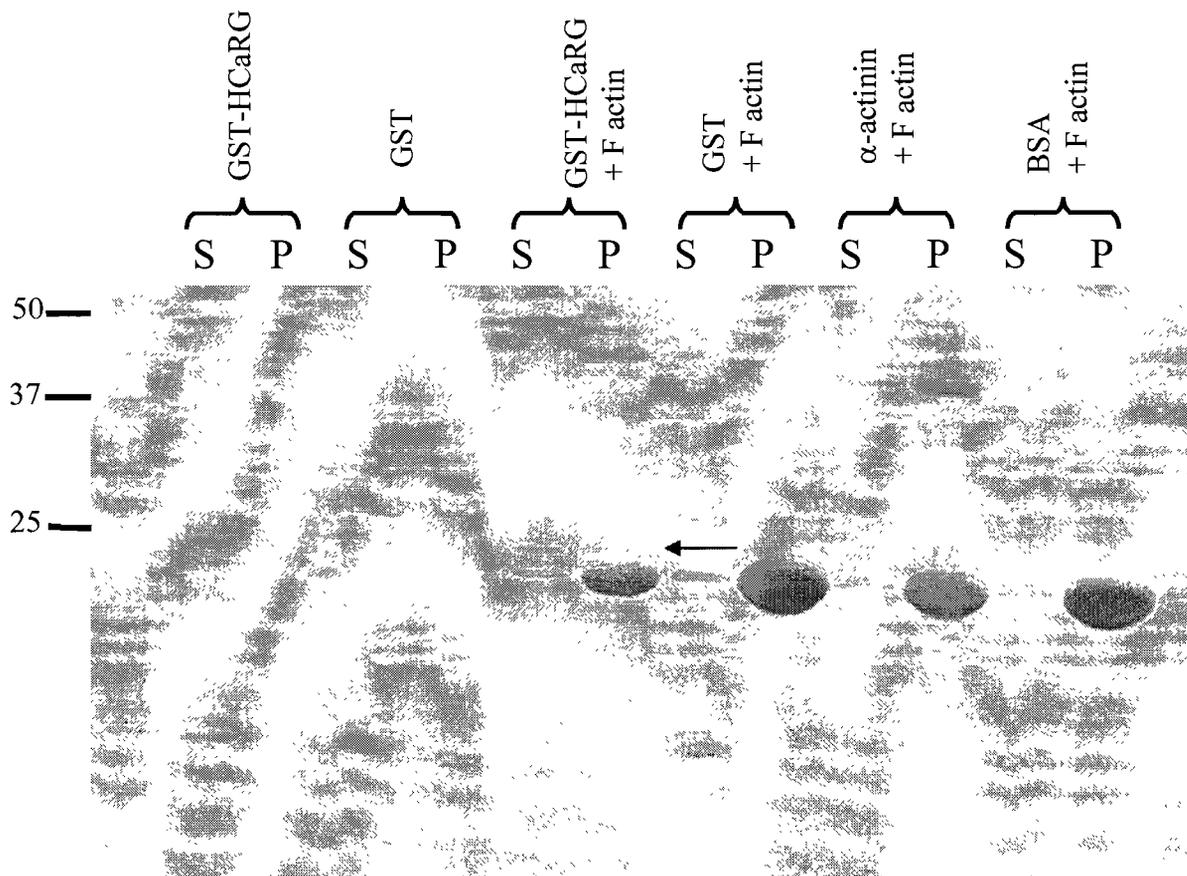


Figure 4.3 : Essais de spin-down avec rHCaRG et l'actine en polymérisation.

$\alpha$ -actinine est un contrôle positif de liaison à l'actine filamenteuse et la BSA est un contrôle négatif d'interaction. S = surnageant, P= culot. Ainsi dans le culot se retrouve l'actine filamenteuse et dans le surnageant l'actine monomérique. La flèche indique la bande de HCaRG retrouvée dans la fraction du culot(n=2).

Nous avons aussi montré que la sur-expression de rHCaRG modifie le rapport G-actine/F actine dans les cellules MDCK ; sans stimulation, les cellules H15 sur-exprimant HCaRG montrent un ratio de G-actine/F actine de  $15,8 \pm 2,3$  comparativement à  $3,4 \pm 0,5$  pour les cellules contrôles N3 ( $p < 0.001$ ). Ainsi, les cellules sur-exprimant rHCaRG possèdent environ 5 fois plus d'actine monomérique. De plus, lorsque les cellules sont stimulées avec de la Jasplakinolide (Section 1.1.3), l'actine filamenteuse est stabilisée (Figure 4.4). On observe l'effet contraire avec un déstabilisant du cytosquelette tel que la Latrunculin B. Avec des doses croissantes de Japlakinolide, on remarque que le rapport de G-actine/F-actine des H15 diminue progressivement pour rejoindre celui des cellules N3 à une concentration de seulement  $0,04 \mu\text{M}$  (Figure 4.4, Figure 4.5). On peut remarquer, avec des doses croissantes de Latrunculin B (Figure 4.5), que la toxine ne déstabilise pas la F-actine des H15 alors que seulement les cellules N3 augmentent leur quantité d'actine libre. Ainsi, nos résultats suggèrent que HCaRG est capable d'interagir avec l'actine globulaire et d'avoir aussi un impact sur la polymérisation de ses filaments. On remarque aussi cet effet dans les expériences de spin-down *in vitro* (Figure 4.3). La quantité d'actine polymérisée dans le culot de HCaRG-GST est plus faible que celle dans la fraction GST ou du contrôle négatif, BSA.

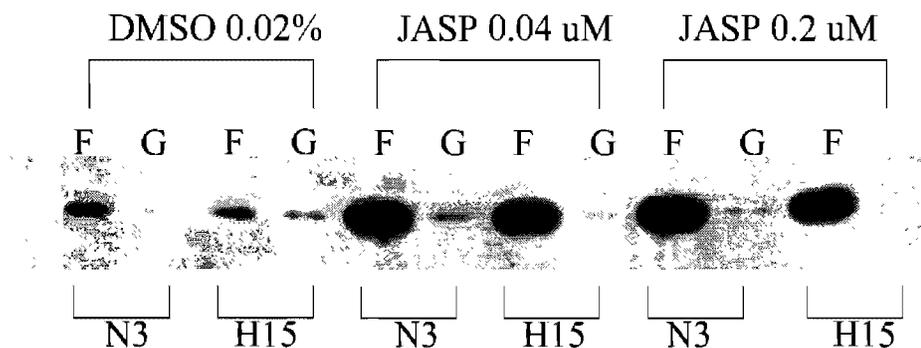


Figure 4.4 : Essais spin-down de l'actine *in vivo* suite à une stimulation avec de la Jasplakinolide (JASP). N3 : le contrôle et H15 : surexprimant HCaRG(n=4).

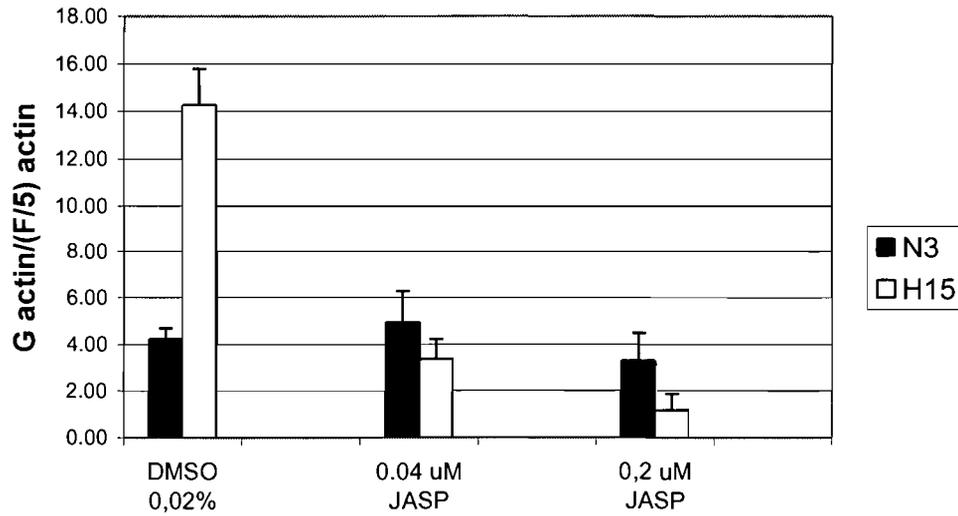
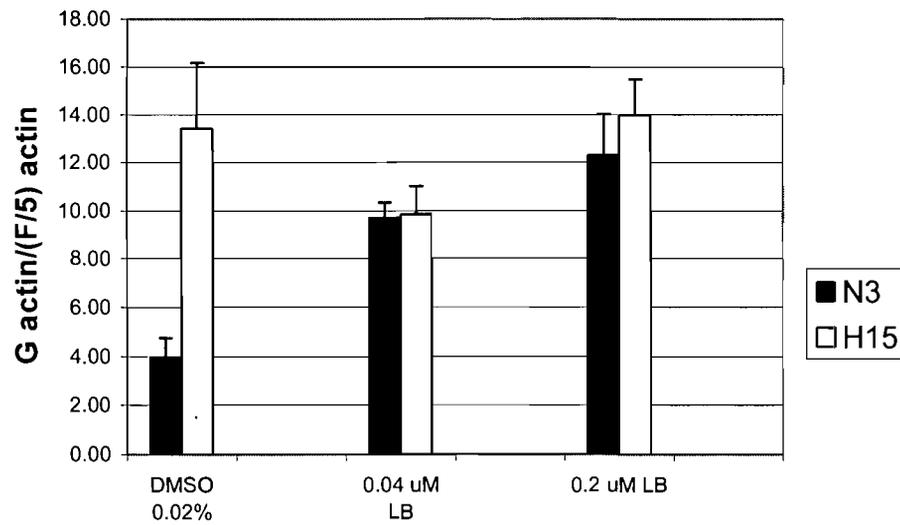
**A****B**

Figure 4.5 Essais spin-down de l'actine *in vivo* suite à une stimulation avec la A) Jasplakinolide (JASP) ou B) la Latrunculine B(LB)(n=4).

### 4.2.3 Effet du « knockdown » de hCaRG sur la migration

Le « knock-down » (KD) de hCaRG a permis de confirmer le rôle de hCaRG dans la migration des cellules HEK293 et MDCK. Nous avons déjà démontré que les cellules surexprimant hCaRG migrent plus rapidement (El Hader, 2005). L'élaboration de trois ShRNAs couvrant la séquence codante de hCaRG a permis d'inhiber l'expression de hCaRG dans ces cellules. L'élaboration des ShRNAs a suivi les règles de Tusch et les algorithmes de compagnies. Tout d'abord, les séquences des ShRNA sont uniques à hCaRG tel que démontré par un BLAST contre le génome humain. Les oligos ont été hybridés et clonés dans le vecteur pSilencer 3.0-H1 qui est sous le contrôle du promoteur H1. Les ShRNAs ont été numérotés 33, 134, et 608 et ces numéros correspondent à la position de la cible sur la séquence codante de hCaRG humain ; l'adénosine de l'ATG du codon de départ correspondant à la position 1. Ainsi le ShRNA 33 couvre le début de la région codante entre les positions 33 et 52. Dans un premier temps, ces trois ShRNAs ont été transfectés dans les cellules HEK293 pendant 24 heures. Ensuite l'amplification de l'ARNm de hCaRG par PCR a été rapportée sur l'ARNm de la 18S pour obtenir un dosage semi-quantitatif (Figure 4.6A). Nos résultats montrent que le ShRNA 134 est celui qui diminue le plus l'ARNm de hCaRG, soit une réduction de plus de 40% ( $41\pm 5\%$ ). Le ShRNA 33 cause une inhibition de  $22\pm 4\%$  et le ShRNA 608 diminue de  $33\pm 5\%$  les valeurs de mRNA de hCaRG. Ces résultats ont été confirmés par PCR quantitatif en temps réel (qPCR) avec environ le même pourcentage d'inhibition. De plus, nous nous sommes procurés des ShRNA provenant de la compagnie Sigma sous la forme d'une librairie contenue dans des « stocks » glycérols de bactéries. Seulement le ShRNA#5 a démontré une activité inhibitrice. Le ShRNA#5 a pour cible la position 132

de la région codante. Ainsi cette région de hHCaRG semble bien répondre à l'activité du complexe RISC responsable de la coupure de l'ARN par la reconnaissance du siRNA (Preall, 2005). Nos données de qPCR ont montré que la combinaison de plusieurs ShRNAs n'augmentait pas le pouvoir d'inhibition (Figure 4.6B). Les combinaisons 134 et ShRNA#5, 134 et 608 et 134 et 60 et ShRNA5 ont été testées. L'impact des ShRNAs a aussi été confirmé sur les niveaux de la protéine hHCaRG-GFP. Pour ce faire, le plasmide contenant hHCaRG-GFP a été co-transfecté dans les HEK293 avec les ShRNA 33, 134, 608 ou scramble. On peut voir clairement la diminution de la fluorescence avec le ShRNA 134 (Figure 4.6C). Le Knockdown de la protéine HCaRG humaine a pu être confirmé par western en utilisant un anticorps anti-GFP, (Figure 4.6D). Ainsi le ShRNA 134 a diminué les niveaux de la protéine GFP-HCaRG de  $46\pm 8\%$  et le ShRNA 608 de  $11\pm 8\%$ . Quant au ShRNA 33, il ne semble pas diminuer significativement les niveaux protéiques de hHCaRG.

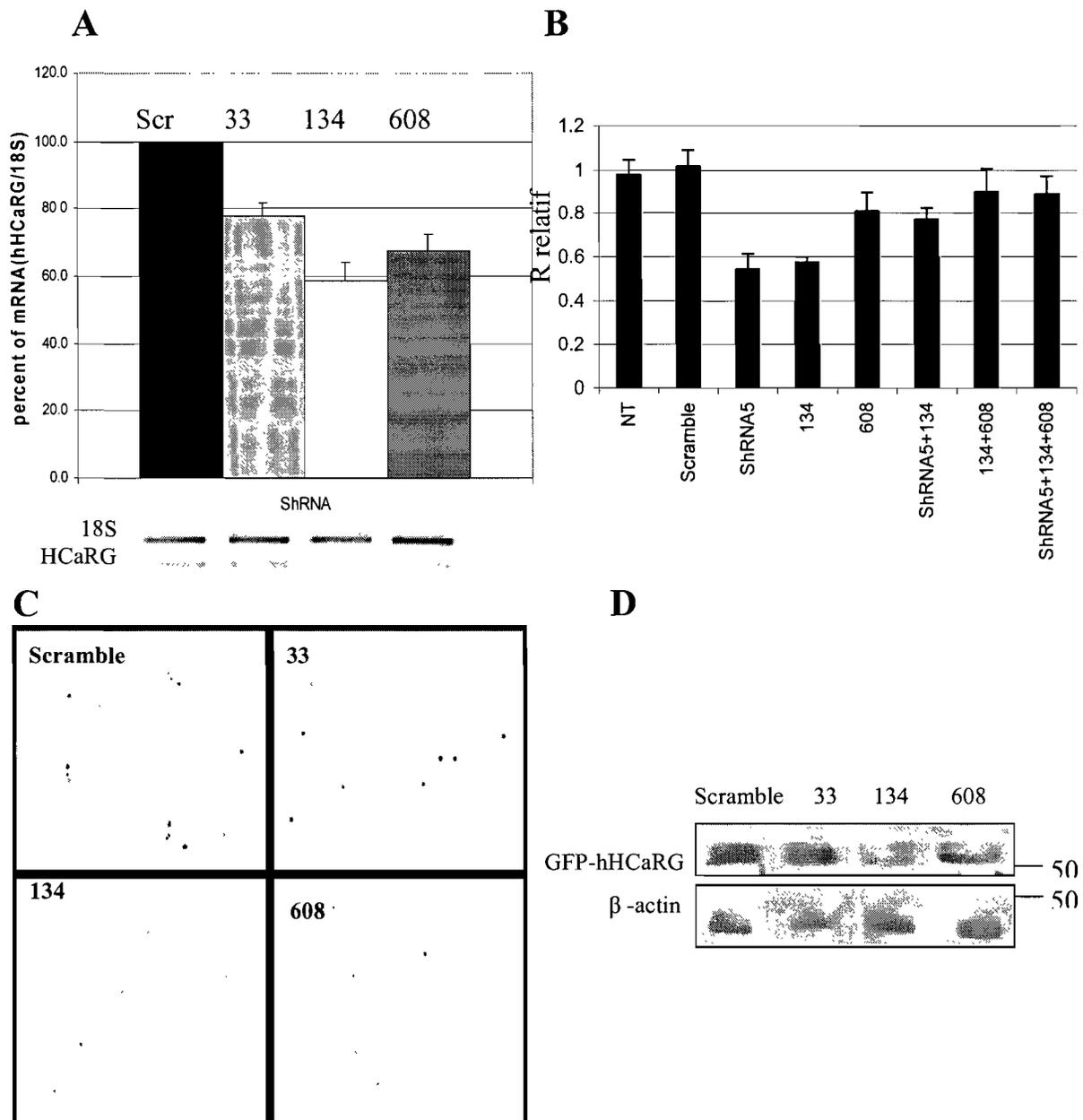


Figure 4.6 : Knockdown de hHCaRG par les ShRNAs. A) Inhibition de l'ARNm de hHCaRG déterminée par essai semi-quantitatif avec l'ARN 18S B) Transfection de plusieurs types de ShRNAs en quantité équimolaire dans des Hek293. hHCaRG a été mesurée par essai qPCR en temps réel C) Fluorescence de hHCaRG-GFP, le DAPI (résultat non montré) a indiqué que les cellules sont à la même confluence D) Immunobuvardage de GFP-hCaRG à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine GFP.

Afin de vérifier l'impact du « knock-down » de HCaRG sur la migration des cellules traitées, des essais de guérison de plaies ont été effectués sur des HEK293 préalablement transfectées avec les ShRNAs (Figure 4.7A). Au temps de 24h nous avons déjà démontré que l'état prolifératif entre les cellules contrôles et sur-exprimant HCaRG était semblable (Solban, 2000). Ainsi, la fermeture de la plaie lorsque les cellules sont traitées avec le ShRNA 134 est de  $16\pm 5\%$  comparativement aux cellules traitées avec un ShRNA contrôle « scramble » qui elles ferment  $28\pm 4\%$  ( $p < 0,01$ ) de la plaie dans le même période de 24 heures ; ces dernières montrant des valeurs semblables aux cellules HEK293 sauvages avec ou sans agent de transfection dans les mêmes conditions (résultat non montré). On obtient une excellente corrélation avec un  $r^2$  de Pearson de 0,85 ( $p < 0,001$ ) inverse entre les niveaux d'expression de hHCaRG et la vitesse de fermeture de plaies ; ainsi plus l'expression de HCaRG est inhibée dans les cellules moins celles-ci ont la capacité de refermer la plaie. Inversement, nous avons montré en transfection transitoire que la surexpression de hHCaRG-GFP augmente la fermeture de la plaie jusqu'à  $38\pm 4\%$  ( $p < 0,01$ ) en 24 heures (Figure 4.7B). Cette augmentation peut être réduite en co-transfectant les cellules avec le ShRNA 134 lequel ramène le taux de fermeture à  $16\pm 4\%$  ( $p < 0,001$ ). En conclusion, l'augmentation de la forme d'actine monomérique ainsi que l'habilité à fermer plus rapidement une plaie par la sur-expression de HCaRG sont des évidences de l'implication de HCaRG dans la migration cellulaire.

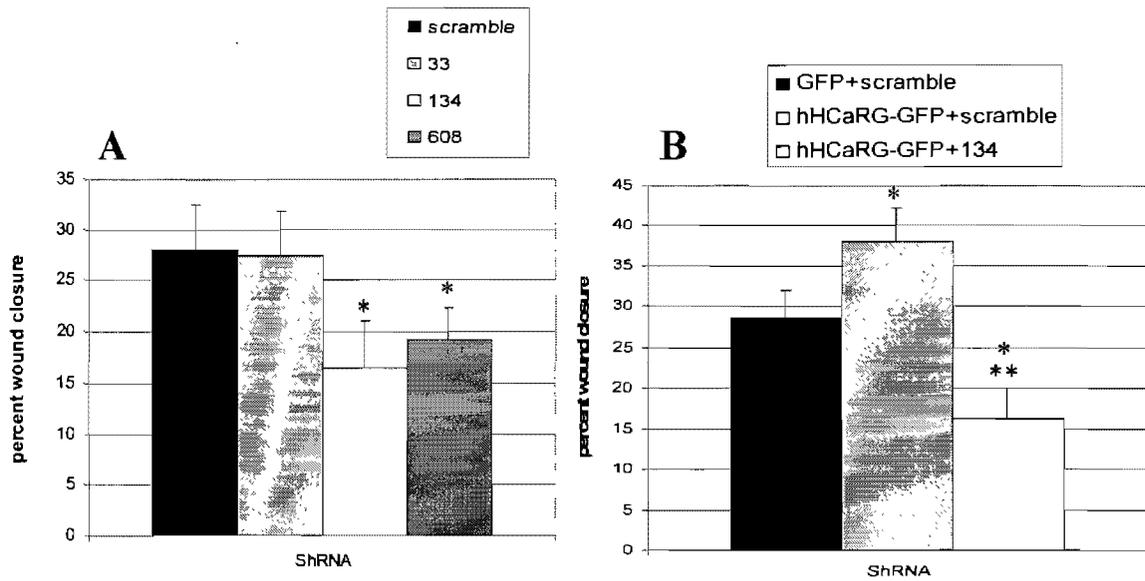


Figure 4.7A-B : Effet du KD de hHCaRG sur la migration cellulaire suite à un essai de guérison de plaie. Les expériences sont en duplicata. \* =  $p < 0.01$  et \*\* =  $p < 0.001$

## **Chapitre 5**

### **Discussion**

## 5.1 La régulation de l'expression de HCaRG

Le calcium extracellulaire est un facteur important dans la régulation de certains gènes comme ceux de la PTH et de la vasopressine (Okazaki, 1991). L'efficacité des constructions des promoteurs 1618 et 2073 à répondre au NaCl, mannitol, EGTA et CaCl<sub>2</sub> dans les cellules HEK293, démontre cette particularité pour HCaRG aussi et pour l'implication de son élément nCARE. En fait, le plus long fragment couvre 2073 pb en amont du site d'initiation de la traduction en incluant un exon non traduit. L'autre construction, quant à elle, est de 1618 pb et exclut l'exon non traduit. Nos résultats montrent que les deux fragments sont inhibés par le CaCl<sub>2</sub>, le NaCl et le mannitol après 4 heures d'incubation. La chélation des ions divalents, dont plus spécifiquement du Ca<sup>2+</sup> par l'EGTA, augmente la transcription de HCaRG. Cette stimulation confirme l'importance du Ca<sup>2+</sup> extracellulaire dans la régulation négative de ce gène. Pour la construction nCARE de HCaRG de rat, il a déjà été montré par un autre étudiant du laboratoire que cet élément était négativement régulé par le CaCl<sub>2</sub>. Cependant, l'inhibition par le calcium du promoteur humain et son implication *ex vivo* n'avaient pas encore été démontrés. Or, nos résultats montrent que l'ajout d'EGTA est capable d'augmenter les niveaux d'ARNm de HCaRG humain. Il est possible que les cellules HEK293 soient très sensibles à l'effet négatif du calcium extracellulaire. Afin de vérifier si cet effet est spécifique au calcium, des doses croissantes de CaCl<sub>2</sub> pourraient être ajoutées à 0,3 mM d'EGTA. De plus, il serait important de caractériser le nCARE humain afin de vérifier si cet élément est fonctionnel. Nos résultats précédents de EMSA ont montré, dans les extraits nucléaires des cellules HEK293 et Caco-2 (cellules de

carcinome de colon humain), que plusieurs protéines sont capables de lier le nCARE présent dans le promoteur de HCaRG de rat (EMSA, résultats non montré). Des études similaires devront être faites pour le nCARE du promoteur humain.

Dans la littérature, l'ajout de 50 mM de NaCl aux 110 mM déjà présents dans le milieu pendant une période de 20 heures a un effet positif sur l'activité du nCARE de la PTH (Okazaki, 1991). Dans nos expériences, après 4 heures d'incubation avec l'ajout de 50 mM de NaCl, on observe une inhibition de l'activité luciférase pour le nCARE seul semblable à celle des fragments 2073 et 1618 de promoteurs de HCaRG. Afin de discerner l'effet spécifique des ions  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  du stress osmotique causé par l'ajout de NaCl, nous avons étudié l'effet d'une concentration de 100 mM de mannitol afin d'obtenir une osmolalité équivalente à celle obtenue par l'ajout de 50mM de NaCl dans le milieu. On remarque que le mannitol n'inhibe pas autant que le NaCl l'activité des constructions du promoteur et du nCARE. Ceci suggère que les ions  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  ont un impact sur la régulation de concert avec leur effet sur l'osmolarité. Il a été rapporté que l'inhibition de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase mène à l'expression de gène à réponse rapide à cette variation de  $\text{Na}^+$ . Plusieurs gènes dont c-fos semblent régulés par un mécanisme dépendant des kinase médié par le  $\text{Na}^+$  en concert avec le  $\text{Ca}^{2+}$  (Haloui, 2007). En conclusion, le promoteur de HCaRG et son élément nCARE en particulier possèdent la particularité d'être régulés par plusieurs ions. Il est possible que cet effet soit spécifique aux ions étudiés mais que ces éléments soient sensibles aussi à d'autres ions. Les cellules HEK293 n'ont pas répondu à la stimulation au  $\text{CuCl}_2$  contrairement aux HEPG2 (Muller, 2007) suggérant une spécificité cellulaire. Les cellules HEPG2 sont des cellules de foies,

les COMMDs sont régulés pour la détoxification de cuivre dans cette organe alors que les cellules rénales ne possèdent pas cette fonction mais plutôt un rôle d'excrétion. Les mécanismes de régulation par le cuivre sont probablement absents dans les HEK293.

La protéine HCaRG ne semble pas affecter sa propre transcription. Ceci a été démontré de plusieurs façons. Premièrement, l'activité luciférase du promoteur 1618 n'est pas influencée par la sur-expression de rHCaRG (résultat non montré). Deuxièmement, l'analyse du profil d'expression à l'aide de « genechips » entre les cellules contrôles (N1) et celles sur-exprimant HCaRG (H9) n'a pas montré de différence d'expression de hHCaRG ou d'autres COMMDs (résultat non montré) entre les deux lignées cellulaires. Finalement, la sur-expression de rHCaRG dans le rein de souris transgéniques ne montre pas un changement de l'expression endogène de HCaRG de souris (Matsuda et al., 2007, non publié).

Nous avons montré que la sur-expression de rHCaRG dans les cellules HEK293 cause un arrêt des cellules dans le phase G2M du cycle cellulaire et diminue ainsi le taux de prolifération cellulaire comparativement aux cellules contrôles (Devlin et al., 2002). De plus, lors d'une ischémie-reperfusion du rein chez le rat, le profil d'expression de HCaRG est l'inverse de celui de c-myc, un marqueur de la prolifération cellulaire (Solban et al., 2001). Ceci suggère que l'expression de HCaRG serait diminuée dans la phase de prolifération et augmentée pendant la différenciation cellulaire. Ainsi, la présence d'éléments CDE et CHR retrouvés dans le promoteur humain et de rat de HCaRG pourrait expliquer comment HCaRG est régulé pendant le cycle cellulaire. Lorsque ces

éléments sont à proximité l'un et de l'autre, ils répriment l'activité de facteurs comme NF- $\kappa$ B. Ils peuvent agir aussi en tandem et avec E2F et Sp1/3 (Haugwitz, 2002). Ces éléments sont aussi retrouvés dans les promoteurs des COMMDs. Les cellules HeLa (cellules leucémiques humaines) transfectées avec le promoteur 1618 et stimulées avec des agents déstabilisateurs du cycle cellulaire tel que la mimosine (arrêt en G1), thymidine (arrêt G1-S) et le nocodazole (arrêt G2-M) n'ont pas montré une variation significative de l'activité de luciférase de la construction du promoteur 1618 (Tremblay J et al. résultats non publiés). Il serait important de cloner la région promotrice contenant les éléments CDE et CHR dans un vecteur possédant un promoteur minimal et de faire des EMSA avec des sondes couvrant ces éléments dans des cellules stimulées avec ces agents déstabilisateurs. De plus, la sur-expression de HCaRG induit une différenciation cellulaire (Section 1.3.6). L'utilisation la lignée cellulaire Caco-2 pourrait être utile ; ces dernières sont capables de se différencier spontanément après quelques jours de confluence. Ainsi, les constructions des promoteurs ou des éléments pourraient être testés pendant le processus de différenciation.

Les éléments de réponse aux facteurs de transcription dans les promoteurs sont importants pour la régulation de la transcription. Les nombreux éléments putatifs retrouvés dans les promoteurs des COMMDs font en partie le lien avec leurs fonctions. COMMD1 a été démontré capable d'inhiber la voie de transcription médiée par  $\kappa$ B. Les nombreux éléments de réponse au NF- $\kappa$ B présents dans les promoteurs des COMMDs pourraient agir comme mécanismes d'auto-régulation. De plus, la capacité des COMMDs à lier le complexe Nf- $\kappa$ B tel que RelA et C-Rel et la présence des sites Rel dans les

promoteurs de COMMD-3-5-10 renforce cette hypothèse. Il serait important de connaître l'impact de HCaRG dans cette voie de signalisation puisque ce dernier se lie à RelA et C-Rel (De Pie, 2006). De plus, nous avons retrouvé une fraction de HCaRG-GFP à la bordure du noyau, ce qui pourrait être le site de la co-localisation entre HCaRG et le complexe NF- $\kappa$ B.

## **5.2 Les partenaires protéiques de HCaRG**

La propriété, retrouvée chez plusieurs membres de la familles des COMMDs, d'interagir avec de nombreux partenaires protéiques et d'être présent dans la plupart des organelles de la cellule est aussi présente chez HCaRG. Cette petite protéine de 224 acides aminés est retrouvée dans le noyau des cellules COS (Solban et al., 2000). Dans les HEK293, nous avons détecté HCaRG-GFP majoritairement au niveau des pseudopodes et des lamellipodes associés à l'actine et dans certains cas, nous l'avons retrouvé fortement concentré en un point près ou dans le noyau (El Hader, C. Croisetièrè, manuscrit en préparation en annexe). Des études de microscopie confocale seront nécessaires pour déterminer sa localisation fine. L'interaction avec la  $\beta$ -actine, la NKCC2, la Na,K-ATPase  $\beta_1$ , le canal potassique voltage dépendant et le transporteur d'acides aminés, détectée initialement par la technique du double hybride a été confirmée, expérimentalement par les techniques de co-immunoprécipitation et de « pull-down ». Les transporteurs et canaux sont impliqués entres autres dans la polarisation et la migration de la cellule. La Na,K-ATPase  $\beta_1$  est responsable de l'insertion du complexe  $\alpha\beta$  de la Na,K-ATPase et peut moduler le transport des ions  $K^+$  et  $Na^+$  à travers la membrane. De plus, des études d'expression de la cadhérine, une molécule d'adhésion, et

de la Na,K-ATPase  $\beta_1$  ont démontrés un rôle de cette sous-unités dans l'induction de la polarisation de la cellule ainsi que dans la motilité (Sirgrid, 2001). La NKCC2 est exclusivement présente dans le rein à la membrane basolatérale pour maintenir le volume cellulaire adéquat ainsi que la coordination des gradients ioniques responsable de la sécrétion de fluide (Haas, 2000). Le canal potassique voltage dépendant est une protéine transmembranaire sensible au changement de voltage. Il est la clé du retour de la cellule polarisée à un état de repos (Carolina et al., 2005). Ainsi, ces protéines interagissant avec HCaRG sont importantes dans la polarisation de la cellule et cette étape est nécessaire à la migration. De plus, la Na,K-ATPase  $\beta_1$  semble avoir un rôle plus direct dans l'adhésion et la migration puisqu'il a déjà été rapporté dans ces fonctions en relation avec la cadhérine (Sirgrid, 2001).

Le criblage par double hybride suggère aussi l'interaction entre HCaRG et d'autres protéines telles que les protéines Appolon/Bruce qui augmentent la dégradation de Smac et inhibent l'activité de la caspase-9 pour induire l'apoptose (Xiao-Bo Qiu, 2005). Les protéines DAZ sont impliquées dans le développement des testicules et sont importantes dans la spermatogénèse (Xiao-Bo Qiu, 2005). La prosaposine, le précurseur de la saposine est un facteur neurotrophique. La mutation de cette dernière a été associée à la maladie de Gaucher et de Tay-Sachs (Gieselmann, 1991). La maladie de Tay-Sachs est un désordre lipidique qui accumule les graisses dans les tissus et le système nerveux. De plus, dans une étude, il a été démontré que la prosaposine peut sauver 60% des neurones de l'apoptose induite par un milieu pauvre en potassium. La chaperonine TCP1 possède la fonction de permettre la bonne conformation des nouveaux polypeptides (Ronald

Melki et al., 1993). Plus particulièrement, la bonne conformation de la  $\beta$ -actine est induite par le complexe TCP1. Un des partenaires de HCaRG est le facteur de transcription NFYC une sous-unité du complexe de transcription général NFY (Section 1.2.8). HCaRG pourrait ainsi moduler l'expression de certains gènes. De plus, la présence d'un élément putatif de liaison pour un récepteur nucléaire dans le promoteur de HCaRG est une autre évidence pour cette fonction. Finalement, nous avons récemment démontré que l'un des partenaires de HCaRG est la protéine COMMD8. Bien que cette dernière soit un membre de la famille des COMMD, elle n'a pas encore été caractérisée dans la littérature. Il serait intéressant de mieux caractériser les interactions entre COMMD8 et HCaRG en relation avec les fonctions de HCaRG.

En conclusion, HCaRG est une petite protéine qui peut lier de nombreux partenaires protéiques. Des études de mutagenèse dirigée et de délétions pourront permettre d'identifier le ou les sites responsables de ces liaisons. De plus, par sa versatilité, HCaRG peut se retrouver presque partout dans la cellule, HCaRG pourrait donc être une protéine échafaud servant à stabiliser la formation de complexes protéiques. Par exemple, la colocalisation de HCaRG avec la Na,K-ATPase  $\beta$ 1 en un point concentré près du noyau pourrait s'avérer être située dans le réticulum endoplasmique rugueux. Ainsi, HCaRG pourrait aider à la traduction en se liant la partie C-terminale de cette dernière ou pourrait, de concert avec les chaperonines, aider au remodelage des protéines naissantes (Ronald Melki et al., 1993). La synthèse *in vitro* de la Na,K-ATPase  $\beta$ 1 par un lysat de réticulocytes avec ou sans la présence de HCaRG purifié pourrait nous permettre de vérifier cette hypothèse. D'un autre point de vue, HCaRG pourrait aider à l'insertion dans

la membrane du complexe  $\alpha\beta$  de la Na,K-ATPase par son interaction avec la sous-unité  $\beta 1$ . Des études d'immunofluorescence avec la Na,K-ATPase  $\beta 1$ -YFP pourraient nous permettre de voir sa localisation à la membrane par la sur ou sous-expression de HCaRG.

### **5.3 HCaRG, actine et migration cellulaire**

La confirmation de l'interaction entre l'actine et HCaRG ainsi que leur colocalisation dans les lamellipodes nous ont incités à investiguer davantage le rôle de HCaRG dans la migration cellulaire. L'augmentation et la diminution de la migration par la sur-expression et la sous-expression de HCaRG ont confirmé cette fonction. La capacité de HCaRG à se lier à l'actine monomérique et à dépolymériser l'actine filamenteuse est importante dans le processus de la migration cellulaire. Nos résultats suggèrent que HCaRG pourrait être une protéine qui dénuderait la coiffe de l'actine ou encore pourrait être une protéine de coiffe. Un immunobuvardage contre HCaRG dans les culots des expériences de déséquilibre G/F actine *ex vivo* pourrait confirmer les résultats de « spindown ». Nous n'avons pas montré directement que HCaRG pouvait lier l'actine filamenteuse. La liaison protéique dépend de plusieurs facteurs dont le pH, la concentration de la protéine et la concentration ionique qui peuvent être ajustés pour optimiser les études d'interaction. Il est probable que HCaRG serait capable de se lier seulement aux monomères d'actine qui n'ont pas encore libéré le phosphate inorganique. Ainsi, HCaRG se retrouverait séquestré lors de l'incorporation des unités de G-actine dans le filament. Des études de microscopie électronique pourraient nous permettre de vérifier l'impact de HCaRG sur la longueur des filaments d'actine. De plus, en utilisant un mélange d'actine filamenteuse de différentes longueurs, il serait possible de

déterminer la capacité de liaison de HCaRG et ainsi déterminer s'il s'agit d'une protéine de coiffe. Puisque nos données montrent que le niveau d'actine filamenteuse est plus élevé dans les cellules H15 sur-exprimant HCaRG que dans les cellules contrôles N3 suite à une stimulation à la jasplakinolide, il est possible que HCaRG soit en réalité une protéine de coiffe puisque ces dernières sont connues pour stabiliser les brins d'actine. De plus, de nombreuses protéines de coiffe augmentent la motilité cellulaire (Hug, Jay et al., 1995). La capacité de HCaRG à lier l'actine et à influencer sa polymérisation n'a été montrée jusqu'ici que de façon indirecte. Un essai de polymérisation avec de l'actine-pyrène pourrait permettre de suivre l'effet de HCaRG sur la polymérisation avec un spectrofluoromètre. De plus, des études de mutagenèse dirigée sur HCaRG pourraient confirmer les sites et l'impact des ces interactions entre HCaRG et l'actine en utilisant les essais de « spin-down » et de « pull-down ». Les modifications du ratio G-actine/F-actine obtenus par la sur-expression de HCaRG suggère que la cellule a une plus grande capacité de polymérisation d'actine. Le réservoir d'actine monomérique est important pour la dynamique du cytosquelette. La profiline et la thymosine  $\beta$ 4 sont essentielles dans le maintien de ce réservoir. Or, nous avons montré que HCaRG possède des sites de liaison putatifs à l'actine semblables à ceux de la profiline et la thymosine  $\beta$ 4 dans la séquence d'HCaRG. La profiline permet aux monomères d'actine D de retrouver leur forme T prête à être polymérisée. La thymosine  $\beta$ 4 retient les monomères T d'actine pour assurer une réserve. Ainsi, HCaRG pourrait faire le lien entre la profiline et la thymosine  $\beta$ 4 en favorisant l'accumulation des monomères T.

La sur-expression de HCaRG dans les cellules « Madin-Darby Canine Kidney Cells» MDCK conduit à une augmentation de l'activité de la Na,K-ATPase (3 fois), de la NKCC (1,5 fois) (Manuscrit en annexe). Les niveaux de la protéine NKCC sont les mêmes dans les cellules N3 et H15 cependant les cellules H15 montrent un niveau plus important de phospho-NKCC, ce qui pourrait expliquer son activité accrue. De plus, les H15 possèdent un volume cellulaire de 60% plus élevé ainsi qu'une augmentation de la concentration intracellulaire de sodium (Manuscrit en annexe). L'activité accrue des transporteurs et canaux ioniques dans les H15 ainsi que l'augmentation du volume cellulaire sont des moyens pour la cellule de devenir polarisée (Section 1.2.7). Or, la polarisation est une étape importante dans la migration cellulaire. De plus, il a été démontré que l'activité de ces canaux et transporteurs est nécessaire à la migration (Cantiello et al., 1993; Ritter, 1998) Dans un volume cellulaire contrôlé par les transporteurs et canaux ioniques, les transporteurs des ions créent un milieu propice au bon fonctionnement du cytosquelette et de sa machinerie nécessaire à une migration optimale. La coordination de ces événements est maintenue par un gradient de  $Ca^{2+}$  intracellulaire plus élevé à l'arrière de la cellule que dans les lamellipodes (Section 1.2.7). Or, l'expression de HCaRG est sous le contrôle du  $Ca^{2+}$  et pourrait de plus être important pour le recrutement de HCaRG au bon site cellulaire. Ainsi, HCaRG serait d'avantage localisé dans les lamellipodes qu'à l'arrière de la cellule.

En conclusion, l'augmentation de la migration des cellules par la sur-expression de HCaRG se produit de concert avec l'activité dépolymérisante des filaments d'actine par HCaRG ainsi que de la polarisation de la cellule. La séquestration de l'actine

monomérique par HCaRG est une étape clé accompagnée par l'augmentation de l'activité des transporteurs et canaux ioniques. L'augmentation de la migration cellulaire après transfection transitoire de HCaRG et la réduction de la migration par les ShRNAs dirigés contre HCaRG sont des évidences supportant l'implication de HCaRG dans ce processus. Cependant, les mécanismes pour y arriver ne sont pas encore clairs. Plusieurs évidences montrent que l'activité des transporteurs est reliée à l'intégrité du cytosquelette (Section 1.1). Ainsi, la dépolymérisation de l'actine pourrait être le lien entre l'activation des transporteurs et canaux ioniques sous le contrôle de HCaRG.

## 5.4 Conclusion

HCaRG a été récemment classé dans la famille des protéines COMMDs et renommé COMMD5. Nous avons nommé cette protéine HCaRG pour « Hypertension-related Calcium-Regulated Gene » (Solban et coll. JBC, 2000) et avons émis l'hypothèse que le déséquilibre calcique observé chez plusieurs hypertendus pourrait être causé en partie par cette protéine. L'augmentation des niveaux de HCaRG dans les reins de rats génétiquement hypertendus supporte son rôle dans le développement de l'hypertension. Récemment, nous avons observé que les souris transgéniques sur-exprimant HCaRG dans le rein ont une tension artérielle plus élevée que les souris contrôles. La régulation de l'expression de HCaRG par le stress osmotique et le calcium rejoint aussi ce déséquilibre ionique observé chez les rats SHR. Nous avons montré ici que HCaRG affecte la polymérisation de l'actine en se liant à l'actine monomérique. De plus, HCaRG est associé à l'actine dans les lamellipodes. Les changements des niveaux de HCaRG affectent la migration cellulaire et l'augmentation de l'activité des transporteurs ioniques contribue à l'augmentation de la motilité cellulaire induite par HCaRG. Les résultats obtenus jusqu'à maintenant appuient l'hypothèse que HCaRG pourrait être impliqué dans le développement de l'hypertension ainsi que dans la fonction et la réparation rénale. Les processus de dé-différenciation, de prolifération, de migration et de re-différenciation des cellules épithéliales rénales sont les étapes clés de la réparation du rein endommagé (Paul A Nony et al, 2003) et HCaRG influence chacune de ces étapes. Des études d'ischémie-reperfusion chez les souris transgéniques ou encore traitées par les ShRNA sont en cours dans le laboratoire afin de vérifier cette hypothèse. Nous avons vu

que HCaRG interagit avec de nombreuses protéines cellulaires. L'une d'entre elles est la protéine COMMD8 dont la fonction n'est pas encore connue. Cependant, cette découverte, en plus de appuyer le fait que HCaRG est un membre de la famille des COMMDs, ouvre la voie à l'exploration du rôle de cette nouvelle famille dans le système cardiovasculaire et rénal.

## **Bibliographie**

Abraham VC, Vijaykumar K, Lansing Taylor D. The actin-based nanomachine at the leading edge of migrating cells. *Biophys.J.* 77.3 (1999): 1721-32.

Alberts Bruce. *Molecular biology of the cell.* 4<sup>th</sup> edition, Garland science (2001).

Anderson KI, Wang Y, Small JV. Coordination of protrusion and translocation of the keratocyte involves rolling of the cell body. *J.Cell Biol.* 134.5 (1996): 1209-18.

Baldwin, A. S. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J.Clin.Invest* 107.3 (2001): 241-46.

Bhakat KK, Izumi T, Yang SH, Hazra TK. Role of acetylated human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in regulation of the parathyroid hormone gene. *EMBO J.* 22.23 (2003): 6299-309.

Bourne, H. R. How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9.2 (1997): 134-42.

Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat.Genet.* 5.4 (1993): 327-37.

Burstein E, Hoberg JE, Wilkinson AS, Rumble JM, Csomos RA, Komarck CM. COMMD proteins, a novel family of structural and functional homologs of MURR1. *J.Biol.Chem.* 280.23 (2005): 22222-32.

Cantiello HF, Prat AG, Bonventre JV. Actin-binding protein contributes to cell volume regulatory ion channel activation in melanoma cells. *J.Biol.Chem.* 268.7 (1993): 4596-99.

Coroadinha H, Carvalhal AV. Activity After Cell Growth Inhibition by the IRF-1 System *Animal Cell Technology* 10.1007 (2007): 1465-1481.

Carolina O, Vivian G. Slow Inactivation in Voltage Gated Potassium Channels Is Insensitive to the Binding of Pore Occluding Peptide Toxins *Biophysical Journal* Volume 89 (2005): 1009–1019.

Cooper, J. A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J.Cell Biol.* 105.4 (1987): 1473-78.

Cooper, J. A. and D. A. Schafer. Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr.Opin.Cell Biol.* 12.1 (2000): 97-103.

de Bie P, van de Sluis B, Burstein E, Duran KJ, Berger R, Duckett CS, Characterization of COMMD protein-protein interactions in NF-kappaB signalling. *Biochem.J.* 398.1 (2006): 63-71.

de Bie P, van de Sluis A, Klomp L, Wijmenga C. The many faces of the copper metabolism protein MURR1/COMMD1. *J.Hered.* 96.7 (2005): 803-11.

Jeane DF, Wintz H, Hyoun Kim J, Poynton H, Fox T. Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. *Biometals* 16.1 (2003): 185-97.

Desai A, Mitchison TJ. Microtubule polymerization dynamics. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 13 (1997): 83-117.

Devlin A, Solban N, Tremblay S, Tremblay J. HCaRG is a novel regulator of renal epithelial cell growth and differentiation causing G2M arrest." *Am.J.Physiol Renal Physiol* 284.4 (2003): F753-F762.

Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat.Cell Biol.* 1.5 (1999): 253-59.

El Hader C, Tremblay S, Solban N, Gingras D, Beliveau R, Orlov SN, Tremblay J. HCaRG increases renal cell migration by a TGF-alpha autocrine loop mechanism. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 289.6 (2005): F1273-F1280.

Ganesh L, Burstein E, Guha-Niyogi A, Louder MK, Mascola JR, Klomp LW. The gene product Murr1 restricts HIV-1 replication in resting CD4+ lymphocytes. *Nature* 426.6968 (2003): 853-57.

Gieselmann V, Poltena A, Kreysing J, Kapplera J, Fluhartyb A, Figuraa K. Molecular genetics of metachromatic leukodystrophy , *Developmental Neuroscience* (1991) 13: 222-227

Grabowski, Tortora Principe d'anatomie et de physiologie. ERPI, 2000.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 16 (1998): 225-60.

Grinstein S, Woodside M, Waddell TK, Downey G. Focal localization of the NHE-1 isoform of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport: assessment of effects on intracellular pH. *EMBO J.* 12.13 (1993): 5209-18.

Haas M, Forbush B. The Na-K-Cl Cotransporter of Secretory Epithelia, *Annu Rev Physiology* 62 (2000); 515-34.

Hatton DC, McCarron D. Dietary calcium and blood pressure in experimental models of hypertension. A review. *Hypertension* (2002) 23:513-530.

Haugwitz U, Wasner M. A single cell cycle genes homology region (CHR) controls cell cycle-dependant transcription of the cdc25C phosphatase gene and is able to cooperate with E2F or Sp1/2 sites. *Nucleic Acid Res* (2001): 1967-1976

Herrmann H, Aebi U. Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 8.2 (1998): 177-85.

Higgs N, Pollard TD. Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu.Rev.Biochem.* 70 (2001): 649-76.

Hill TL, Kirschner MW. Subunit treadmilling of microtubules or actin in the presence of cellular barriers: possible conversion of chemical free energy into mechanical work. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 79.2 (1982): 490-94.

Kenneth C, Holmes A, Popp D, Gebhard W. Atomic model of the actin filament. *Nature* 347.6288 (1990): 44-49.

Haloui M, Taurin S, Akimova OA, Guo DF, Tremblay J, Hamet P, Orlov S.  $[Na^+]_i$ -induced c-Fos expression is not mediated by activation of the 5'-promoter containing known transcriptional elements. *FEBS Journal* 274 (14), (2005): 3557-3567.

Hug C, Jay YP. Capping protein levels influence actin assembly and cell motility in *Dictyostelium*, *Cell* Vol 81, (1995) :591-600.

Iijima M, Huang YE, Devreotes P. Temporal and spatial regulation of chemotaxis. *Dev.Cell* 3.4 (2002): 469-78.

Janetopoulos C, Lan Ma, Peter N, Devreotes P, Pablo A. Iglesias. Chemoattractant-induced phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate accumulation is spatially amplified and adapts, independent of the actin cytoskeleton. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101.24 (2004): 8951-56.

Joyce D, C. Albanese, J. Steer, M. Fu, B. Bouzahzah and R.G. Pestell "NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection." *Cytokine Growth Factor Rev.* 12.1 (2001): 73-90.

Komuro, H, Rakic P. Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca<sup>2+</sup> fluctuations. *J.Neurobiol.* 37.1 (1998): 110-30.

Kuninger DT, Izumi T, Papaconstantinou J. Human AP-endonuclease 1 and hnRNP-L interact with a nCaRE-like repressor element in the AP-endonuclease 1 promoter. *Nucleic Acids Res.* 30.3 (2002): 823-29.

Lameire N, Vanholder R. Pathophysiologic features and prevention of human and experimental acute tubular necrosis. *J Am Soc Nephrol* 12 Suppl 17(2001): S20-S32.

Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84.3 (1996): 359-69.

Loisel TP, Boujemaa R, Pantaloni D, Carlier MF. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 401.6753 (1999): 613-16.

Machesky L.M, Hall A. Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J.Cell Biol.* 138.4 (1997): 913-26.

Machesky L.M, Insall RH. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr.Biol.* 8.25 (1998): 1347-56.

May RC, Hall ME, Higgs HN, Pollard TD. The Arp2/3 complex is essential for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *Curr.Biol.* 9.14 (1999): 759-62.

Mitchison, T.J. Evolution of a dynamic cytoskeleton. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 349.1329 (1995): 299-304.

Montminy, M. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu.Rev.Biochem.* 66 (1997): 807-22.

Muller P, van Bakel H, van de Sluis B, Holstege F, Wijmenga C, Klomp LW. Gene expression profiling of liver cells after copper overload in vivo and in vitro reveals new copper-regulated genes. *J.Biol.Inorg.Chem.* 12.4 (2007): 495-507.

Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95.11 (1998): 6181-86.

Nishizuka, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258.5082 (1992): 607-14.

Okazaki T, Zajac JD, Igarashi T, Ogata E, Kronenberg HM. Negative regulatory elements in the human parathyroid hormone gene. *J.Biol.Chem.* 266.32 (1991): 21903-10.

Paul A, Schnellmann G. Mechanisms of renal cell repair and regeneration after acute renal failure.2003, *J Pharmacol Exp Ther* (4)3 (2003):905-12.

Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112.4 (2003): 453-65.

Postma M, Bosgraaf L, Looovers M. Chemotaxis: signalling modules join hands at front and tail. *EMBO Rep.* 5.1 (2004): 35-40.

Postma M, Roelofs J, Goedhart J. Sensitization of Dictyostelium chemotaxis by phosphoinositide-3-kinase-mediated self-organizing signalling patches. *J.Cell Sci.* 117.Pt 14 (2004): 2925-35.

Preall JB, Sontheimer EJ, RNAi: RISC gets loaded., *Cell* (2005) 123(4):543-5

Ritter, M. Cell volume regulatory ion transport in cell migration. *Contrib.Nephrol.* 123 (1998): 135-57.

Melki M, Vainberg, I, Robert L. Chow, Nicholas J. Cowan. Chaperonin mediated folding of vertebrate actin-related protein and  $\beta$ -tubulin *The Journal of Cell Biology*, Vol. 122, No. 6 (1993): 1301-1310

Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* (2004) 114:5-14(2)

Schwab A. Ion channels and transporters on the move. *News Physiol Sci*. 16 (2001): 29-33.

Shen HM, Lin Y, Choksi S, Tran J, Jin T, Chang L, Karin M. Essential roles of receptor-interacting protein and TRAF2 in oxidative stress-induced cell death. *Mol. Cell Biol*. 24.13 (2004): 5914-22.

Shi X, Ding M, Ye J, Wang S, Leonard SS, Zang L, Castranova V, Vallyathan V, Chiu A, Dalal N, Liu K. Cr(IV) causes activation of nuclear transcription factor- $\kappa$ B, DNA strand breaks and dG hydroxylation via free radical reactions. *J. Inorg. Biochem*. 75.1 (1999): 37-44.

Sirgrid A. Na,<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase B1-subunit is required for epithelial polarization, supression of invasion and cell motility, *Molecular biology of the Cell* (2001) Vol 12., 279-295

Small JV, Resch GP. The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility. *Curr. Opin. Cell Biol*. 17.5 (2005): 517-23.

Solban N, Jia HP, Richard S, Tremblay S, Devlin A, Peng J, Gossard F, Guo DF, Morel G, Hamet P, Lewanczuk R, 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.* 275.41 (2000): 32234-43.

Soll DR, Wessels D, Heid PJ, Zhang H. A contextual framework for characterizing motility and chemotaxis mutants in *Dictyostelium discoideum*. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 23.7-8 (2002): 659-72.

Sommerhalter M, Zhang Y, Rosenzweig AC. Solution structure of the COMMD1 N-terminal domain. *J.Mol.Biol.* 365.3 (2007): 715-21.

Sowers JR, Zemel MB, Zemel PC, Standley PR. Calcium metabolism and dietary calcium in salt sensitive hypertension. *Am J Hypertens* (1991) 4:557-563.

Suree N, Kulkarni P, Deschamps P. Characterization and copper binding properties of human COMMD1 (MURR1). *Biochemistry* 46.11 (2007): 3116-28.

Sun QS, Yamamoto M, Mejillano M, Helen L. Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J.Biol.Chem.* 274.47 (1999): 33179-82.

Tao TY, Liu F, Klomp L, Wijmenga C, Gitlin JD. The copper toxicosis gene product Murr1 directly interacts with the Wilson disease protein. *J.Biol.Chem.* 278.43 (2003): 41593-96.

Touyz RM, Milne FJ. Alterations in intracellular cations and cell membrane ATPase activity in patients with malignant hypertension. *J Hypertens* (1995): 13:867-874.

Tuschl T, Elbashir SM, Harborth J, Weber K. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26 (2002): 199-213

Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr.Med.Chem.* 12.10 (2005): 1161-208.

Sluis B, Muller P, Duran K, Chen A, Arjan J. Groot, Klomp W, Paul P. Liu, Cisca W. Increased activity of hypoxia-inducible factor 1 is associated with early embryonic lethality in *Commd1* null mice. *Mol.Cell Biol.* 27.11 (2007): 4142-56.

Van Troys M, Dewitte D, Goethals M, Carlier MF, Vandekerckhove J. The actin binding site of thymosin beta 4 mapped by mutational analysis, *The EMBO Journal* vol. 15 no.2 (1996): 201-210.

Van Haastert PJ, Devreotes PN. Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 5.8 (2004): 626-34.

Verkhovsky AB, Svitkina TM, Borisy GG. Polarity sorting of actin filaments in cytochalasin-treated fibroblasts. *J.Cell Sci.* 110 ( Pt 15) (1997): 1693-704.

Wakatsuki T, Schwab B, Thompson NC, Elson EL. Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *J.Cell Sci.* 114.Pt 5 (2001): 1025-36.

Weed AS, Andrei V, Dorothy A, Alissa M, Kinley W, Cooper J, Parsons T. Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J.Cell Biol.* 151.1 (2000): 29-40.

Weiner OD. Regulation of cell polarity during eukaryotic chemotaxis: the chemotactic compass. *Curr.Opin.Cell Biol.* 14.2 (2002): 196-202.

Welch D, Rosenblatt J, Skoble J, Portnoy D, Mitchison TJ. Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* 281.5373 (1998): 105-08.

Xiao-Bo Q, Goldberg A. Identification of two novel proteins that interact with germ-cell-specific RNA-binding proteins DAZ and DAZL1, *JBC Vol.* 280, Issue 1, (2005) : 174-182.

Xiao-Bo Q, Golderg A. The Membrane-associated Inhibitor of Apoptosis Protein, BRUCE/Apollon, Antagonizes Both the Precursor and Mature Forms of Smac and Caspase-9, *Biol. Chem., Vol.* 280, Issue 1 (2005): 174-182.

Zebda N, Bernard O, Bailly M, Welti S, Lawrence D, Condeelis JS. Phosphorylation of ADF/cofilin abolishes EGF-induced actin nucleation at the leading edge and subsequent lamellipod extension. *J. Cell Biol.* 151.5 (2000): 1119-28.

Annexe :

Manuscrit en préparation

***HCaRG interaction with actin and ion transporters promotes renal cell migration***

Carlos El Hader<sup>1,2</sup>, Christian Croisetiére<sup>1</sup>, Nicolas Solban<sup>1</sup>, Sandra Tremblay<sup>1</sup>,  
Alison M. Devlin<sup>1</sup>, Sergei N. Orlov<sup>1</sup>, Pavel Hamet<sup>1,2</sup>, and Johanne Tremblay<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Research Center, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) and <sup>2</sup>Division of Experimental Medicine, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

Address for reprint requests and other correspondence: Dr. Johanne Tremblay, Centre de recherche, CHUM Technopôle Angus, 2901 rue Rachel est, bureau 314, Montréal, Quebec, Canada H1W 4A4. Phone: [information retirée / information withdrawn] – Fax: [information retirée / information withdrawn]

(E-mail: [information retirée / information withdrawn])

**Running title:** HCaRG, actin and ion transporter interaction in cell migration

**Abstract**

Our previous studies suggested a role for the hypertension-related, calcium-regulated gene (HCaRG) in renal regeneration through its effect on kidney cell migration. To better understand HCaRG's mechanism of action, we performed yeast 2-hybrid screening using a human kidney cDNA library, and conducted functional experiments in 2 stable cell lines. Screening with HCaRG as bait revealed its interaction with several ionic transporters, among them Na,K,2Cl co-transporter (NKCC) and Na,K-ATPase. HCaRG was also found to interact and co-localize with actin at the leading edge of migrating cells. Increased activities of the Na,K-ATPase and NKCC were observed in HCaRG-overexpressing cells. These cells displayed higher intracellular Na<sup>+</sup>, water, and total protein content; in contrast, there were no differences in intracellular K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> levels. To see if the increased migration of HCaRG-transfected cells relied on HCaRG-dependent activation of ion transporters, we inhibited both the Na,K-ATPase and NKCC with ouabain or bumetanide, followed by a recovery period. The 2 inhibitors dose-dependently suppressed cell migration of HCaRG and control cells with a more persistent effect in HCaRG cells. Taken together, these results reveal that HCaRG plays an important role in renal cell migration by interacting with actin, the Na,K-ATPase and NKCC as well as in modulation of the intracellular ionic milieu required for optimal operation of the cellular migration machinery.

**Keywords:** HCaRG, kidney, actin, ion transporters, cell migration

## INTRODUCTION

Impaired ion transport, loss of cell polarity, and cytoskeletal disruption are the most common characteristics of injured renal cells (1; 8; 9; 26; 27). Recovery from renal failure requires that injured tubular cells, which do not die or detach from the basement membrane, de-differentiate, proliferate, migrate to denuded areas, re-differentiate, and restore nephron structure and function (25; 32; 54).

HCaRG (hypertension-related, calcium-regulated gene), a highly-conserved gene whose transcript levels are negatively controlled by extracellular calcium, is intensively expressed in renal tubules (16). HCaRG levels are higher in spontaneously hypertensive rat kidneys compared to normotensive controls (Wistar-Kyoto and Brown Norway rats) (39). We have mapped HCaRG to rat chromosome 7 at a locus determining kidney weight and urinary calcium excretion and to mouse chromosome 15 and human chromosome 8q24.3 (38). Recent sequence analyses have assigned HCaRG to a novel gene family of highly interacting proteins, the COMMD protein family. Members of this family, designated as COMMD 1-10 share a highly conserved 70-85 C-terminal domain (COMM domain) while the N-terminal region of these COMMD proteins vary in sequence and in length from 18 residues for COMMD6 to 151 residues for COMMD5 (or HCaRG) allowing for specific functions for each member (7). The prototype of this family (COMMD1/MURR1) has been previously involved in ion transport, copper homeostasis and transcription regulation (5; 6; 10).

In the renal ischemia-reperfusion injury model, we observed previously that HCaRG mRNA levels declined rapidly in the renal cell de-differentiation phase, reciprocally to c-myc mRNA levels, to increase thereafter during the migration and re-

differentiation phases (39). Furthermore, phenotypic changes in the human embryonic (stage when HCaRG expression is low) kidney cell line HEK293 in response to stable overexpression of HCaRG indicated expression of the cellular differentiation (or maturation) program (11).

Besides its effect on cell proliferation and differentiation, we tested the hypothesis that HCaRG could also be a player in the third cellular event important for kidney regeneration: cell migration. We showed recently that HCaRG increased the motility of HEK293 cells and renal collecting duct-derived Madin-Darby canine kidney-C7 (MDCK) cells in 2 different paradigms, the Boyden chamber and wound-healing assay (15). HCaRG overexpression induced major morphological changes, which included multiple lamellipodia presentation and the formation of actin-rich domains at their tips. HCaRG appeared also to increase the initial attachment of cells to the extracellular matrix, giving them the strength to generate forward traction for migration (15).

The aim of the current study was to identify functional protein partners of HCaRG to advance the elucidation of its role in renal cell migration. To achieve this aim, we conducted yeast 2-hybrid screening, which led to the identification of several proteins relevant to renal function interacting with HCaRG. We present evidence that HCaRG increases cell migration through its interactions with actin and ion transporters (23; 29; 41).

## **METHODS**

*Yeast 2-hybrid screening of a human kidney cDNA library:* Human HCaRG cDNA, expressed as fusion to the GAL 4 DNA-binding domain (DNA-BD) was used to

transform AH109 yeast cells. This transformed strain was then mated with the Y187 strain (Clontech) with cDNAs expressed as fusion to the GAL 4-activation domain (AD) and originating from a normal human kidney cDNA library.

The strengths of the interactions were evaluated by  $\beta$ -gal assay. Briefly, yeast cells were lysed, and the supernatant was incubated with O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside. The reaction was then stopped with  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , and optical density ( $\text{OD}_{420}$ ) was measured.

***Protein identification and confirmation of interactions by Western blotting:*** The clones were sequenced and identified with the Sequenase V 2.0 kit (Amersham Biosciences). The sequences obtained were then compared to those in Genbank (BLAST) to identify the proteins that interact with HCaRG. We next prepared proteins of the different clones with an hemagglutinin (HA) epitope in an *in vitro* transcription/translation system (TnT-coupled reticulocyte lysate system, Promega) in accordance with the manufacturer's instructions.

We also prepared the recombinant protein Glutathione S-Transferase (GST)-HCaRG following the manufacturer's instructions, and immobilized GST-HCaRG protein on sepharose beads. Briefly, plasmids encoding GST or GST-HCaRG fusion protein (PGEX3X; Amersham Biosciences) were transformed into *E. coli* BL21 Star cells (Invitrogen) grown at 37°C in LB supplemented with 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ampicillin and induced with 1 mM IPTG for 2 hours. The cells were pelleted, resuspended in 20 ml phosphate-buffered saline (PBS)/1 ml Triton X-100 20%, and sonicated 3 times. Cellular debris was removed, and GST or GST-fusion protein was absorbed by incubation with glutathione-sepharose 4B beads (Amersham Biosciences).

Immobilized GST-HCaRG and the GST protein control were incubated with the proteins generated by *in vitro* transcription/translation. After 6 washes, bound proteins were run on sodium dodecyl sulphate (SDS)-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane, and blocked with 5% bovine milk. Next the membrane was incubated with 1  $\mu\text{g/ml}$  of HA primary antibody (Clontech: 3,808-1), washed with 1x PBS, and incubated with anti-rabbit conjugated horseradish peroxidase (HRP) secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology).

***Pull-down assays with GST-fusion proteins:*** HCaRG-actin interactions were also confirmed by pull-down assays. Glutathione-sepharose beads were preloaded with equivalent amounts (150  $\mu\text{g}$ ) of GST-HCaRG or GST, and mixed with 0, 5 or 20  $\mu\text{g}$  of g-actin (cytoskeleton), followed by incubation for 2 hours at room temperature or incubated with whole HEK293 cell extracts for 2 hours at 4°C. The beads were washed 3 times with 1250  $\mu\text{l}$  of PBS (pH 7.4). Bound proteins were eluted with SDS sample buffer and resolved by SDS-PAGE. The gels were stained with Coomassie blue or transferred to nitrocellulose membranes. Proteins were detected by enhanced chemiluminescence (ECL), using anti-actin polyclonal antibody (Sigma).

***Immunofluorescence microscopy:*** HEK293 cells were transfected with FuGENE6 reagent (Roche) and green fluorescent protein (GFP) or GFP-HCaRG plasmid (39) cultured in DMEM containing 10% FBS, then fixed with 4% paraformaldehyde for 15 minutes and permeabilized with 0.075% saponin for 10 minutes. They were blocked with PBS containing 2% bovine serum albumin (BSA) and 0.2% gelatin. After labelling, the coverslips were mounted in Vectashield, and viewed with a Zeiss Axioskop

fluorescent microscope equipped with a 40X-Planapochromat objective and selective filters for fluorescein isothiocyanate, DAPI and Texas red.

***Stable transfection and cell culture:*** HEK293 cells were transfected with control plasmid (pcDNA1/Neo, Invitrogen) or with plasmid encoding HCaRG by a standard calcium phosphate co-precipitation method as described by Solban et al. (39). MDCK-C7 cells were transfected with Fugene6 reagent (Roche Applied Science). Stable transfectants were selected using 400  $\mu\text{g/ml}$  G418 (HEK293) or 800  $\mu\text{g/ml}$  G418 (MDCK). Clones expressing the highest levels of HCaRG, HCaRG8 and HCaRG9 in HEK293 cells and HCaRG15 in MDCK cells were studied in these experiments, whereas clones transfected with vector alone, Neo1 or Neo6 in HEK293 cells and Neo3 in MDCK cells served as controls. Stable transfectants were maintained in high-glucose DMEM<sup>+</sup> (HEK293) or low-glucose DMEM<sup>-</sup> (MDCK) containing 10% fetal bovine serum (FBS), and 2 mM glutamine with 400  $\mu\text{g/ml}$  G418. Wild type HEK293 and MDCK cells were kept under identical conditions, but without the selection antibiotic G418. All cell types were maintained in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

***NKCC and Na,K-ATPase measurements:*** Cells grown on plastic supports (24-well plates) were used for measurement of Na,K-pump and NKCC activity. All experiments were performed at 37°C and all solutions were at pH 7.4. Confluent cells were washed twice with *medium A* and were incubated for 2 hours in 1 ml of *medium B*. It is well-documented that Na,K-ATPase activity is activated by [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, whereas NKCC is inhibited by [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>. Considering this, we measured the maximal activity of these ion transporters in Na<sup>+</sup>-loaded and Cl<sup>-</sup>-depleted cells. To achieve our goal, the cells were preincubated in K<sup>+</sup>-free or Cl<sup>-</sup>-depleted medium. In K<sup>+</sup>-free medium, KCl was substituted

by an equimolar amount of NaCl (*medium C*), whereas in Cl<sup>-</sup>-depleted medium NaCl, KCl and MgCl<sub>2</sub> were replaced by equimolar amounts of Na gluconate, K gluconate and MgSO<sub>4</sub>, respectively (*medium D*). Then, these media were aspirated, and 0.5 ml of *medium B* containing 0.5-1 μCi/ml <sup>86</sup>RbCl ± 100 μM ouabain ± 10 μM bumetanide was added for 10 minutes. In preliminary experiments, we observed that the kinetics of <sup>86</sup>Rb uptake were linear with up to 20 minutes of incubation. We also documented that at concentrations indicated above, ouabain and bumetanide completely blocked Na,K-ATPase and NKCC, respectively. Isotope uptake was terminated by 4 washes in an ice-cold solution containing 100 mM MgCl<sub>2</sub> and 10 mM HEPES-Tris buffer (*medium E*). The cells were subsequently incubated in 1% SDS, 14 mM EDTA, and radioactivity of the lysed material was counted with a liquid scintillation analyzer. Influxes were calculated as  $V = A/am$ , where  $A$  was the total count in the sample (cpm),  $a$  was <sup>86</sup>Rb-specific radioactivity in the flux medium (cpm/nmol), and  $m$  was the protein content (mg). *Medium A* contained 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>/CaCl<sub>2</sub>, and 10 mM HEPES-Tris, and *medium B*, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>/CaCl<sub>2</sub>, 5 mM D-glucose, and 20 mM HEPES-Tris.

***Immunoblot analysis of ionic transporters:*** Equal amounts of protein extracts in SDS-lysis buffer were subjected to SDS-PAGE analysis, and transferred electrophoretically to a nitrocellulose membrane. The lysis buffer consisted of cold PBS containing 1% SDS, 5 mM EDTA, 0.2 mM orthovanadate, 40 mM β-glycerophosphate and protease inhibitors (1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml pepstatin, 1 μg/ml leupeptin and 0.1 mM PMSF). The membranes were blotted 0.5 μg/ml NKCC1 or 0.5 μg/ml phosphor-NKCC1-R5 antibody (generous gift from Dr. B.I. Forbush) (23), washed with PBS, and

incubated with anti-mouse conjugated HRP secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology). The labeled bands were revealed by chemiluminescence (ECL) reagent, and exposed to Kodak biomax light film.

***Co-immunoprecipitation experiments:*** 50 ug of Pansorbin cells (Calbiochem) were added to 1mg/ml of HEK293 (Neo1) protein extracts and incubated for 15 min at 4°C in a rotative wheel. After 10000g centrifugation for 3 min at 4°C, 5 µg of either anti-HCaRG/COMMD5 rabbit polyclonal antibody (Proteintech Group Inc), anti-NKCC rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz ) or anti-Na,K-ATPase  $\beta_1$  mouse monoclonal antibody (Santa Cruz) were added to the pre-cleared lysates and incubated overnight at 4°C. Protein A Sepharose (for NKCC and HCaRG antibodies) or Protein G agarose (for Na,K-ATPase beta1 antibody) were added, pelleted, the supernatant aspirated and beads washed twice according to the manufacturer's protocol. Samples were then electrophoresed and the membranes were blotted and incubated with respective primary antibodies (anti-HCaRG 1:2000, anti-NKCC 1:500 and anti-Na,K-ATPase  $\beta_1$  1:500), after washing, the membranes were finally incubated with anti-mouse or anti-rabbit conjugated HRP secondary antibody.

***Intracellular  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl$  and  $H_2O$***  were determined as distribution between the extra-and intracellular spaces of  $^{22}Na$ ,  $^{86}Rb$ ,  $^{36}Cl$  and [ $^{14}C$ ]-urea, measured under steady-state conditions and calculated as described in detail previously (29).

***Wound-healing assay:*** Stably-transfected and control HEK293 cells were seeded at a high density ( $1 \times 10^6$  cells) and wounded 1 day later when they formed a confluent monolayer. Scraping a pipette tip through the cell monolayer created the wound. According to previous studies (5; 7) and in contrast to MDCK cells treatment with

ouabain or bumetanide at concentrations below 10  $\mu\text{M}$  was shown to have no effect on HEK293 cell viability. We, therefore, treated the cells with 0.5, 1, 2 or 3  $\mu\text{M}$  of ouabain or with 2, 4, 8 or 10  $\mu\text{M}$  of bumetanide for 24 hours. The cells were then fixed for 15 minutes with 80/20% methanol/acetone at  $-20^{\circ}\text{C}$ , and the coverslips were viewed with a 4X-Planapochromat objective. Quantitative wound closure measurements were recorded for control ( $t=0$ ) and treated wounds after 24 hours. Three randomly-chosen regions of a single wound (each 2 cm long) were photographed at x4 magnification. Mean wound width was measured, and average percent wound closure was calculated as described by El Hader et al. (2005).

## RESULTS

*Yeast 2-hybrid screening of a human kidney cDNA library:* Yeast 2-hybrid screening with HCaRG as bait revealed 24 cDNA clones, coding for protein candidates for interaction with HCaRG. We tested the strength of these interactions by measuring  $\beta$ -gal activity, and each clone was sequenced for comparison with sequences in Genbank (BLAST).

*HCaRG interacts with 7 unknown proteins:* Nine clones coded for unknown proteins, and 7 of them were unique (data not shown). Two of these clones coded for partially characterized proteins, gene product KIAA0596 and CGI-149 protein, and some of them revealed very high homology with proteins of currently, unknown function.

*HCaRG interacts with 11 known proteins:* Twelve clones coded for known proteins, and 11 of them were unique, since 2 had overlapping sequences (clones 7 and 23) (**Table 1**). The strongest interaction of HCaRG was observed with several ionic

transporters. The renal-specific NKCC2F isoform and 2 overlapping fragments of the Na,K-ATPase-transporting  $\beta_1$  subunit as well as the  $\beta_{4.1}$  subunit of the voltage-dependent  $K^+$  channel were among these ionic transporters. Other interactions, including with  $\beta$ -actin, the nuclear transcription factor Y, the putative L-type neutral amino acid transporter, and COMMD8 may provide further information on the renal functions of HCaRG. We have sequenced each of the clones and reported in Table 1, the length of each fragment and its amino acid boundaries. The shortest fragment (clone 32) has 86 amino acids located at the C-terminal end of prosaposin. Clone 7 has 89 amino acids and corresponds to the C-terminal end of the Na,K-ATPase-transporting  $\beta_1$  subunit. It overlaps with the 134 amino acid-long fragment of clone 23. Some of the clones coded for full or near full-length proteins (NKCC2, voltage-gated K channel beta subunit, and COMMD8). HCaRG interacts with a fragment of 124 amino acids located at the C-terminal end of actin.

**Confirmation of HCaRG protein partners:** We confirmed direct protein-protein interactions by Western blotting of proteins generated by the *in vitro* transcription/translation method. Briefly, these proteins, which also express the HA epitope, were incubated either with immobilized GST-HCaRG (H) or with GST alone (C), run on SDS-PAGE, and incubated with anti-HA antibody. **Figure 1** summarizes the results of Western blotting and confirms the interactions with the strongest partners. This included the 2 fragments of the Na,K-ATPase  $\beta_1$  subunit (**Figure 1A, B**), renal-specific NKCC2 (**Figure 1C**), the voltage-gated  $K^+$  channel  $\beta_{4.1}$  subunit (**Figure 1D**),  $\beta$ -actin (**Figure 1E**) and the L-type neutral amino-acid transporter (**Figure 1F**).

Our yeast 2-hybrid screening identified actin as potentially interacting with HCaRG. This interaction was further confirmed *in vitro* by pull-down assay with GST-HCaRG or GST alone, immobilized on glutathion-sepharose beads, incubated with increasing amounts of G-actin, run on SDS-PAGE, and immunoblotted with anti-actin antibody. **Figure 2A** shows the dose-dependent interaction between HCaRG and actin. We also confirmed HCaRG-actin interactions in whole cell extracts from HEK-293 (**Figure 2B**). We examined reciprocal co-immunoprecipitation between HCaRG and the Na,K-ATPase  $\beta$ 1 subunit and HCaRG and NKCC using their respective antibodies. As shown in **Figure 2C**, HCaRG antibody immunoprecipitated the Na,K-ATPase  $\beta$ 1 subunit and inversely, the anti-Na,K-ATPase  $\beta$ 1 subunit antibody immunoprecipitated HCaRG from HEK293 cell extracts. We also noted the appearance of a protein band corresponding to HCaRG with anti-NKCC antibody immunoprecipitation but the reciprocal immunoprecipitation of NKCC with anti-HCaRG antibody was undetectable.

***HCaRG co-localizes with  $\beta$ -actin at the leading edge of lamellipodia:*** In our previous study, we demonstrated that HCaRG overexpression induces multiple lamellipodia presentation (15). Primary cultures of HEK293 cells were transfected with constructs encoding GFP or GFP-HCaRG, and the cells were stained with phalloidin-Texas red to detect actin. While GFP alone was diffused in the cells (data not shown), HCaRG was found to co-localize with actin in elongated lamellipodia projections (see 3 examples in **Figure 3**), confirming interactions between actin and HCaRG in specific cellular structures.

***HCaRG increases both Na,K-ATPase and NKCC-mediated  $^{86}\text{Rb}$  influx:*** Other relevant HCaRG partners include Na-K-ATPase and NKCC. **Figure 4** presents data on

the comparison of ouabain and bumetanide actions on  $^{86}\text{Rb}$  influx in MDCK-C7 cells and in cells transfected with HCaRG plasmid (HCaRG15) or plasmid alone (Neo3). In MDCK-C7, baseline Na,K-ATPase and NKCC (corresponding to NKCC1 as NKCC2 is not present in MDCK cells) activities, measured as the ouabain- and bumetanide-sensitive components of the  $^{86}\text{Rb}$  influx rate, were similar. Stable transfectants of control plasmids had the same  $^{86}\text{Rb}$  influx as untransfected MDCK-C7 cells, whereas transfection with HCaRG increased Na,K-ATPase (ouabain-sensitive  $^{86}\text{Rb}$  influx) and NKCC co-transporter (ouabain-resistant, bumetanide-sensitive  $^{86}\text{Rb}$  influx) activity by 3- and 1.5-fold respectively. We did not observe any effect of HCaRG on  $^{86}\text{Rb}$  influx measured in the presence of ouabain and bumetanide. These data strongly suggest that HCaRG exclusively modulates Na,K-ATPase and NKCC, but has no effect on the function of ouabain- and bumetanide-resistant  $\text{K}^+$  transporters, including  $\text{K}^+$  channels.

To further examine the mechanism of Na,K-ATPase and NKCC activation by HCaRG, we compared the activity of these ion transporters under baseline conditions and after  $\text{Na}^+$ -loading and  $\text{Cl}^-$  depletion in 5 independent experiments. Three-fold higher baseline Na,K-ATPase (Figure 5A) and NKCC (Figure 5B) activities were detected in HCaRG15 cells compared to Neo3 cells. As predicted,  $\text{Na}^+$ -loading and  $\text{Cl}^-$  depletion increased the activities of Na,K-ATPase and NKCC respectively, in both transfected and control cells. Under this condition, Na,K-ATPase (Figure 5A) and NKCC (Figure 5B) activities were 50% higher in HCaRG15 compared to Neo3 cells.

***NKCC activation occurs without any changes in its protein levels:*** We then confirmed that the higher activity observed in HCaRG-expressing MDCK cells was not due to changes in NKCC1 levels (**Figure 5C**). As seen in Figure 5C, no differences in

NKCC1 protein levels were found between HCaRG15 compared to plasmid-only transfected Neo3 cells. Furthermore, the blot showing the same amount of NKCC1 proteins was stripped and immunoblotted with a specific antibody directed against phospho-NKCC1 (anti-phospho-NKCC1 antibody R5). The bottom panel presents higher NKCC1 phosphorylation in HCaRG-expressing cells.

***HCaRG increases intracellular  $\text{Na}^+$ , water and protein content:*** We next determined the consequences of HCaRG interaction with these ion transporters on intracellular  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , and  $\text{Cl}^-$  concentrations in stably-transfected HCaRG and Neo control clones. As shown in **Table 2**, MDCK cells transfected with HCaRG (HCaRG15) had significantly higher  $\text{Na}^+_i$  content compared to control Neo3; this difference was completely abolished in the presence of ouabain and diminished with bumetanide. However, no difference in  $\text{K}^+_i$  and  $\text{Cl}^-_i$  content was found between the 2 clones. This HCaRG-dependent effect on  $\text{Na}^+_i$  content was further confirmed in different stable clones from HEK293 cells. In contrast to C7-MDCK, HEK293 cells are highly permeable to  $^{14}\text{C}$ -urea that allowed us to measure intracellular water content and intracellular  $\text{Na}^+_i$  and  $\text{K}^+_i$  concentrations. While  $[\text{K}^+]_i$  was not different, HCaRG clones 8 and 9 had significantly higher  $[\text{Na}^+]_i$  concentration compared to Neo clones 1 and 6 (**Table 3**).

HCaRG cells showed a 60% increase in water measured as the volume of  $^{14}\text{C}$ -urea compared to control cells (**Table 4**). However, it is important to underline that intracellular water, when normalized per protein content, was not altered in HCaRG transfectants. This observation suggests that elevation of intracellular water volume in HCaRG cells parallels their hypertrophy, as we reported previously (11).

*Ouabain and bumetanide dose-dependently inhibit cell migration of both HCaRG and control cells with a more persistent effect in HCaRG cells:* Our previous studies demonstrated that HCaRG induced membrane protrusion and enhanced the migration potential of kidney cells by 5-fold (15). The current experiments expand this observation by demonstrating that HCaRG interaction with Na,K-ATPase and NKCC cotransport increased their activity. Therefore, the Na,K-ATPase and NKCC could play a role in HCaRG-induced migration. To examine this possibility, we treated control and HCaRG-expressing HEK293 cells with increasing concentrations of ouabain or bumetanide and observed the resulting effect on cell migratory potential and recovery. As seen in **Figure 6**, ouabain (**Figure 6A**) and bumetanide (**Figure 6B**) dose-dependently decreased cell migration of HCaRG and control cells. However, when HCaRG cells treated with ouabain (3  $\mu$ M) or bumetanide (10  $\mu$ M) for 1 day were subjected to a 24-hour recovery phase, which consisted of cell medium replacement by a drug-free medium, they showed slower recovery, as reflected by lower migration compared to control cells (**Figure 7A and B**). The more persistent inhibition of migration of HCaRG-expressing cells revealed the more important involvement of the Na,K-ATPase and NKCC in HCaRG-driven cell motility.

## DISCUSSION

We have previously demonstrated that HCaRG is highly expressed in kidney tubules (39) and has a putative role in renal epithelial cell migration (11). HCaRG-overexpressing cells showed an increase in their motile behaviour (15) and the conditioned medium from these cells was found to stimulate the migration of control

cells, in part, through the synthesis and release of transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) and autocrine/paracrine activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) (15). The molecular mechanisms of these HCaRG functions in renal cells required further elucidation.

As a first step, we searched for intracellular HCaRG protein partners by yeast 2-hybrid screening of a cDNA library from normal human kidneys. We detected 24 interacting clones, 11 of them coding for known proteins. Among the most strongly interacting protein partners of HCaRG we have uncovered are a number of transporter proteins that are normally expressed at the cytoplasmic membrane, for example, NKCC2 co-transporter protein (isoform F), 2 fragments of the Na,K-ATPase  $\beta_1$  subunit, the voltage-gated  $K^+$  channel  $\beta_{4.1}$  subunit, and the L-type neutral amino acid transporter.

Cell migration is based on highly-co-ordinated cytoskeletal remodelling, as well as the activity of ion channels and transporters (12; 17; 18; 28). Cytoplasmic calcium plays a pivotal role in these intracellular processes (22). HCaRG expression is under the control of calcium, and we have previously mapped the HCaRG gene to a locus responsible for kidney weight and the control of urinary  $Ca^{2+}$  excretion (13; 38).

We showed also that HCaRG interacted strongly with the C-terminal end of actin in yeast 2-hybrid screening and this interaction was further confirmed in vitro by pull-down assay. The analysis of the amino acid sequence of HCaRG showed the presence of putative actin-binding domains. Thus at the N-terminal end of HCaRG, between residues 50 to 88, there are 3 actin binding-like motifs. These domains are conserved between species (rat, mouse and human) and have been reported in the known actin binding proteins thymosine B4, caldesmon and profilin (45; 46; 50). The domain found in

caldesmon is overlapping with the one in profilin and the domain found in thymosin B4 is just upstream to these two overlapping sites. Furthermore, the secondary structure of HCaRG predicts an alpha helix upstream and within the putative region of the actin-binding domains. In general, alpha-helix structures serve as interface for interaction with other proteins. The alpha-helix in thymosin B4 is required for its binding to actin (44). While thymosin B4 and profilin are G-actin binding proteins, caldesmon is a F-actin binding protein. Our data showed that HCaRG binds to G-actin (Figure 2) but did not seem to bind to F-actin (not shown).

Interestingly, and in accordance with our previous findings that HCaRG increases renal cell migration via a TGF- $\alpha$  autocrine loop mechanism, the EGFR, which is a single-span transmembrane glycoprotein that is activated by TGF- $\alpha$  binding (30), has also been reported to bind actin and to associate directly with the cytoskeleton in vivo (33; 42).

Actin filaments are known to play a central role in cell migration (6; 34). They interact with a large variety of proteins that are important for their polymerization, dynamic turnover, and structural organization into a cross-linked network (40; 47). The increase in the motile behaviour of HCaRG-expressing cells is mediated by cell morphology changes, including lamellipodia presentation, in association with several features of actin remodeling (15). HCaRG belongs to the COMMD family of highly interacting proteins. These interactions have been shown to occur throughout the cells (7). We previously localized HCaRG in the nucleus of Cos cells (39) and here we show that HCaRG can co-localize with actin within the nucleus (upper panel of Figure 3) and at the leading edge of lamellipodia (Figure 3, three panels), and we propose that this interaction drives protrusion of the cell pole.

This role, together with the above-mentioned HCaRG interaction with several ion transporters, led us to explore their impact on cell migration. There is presently growing interest in the role of ion channels and transporters in cell migration (12; 17; 18; 28). They mediate salt and osmotically-obliged water uptake at the front of migrating cells, which contributes to lamellipodia extension (2; 21; 48). NKCC is the major ion transport system accomplishing electrolyte accumulation (37). The resulting enhanced  $\text{Na}^+$  entry must be paralleled by increased  $\text{Na}^+$  extrusion, which is accomplished by the Na,K-ATPase (51). Our study convincingly implicates HCaRG in alterations of ion fluxes in MDCK-C7 cells. HCaRG-overexpression heightened both baseline and maximal Na,K-ATPase and NKCC activities without changing their protein levels. This could be due to activation of the transporter itself by a phosphorylation-dependent mechanism, as increased NKCC1 phosphorylation was observed in HCaRG-expressing cells.

Since several protein partners of HCaRG are membrane transporters involved in cell ion homeostasis, we compared the concentrations of intracellular  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , and  $\text{H}_2\text{O}$  in stably-transfected HCaRG clones and control clones. While there was no difference in  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  intracellular concentrations between HCaRG cells and the controls, the HCaRG clones had significantly greater  $[\text{Na}^+]_i$  levels than control clones.

The parallel increase in  $\text{H}_2\text{O}$  is probably related to features of cellular hypertrophy, in keeping with our previous studies (11). The loss of nephrons during renal disease progression is paralleled by compensatory hypertrophy of the remaining nephrons (20; 43; 55), due, in large part, to an excess of intracellular osmolytes which increase cell volume. HCaRG could contribute to this phenomenon via its effect on intracellular electrolyte concentration, cell swelling and hypertrophy. Its further role in cellular

hypertrophy in view of increased  $[Na^+]_i$ , demonstrated in other pathologies such as hypertension and even heart failure requires further study (3; 49).

Na,K-ATPase and NKCC inhibition was found to disturb the migratory potential of different cell lines (4; 24; 31; 36; 52). Thus, the observed dose-dependent inhibition of migration of both HCaRG and Neo cells and the lower recovery of HCaRG-expressing cells seen after Na,K-ATPase or NKCC cotransporter inhibition, when compared to control cells, are clear indicators that the higher migration potential of HCaRG cells involved Na,K-ATPase and NKCC activation by HCaRG but the exact mechanisms of the interaction between HCaRG and transport proteins as well as with other proteins remain to be elucidated.

Evidence suggests that the function of ion channels and transporters is closely related to the actin cytoskeleton; they can be regulated by the state of actin filaments (14). Changes in their own activity in turn influence the actin cytoskeleton (19; 35). In addition, it has been shown that organization of the actin filament network by accessory proteins can also modulate the ability of cells to migrate (10; 53). Although HCaRG may interact with actin and the ion transporters, it is not clear that the proposed interactions has functional significance. However, it is conceivable that HCaRG plays a role in renal cell migration by setting the intracellular milieu that is required for optimal operation of the cytoskeletal migration machinery.

***ACKNOWLEDGEMENTS:*** We acknowledge the excellent technical help of Nathalie Bourcier and Suzanne Cossette and the editorial assistance of Ovid Da Silva, Research Support Office, Research Centre, CHUM.

**GRANTS:** This study is supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Grant MOP-3859 to Johanne Tremblay. Carlos El Hader is the recipient of a CIHR-Canadian Hypertension Society doctoral studentship.

## Reference List

1. **Ashworth SL, Wean SE, Campos SB, Temm-Grove CJ, Southgate EL, Vrhovski B, Gunning P, Weinberger RP and Molitoris BA.** Renal ischemia induces tropomyosin dissociation-destabilizing microvilli microfilaments. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F988-F996, 2004.
2. **Atilgan E, Wirtz D and Sun SX.** Morphology of the lamellipodium and organization of actin filaments at the leading edge of crawling cells. *Biophys J* 89: 3589-3602, 2005.
3. **Baartscheer A.** Chronic inhibition of na(+)/h(+)-exchanger in the heart. *Curr Vasc Pharmacol* 4: 23-29, 2006.
4. **Bereiter-Hahn J and Voth M.** Ionic control of locomotion and shape of epithelial cells: II. Role of monovalent cations. *Cell Motil Cytoskeleton* 10: 528-536, 1988.
5. **Biasio W, Chang T, McIntosh CJ and McDonald FJ.** Identification of Murr1 as a regulator of the human delta epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 279: 5429-5434, 2004.

6. **Burstein E, Ganesh L, Dick RD, van De SB, Wilkinson JC, Klomp LW, Wijmenga C, Brewer GJ, Nabel GJ and Duckett CS.** A novel role for XIAP in copper homeostasis through regulation of MURR1. *EMBO J* 23: 244-254, 2004.
7. **Burstein E, Hoberg JE, Wilkinson AS, Rumble JM, Csomos RA, Komarck CM, Maine GN, Wilkinson JC, Mayo MW and Duckett CS.** COMMD proteins, a novel family of structural and functional homologs of MURR1. *J Biol Chem* 280: 22222-22232, 2005.
8. **Bush KT, Keller SH and Nigam SK.** Genesis and reversal of the ischemic phenotype in epithelial cells. *J Clin Invest* 106: 621-626, 2000.
9. **Chen J, Liu X, Mandel LJ and Schnellmann RG.** Progressive disruption of the plasma membrane during renal proximal tubule cellular injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 171: 1-11, 2001.
10. **de Bie P, van De SB, Burstein E, Duran KJ, Berger R, Duckett CS, Wijmenga C and Klomp LW.** Characterization of COMMD protein-protein interactions in NF-kappaB signalling. *Biochem J* 398: 63-71, 2006.
11. **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* 284: F753-F762, 2003.

12. **Dreval V, Dieterich P, Stock C and Schwab A.** The role of Ca<sup>2+</sup> transport across the plasma membrane for cell migration. *Cell Physiol Biochem* 16: 119-126, 2005.
13. **Dumas P, Kren V, Krenová D, Pravenec M, Hamet P and Tremblay J.** Identification and chromosomal localization of ecogenetic components of electrolyte excretion. *J Hypertens* 20: 209-217, 2002.
14. **Ebner HL, Cordas A, Pafundo DE, Schwarzbaum PJ, Pelster B and Krumschnabel G.** Importance of cytoskeletal elements in volume regulatory responses of trout hepatocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R877-R890, 2005.
15. **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* 289: F1273-F1280, 2005.
16. **Fukuo K, Nakahashi T, Hata S, Morimoto S and Ogihara T.** Nitric oxide induces upregulation of Fas antigen and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 27: 823-826, 1996.
17. **Fulgenzi G, Graciotti L, Faronato M, Soldovieri MV, Miceli F, Amoroso S, Annunziato L, Procopio A and Taglialatela M.** Human neoplastic mesothelial

- cells express voltage-gated sodium channels involved in cell motility. *Int J Biochem Cell Biol* 2006.
18. **Granados-Gonzalez G, Mendoza-Lujambio I, Rodriguez E, Galindo BE, Beltran C and Darszon A.** Identification of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in sea urchin sperm. *FEBS Lett* 579: 6667-6672, 2005.
  19. **Hallows KR, Packman CH and Knauf PA.** Acute cell volume changes in anisotonic media affect F-actin content of HL-60 cells. *Am J Physiol* 261: C1154-C1161, 1991.
  20. **Kim NH.** Podocyte hypertrophy in diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 10 Suppl: S14-S16, 2005.
  21. **Klein M, Seeger P, Schuricht B, Alper SL and Schwab A.** Polarization of Na(+)/H(+) and Cl(-)/HCO<sub>3</sub>(-) exchangers in migrating renal epithelial cells. *J Gen Physiol* 115: 599-608, 2000.
  22. **Lee J, Ishihara A, Oxford G, Johnson B and Jacobson K.** Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature* 400: 382-386, 1999.
  23. **Lytle C and Forbush BI.** The Na-K-Cl cotransport protein of shark rectal gland. II. Regulation by direct phosphorylation. *J Biol Chem* 267: 25438-25443, 1992.

24. **McDaniel N and Lytle C.** Parietal cells express high levels of Na-K-2Cl cotransporter on migrating into the gastric gland neck. *Am J Physiol* 276: G1273-G1278, 1999.
25. **Mene P, Polci R and Festuccia F.** [Mechanisms of repair after renal injury]. *G Ital Nefrol* 20: 229-237, 2003.
26. **Molitoris BA.** Actin cytoskeleton in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 66: 871-883, 2004.
27. **Morigi M, Buelli S, Angioletti S, Zanchi C, Longaretti L, Zoja C, Galbusera M, Gastoldi S, Mundel P, Remuzzi G and Benigni A.** In response to protein load podocytes reorganize cytoskeleton and modulate endothelin-1 gene: implication for permselective dysfunction of chronic nephropathies. *Am J Pathol* 166: 1309-1320, 2005.
28. **O'Grady SM and Lee SY.** Molecular diversity and function of voltage-gated (Kv) potassium channels in epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 1578-1594, 2005.
29. **Orlov SN, Tremblay J and Hamet P.** Cell volume in vascular smooth muscle cells is regulated by bumetanide-sensitive ion transport. *Am J Physiol* 270: C1388-C1397, 1996.

30. **Pino MS, Shrader M, Baker CH, Cognetti F, Xiong HQ, Abbruzzese JL and McConkey DJ.** Transforming growth factor alpha expression drives constitutive epidermal growth factor receptor pathway activation and sensitivity to gefitinib (Iressa) in human pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res* 66: 3802-3812, 2006.
31. **Rajasekaran SA, Barwe SP and Rajasekaran AK.** Multiple functions of Na,K-ATPase in epithelial cells. *Semin Nephrol* 25: 328-334, 2005.
32. **Remuzzi G, Benigni A and Remuzzi A.** Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 116: 288-296, 2006.
33. **Rijken PJ, Hage WJ, van Bergen en Henegouwen PM, Verkleij AJ and Boonstra J.** Epidermal growth factor induces rapid reorganization of the actin microfilament system in human A431 cells. *J Cell Sci* 100 ( Pt 3): 491-499, 1991.
34. **Roger L, Gadea G and Roux P.** Control of cell migration: a tumour suppressor function for p53? *Biol Cell* 98: 141-152, 2006.
35. **Schwab A, Schuricht B, Seeger P, Reinhardt J and Dartsch PC.** Migration of transformed renal epithelial cells is regulated by K<sup>+</sup> channel modulation of actin cytoskeleton and cell volume. *Pflugers Arch* 438: 330-337, 1999.

36. **Schwab A, Wojnowski L, Gabriel K and Oberleithner H.** Oscillating activity of a Ca(2+)-sensitive K<sup>+</sup> channel. A prerequisite for migration of transformed Madin-Darby canine kidney focus cells. *J Clin Invest* 93: 1631-1636, 1994.
37. **Shen MR, Chou CY; Hsu KF and Ellory JC.** Osmotic shrinkage of human cervical cancer cells induces an extracellular Cl<sup>-</sup>-dependent nonselective cation channel, which requires p38 MAPK. *J Biol Chem* 277: 45776-45784, 2002.
38. **Solban N, Dumas P, Gossard F, Sun Y, Pravenec M, Kren V, Lewanczuk R, Hamet P and Tremblay J.** Chromosomal mapping of HCaRG, a novel hypertension-related, calcium-regulated gene. *Folia Biol* 48: 7-12, 2002.
39. **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* 275: 32234-32243, 2000.
40. **Su JL, Yang CY, Shih JY, Wei LH, Hsieh CY, Jeng YM, Wang MY, Yang PC and Kuo ML.** Knockdown of contactin-1 expression suppresses invasion and metastasis of lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 66: 2553-2561, 2006.
41. **Takeyasu K, Tamkun MM, Renaud KJ and Fambrough DM.** Ouabain-sensitive (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase activity expressed in mouse L cells by transfection

- with DNA encoding the alpha-subunit of an avian sodium pump. *J Biol Chem* 263: 4347-4354, 1988.
42. **Tang J and Gross DJ.** Regulated EGF receptor binding to F-actin modulates receptor phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 312: 930-936, 2003.
  43. **Thomas MC, Burns WC and Cooper ME.** Tubular changes in early diabetic nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis* 12: 177-186, 2005.
  44. **Van Troys M, Dewitte D, Goethals M, Carlier MF, Vandekerckhove J and Ampe C.** The actin binding site of thymosin beta 4 mapped by mutational analysis. *EMBO J* 15: 201-210, 1996.
  45. **Vancompernelle K, Goethals M, Huet C, Louvard D and Vandekerckhove J.** G- to F-actin modulation by a single amino acid substitution in the actin binding site of actobindin and thymosin beta 4. *EMBO J* 11: 4739-4746, 1992.
  46. **Vandekerckhove JS, Kaiser DA and Pollard TD.** Acanthamoeba actin and profilin can be cross-linked between glutamic acid 364 of actin and lysine 115 of profilin. *J Cell Biol* 109: 619-626, 1989.
  47. **Vavylonis D, Kovar DR, O'shaughnessy B and Pollard TD.** Model of formin-associated actin filament elongation. *Mol Cell* 21: 455-466, 2006.

48. **Verkman AS.** More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci* 118: 3225-3232, 2005.
49. **Vokurkova M, Novakova O, Dobesova Z, Kunes J and Zicha J.** Relationships between membrane lipids and ion transport in red blood cells of Dahl rats. *Life Sci* 77: 1452-1464, 2005.
50. **Wang CL, Wang LW, Xu SA, Lu RC, Saavedra-Alanis V and Bryan J.** Localization of the calmodulin- and the actin-binding sites of caldesmon. *J Biol Chem* 266: 9166-9172, 1991.
51. **Warntges S, Grone HJ, Capasso G and Lang F.** Cell volume regulatory mechanisms in progression of renal disease. *J Nephrol* 14: 319-326, 2001.
52. **Woo AL, James PF and Lingrel JB.** Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 275: 20693-20699, 2000.
53. **Yu D, Zhang P and Zhan X.** Cortactin mediated morphogenic cell movements during zebrafish (*Danio rerio*) gastrulation. *Sci China C Life Sci* 48: 601-607, 2005.
54. **Zhuang S, Dang Y and Schnellmann RG.** Requirement of the epidermal growth factor receptor in renal epithelial cell proliferation and migration. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F365-F372, 2004.

55. **Zoja C, Morigi M and Remuzzi G.** Proteinuria and phenotypic change of proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 14 Suppl 1: S36-S41, 2003.

**Table 1. Yeast 2-hybrid screening: HCaRG interacts with 11 known proteins.**

Screening of a normal human cDNA library, using HCaRG as bait, identified 12 clones that interacted with HCaRG coding for proteins whose function was known. Eleven of these were unique. The table presents a classification in decreasing order of the strength of the interactions, which were determined by  $\beta$ -gal measurement (except for COMMD8 for which it was not determined). The accession number, the length of the fragments in the clones and the amino acids at their extremities are indicated.

Clone	Gene name	Accession	Length of fragment in a.a	(a.a from-to)/total	Characteristic
6	NKCC2	NM_000338	1099	(1-1099)/1099	Full length
18	Nuclear transcription factor Y $\gamma$	BC005003	240	(1-240)/336	N-terminal end
8	Voltage-gated K channel $\beta$	AF262975	142	(1-142)/142	Full length
5	Chaperonin containing TCP1, subunit 5	NM_012073	111	(422-533)/533	C-terminal end
7	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting $\beta$	BC000006	89	(214-303)/303	C-terminal end
23	idem	idem	134	(189-303)/303	C-terminal end
25	Putative L-type neutral a.a transporter	NM_001042 386	215	(446-661)/661	C-terminal end
28	Actin- $\beta$	XM_037239	124	(251-375)/375	C-terminal end
14	Appolon/Bruce	XM_029483	ND	ND	ND
15	DAZ associated protein 2	BC007900	169	(1-168)/168	Full length
32	Prosaposin	NM_001042 466	86	(441-526)/526	C-terminal end
1	COMMD8	BC008371	172	(5-183)/183	Near full length

**Table 2.** Intracellular  $K^+$ ,  $Na^+$  and  $Cl^-$  (nmol per mg of protein) content in transfected MDCK-C7, Neo3 and HCaRG15 cells. The cells were incubated with radioisotopes +/- ouabain and bumetanide for 6 hours in DMEM. Means  $\pm$  S.E.M. from experiments performed in quadruplicate are shown. \*\*\*  $p < 0.001$ , compared to Neo3 cells. (N.D.: not determined)

Additions, $\mu$ M	Neo3			HCaRG15		
	$K^+$	$Na^+$	$Cl^-$	$K^+$	$Na^+$	$Cl^-$
None (control)	1797 $\pm$ 22	77 $\pm$ 8	59 $\pm$ 4	1858 $\pm$ 36	151 $\pm$ 5***	56 $\pm$ 5
Ouabain, 100	98 $\pm$ 5	2082 $\pm$ 3	N.D.	65 $\pm$ 3	1996 $\pm$ 48	N.D.
Bumetanide, 10	2071 $\pm$ 26	59 $\pm$ 4	56 $\pm$ 8	2088 $\pm$ 54	90 $\pm$ 20	58 $\pm$ 12

**Table 3.** Intracellular Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> concentrations in transfected HEK293, Neo1 and Neo6 (controls) and in HCaRG clone 8 and HCaRG clone 9 and incubated with isotopes for 6 hours. The results are means ± S.E.M. from experiments performed in quadruplicate. \*\* p< 0.005, compared to Neo1 and Neo6 cells.

	<b>Neo1</b>	<b>Neo6</b>	<b>HCaRG8</b>	<b>HCaRG9</b>
<b>Intracellular Na<sup>+</sup> concentration, mM</b>	35.8±0.7	39.7±2.4	60.8±8.0**	57.3±4.0**
<b>Intracellular K<sup>+</sup> concentration, mM</b>	140.2±5.0	151.1±12.3	131.1±5.1	158.6±4.6

**Table 4.** Protein and water differences between Neo clone 1 and Neo clone 6 (controls) and HCaRG clone 8 and HCaRG clone 9. The results are the mean  $\pm$  S.E.M. from experiments performed in quadruplicate. \*\*  $p < 0.005$ , compared to Neo1 and Neo6 cells.

	<b>Neo1</b>	<b>Neo6</b>	<b>HCaRG8</b>	<b>HCaRG9</b>
<b>Intracellular water (pl per cell)</b>	1.2 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.04**	2.2 $\pm$ 0.04**
<b>Protein content (pg per cell)</b>	189 $\pm$ 28	213 $\pm$ 22	358 $\pm$ 44**	389 $\pm$ 59**
<b>Intracellular water (nl per <math>\mu</math>g protein)</b>	6.3 $\pm$ 0.4	6.0 $\pm$ 0.3	6.4 $\pm$ 0.1	5.7 $\pm$ 0.1

**Figure legends:**

**Figure 1: Confirmation of some protein interactions.** We confirmed some interacting clones by transcription/translation *in vitro*. The resulting peptides, which also expressed the HA epitope, were submitted to pull-down assay with GST-HCaRG (H) or with GST (C) alone, then run on SDS-PAGE, transferred onto a membrane and incubated with anti-HA antibody (see Methods). We detected a band only after incubation with GST-HCaRG, thereby confirming the interaction between HCaRG and certain clones, such as 2 different fragments of the Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>/ATPase  $\beta_1$  subunit (**A**, **B**), the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,Cl<sup>-</sup> co-transporter (NKCC2) (**C**), the voltage-gated K<sup>+</sup> channel  $\beta$ -subunit (**D**),  $\beta$ -actin (**E**), and the L-type neutral amino acid transporter (**F**).

**Figure 2: Confirmation of HCaRG-protein interactions by pull-down assays and co-immunoprecipitation.** (A) 150  $\mu$ g of GST or GST-HCaRG were incubated with 0, 5 or 20  $\mu$ g of G-actin for 2 hours at room temperature. Retained proteins were run on SDS-PAGE, transferred onto a membrane and blotted with 0.6  $\mu$ g/ml actin antibody (Sigma), washed with PBS, then incubated with anti-rabbit conjugated HRP secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology). (B) Pull-down was also performed with whole cell extracts of HEK293 endogenously expressing HCaRG. The band corresponds to endogenous actin. (C) Reciprocal co-immunoprecipitations were performed as described in Methods. None indicates without antibody in the immunoprecipiation (IP) incubation, immunoblots (IB) were performed with anti-HCaRG antibody in the first two gels and with anti-Na,K-ATPase $\beta_1$  antibody in the gel shown in the right panel.

**Figure 3: Co-localization of HCaRG and actin in lamellipodia.** HEK293 cells were transfected with 1.5  $\mu$ g of GFP-HCaRG (green) plasmid using FuGENE6 (Roche) reagent, then stained with phalloidin-Texas red and DAPI to visualize actin (red) and the nucleus (blue), respectively. One-cell images from all fluorescent channels were superimposed, and co-localization (merged images) appears in yellow (green and red).

**Figure 4: Rate of  $^{86}\text{Rb}$  influx in Neo3 and HCaRG15 MDCK-C7 cells.**  $^{86}\text{Rb}$  influx was first measured without any treatment and served to determine ouabain-sensitive (Na,K-ATPase), bumetanide-sensitive (NKCC) and remaining ouabain+bumetanide-resistant influxes. The means  $\pm$  S.E.M. from a representative experiment performed in quadruplicate are shown. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*  $p < 0.05$ , compared to Neo3 cells.

**Figure 5: Baseline and maximal activity of Na,K-ATPase (A), and NKCC (B), in Neo3 and HCaRG15 cells.** Baseline values of Na,K-ATPase and NKCC in Neo3 cells were taken as 100%. Means  $\pm$  S.E.M. from 5 independent experiments performed in quadruplicate are shown. \*  $p < 0.05$ , compared to Neo3 cells. (C) Equal amounts of proteins were loaded onto acrylamide gel, blotted against anti-NKCC1 antibody (top panel) and anti-phospho-NKCC1-R5 (bottom panel).

**Figure 6: Wound-healing assay.** The capacity of HEK293 cells to migrate to the wound was determined by measuring wound closure at  $t=0$  and 24 hours after treatment with different doses of ouabain (A) or bumetanide (B). The data are expressed as the means  $\pm$

S.E.M. of 3 experiments as described by El Hader et al. (2005). \*\*\*  $p < 0.001$ , compared to Neo1 cells.

**Figure 7: Recovery assay.** After 1 day of treatment with 3  $\mu\text{M}$  ouabain (A) or 10  $\mu\text{M}$  bumetanide (B), the medium was removed and replaced by fresh drug-free medium. The cells were allowed to migrate for another 24 hours, and migration was measured as indicated above. The data are expressed as the means  $\pm$  S.E.M. of 3 experiments. \*\*  $p < 0.005$ , compared to Neo1 cells.

Figure 1

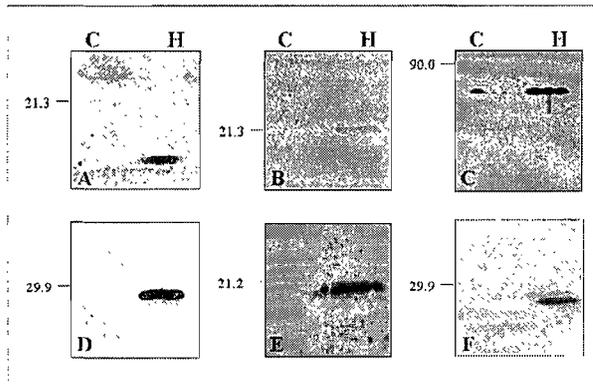


Figure 2A

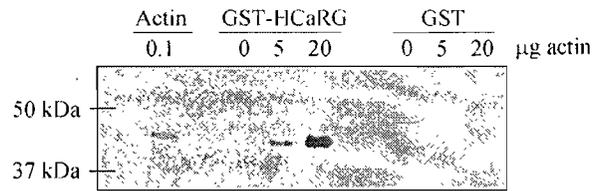


Figure 2B



Figure 2C

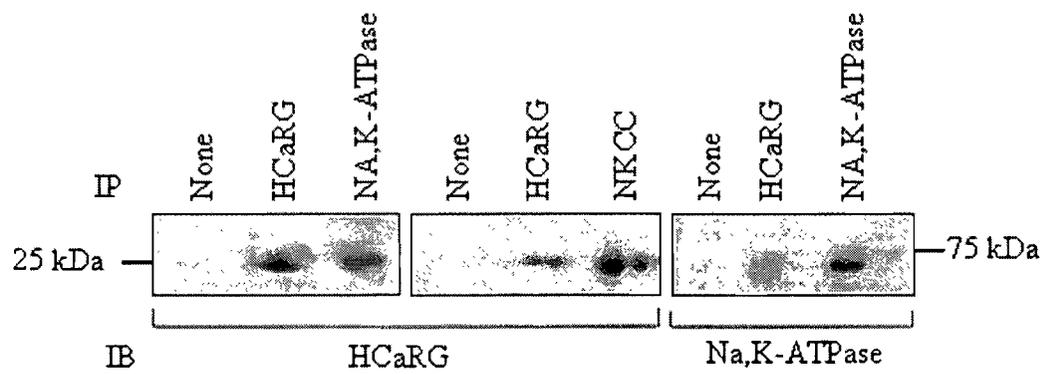


Figure 3

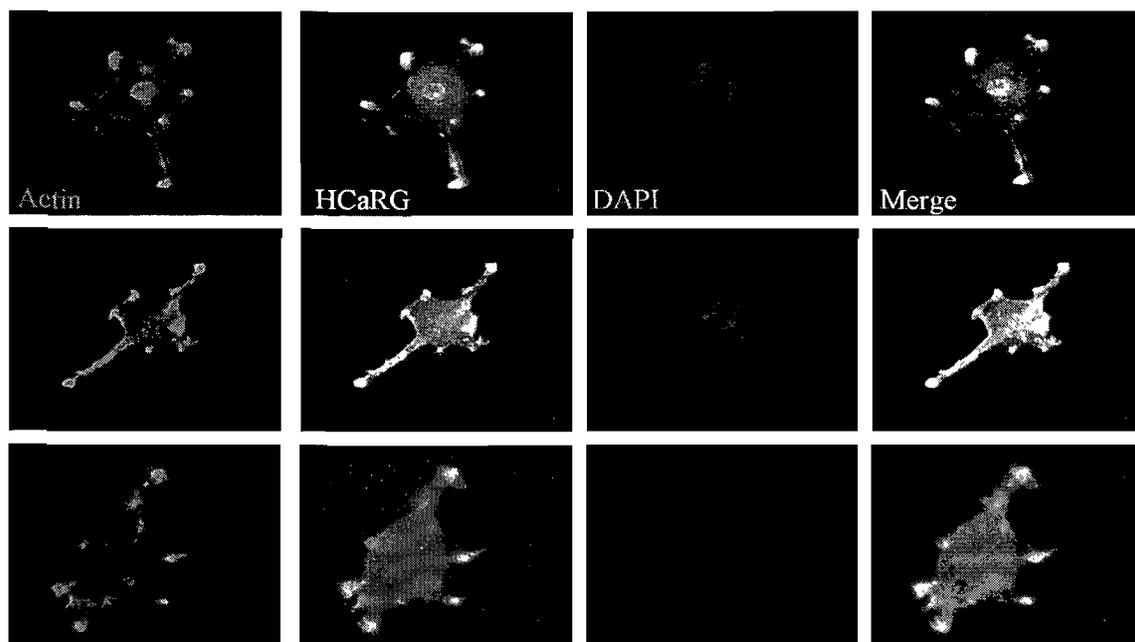


Figure 4

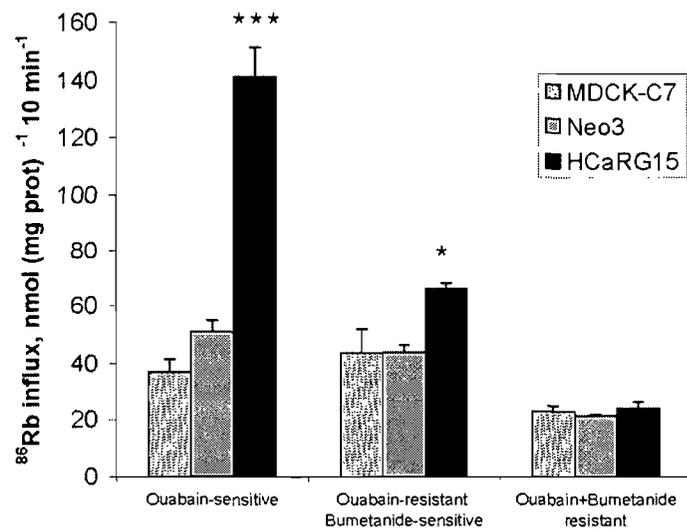


Figure 5A

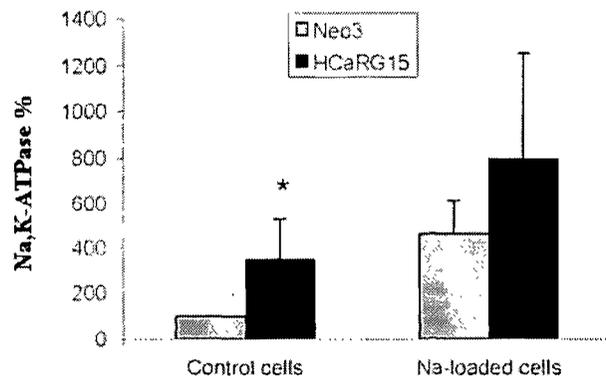


Figure 5B

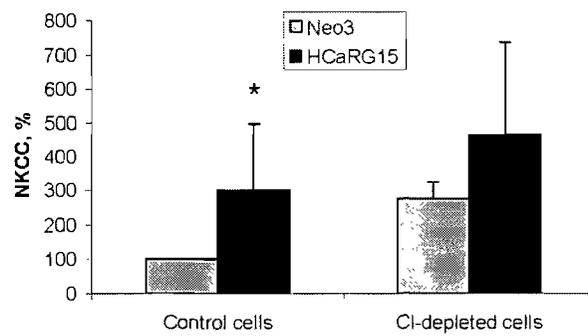


Figure 5C

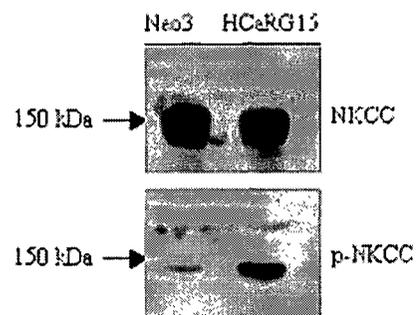


Figure 6A

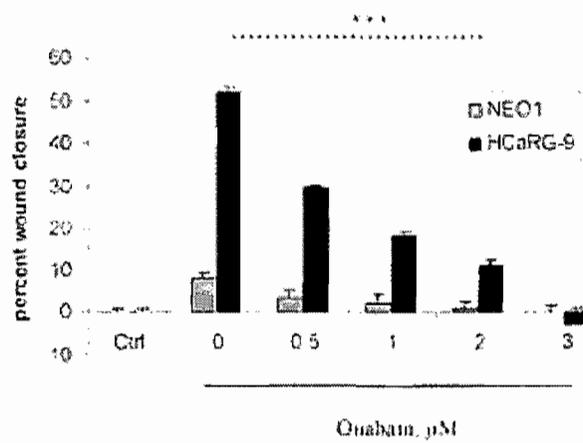


Figure 6B

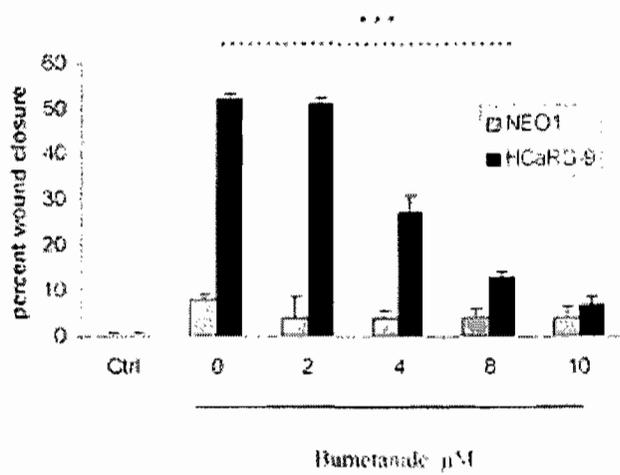


Figure 7A

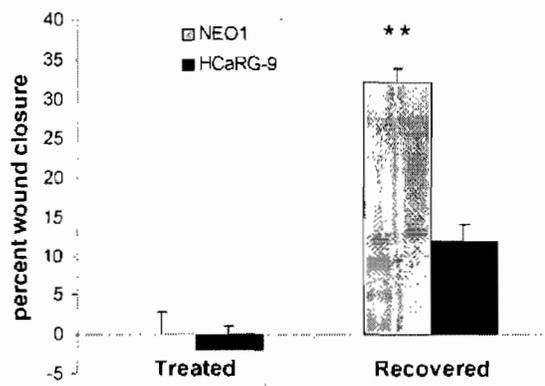


Figure 7B

