

Des microARN contrôlent la fabrication de cils vibratiles chez les vertébrés

Benoît Chevalier, Laurent Kodjabachian, Christelle Coraux, Pascal Barbry, Brice Marcet

Cellules multiciliées, un rôle-clé dans de multiples fonctions tissulaires

Les cellules multiciliées bordant la surface de certains tissus sont présentes chez tous les vertébrés et possèdent à leur surface des centaines de cils vibratiles, organites constitués de microtubules (Figure 1). Le battement coordonné des cils vibratiles permet un mouvement liquidien efficace, qui joue un rôle important dans divers processus physiologiques comme l'évacuation par l'appareil respiratoire des particules inhalées piégées dans le mucus (clairance mucociliaire), la circulation du liquide céphalo-rachidien ou la migration de l'embryon dans le tractus génital [1, 2]. Les dyskinesies ciliaires, la mucoviscidose, l'asthme, les broncho-pneumopathies chroniques obstructives ou encore l'hydrocéphalie sont autant de maladies où un dysfonctionnement primaire ou secondaire des cils vibratiles peut contribuer à l'aggravation de symptômes respiratoires, cérébraux, ou reproductifs [1, 2]. L'élucidation des mécanismes gouvernant la synthèse de ces cils vibratiles apparaît ainsi comme une question fondamentale de biologie avec des implications biomédicales évidentes.

La fabrication des cils vibratiles (multiciliogenèse) intervient au cours du développement et lors de la régénération de certains épithéliums spécialisés, notamment mucociliaires. La multiciliogenèse nécessite : (1) la sortie du cycle cellulaire ; (2) la production

de centaines de corps basaux grâce à la multiplication massive de centrioles (centriologénèse) ; (3) la migration et l'ancrage des corps basaux à la surface apicale où ils jouent le rôle de centre organisateur des microtubules, à la base de chaque cil [3]. Quels sont les mécanismes contrôlant l'élaboration de multiples cils vibratiles dans une même cellule ? Afin de répondre à cette question, nous nous sommes intéressés à deux exemples d'épithélium mucociliaire : le premier borde les voies aériennes des mammifères ; le second correspond à l'épiderme d'embryons d'amphibiens. Tous deux disposent à la fois de cellules sécrétrices de mucus et de cellules multiciliées [4-6] (Figure 1A et 1B). Nous avons entrepris une étude comparative systématique de la multiciliogenèse dans l'épithélium bronchique humain et dans l'épiderme d'embryon de xénope (*Xenopus laevis*) afin d'identifier les microARN et leurs gènes cibles potentiellement impliqués dans la mise en place de la multiciliogenèse.

Les microARN (miARN ou miR) appartiennent à une classe de petits ARN simple brin non codants régulateurs, contrôlant de nombreux processus biologiques en réprimant l'expression génique par différents mécanismes post-transcriptionnels [7]. Chaque miARN est capable de cibler un ou plusieurs ARN messagers (ARNm) par le jeu d'appariements avec une ou plusieurs séquences généralement localisées dans la région 3' non traduite des cibles. La découverte des

B. Chevalier, P. Barbry, B. Marcet : CNRS, Institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire, UMR-6097, Sophia-Antipolis ; Université de Nice-Sophia-Antipolis, Sophia-Antipolis, F06560, France.

L. Kodjabachian : CNRS, Institut de biologie du développement de Marseille-Luminy, UMR-6216 ; Université de la Méditerranée, Marseille, F13288, France.

C. Coraux : Inserm U903, Reims, F51092, France ; Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, F51100, France.

barbry@ipmc.cnrs.fr

marcet@ipmc.cnrs.fr

miARN a fourni un nouveau paradigme associant répression de gènes-clés et destin cellulaire. Des miARN ont ainsi été impliqués dans la morphogénèse pulmonaire ou dans certaines pathologies respiratoires [7-10]. Nous avons récemment démontré le premier lien fonctionnel, conservé des amphibiens à l'homme, entre une famille de miARN et la multiciliogenèse [11].

Expression de la famille miR-449 pendant la multiciliogenèse

Nous avons établi par séquençage à haut débit les signatures des miARN au cours de la différenciation mucociliaire de l'épithélium bronchique humain et de l'épiderme embryonnaire de xénope. La famille miR-449 (miR-449a, miR-449b et miR-449c) représente les miARN les plus fortement induits pendant la multiciliogenèse chez les deux espèces. Par différentes approches combinant hybridation *in situ*, immunohistochimie, tri cellulaire et séquençage, nous avons pu établir la spécificité d'expression des miR-449 dans les cellules multiciliées dans nos deux modèles [11] (Figure 1). Une analyse de syntenie du gène hôte *Cdc20b* du cluster miR-449 révèle la conservation du locus dans tous les génomes de vertébrés examinés. Bien que la fonction de CDC20B demeure inconnue, nous avons montré la corégulation de CDC20B et de miR-449 pendant la multiciliogenèse,



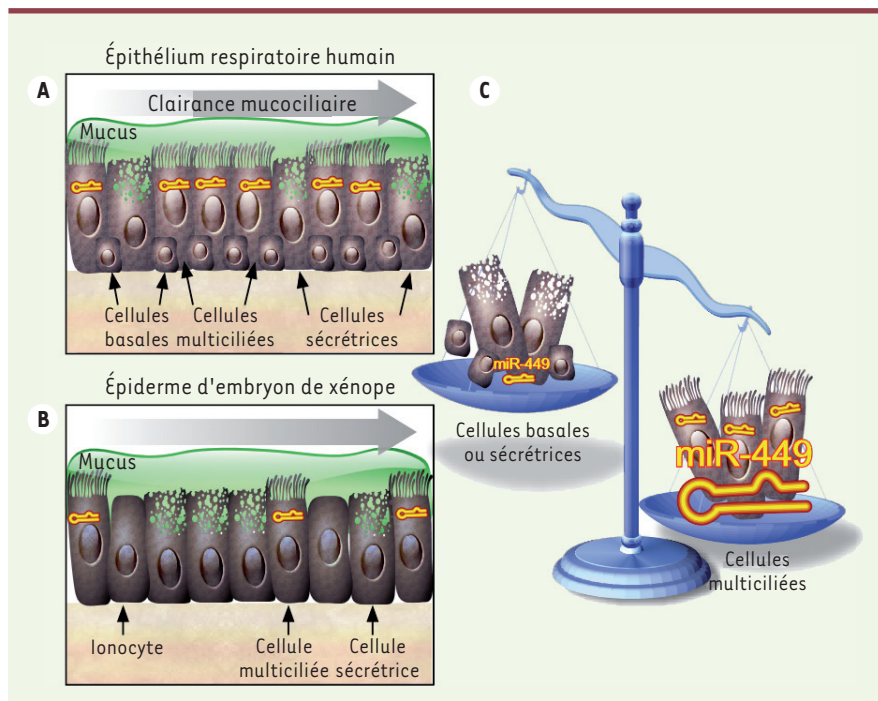


Figure 1. Expression spécifique de miR-449 dans les cellules multiciliées. Les épithéliums mucociliaires tels que l'épithélium bronchique humain (A) ou l'épiderme embryonnaire de xénope (B) sont constitués de cellules sécrétrices de mucus et de cellules multiciliées. L'épithélium bronchique contient également des cellules basales qui pourraient servir de réservoir pour la réparation. L'épiderme du xénope contient également des cellules spécialisées dans le transport d'ions, appelées ionocytes. C. Les membres de la famille miR-449 sont fortement enrichis dans les cellules multiciliées tandis que leur niveau d'expression n'est quasiment pas détectable dans les autres types cellulaires.

suggérant une possible synergie entre le miARN et son gène hôte.

Chez les deux espèces, l'inactivation spécifique de miR-449 (à l'aide d'oligonucléotides antisens) réprime fortement la multiciliogenèse, causant la réduction concomitante du nombre de cellules exprimant la tubuline (un marqueur des cils vibratiles) et la centrine-2 (un marqueur des corps basaux). Malgré leur différenciation avortée, les cellules déficientes pour miR-449 maintiennent leur identité de précurseurs ciliés et continuent d'exprimer l'ARNm *foxJ1*, qui code pour un régulateur-clé de la multiciliogenèse chez les vertébrés [3] (Figure 2). Précisons que l'inactivation de miR-449 n'altère pas la ciliogenèse des cellules portant un cil vibratile unique, suggérant une action spécifique de miR-449 sur la multiciliogenèse. Ces résultats suggèrent que les miR-449 sont requis pour le déclenchement de la multiciliogenèse à une étape précoce, avant la centriogenèse [11].

miR-449 réprime le cycle cellulaire et la voie Notch/Delta1

En analysant le transcriptome au cours de la différenciation ou en réponse à la

surexpression de miR-449, nous avons identifié des cibles potentielles de miR-449. Un premier groupe de cibles, validées expérimentalement, code pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (amphiréguline, cycline B1, cycline E2 et Cdc25A). Ces résultats sont en accord avec la capacité de miR-449 à bloquer le cycle cellulaire, une étape cruciale avant l'engagement dans la centriogenèse [11].

Le second groupe de cibles validées dans les deux espèces correspond au récepteur Notch1 et à son ligand Delta-1 (DLL1). Dans nos deux modèles, l'activation de la voie de signalisation Notch est incompatible avec la différenciation des cellules multiciliées. Les régions des transcrits *Dll1* et *Notch1* contenant les sites de fixation de miR-449 sont conservées de la grenouille à l'homme. Chez l'homme, les miARN de la famille miR-449 répriment l'expression à la fois de *Dll1* et de *Notch1* tandis qu'ils inhibent seulement l'expression de *Dll1* chez le xénope. Plusieurs expériences indiquent que, dans nos deux modèles, les miR-449 contrôlent la multiciliogenèse en agissant directement sur la voie de signalisation Notch : (1) l'expression des transcrits et des protéi-

nes *Dll1* et/ou *Notch1* est réprimée par la surexpression de miR-449 tandis que l'effet opposé est observé après son inactivation ; (2) *Dll1* et/ou *Notch1* sont faiblement exprimés dans les cellules multiciliées qui expriment fortement miR-449 par rapport aux cellules environnantes dans l'épithélium mucociliaire humain ; (3) l'injection dans l'épiderme de xénope d'un ARNm *Dll1* synthétique dépourvu des sites de fixation de miR-449 réprime la multiciliogenèse, tout comme le fait la perte de miR-449 ; (4) des oligonucléotides complémentaires des sites de liaison conservés de miR-449 dans les transcrits *Notch1* ou *Dll1* protègent ces transcrits contre l'action de miR-449. Ces oligonucléotides protecteurs provoquent l'élévation des transcrits et des protéines endogènes *Notch1* et/ou *Dll1* et répriment la multiciliogenèse. Les effets de l'inactivation de miR-449 sur la multiciliogenèse sont ainsi mimés par des agents bloquant l'interaction entre miR-449 et ses cibles de la voie Notch ; (5) enfin, l'inactivation de *Dll1* ou *Notch1* augmente la multiciliogenèse et la rétablit de manière efficace dans les embryons de xénope invalidés pour miR-449. L'ensemble de ces données indiquent que

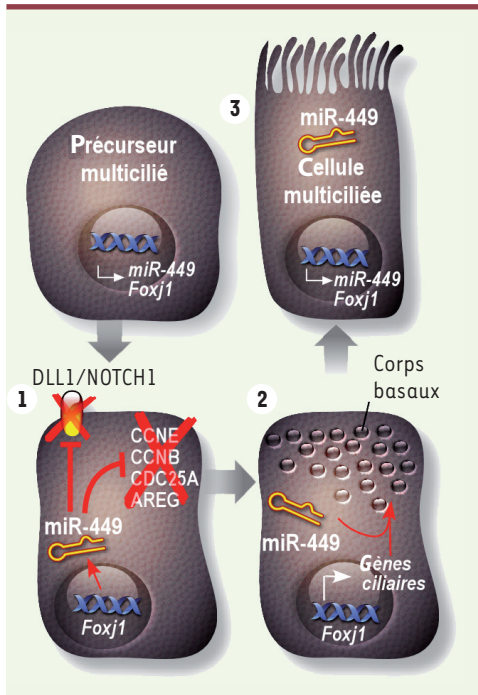


Figure 2. Modèle illustrant le rôle de miR-449 au cours de la multiciliogenèse. La multiciliogenèse est initiée par l'acquisition de l'identité ciliaire. Dans les progéniteurs de cellules multiciliées, l'expression de miR-449 et du facteur de transcription FOXJ1 est induite. L'expression de miR-449 permet de bloquer le cycle cellulaire et l'expression de DLL1 et/ou Notch1 ce qui entraîne l'entrée dans le processus de différenciation (phase 1). Dans la phase 2, l'expression de miR-449 favorise la multiplication massive des corps basaux. L'expression conjointe de miR-449 et FOXJ1 participe ensuite à la migration et l'ancrage de ces corps basaux néosynthétisés à la surface apicale. FOXJ1 induit l'expression des gènes nécessaires à l'assemblage de l'axonème et à l'élongation des cils vibratiles (phase 3). L'expression de miR-449 reste élevée dans les cellules multiciliées suggérant un rôle probable dans le maintien de ce phénotype.

les miR-449 déclenchent le processus de multiciliogenèse en réprimant directement les cibles DLL1 et Notch1.

À la recherche des effecteurs-clés de la multiciliogenèse

En conclusion, notre étude révèle pour la première fois le rôle joué par les miARN de la famille miR-449 en tant que régulateurs-clés et conservés de la multiciliogenèse chez les vertébrés. La famille miR-449 favorise la centriogenèse et contribue à la différenciation des cellules multiciliées en réprimant directement la voie de signalisation Notch et des molécules liées au cycle cellulaire (Figure 2) [11]. En ce sens, ces miARN peuvent apparaître comme des chefs d'orchestre modulant simultanément plusieurs voies de signalisation importantes afin de promouvoir le phénotype multicilié. La poursuite de la recherche des cibles de

miR-449 et de la voie Notch devrait identifier les effecteurs-clés de la multiciliogenèse, qui restent très largement méconnus. Un autre candidat particulièrement intéressant est CDC20B puisque cette protéine paraît être un nouveau composant des corps basaux coexprimé avec miR-449 [11].

Gageons qu'en fournissant de nouvelles connaissances sur les mécanismes conservés contrôlant la multiciliogenèse, notre étude pourrait également ouvrir la voie à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à traiter les pathologies associées à des défauts de cils vibratiles. Le succès de notre étude comparative chez deux tétrapodes distants illustre enfin la pertinence de l'adage selon lequel « rien en biologie n'a de sens qu'à la lumière de l'évolution ». ♦

MicroRNA control biosynthesis of motile cilia in vertebrates

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Chilvers MA, O'Callaghan C. Local mucociliary defence mechanisms. *Paediatr Respir Rev* 2000 ; 1 : 27-34.

2. Fliegauf M, Benzing T, Omran H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 ; 8 : 880-93.
3. Vlodav E, Stearns T. Molecular characterization of centriole assembly in ciliated epithelial cells. *J Cell Biol* 2007 ; 178 : 31-42.
4. Coraux C, Roux J, Jolly T, et al. Epithelial cell-extracellular matrix interactions and stem cells in airway epithelial regeneration. *Proc Am Thorac Soc* 2008 ; 5 : 689-94.
5. Hajj R, Baranek T, Le Naour R, et al. Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transit-amplifying cell properties. *Stem Cells* 2007 ; 25 : 139-48.
6. Hayes JM, Kim SK, Abitua PB, et al. Identification of novel ciliogenesis factors using a new *in vivo* model for mucociliary epithelial development. *Dev Biol* 2007 ; 312 : 115-30.
7. Giovannini-Chami L, Grandvaux N, Zaragosi LE, et al. Impact of MicroRNA in normal and pathological respiratory epithelia. *Methods Mol Biol* 2011 ; 741 : 171-91.
8. Bhattacharya S, Balakathiresan NS, Dalgard C, et al. Elevated miR-155 promotes inflammation in cystic fibrosis by driving hyper-expression of interleukin-8. *J Biol Chem* 2011 ; 286 : 11604-11.
9. Harris KS, Zhang Z, McManus MT, et al. Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 2208-13.
10. Oglesby IK, Bray IM, Chotirmall SH, et al. miR-126 is downregulated in cystic fibrosis airway epithelial cells and regulates TOM1 expression. *J Immunol* 2010 ; 184 : 1702-9.
11. Marcet B, Chevalier B, Luxardi G, et al. Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat Cell Biol* 2011 ; 13 : 694-701.

TIRÉS À PART

P. Barbry et B. Marcet



Tarifs d'abonnement m/s - 2011

**Abonnez-vous
à médecine/sciences**

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès
des sciences biologiques et médicales

**Bulletin d'abonnement
page 674 dans ce numéro de m/s**

