

La protéine SCRIB contrôle la contractilité apicale pendant la différenciation épithéliale

Batiste Boëda

Unité Polarité cellulaire, migration et cancer,
Université Paris Cité, CNRS UMR3691,
Institut Pasteur, Paris, France
boeda@pasteur.fr

La protéine SCRIB et la polarité cellulaire

Les organismes pluricellulaires sont composés de nombreuses cellules asymétriques présentant des pôles morphologiquement et fonctionnellement distincts. Par exemple, les cellules de l'épithélium digestif ont un pôle apical orienté vers la lumière intestinale et impliqué dans l'absorption des nutriments, et un pôle basal dont le rôle est de transmettre ces nutriments à la circulation sanguine. Le concept de polarité cellulaire apico-basale englobe l'ensemble des facteurs impliqués dans l'équilibre dynamique entre ces deux pôles. Les cellules épithéliales peuvent également s'arranger les unes par rapport aux autres suivant un ordre contraint, comme par exemple les cellules sensorielles de l'oreille interne, qui ont à leur surface apicale une touffe ciliaire dont l'orientation est identique. Le concept de polarité planaire englobe les facteurs impliqués dans l'organisation coordonnée des cellules dans le plan de l'épithélium.

De nombreuses protéines participent au contrôle de la polarité cellulaire, dont la protéine Scribble, qui opère au carrefour des polarités apico-basale et planaire. Chez la mouche drosophile, les mutations supprimant Scribble induisent une croissance anarchique et une désorganisation des tissus épithéliaux, qui perdent totalement leur polarité apico-basale au cours du développement, ce qui entraîne la mort de l'animal au stade larvaire [1]. Étonnamment, la perte de la protéine SCRIB, homologue de Scribble chez

les vertébrés, n'est pas suffisante pour induire des défauts majeurs de polarité apico-basale dans les épithéliums chez la souris, mais induit plutôt une anomalie de polarité planaire (désorganisation des touffes ciliaires des cellules sensorielles de l'oreille interne) [2]. Les souris mutantes dépourvues de SCRIB présentent également un défaut sévère de formation du tube neural lié à un défaut de polarité planaire, entraînant un décès précoce au cours du développement embryonnaire [2]. Chez l'homme, des mutations de *SCRIB* ont été impliquées dans des malformations du tube neural, telles que *spina bifida* [3].

La protéine SCRIB possède des similarités de séquence avec deux autres protéines : Lano (*LAP and no PDZ*) et ERBIN (*ERBB2-interacting protein*). Chez la souris, seule la suppression de ces trois protéines entraîne des défauts de polarité apico-basale dans les épithéliums [4], ce qui suggère que SCRIB joue un rôle redondant dans cette polarité chez les mammifères. Le mécanisme moléculaire par lequel la protéine SCRIB exerce son action polarisante au sein des épithéliums est complexe car SCRIB peut se lier à plus de cinquante protéines différentes. Cependant, l'activation de la voie de signalisation impliquant CDC42, une petite protéine intracellulaire de la famille des Rho GTPases, semble jouer un rôle central [2].

La perte de SCRIB affecte la forme des cellules Caco-2 durant leur différenciation

Pour tenter de comprendre le rôle du gène *SCRIB* dans le processus de

polarité apico-basale, nous l'avons inactivé par mutation dans les cellules Caco-2, une lignée cellulaire tumorale humaine d'origine intestinale dérivée d'un adénocarcinome colique, en utilisant la technique CRISPR/Cas-9 [5]. Les cellules Caco-2 ont la capacité de se différencier spontanément en cellules intestinales polarisées, avec des pôles apical et basal bien définis. Cette différenciation apico-basale est encore plus marquée lorsque les cellules sont cultivées dans des systèmes microfluidiques (les « intestins sur puce »), qui permettent de former en sept jours des structures en trois dimensions rappelant les villosités intestinales, avec des repliements similaires à ceux de l'intestin humain [6]. Dans ces conditions de culture, les cellules Caco-2 normales ou privées de la protéine SCRIB se différencient en un pseudo-épithélium intestinal ne présentant pas de défaut manifeste de polarité apico-basale. Étonnamment, les villosités intestinales produites à partir des cellules Caco-2 privées de SCRIB sont cependant beaucoup plus aplaties, et présentent une surface de contact avec le milieu extérieur réduite par rapport aux villosités dérivées des cellules Caco-2 parentales [7].

Un tel défaut morphologique à l'échelle de l'organe peut s'expliquer par un défaut à l'échelle cellulaire. Nous avons donc eu recours à un autre système de culture des cellules Caco-2 permettant une analyse microscopique détaillée de leur forme. Les cel-

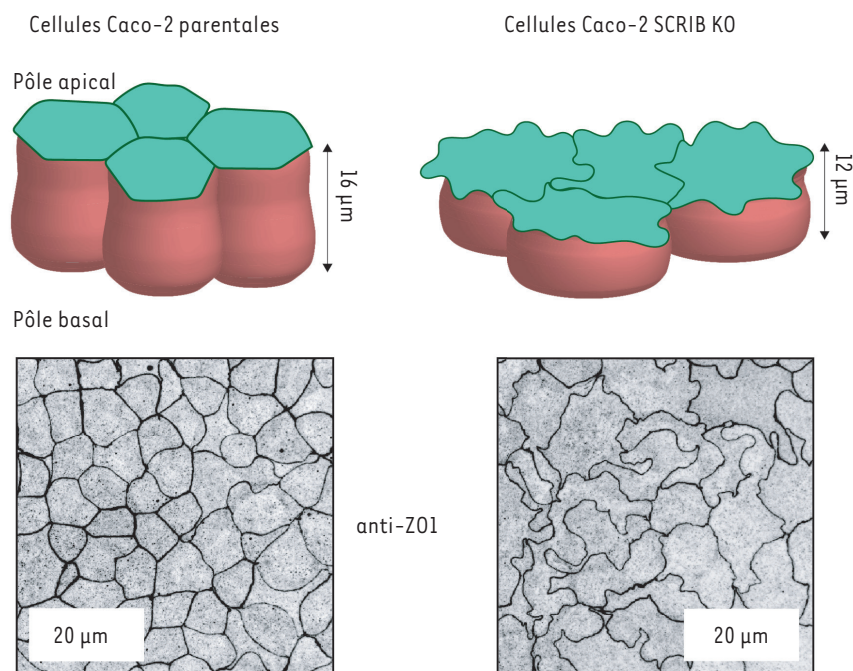


Figure 1. Rôle de la protéine SCRIB dans la forme des cellules épithéliales Caco-2. Une analyse immunohistochimique des jonctions intercellulaires serrées avec un anticorps dirigé contre la protéine ZO-1 (*zonula occludens-1*) permet d'illustrer la différence des contours de la surface apicale entre les cellules Caco-2 produisant normalement la protéine SCRIB (Caco-2 parentales, à gauche) et les cellules Caco-2 qui en sont dépourvues (Caco-2 SCRIB KO, à droite).

lules ont été cultivées pendant 21 jours sur une membrane poreuse placée dans des chambres de culture individuelles [8]. Dans ces conditions, les cellules parentales et les cellules mutantes dépourvues de SCRIB se différencient en un épithélium monostratifié plat. Une analyse immunohistochimique des jonctions intercellulaires serrées apicales a montré que les cellules parentales forment un épithélium dont chaque cellule présente une forme hexagonale et une surface apicale homogène, tandis que les cellules privées de SCRIB ont une surface apicale variable, plus grande en moyenne, et présentant des anomalies de contours : leurs jonctions serrées ne forment pas des lignes droites, mais des zigzags dans un plan transversal (Figure 1). Ces anomalies ne semblent cependant pas altérer la barrière épithéliale, comme l'attestent les mesures de perméabilité de l'épithélium [7].

SCRIB et SHROOM, un duo de protéines contrôlant la contractilité apicale des cellules épithéliales

Les myosines sont impliquées dans le contrôle des jonctions apicales en produisant un réseau de forces qui maintient la forme des cellules [9]. Nous avons constaté que dans les cellules privées de SCRIB, la forme contractile de la chaîne légère de la myosine II était concentrée à la base des cellules et non pas à leur pôle apical, ce qui semblait indiquer un rôle de SCRIB dans le positionnement et l'activation des myosines au pôle apical. La myosine II est activée par la kinase ROCK (*Rho-associated coiled-coil containing kinase*) [9], qui elle-même peut être activée par la petite protéine RhoA ou par des protéines de la famille SHROOM. Or, la protéine SHROOM2 est un partenaire de liaison de SCRIB [10]. Nous avons testé la possibilité que la perte de SCRIB induise un défaut de recrutement du complexe fonctionnel

SHROOM/ROCK/myosine aux contacts intercellulaires apicaux, qui serait responsable des défauts morphologiques observés dans les cellules mutantes. Nous avons constaté que le recrutement de la protéine SHROOM2 aux jonctions intercellulaires est inhibé par la perte de SCRIB. De plus, une analyse biochimique des protéines impliquées dans ce complexe a montré que la protéine SCRIB se liait au complexe SHROOM2/ROCK avec une affinité beaucoup plus forte que celle de sa liaison à la protéine SHROOM2 seule, ce qui suggère l'existence d'une coopération favorisant l'assemblage de ces trois protéines. SCRIB se lie à SHROOM2 par une petite séquence d'une trentaine d'acides aminés (nommée séquence WRAAR en référence aux acides aminés les plus impliqués), remarquable par sa conservation au cours de l'évolution des espèces, car elle est presque identique chez les méduses, les insectes et tous les vertébrés. Nous avons mon-

tré que cette séquence était capable de se lier également à SHROOM4, mais pas à SHROOM1 ni à SHROOM3, et que sa suppression suffisait à abolir l'interaction entre SCRIB et SHROOM2. Des expériences de sauvetage phénotypique ont permis de confirmer le rôle de cette séquence dans les anomalies morphologiques des cellules Caco-2 privées de SCRIB. Ces cellules ont été transduites avec un virus permettant la réexpression de la protéine SCRIB, mutée ou non dans la séquence WRAAR, puis elles se sont différenciées en culture sur des membranes poreuses pendant 21 jours. Les colonies de cellules Caco-2 réexprimant la protéine SCRIB non mutée ont alors recouvré une forme similaire à celle des cellules parentales, au contraire des cellules Caco-2 réexprimant la protéine mutée, qui ont conservé leurs jonctions intercellulaires en zigzag [7]. Cette expérience a permis de montrer que la séquence WRAAR de la protéine SCRIB exerce une action contractile aux jonctions apicales, qui implique le recrutement du complexe SHROOM/ROCK (Figure 1).

Perspectives

Ainsi, la simple perte de la protéine SCRIB ne perturbe pas sensiblement

l'organisation apico-basale de cellules épithéliales humaines d'origine intestinale, les cellules Caco-2 qui, dans deux modèles de culture cellulaire, maintiennent des pôles apical et basal bien différenciés. Cependant, elle entraîne une distribution anormale du complexe protéique SHROOM/ROCK/myosine le long de l'axe apico-basal, provoquant des défauts de forme tant à l'échelle cellulaire qu'à l'échelle tissulaire, où les villosités intestinales cultivées sur puce microfluidique ont une forme aplatie. Cette anomalie morphologique rappelle le phénotype neurodéveloppemental des souris mutantes dépourvues de SCRIB, dont le neuroépithélium reste plat au lieu de former une structure tubulaire (tube neural). L'étude mécanistique dans ce système expérimental apporte donc un nouvel éclairage sur le phénotype murin, tout en offrant des perspectives de compréhension de phénotypes similaires dans l'espèce humaine. ♦

SCRIB controls apical contractility during epithelial differentiation

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été financé par le programme Émergence Cancéropôle Île-de-France. Je remercie Sandrine Etienne-Manneville, directrice

du laboratoire « Polarité cellulaire, migration et cancer », pour la relecture de ce texte.

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Bilder D, Perrimon N. Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* 2000 ; 403 : 676-80.
2. Bonello TT, Peifer M. Scribble : A master scaffold in polarity, adhesion, synaptogenesis, and proliferation. *J Cell Biol* 2019 ; 218 : 742-56.
3. Lei Y, Zhu H, Duhon C, et al. Mutations in planar cell polarity gene *SCRIB* are associated with spina bifida. *PLoS One* 2013 ; 8 : e69262.
4. Choi J, Troyanovsky RB, Indra I, et al. Scribble, Erbin, and Lano redundantly regulate epithelial polarity and apical adhesion complex. *J Cell Biol* 2019 ; 218 : 2277-93.
5. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 2013 ; 154 : 1380-9.
6. Kim HJ, Li H, Collins JJ, et al. Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016 ; 113 : E7-15.
7. Boëda B, Michel V, Etournay R, et al. SCRIB controls apical contractility during epithelial differentiation. *J Cell Biol* 2023 ; 222 : e202211113.
8. Lea T. Caco-2 cell line. In : Verhoeckx K et al., editors. *The impact of food bioactives on health : in vitro and ex vivo models*. Cham (CH) : Springer, 2015 ; chapter 10.
9. Martin AC, Goldstein B. Apical constriction : themes and variations on a cellular mechanism driving morphogenesis. *Development* 2014 ; 141 : 1987-98.
10. Amano M, Hamaguchi T, Shohag MH, et al. Kinase-interacting substrate screening is a novel method to identify kinase substrates. *J Cell Biol* 2015 ; 209 : 895-912.



m/s
médecine/sciences

**Avec m/s, vivez en direct
les progrès et débats
de la biologie et de la médecine**

CHAQUE MOIS / AVEC LES ARTICLES DE RÉFÉRENCE DE M/S
CHAQUE JOUR / SUR WWW.MEDECINESCIENCES.ORG

Abonnez-vous sur
www.medecinesciences.org