



HAL
open science

Interactions des microARN de la famille miR-34/449 avec les voies de signalisation intracellulaire : rôle dans la différenciation des cellules multiciliées chez les vertébrés

Olivier Mercey

► To cite this version:

Olivier Mercey. Interactions des microARN de la famille miR-34/449 avec les voies de signalisation intracellulaire : rôle dans la différenciation des cellules multiciliées chez les vertébrés. Sciences agricoles. Université Côte d'Azur, 2016. Français. NNT : 2016AZUR4119 . tel-01654422

HAL Id: tel-01654422

<https://theses.hal.science/tel-01654422>

Submitted on 3 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE CÔTE D'AZUR**

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE CÔTE D'AZUR
Domaine
Interactions Moléculaires et Cellulaires

**Interactions des microARN de la famille miR-34/449 avec
les voies de signalisation intracellulaire :
Rôle dans la différenciation des cellules multiciliées chez
les vertébrés**

**Présentée par
Olivier MERCEY**

Thèse soutenue publiquement le
9 décembre 2016
devant le jury composé de :

Dr. Pascal BARBRY
Dr. Philippe BASTIN
Dr. Xavier GIDROL
Dr. Michel CHIGNARD
Dr. Maximilien FURTHAUER
Dr. Brice MARCET

Président du Jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de Thèse

Chez les vertébrés, les cellules multiciliées (MCC), qui arborent à leur surface apicale jusqu'à plusieurs centaines de cils mobiles, bordent la surface de certains tissus comme les voies respiratoires, les ventricules cérébraux, les trompes utérines, l'épiderme d'embryon de grenouille ou encore les placodes olfactives de poisson. Le battement coordonné de leurs cils crée un flux directionnel liquidien, nécessaire à divers processus physiologiques comme l'évacuation par l'appareil respiratoire des particules inhalées piégées dans le mucus. La fabrication des cils mobiles (multiciliogénèse), qui intervient au cours de la différenciation des MCC lors du développement ou de la régénération de certains épithéliums, nécessite : (1) la sortie du cycle cellulaire ; (2) la production de centaines de corps basaux grâce à la multiplication massive de centrioles ; (3) un remodelage du cytosquelette d'actine au pôle apical, (4) la migration et l'ancrage des corps basaux à la surface apicale où ils jouent à la base de chaque cil un rôle de centre organisateur des microtubules.

Les microARN (miARN ou miR) sont de petits ARN non-codants endogènes qui contrôlent de nombreux processus biologiques en réprimant l'expression génique par des mécanismes post-transcriptionnels. En 2011, mon laboratoire d'accueil a été le premier à établir un lien fonctionnel, conservé des amphibiens jusqu'à l'Homme, entre les miARN de la famille miR-34/449 et la multiciliogénèse. Les miR-34/449, spécifiquement exprimés dans les MCC, contrôlent la multiciliogénèse en réprimant à la fois le cycle cellulaire et la voie de signalisation Notch, deux étapes précoces de la différenciation « multiciliée ».

Mon travail de thèse a consisté à démêler les mécanismes conservés par lesquels les miR-34/449 interagissent avec plusieurs voies de signalisation afin de contrôler la différenciation des MCC. Nous avons utilisé un modèle *in vitro* de culture d'épithélium des voies respiratoires humaines ou murines ainsi que deux approches *in vivo* correspondant à l'épiderme d'embryons d'amphibiens et un modèle d'asthme induit chez la souris. Nous avons ainsi montré que les miR-34/449 contrôlent la réorganisation du réseau apical d'actine, une étape clé de la multiciliogénèse, en modulant l'expression et l'activité d'acteurs des voies des petites GTPases. En inhibant directement certains composants de ces voies tels que RRAS, ARHGAP1 ou ARHGDI1, les miR-34/449 activent la petite GTPase RhoA et promeuvent la relocalisation de la filamine-A, deux événements essentiels à l'enrichissement apical du réseau d'actine.

Par ailleurs, nous avons identifié et caractérisé fonctionnellement des séquences variantes des miR-34/449, appelés isomiR-34/449. Une comparaison des profils d'expression génique induits par les différents membres de la famille miR-34/449 indique que certaines cibles des isomiR sont communes à celles de leurs homologues canoniques tandis que d'autres sont distinctes. Certaines fonctions seraient partagées par ces différents variants alors que d'autres seraient plus spécifiques. En effet, nous avons montré que comme leurs homologues canoniques, ces isomiR-34/449 bloquent à la fois le cycle cellulaire et la voie Notch, deux événements précoces indispensables à la multiciliogénèse, mais n'induisent pas d'effet sur le réseau d'actine contrairement aux miR-34/449.

Enfin, nous avons démontré à partir de nos différents modèles qu'une inhibition précoce de la voie de signalisation BMP contrôle la multiciliogénèse, en interaction avec la voie Notch. De plus, l'inhibition du signal BMP dans un modèle d'asthme murin augmente le nombre de MCC lors de la régénération de l'épithélium respiratoire.

L'ensemble de mes travaux ont permis de positionner les miR-34/449 comme chefs d'orchestre modulant différentes voies de signalisation pour gouverner la multiciliogénèse. Une meilleure compréhension de ces mécanismes est un prélude indispensable à la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces pour lutter contre les pathologies associées à des désordres ciliaires.

Remerciements

En tout premier lieu, je tiens évidemment à dire un grand merci à Pascal Barbry pour m'avoir accueilli dans son laboratoire durant ces quatre années qui ont réellement été très enrichissantes en bien des points, scientifiquement, techniquement et humainement bien sûr. C'est une tranche de vie qui se termine et qui restera dans ma mémoire comme un moment très positif. Je le remercie également de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

J'aimerais remercier particulièrement Brice Marcet, mon directeur de thèse, pour tout ce que nous avons partagé pendant ces années. Malgré les déconvenues sur un bon nombre d'expériences et de résultats, j'ai énormément appris à tes côtés. La manière de diriger ma thèse a été en parfaite adéquation avec mon profil, et tu sais parfaitement gérer humainement pour que chacun se sente à sa place dans le laboratoire. Au-delà de l'aspect scientifique, nous avons pu échanger sur de nombreux sujets, rendant d'autant plus agréable ces moments partagés.

Par la suite j'aimerais remercier mes rapporteurs Philippe Bastin et Xavier Gidrol pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Leurs critiques pertinentes ont été très constructives pour la correction du manuscrit. Je tiens également à remercier mes examinateurs Michel Chignard et Maximilien Fürthauer d'avoir répondu positivement pour la relecture et l'examen de ma thèse.

Je voudrais également remercier l'association « la ligue contre le cancer » pour le soutien financier de ma 4^e année de thèse.

J'aimerais remercier tous les membres de l'équipe qui ont contribué à la bonne ambiance durant cette thèse. Tout d'abord, je remercie tous les membres du groupe « cilio » à commencer par Benoît Chevalier qui m'a beaucoup appris lorsque j'ai débuté ma thèse et avec qui j'ai pu partager des super moments, que ce soit au labo ou autour de verres. Merci également à Laure-Emmanuelle Zaragosi pour sa gentillesse et ses connaissances. Merci aussi à Sandra Ruiz-Garcia et Amélie Cavard. Je tiens également à merci à Valérie Julia et Isabelle Berthier pour toute la partie *in vivo* chez la souris. Je remercie également tous les membres de la plateforme de génomique, Virginie Magnone, Géraldine Rios, Marie-Jeanne Arguel, et Nicolas Pons, qui m'ont été d'une aide très précieuse pour bon nombre d'expériences. Merci également aux bio-informaticiens, Kévin Lebrigand, Nicolas Nottet, Agnès Paquet, Alexandra Poppa et Marie Deprez pour leur aide. Je tiens également à remercier Bernard Mari et Roger Rezzonico pour leurs connaissances mais également pour tous les instants de rigolade. Merci aussi à Karine Robbe-Sermesant, Rainer Waldmann et Carole Gaillard. Je tiens particulièrement à remercier Gilles Ponzio, mon voisin de bureau pendant plus de 3 ans, pour tous les bons moments partagés. En plus des conseils scientifiques pertinents, Gilles, par ta bonne humeur et ton sens de l'humour, tu as largement contribué à faire passer ces 4 ans très vite, peut-être même trop vite. Notre livre d'or, malheureusement plus à jour, reste une preuve irréfutable de la bonne ambiance dans le bureau. Je remercie évidemment les « jeunes » du labo

avec qui j'ai profité de nombreux bons moments dans et hors du laboratoire. Je pense évidemment à Nicolas (encore) et notre anglais Richard, avec qui j'ai beaucoup échangé et partagé en toute complicité, que ce soit autour du sport comme autour de verres. Un merci particulier à Nihal pour sa gentillesse et sa disponibilité. Merci également à Grégoire, Laura, Marine, Cécile, Imène, Matthieu et Julien.

En dehors de notre équipe, il y a encore beaucoup de gens que j'aimerais remercier à l'institut. Commençons par les « copains », ceux sans qui ces années auraient sûrement été plus monotones. Je pense en premier lieu à l'équipe Heurteaux et notamment Sarah. Spécimen en voie de disparition de chitirabe, tous les moments partagés représentent des bons souvenirs, que ce soient les différentes soirées, le marathon, mais surtout un nombre incalculable de rires ensemble au laboratoire. Merci à toi d'avoir grandement participé à l'atmosphère géniale du laboratoire. En continuant dans la même équipe, je voudrais remercier Miled, encore une fois pour tous les bons moments passés. J'espère que tu vas t'épanouir à Montréal, et qu'on va se revoir vite dans le grand Nord. Merci également à Hadi, roi de la dance des pecs. Courage pour la suite des études. Je remercie également Pierre et Mélanie, tous deux adorables et que je regrette de ne pas avoir connus plus tôt. Des belles tranches de vie partagées avec vous également et j'espère que ça va continuer. Merci également à Thomas, qui, sous ses airs ronchons, est plus que sympathique. Il faut apprendre à te connaître patiemment, mais cela vaut le coup d'attendre. Entraîne-toi encore un peu au foot pour qu'on reforme l'équipe dans quelques années.

Je voudrais enfin remercier tous ceux qui m'ont, à un moment ou à un autre, éclairé, aidé, avec qui j'ai pu échanger, ceux avec qui j'ai rigolé, bref tout ceux qui, de près ou de loin, ont laissé leur empreinte dans cette histoire qu'est ma thèse. Je pense aux gars du foot, mais également à Jean, Thierry et Christelle qui m'ont accueilli pour la première fois à l'institut. Il y a aussi Thomas Maurin, Éric Macia, mais également Fred et Julie de la plateforme imagerie et cytométrie ou encore Anne Sophie et Delphine de la plateforme de spectrométrie. Enfin, en dernier lieu, je tiens à remercier tous les doctorants et post doctorants, et la liste est longue, avec qui j'ai passé des moments incroyables.

En dehors de l'institut, c'est évidemment toi, Alexandra, que j'aimerais remercier en premier car tu as été à mes côtés tout ce temps, patiente dans les moments plus difficiles, et toujours présente pour moi. Merci pour cette complicité sans limite et vivement la prochaine aventure parisienne ensemble. Je pense aussi à tous les amis, les piliers, disséminés partout en France, que je n'ai que trop peu vus pendant ces 4 ans mais qui savent me donner le sourire même à distance.

Je remercie également les gars du hockey, avec qui j'ai passé beaucoup de week-end à crapahuter partout en France pour s'accrocher au haut niveau. J'ai pu vivre un titre de champion de France pour la première fois grâce à vous et je vous en remercie.

Enfin, pour conclure, un grand remerciement à ma famille, toujours là pour moi et qui a également largement contribué au bon déroulement de ces 4 années et à ma bonne humeur.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
I. Les cils	2
A. Généralités	2
B. Les centrioles	3
1. La fonction double des centrioles	3
2. La structure et la mise en place des centrioles	4
C. La formation du cil	8
1. La zone de transition	8
2. Le transport intra-flagellaire	9
3. Le contrôle de la taille du cil	10
4. La structure de l'axonème et la classification des cils	11
D. L'apparition du cil au cours de l'évolution	12
1. L'hypothèse endo-symbiotique bactérienne	13
2. L'hypothèse endo-symbiotique virale	13
3. Le modèle endogène	13
E. Les fonctions ciliaires	14
1. Le cil primaire	14
2. Les cils mobiles	16
3. Les autres types de cils	18
F. Les ciliopathies	20
1. Les ciliopathies du cil primaire	20
2. Les dyskinésies ciliaires primitives	21
3. Les dyskinésies ciliaires secondaires	22
II. Les voies respiratoires humaines	27
A. Anatomie	28
1. Les voies respiratoires supérieures	28
2. Les voies respiratoires inférieures	31
B. Les différentes cellules de l'épithélium respiratoire des voies supérieures	33
1. Les cellules multiciliées	33
2. Les cellules basales	34
3. Les cellules sécrétrices de mucus	35
C. L'épithélium mucocilié : unité fonctionnelle protectrice des voies respiratoires	36

1.	Mucus et liquide périciliaire : première ligne de défense.....	36
2.	La clairance mucociliaire	38
3.	La barrière épithéliale	40
4.	La sécrétion de molécules antimicrobiennes.....	42
III.	Les microARN.....	43
A.	Historique des microARN.....	43
B.	La nomenclature des microARN	44
C.	La biogénèse des miARN.....	45
1.	La transcription des miARN	45
2.	La maturation nucléaire des microARN.....	45
3.	L'export cytoplasmique des miARN	46
4.	La maturation cytoplasmique des miARN	47
5.	Formation du complexe ribo-nucléo-protéique RISC.....	48
6.	Biogénèse non canonique des miARN.....	49
D.	Reconnaissance des ARN par le complexe RISC.....	50
1.	Le miARN guide, déterminant majeur pour la reconnaissance des ARNm cibles.....	50
2.	Facteurs secondaires dans la reconnaissance d'ARNm cibles.....	52
E.	Mécanismes de répression des microARN	53
1.	GW182, centre de recrutement pour la répression des ARNm	53
2.	PAN2-PAN3 et CCR4-NOT, deux complexes de déadénylation de l'ARNm.....	54
3.	CCR4-NOT recrute d'autres répresseurs de l'ARNm	55
F.	Les isomiR	56
1.	Les différentes formes d'isomiR.....	56
2.	Spécificité d'expression des isomiR.....	59
3.	Stabilité des isomiR	60
4.	Fonction des isomiR	60
G.	Les miARN de la famille miR-34/449	62
1.	Localisation génomique chez l'Homme.....	62
2.	Leur conservation au cours de l'évolution	63
3.	Profil d'expression tissulaire chez l'Homme	63
4.	Fonction des miR-34/449	64
5.	La régulation des miR-34/449	65
IV.	La différenciation des cellules multiciliées	66
A.	Les modèles d'étude.....	67

1. Les modèles <i>in vivo</i>	67
2. Le modèle <i>in vitro</i> d'interface Air/Liquide (IAL)	70
B. Les voies de signalisation impliquées dans la différenciation multiciliée.....	71
1. La voie Notch.....	71
2. La voie BMP	72
3. La voie des petites protéines GTPases	74
C. Les différentes étapes de la différenciation multiciliée	75
1. Les progéniteurs des cellules multiciliées.	75
2. La spécification des cellules basales en cellules multiciliées	77
3. L'arrêt du cycle cellulaire.....	84
4. La mise en place d'un réseau transcriptionnel précoce.....	84
5. Multiplication des centrioles ou centriogénèse.....	87
6. La migration et l'ancrage des corps basaux à la membrane apicale.....	89
RESULTATS	96
I. Les microARN de la famille miR-34/449 sont des régulateurs clés de la différenciation des cellules multiciliées chez les vertébrés	98
A. Contexte de l'étude	98
B. Résultats.....	102
1. Caractérisation du réseau d'actine des cellules multiciliées chez l'Homme et le Xénope..	102
2. Les miR-34/449 contrôlent la formation du réseau apical d'actine.....	102
3. Le rôle des miR-34/449 sur la réorganisation du réseau apical d'actine est indépendant de la voie Notch.....	103
4. Les miR-34/449 régulent la voie des petites GTPases.....	104
5. Les miR-34/449 contrôlent la réorganisation apicale du réseau d'actine en réprimant l'expression de R-Ras.....	105
C. Conclusion	106
D. Résultats Additionnels.....	107
1. La Géminine : nouvelle cible de miR-34/449	107
II. Caractérisation des isomiR de la famille 34/449 : quand la famille s'agrandit !.....	108
A. Contexte de l'étude	108
B. Résultats.....	109
1. Identification de variants pour miR-34b-5p et miR-449c-5p chez l'Homme	109
2. L'abondance relative des formes canoniques et isomiR de miR-34b et miR-449c n'est pas due à des artefacts de séquençage	110
3. Effets fonctionnels des isomiR	110

C. Conclusion	111
D. Résultats additionnels	112
1. Moésine, cible spécifique du 5'isomiR-34b ?	112
III. L'implication de la voie de signalisation BMP dans la différenciation multiciliée chez les vertébrés	113
A. Contexte de l'étude	113
B. Résultats	113
1. La voie de signalisation BMP est active au cours de la différenciation mucociliée chez l'Homme et le xénope	113
2. La modulation de la voie BMP perturbe la formation de l'épithélium mucocilié	114
3. Interconnexion entre voie BMP et voie Notch	115
C. Conclusion	115
D. Résultats additionnels	116
1. L'inhibition précoce de la voie BMP augmente le nombre de précurseurs des cellules multiciliées.....	116
2. La répression de la voie BMP inhibe fortement l'expression de la famille d'inhibiteurs de différenciation ID.....	116
3. L'inhibition des ID par Noggin pourrait moduler l'activité transcriptionnelle du facteur précoce de différenciation E2F4.....	116
4. Les effets de la modulation de la voie BMP sur la multiciliogénèse sont indépendants de la voie Notch	117
5. L'inhibition de BMP augmente la régénération des cellules multiciliées <i>in vivo</i>	117
E. Conclusion	118
F. Procédures expérimentales	119
DISCUSSION/PERSPECTIVES	120
I. MiR-34/449 : chefs d'orchestre de la multiciliogénèse	121
A. miR-34/449 contrôlent la réorganisation du réseau apical d'actine	121
B. miR-34/449 : implication dans d'autres processus de la multiciliogénèse ?	125
C. miR-34, miR-449 et isomiR-34/449 : Redondance ou complémentarité ?.....	125
D. Contribution des gènes des loci miR-34 et miR-449 : existence de deux loci « multiciliaires » ?.....	129
II. Rôle de la voie BMP dans la multiciliogénèse.....	131
III. Modulation de la voie BMP et des miR-34/449 <i>in vivo</i> : vers une approche thérapeutique ?	132
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	136

ABREVIATIONS

4E-T	Eukaryotic translation initiation factor 4E transporter
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase Domain
ADN	acide ribonucléique
AhR	aryl hydrocarbon receptor
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARN	acide désoxyribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
BBS	Bardet-Biedl Syndrome
bHLH	basic helix loop helix
BMP	Bone Morphogenic Protein
BPCO	bronchopneumopathies chroniques obstructives
CALK	Chlamydomonas aurora-like protein kinase
CAT-1	cationic amino acid transporter 1
CC10	Club Cell protein 10kDa
CCDC67 ou deup1	coiled-coil domain containing 67
CCNO	Cyclin O
CD	Cluster of Diffenentiation
Cdc20	Cell division cycle protein 20 homolog
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CENP-J	Centromere Protein J
Cep	Centriolar protein
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CP110	Centriolar coiled-coil protein of 110 kDa
CRB3	Crumbs3
Cre	Causes recombination
DAAM1	Disheveled-associated activator of morphogenesis 1 N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester
DAPT	
DCP	dyskinésies ciliaires primitives
DCS	dyskinésies ciliaires secondaires
DDX6	DEAD box protein 6
DGCR8	Di George Critical Region 8
DLG3	Disks large homolog 3
DLL	Delta-Like
EB	Microtubule-associated protein RP/EB family member
EBP50	Ezrin/Radixin/Moesin Binding Protein 50
EDC	Enhancer of mRNA-decapping protein
EGF	epidermal growth factor
eIF	eukaryotic initiation factor
ELMO	Engulfment and Cell Motility
ENaC	Epithelial Na Channel
ER	Estrogen Receptor
Exp5	Exportin-5

FAK	Focal Adhesion Kinase
Foxj1	Forkhead box protein J1
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
GAP	GTPases Activating Proteins
GDI	Guanine Dissociation Inhibitors
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factors
GEMC1	Geminin Coiled-Coil Domain Containing 1
GFP	Green Fluorescent Protein
GLI	zinc finger protein GLI
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
GMNN	Geminin
GMPc	Guanosine MonoPhosphate cyclique
GRHL2	Grainyhead-like 2
GTP	guanosine triphosphate
Hes	hairy/enhancer of split
HEY	Hes-related with YRPW motif
Hh	Hedgehog
hPOC	human Proteome Of Centriole
HuR	ELAV-like protein 1
IAL	Interface Air/Liquide
ID	Inhibitor of Differentiation
IFT	intraflagellar transport
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukin
JAG	Jagged
JAM	Junction Adhesion Molecules
KAP	kinesin-associated protein 3
Kif	Kinesin-like protein
KRT	Cytokeratin
LECA	Last Eucaryotic Common Ancestor
MAM	Mastermind
MBL2	Mannose Binding Lectin 2
MCIDAS	Multicilin
miARN	microARN
MKS	Meckel-Grüber Syndrome
MSN	Moesin
MTOC	MicroTubule-Organizing Center
MUC	Mucin
NEAT1	Nuclear enriched abundant transcript 1
NGFR	nerve growth factor receptor
NICD	Notch intracellular domain
Nubp1	Nucleotide Binding Protein 1
Odf2	Outer dense fiber protein 2
OFD1	Oral-facial-digital syndrome 1 protein
P53	Cellular tumor antigen p53
PABP	Poly(A) Binding Protein

PACT	Protein activator of PKR
PARN	poly(A)-specific ribonuclease
PCM	Pericentriolar material
PCP	Planar Cell Polarity
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLK-4	Polo-like Kinase 4
PTCH1	Patched-1
Ran	Ras-related Nuclear protein
RAR	Retinoic Acid Receptor
RBPJ	Recombining binding protein suppressor of hairless
RFX	Regulatory factor X
RGMC	Reduced Generation of Motile Cilia
RISC	RNA-induced silencing complex
R-Ras	Ras-related protein
SAS-6	Spindle assembly abnormal protein 6 homolog
SEPT2	Septine2
siARN	small interfering ARN
SMAD	Mothers against decapentaplegic homolog
SMO	Smoothened
snoARN	small nucleolar ARN
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPICE1	Spindle And Centriole Associated Protein 1
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STIL	SCL-interrupting locus protein
TGFB	Transforming Growth Factor Beta
TNRC	Trinucleotide Repeat Containing
TP63	Tumor Protein P63
TRBP	TAR RNA-binding protein
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
TUT	Terminal Uridylyl Transferase
UTR	untranslated region
YAP	Yes-associated Protein
YFP	Yellow Fluorescent Protein
ZO	zona occludens
γ-TuRC	γ Tubulin Ring Complex

Liste des figures

- Figure 1** La structure d'un centriole père
- Figure 2** Assemblage des microtubules lors de la mise en place des centrioles
- Figure 3** Structure du corps basal, de la zone de transition de de l'axonème d'un cil mobile (9+2)
- Figure 4** Le transport intra-flagellaire (IFT)
- Figure 5** Cellule photosensible (bâtonnet)
- Figure 6** Cil primaire dans le rein
- Figure 7** Voie de signalisation Sonic Hedgehog et cil primaire
- Figure 8** Exemple de polydactylie observée dans le syndrome de Bardet-Biedl
- Figure 9** Chevauchement des modules génétiques correspondant à diverses ciliopathies
- Figure 10** Voies respiratoires supérieures chez l'Homme
- Figure 11** Les différents sinus paranasaux chez l'Homme
- Figure 12** Evolution de l'épithélium de surface le long du tractus respiratoire chez l'Homme
- Figure 13** Cellule sécrétrice de mucus
- Figure 14** Organisation en brosse des mucines à la surface des cils et des microvillosités
- Figure 15** La polarité planaire
- Figure 16** Le cycle de battement du cil
- Figure 17** Les différents types de complexes jonctionnels de la cellule épithéliale
- Figure 18** Premières étapes de la biogénèse des miARN
- Figure 19** Maturation cytoplasmique des miARN
- Figure 20** Mécanismes de répression des miARN
- Figure 21** Les différentes formes d'isomiR
- Figure 22** Localisation génomique des loci des miR-449 et des miR-34b/c chez l'Homme
- Figure 23** Séquences des miR-34/449 matures
- Figure 24** Le poisson zèbre et le xénope comme modèles d'études de la multiciliogénèse
- Figure 25** Petits organismes modèles dans l'étude des cils
- Figure 26** La voie de signalisation Notch
- Figure 27** La voie de signalisation BMP
- Figure 28** Les différentes régulations des petites GTPases
- Figure 29** Modèle de différenciation dépendant de Notch proposé chez la souris
- Figure 30** Modèle récapitulant les différentes régulations transcriptionnelles de la multiciliogénèse
- Figure 31** Modèle de l'amplification des centrioles dans les cellules multiciliées
- Figure 32** Liaison des corps basaux au réseau d'actine par les complexes d'adhésion ciliaires
- Figure 33** Cibles ciliaires directes et indirectes des facteurs de transcription Foxj1 et RFX
- Figure 34** Description des différentes stratégies de modulation de l'effet des miR-34/449
- Figure 35** Modèle proposé de la réorganisation du cytosquelette d'actine en réponse à l'inhibition de R-Ras par miR-34/449
- Figure 36** miR-34 et miR-449, redondance ou complémentarité?
- Figure 37** Hypothèses sur le clivage imprécis du microprocesseur donnant naissance aux isomiR en 5'
- Figure 38** Devenir de l'épithélium respiratoire en culture en fonction du niveau d'activité de la voie BMP

INTRODUCTION GENERALE

I. Les cils

A. Généralités

Le cil cellulaire est un organite retrouvé à la surface de nombreuses cellules eucaryotes qui se projette vers le milieu extracellulaire à la façon d'une antenne et qui est fortement conservé des protistes aux mammifères. Les organismes procaryotes sont également dotés d'organites similaires mais présentent des différences structurales et fonctionnelles fondamentales. Ce manuscrit traitera uniquement des cils eucaryotes. Le terme de flagelle est parfois utilisé pour décrire le cil cellulaire. Bien que de même structure que le cil, il se distingue par sa taille plus grande.

C'est Antoni van Leeuwenhoek, commerçant drapier et scientifique hollandais du XVII^e siècle, qui, après avoir mis au point et amélioré les premiers prototypes de microscopes a pu observer et décrire pour la première fois en 1676 des protozoaires « ciliés ». Puis, il découvre en 1677 l'existence des spermatozoïdes qu'il nomme « animalcules » flagellés. Pendant environ trois siècles, la fonction du cil fut cantonnée à un rôle de motilité. Ce n'est qu'en 1968 que des cils dépourvus de motilité, appelés cils « primaires », furent identifiés (Sorokin 1968). Cependant, les fonctions ciliaires n'ont suscité que peu d'intérêt, et le cil primaire était alors considéré comme une structure vestigiale. À la fin du XX^e siècle, des études ont pu montrer que les cils jouent un rôle dans de nombreux processus physiologiques tels que la transduction de signaux, les détections chimio- et mécano-sensorielles ou l'établissement de la polarité et de l'asymétrie droite/gauche au cours du développement embryonnaire (Satir & Christensen 2007). De nombreux acteurs essentiels à la mise en place du cil, ainsi que des mécanismes permettant son élaboration ont commencé à être décrits. Avec l'avènement des technologies de séquençage haut-débit et de protéomique, plus de 2500 gènes ou protéines, formant le « ciliome », ont été identifiés comme participant à la fonction ciliaire (Inglis et al. 2006). Ce répertoire, qui pourrait s'agrandir davantage, est notamment très utile dans la caractérisation génétique de pathologies associées à la fonction ciliaire, regroupées sous le terme de ciliopathies (Cf Partie I.F).

La première partie de ce manuscrit sera consacrée à la description structurale de cet organite. Les différentes hypothèses pouvant expliquer son origine ainsi que la conservation du cil au cours de l'évolution seront ensuite discutées. Enfin, ses différentes fonctions ainsi que les maladies résultant de sa dysfonction seront décrites.

B. Les centrioles

1. La fonction double des centrioles

Les centrioles sont des structures en forme de baril d'environ 0.2 μm de diamètre et 0,5 μm de longueur qui ont été observées pour la première fois en 1883 par Edouard Van Beneden puis par Theodore Boveri quelques années plus tard (Sathananthan et al. 2006; Moritz & Sauer 1996). Ils sont constitués, dans la très grande majorité des cas, de 9 triplets de microtubules (A,B,C) organisés avec une symétrie d'ordre 9 en cercle autour d'un noyau cylindrique formant une roue de charrette et appelé le « cartwheel » (décrit plus loin). Bien que leur structure soit très largement conservée dans le règne eucaryote, plusieurs exceptions existent. C'est notamment le cas du ver *Caenorhabditis elegans* dont les centrioles sont composés de 9 singulets de microtubules et n'ont pas de structure strictement comparable au cartwheel (Pelletier et al. 2006).

Les centrioles ont principalement deux fonctions cellulaires. En 1887, Boveri et Van Beneden qualifiaient le centriole « d'organe pour la division cellulaire » (Sathananthan et al. 2006; Moritz & Sauer 1996). En effet, l'assemblage de deux centrioles disposés perpendiculairement (centriole père et centriole fils) permet le recrutement d'un amas protéique dense appelée matériel péricentriolaire afin de former le centrosome, le principal centre organisateur de microtubules de la cellule (ou MTOC pour « MicroTubule-Organizing Center »). Le MTOC est impliqué dans l'arrangement du fuseau mitotique lors de la division cellulaire, mais également dans la migration et la polarité des cellules. Le rôle indispensable des centrioles durant la mitose fait toutefois l'objet de controverses avec la découverte de l'absence de centriole chez plusieurs espèces de champignons, de plantes à graines, ainsi que chez certains protistes. De plus, plusieurs études démontrent que certains types cellulaires sont capables de se diviser en l'absence de centrioles. Chez l'embryon de souris par exemple, les centrioles sont transitoirement absents lors des premiers clivages du blastomère et sont observables en microscopie électronique seulement à partir du stade 64 cellules (Szollosi et al. 1972). Une autre étude montre que malgré l'absence de centriole causée par la mutation d'un gène de structure, le développement embryonnaire se déroule sans défaut morphologique chez la drosophile (Basto et al. 2006). Friedländer et collègues ont même proposé un modèle alternatif au MTOC comme centre de la division cellulaire, en suggérant que c'est le fuseau mitotique des métazoaires qui permet la ségrégation correcte des centrioles et chromosomes durant la division cellulaire (Friedländer & Wahrman 1970).

Les centrioles sont également capables de migrer à la surface cellulaire pour devenir des corps basaux et servir de plateforme à partir de laquelle l'élongation des cils s'opère. Lors des étapes précoces de la formation du fuseau mitotique durant le cycle cellulaire, le cil primaire est résorbé et

les centrioles rejoignent le centre de la cellule pour participer à l'assemblage du fuseau mitotique (Rieder et al. 1979). En fin de mitose, les centrioles migrent de nouveau à la surface de la cellule et participent à la formation du cil primaire.

En terme de conservation au cours de l'évolution, la présence de centrioles semble davantage corrélée à la présence de cils ou flagelles que la présence de centrosomes, suggérant leurs rôle préférentiel de plateforme pour la construction ciliaire (Debec et al. 2010).

C'est précisément cette dernière fonction qui retiendra notre attention dans la suite du manuscrit.

2. La structure et la mise en place des centrioles

a. *L'initiation de l'assemblage centriolaire*

L'assemblage des centrioles est un mécanisme finement régulé afin d'éviter la formation de centrioles surnuméraires au sein d'une cellule. Dans les cellules, les procentrioles (centrioles néoformés) prennent naissance perpendiculairement à l'axe des deux centrioles parentaux existant durant la transition G1/S. Une fois que l'assemblage des deux nouveaux centrioles a débuté, aucune autre duplication centriolaire n'est possible avant que la cellule ne finisse la mitose (Tsou & Stearns 2006). Ce type de duplication est appelé canonique. A l'inverse, les procentrioles peuvent également se former *de novo* lorsque les centrioles parentaux sont absents, suggérant donc que le rôle des centrioles parentaux n'est pas de permettre la formation des procentrioles, mais plutôt de contrôler la localisation de leur auto-assemblage (Rodrigues-Martins et al. 2007).

Les mécanismes mis en jeu lors des étapes initiales de la formation d'un procentriole demeurent encore mal élucidés. Les protéines centriolaires Cep192, Cep152 et Cep63 (Centriolar Protein 192, 152, 63) y joueraient un rôle clé chez les mammifères (Hatch et al. 2010; Sonnen et al. 2013; Kim et al. 2013; Lukinavičius et al. 2013; Brown et al. 2013). Ces protéines sont capables de recruter la protéine clé Polo-like Kinase 4 (PLK-4) (Kim et al. 2013)(Sonnen et al. 2013). L'importance de PLK-4 dans ce processus est soulignée par sa perte de fonction, qui empêche la duplication des centrioles (Habadanck et al. 2005). L'avènement de la microscopie à très haute résolution (Super-resolution three-dimensional-structured illumination microscopy (3D-SIM)) a permis de révéler que PLK-4 spécifie le positionnement du procentriole en formant une sorte de point au centre d'un anneau composé par Cep152 et Cep63 (Sir et al. 2011; Sonnen et al. 2012; Mennella et al. 2012; Lawo et al. 2012). PLK-4 phosphoryle ensuite la protéine STIL (« SCL-interrupting locus protein » ou Ana2 chez la drosophile), permettant le recrutement de SAS-6 (Spindle assembly abnormal protein

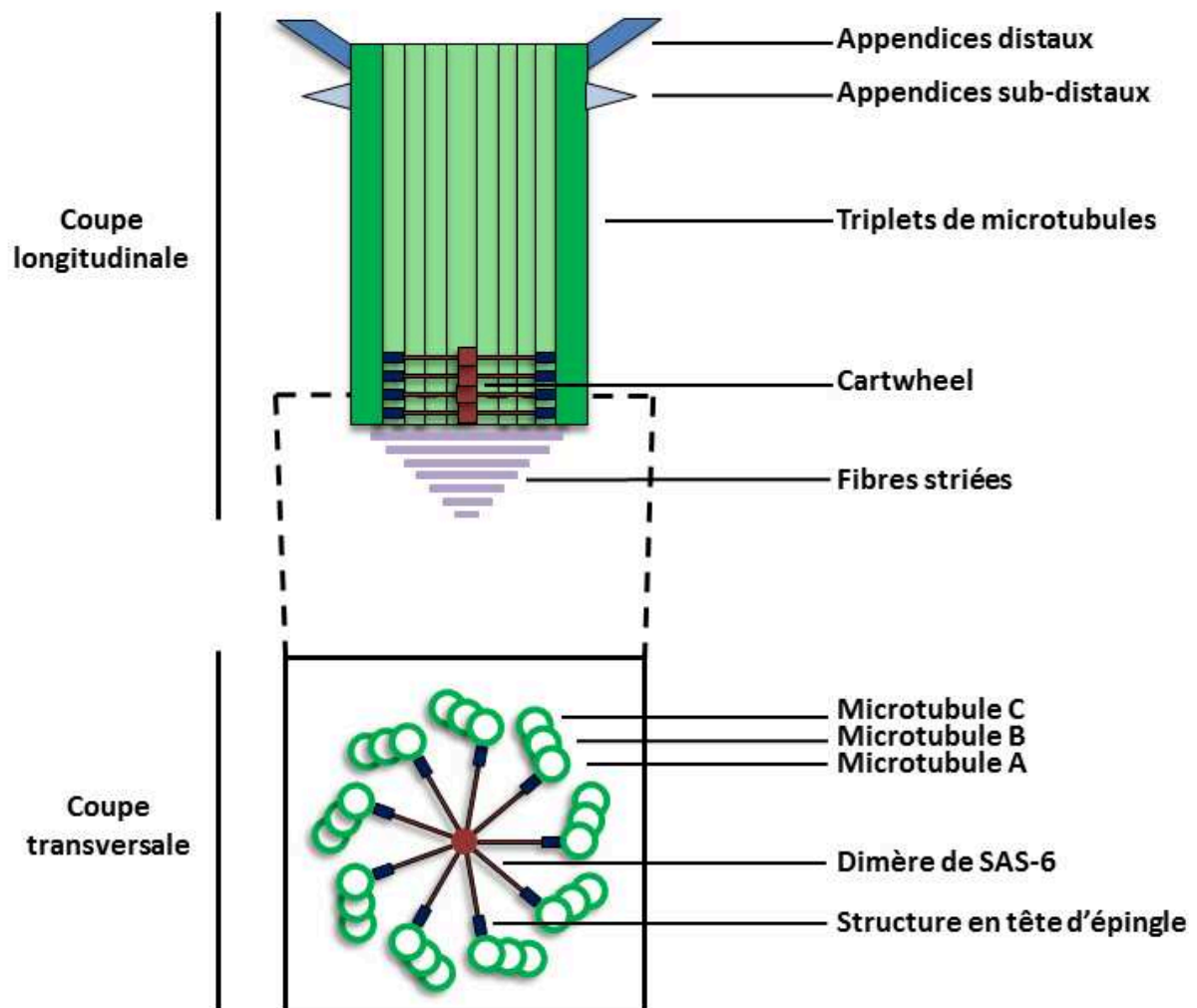


Figure 1 : La structure d'un centriole père

Le triplet de microtubules est amarré au cartwheel (formé par 9 dimères de SAS-6) *via* la structure en épingle formée par la protéine Cep135. Les appendices viennent par la suite coiffer le centriole père lors de sa maturation.

homolog), protéine structurale du cartwheel et par conséquent indispensable à la mise en place du centriole (Dzhindzhev et al. 2014).

b. Le cartwheel

L'acquisition de la symétrie d'ordre 9 est rendue possible à partir de cette structure qui représente le cœur même du centriole. Le cartwheel est positionné dans la partie proximale du centriole et va servir de base pour la mise en place progressive des différents composants de cet organite. Le cartwheel est composé d'un noyau central d'où rayonnent des fibres radiales. Ce noyau et ces fibres sont formés par des polymères de SAS-6. Un dimère de SAS-6 représente un des rayons du cartwheel et ce sont donc 18 monomères qui s'agencent de manière à former les 9 rayons espacés d'un angle d'environ 40° ainsi que le noyau (Nakazawa et al. 2007) (Figure 1). A l'extrémité de chacun des rayons se trouve une structure en tête d'épingle formée par la protéine Cep135 qui stabilise la symétrie du cartwheel et qui permet aux triplets de microtubules de s'accrocher (Hiraki et al. 2007). Plusieurs cartwheel sont empilés dans la lumière du centriole et le nombre de cartwheel imbriqués est grandement variable selon les organismes.

Le cartwheel est absent des centrosomes matures, suggérant que sa présence est utile uniquement pour la mise en place du centriole mais non pas pour son maintien. Cependant, il est présent dans la partie proximale des corps basaux des cellules multiciliées de trachées de souris (Vladar & Stearns 2007), pouvant poser la question de son rôle dans l'établissement du cil. Bayless et collaborateurs ont d'ailleurs proposé que Cep135 stabilise l'intégrité structurelle du corps basal lorsque ce dernier est soumis aux résultantes des forces engendrées par le battement ciliaire (Bayless et al. 2012).

c. L'assemblage des microtubules

Une fois le cartwheel mis en place, les microtubules peuvent s'y amarrer de manière séquentielle. Les microtubules sont composés d'hétérodimères de tubulines α et β qui s'organisent longitudinalement sous forme de protofilaments. Les protofilaments s'assemblent ensuite latéralement pour former le microtubule de forme cylindrique (Figure 2) (Kollman et al. 2011).

Ce sont tout d'abord les microtubules de type A (constitués de 13 protofilaments) qui viennent s'accrocher sur chaque extrémité des rayons du cartwheel grâce à la structure en tête d'épingle formée par Cep135. La tubuline γ est indispensable à cet ancrage. Associée à d'autres protéines, elle va former une entité de forme conique appelée γ -TuRC (pour γ Tubulin Ring Complex) qui va servir de base sur laquelle le microtubule A se positionne et s'allonge de manière unidirectionnelle du pôle proximal vers le pôle distal. Ce complexe va également avoir un rôle

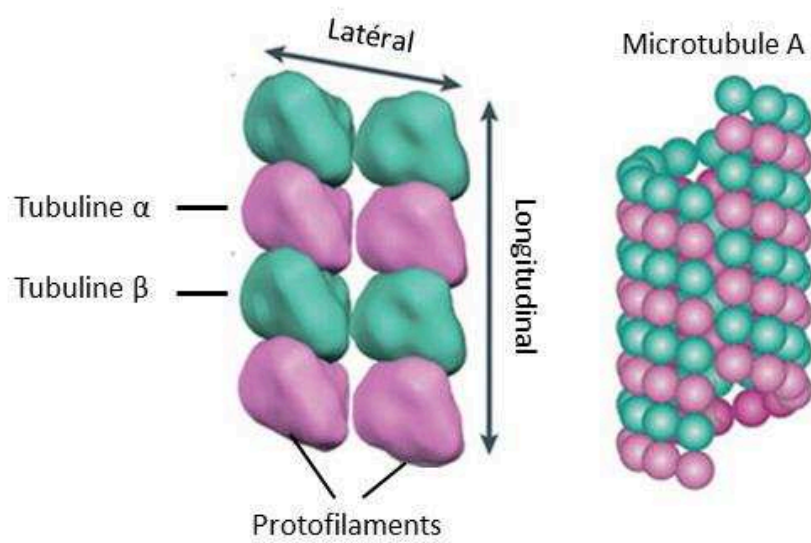


Figure 2 : Assemblage des microtubules lors de la mise en place des centrioles

Des hétérodimères de tubulines α et β s'assemblent de manière longitudinale pour former des protofilaments qui à leur tour s'organisent latéralement pour former les microtubules (d'après Kollman et al., 2011)

protecteur pour stabiliser la partie proximale des microtubules. La protéine CENP-J (pour « Centromere Protein J » aussi connue sous le nom de CPAP), recrutée par Cep152, est également indispensable à l'ancrage des microtubules A, certainement via le recrutement du γ -TuRC (Cizmecioglu et al. 2010). L'activité de CENP-J est dépendante de sa phosphorylation par la Serine/threonine-protein kinase PLK2 (PLK-2) durant la phase G1/S du cycle cellulaire, permettant ainsi un contrôle précis de la duplication centriolaire (Chang et al. 2010).

Les microtubules B et C (constitués de 10 protofilaments) vont quant à eux se fixer respectivement le long des microtubules A et B, et ceci de manière aléatoire sur leur longueur. Leur élongation est donc bidirectionnelle. Côté proximal, l'élongation s'arrête lorsque les microtubules ont atteint l'extrémité du microtubule A.

Les centrioles sont des structures extrêmement stables et leurs microtubules sont résistants au froid, aux détergents et aux drogues dépolymérisantes comme le nocodazole. Il est possible que les modifications post-traductionnelles des microtubules telles les glutamylations jouent un rôle important dans cette stabilité (Bobinnec et al. 1998).

Plusieurs études récentes ont permis de mettre en évidence des acteurs impliqués dans le contrôle de la longueur des centrioles. CPAP, par exemple, régule positivement la croissance centriolaire en permettant l'addition de tubulines au pôle distal, en s'associant avec Cep120 et SPICE1 (« Spindle And Centriole Associated Protein 1 ») (Comartin et al. 2013; Tang et al. 2009). De plus, hPOC5 (pour « human Proteome Of Centriole 5 »), une protéine située dans la partie distale du centriole, joue également le rôle de régulateur de sa taille (Azimzadeh et al. 2009). De la même façon, Keller et collègues ont montré en 2009 que hPOC1 est impliquée dans ce contrôle. En réalisant une surexpression de cette protéine, ils ont pu observer des centrioles de taille excessive, résultat similaire à celui obtenu avec la surexpression de CPAP par Schmidt et collègues la même année (Keller et al. 2009; Schmidt et al. 2009). A l'inverse, Cep97 a été identifiée comme régulateur négatif de l'élongation centriolaire, en recrutant CP110 (« Centriolar coiled-coil protein of 110 kDa »), qui va agir comme une coiffe sur l'extrémité distale du centriole, bloquant sa polymérisation (Spektor et al. 2007). L'inhibition de CP110 dans des cellules humaines engendre des centrioles anormalement longs (Schmidt et al. 2009). Kif-24 (« Kinesin-like protein KIF24 ») interagit avec CP110 et Cep97 et intervient dans cette régulation (Kobayashi et al. 2011), tout comme la protéine OFD1 (« Oral-facial-digital syndrome 1 protein ») située à l'extrémité distale du centriole (Singla et al. 2010).

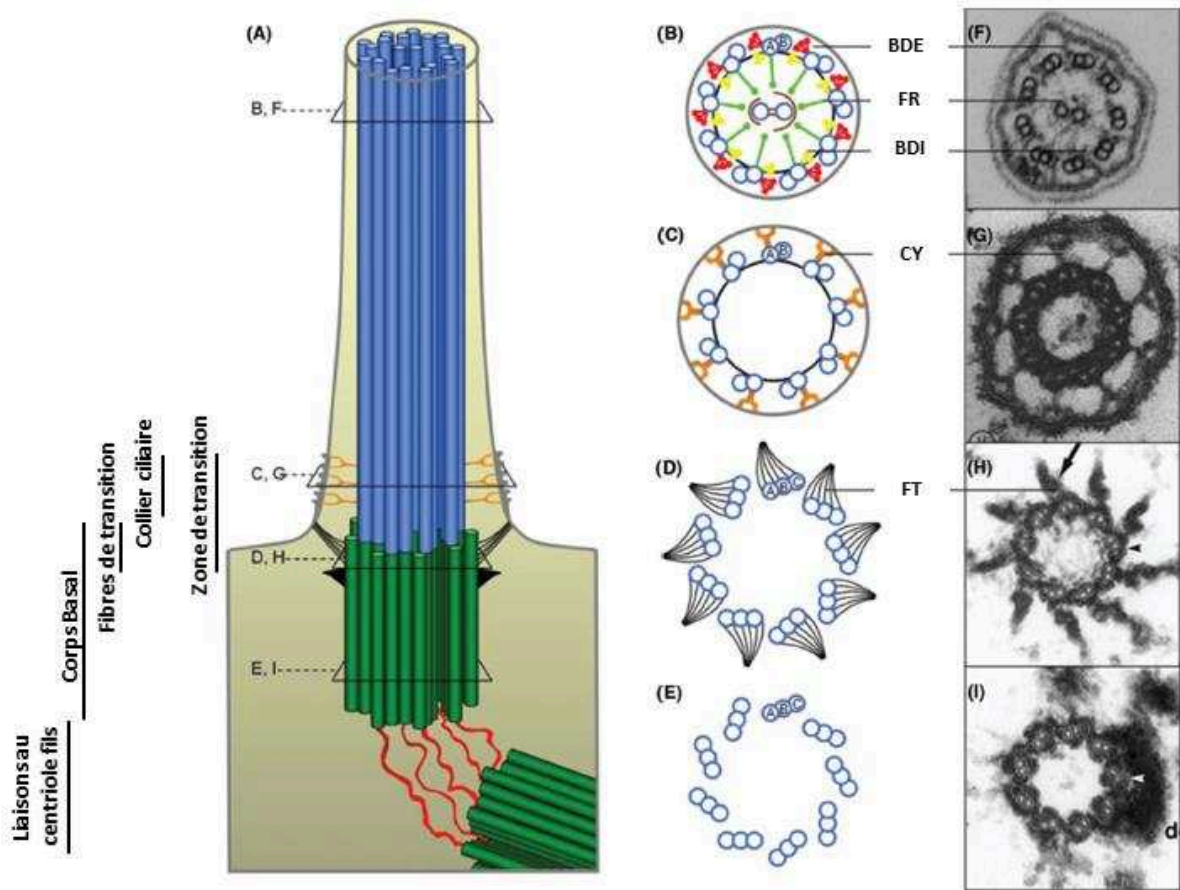


Figure 3 : Structure du corps basal, de la zone de transition de l'axonème d'un cil mobile (9+2)

(A) Représentation longitudinale d'un cil s'allongeant à partir d'un corps basal, relié à son centriole fils. (B,F) Coupe transversale de l'axonème du cil mobile (9+2) possédant 9 doublets de microtubules A et B, des bras de dynéines externes (BDE) et internes (BDI) mais aussi des fibres radiales (FR). (C,G) Coupe transversale du collier ciliaire avec les connecteurs en forme de Y (CY). (D,H) Coupe transversale au niveau distal du corps basal possédant 9 triplets de microtubules (A,B,C) d'où se projettent des fibres de transition (FT). (E,I) Coupe transversale des 9 triplets de microtubules du côté proximal du corps basal. Chaque coupe est représentée sous forme de schéma et par une image de microscopie électronique. (D'après Perdersen et al., 2012)

d. L'acquisition des appendices et maturation en corps basal

Au-delà de leur structure propre, la dualité de fonctions des centrioles, utiles à la fois pour la mise en place du fuseau mitotique et pour la formation du cil, nécessite des éléments de régulation leur permettant de basculer d'une fonction à l'autre. L'acquisition d'appendices sur le centriole père va engendrer sa maturation en corps basal à la surface cellulaire, et ainsi permettre l'élongation du cil (Figure 3) (Pedersen et al. 2012).

Dans la région distale du centriole père, deux types d'appendices avec une symétrie d'ordre 9 sont retrouvés :

- Les appendices sub-distaux (appelés également pieds basaux dans les cellules multiciliées) sont composés de protéines telles que la ninéine, EB1, EB3 (« Microtubule-associated protein RP/EB family member ») ou Cep170 qui jouent un rôle important dans l'ancrage stable des microtubules, indispensables à la ciliogénèse (Anderson 1972). Les satellites péricentriolaires, qui forment des granules gravitant principalement autour des centrioles et composés en grande partie par la protéine PCM-1 (« Pericentriolar material 1 protein »), sont également impliqués dans l'ancrage des microtubules au centriole père (Dammermann & Merdes 2002). De manière intéressante, Yadav et collègues ont montré très récemment que CP110 était indispensable à la formation de ces fibres sub-distales (Yadav et al. 2016). Leur rôle a principalement été mis en évidence dans les cellules multiciliées dans lesquelles leur orientation va influencer l'alignement des corps basaux, le positionnement des cils et par conséquent permettre un battement ciliaire coordonné (Clare et al. 2014; Kunimoto et al. 2012). L'équipe de Tsukita a souligné l'importance de la protéine Odf2 (« Outer dense fiber protein 2 ») dans la formation du pied basal. La perte de fonction d'une isoforme de cette protéine dans la trachée de souris cause la perte du pied basal et entraîne une perte de coordination ciliaire (Kunimoto et al. 2012).

- Les appendices distaux, eux aussi indispensables à la ciliogénèse, vont murir en fibres de transition afin de permettre au centriole père en cours de devenir corps basal de se rattacher à la membrane plasmique. Cep164 est une protéine localisant spécifiquement au niveau de ces structures. Même si son rôle dans l'assemblage de ces appendices n'est pas défini, son inhibition empêche la construction du cil dans les cellules épithéliales de rétine (RPE1) (Graser et al. 2007). OFD1, précédemment décrit comme contrôlant la longueur du centriole, semble également intervenir dans la mise en place de ces appendices distaux puisque les cellules déficientes pour cette protéine sont incapables de former ces fibres, effet mis en évidence par l'absence de marquage de Cep164 (Singla et al. 2010). L'utilisation de souris déficientes pour Odf2 révèle que cette protéine est également indispensable à la mise en place de ce deuxième type d'appendices (Ishikawa et al. 2005).

La même équipe a même mis en évidence 8 ans plus tard les domaines protéiques de Odf2 impliqués dans la mise en place de chacun des appendices distaux et sub-distaux (Tateishi et al. 2013).

- Une autre structure vient coiffer l'extrémité proximale du centriole père devenu corps basal : les fibres striées. Ces filaments, composés majoritairement par la protéine rootletine ont pour principal rôle d'amortir les distorsions causées la mobilité ciliaire (active ou passive) et ainsi assurer la stabilité à long terme du cil (Yang et al. 2002; Yang et al. 2005).

C. La formation du cil

Une fois que le centriole père est devenu corps basal en acquérant ses différents appendices et en s'attachant à la surface cellulaire, il va pouvoir donner naissance au cil.

1. La zone de transition

La zone de transition correspond à la région où l'extrémité distale du corps basal va engendrer le cil. C'est à ce niveau que le microtubule C du corps basal va stopper sa croissance, et où l'axonème, composé de 9 doublets de microtubules A et B de symétrie d'ordre 9, va initier son élongation. Cette région, située juste en distal des fibres de transitions, est caractérisée par des connecteurs en forme de coupe de champagne ou de « Y » sur plusieurs rangées reliant le microtubule A de l'axonème à la membrane et formant une structure appelée collier ciliaire (Gilula & Satir 1972) (Figure 3).

L'équipe de George Witman a mis en évidence pour la première fois chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas* la présence de Cep290 (NPHP6 chez l'Homme) dans la zone de transition. L'utilisation d'un mutant leur a permis de démontrer que cette protéine est indispensable à la mise en place des connecteurs membranaires en forme de Y. De plus, Cep290 confère au collier ciliaire un rôle de barrière sélective régulant l'entrée et la sortie des protéines ciliaires (Craig et al. 2010). En effet, le mutant présente des défauts de composition protéique au niveau du cil et notamment au niveau de la balance du transport intra-flagellaire (Cf Partie I.C.2). Conservée chez les organismes ciliés, Cep290 a été associée à de nombreuses ciliopathies comme la néphronophtise (ou « NPHP » d'où le nom de la protéine chez l'Homme, NPHP6), le syndrome de Joubert, le Syndrome de Bardet-Biedl ou encore le syndrome Meckel-Grüber (MKS) et l'amaurose congénitale de Leber (Betleja & Cole 2010) (Cf Partie I.F).

Plusieurs autres protéines intervenant dans la structure du collier ciliaire (MKS : « Meckel Syndrome Protein », MKSR : « Meckel Syndrome Relative Protein », NPHP : « Nephrocystin ») ont depuis été découvertes et permettent de confirmer les observations de l'équipe de Witman Craig

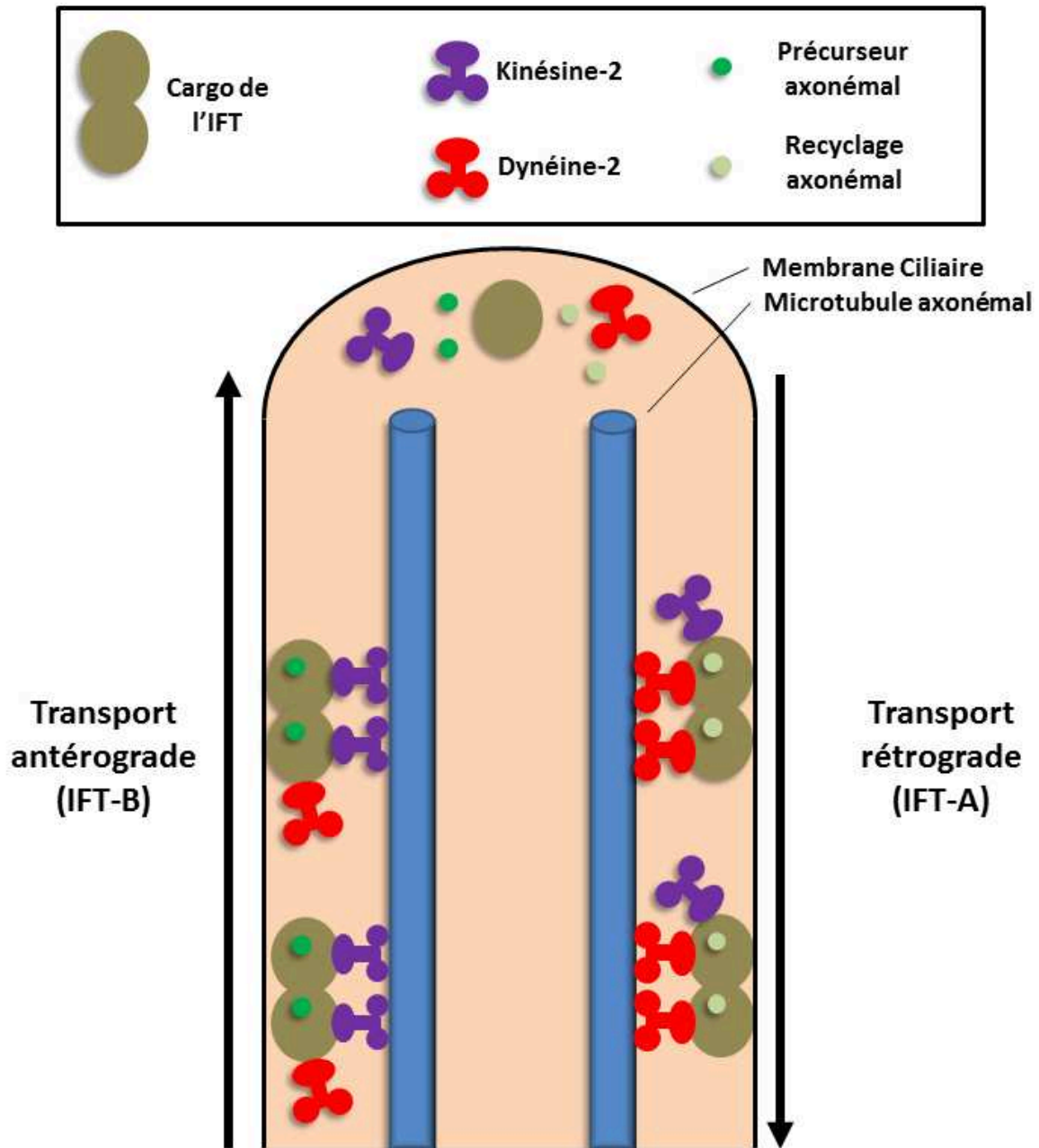


Figure 4 : Le transport intra-flagellaire (IFT)

Le transport intra-flagellaire antérograde est le mécanisme par lequel s'effectue l'apport d'éléments structuraux (comme la tubuline) au bout distal du cil où a lieu l'assemblage, permettant ainsi la croissance de l'axonème. Ce transport est guidé par la kinésine-2. Par la suite les particules axonémales sont recyclées à l'aide du transport rétrograde pris en charge par la dynéine-2.

quant au rôle sélectif de ces protéines. En effet, leur défaut entraîne l'accumulation de protéines non ciliaires le long de l'axonème (Williams et al. 2011; Li et al. 2016). Une autre protéine joue le rôle de barrière de diffusion au niveau de la zone de transition : la Septin-2 (Hu et al. 2010). Les auteurs ont utilisé la technique de redistribution de fluorescence après photo-blanchiment (FRAP en anglais pour Fluorescence Recovery After Photobleaching) afin de démontrer la diffusion de protéines de la membrane ciliaire fusionnées avec la protéine fluorescente GFP (« Green Fluorescent Protein »). L'utilisation de petits ARN non codants inhibiteurs (siARN pour small interfering ARN) contre SEPT2 (codant pour la septin-2) leur a permis de montrer que la diffusion était grandement facilitée. Cette barrière de diffusion permise par la zone de transition va donc limiter les apports au compartiment ciliaire. De plus, le cil ne présentant pas la machinerie nécessaire à l'élaboration des protéines essentielles à sa construction, ces protéines vont donc devoir être acheminées à la base du cil, traverser la zone de transition de manière sélective, et enfin être transportées sur leur site d'incorporation au sein du cil. Ainsi, l'assemblage et la maintenance de l'axonème sont permis par un mécanisme complexe de transport actif, le transport intra-flagellaire.

2. Le transport intra-flagellaire

Le transport intra-flagellaire (ou IFT pour « intraflagellar transport ») représente un système de transport moléculaire bidirectionnel extrêmement conservé au cours de l'évolution. Lors de la croissance de l'axonème, l'incorporation de nouvelles protéines se produit à l'extrémité distale du cil. Dès lors, l'IFT consiste à un transit de protéines (ou cargos) entre la membrane ciliaire et le microtubule B de l'axonème qui se déplacent de la base jusqu'à l'extrémité du cil (transport antérograde) mais également à un recyclage des particules grâce à une voie descendante (transport rétrograde) (Figure 4). Kozminski et collègues ont mis en évidence pour la première fois ce mécanisme chez *Chlamydomonas reinhardtii* en visualisant le déplacement de particules le long de l'axonème à l'aide d'un microscope à contraste interférentiel (Kozminski et al. 1993).

Le transport de blocs de construction servant à la mise en place de l'axonème intervient par train. Chaque train est composé par un complexe précis de particules dépendant du sens de transport (antérograde ou rétrograde). Ces particules ont pu être purifiées et identifiées chez *Chlamydomonas* (Cole et al. 1998). Ainsi, les protéines formant ces particules ont pu être classées en deux sous-complexes : le complexe IFT-A associé au transport rétrograde (au moins 6 protéines), et le complexe IFT-B associé au transport antérograde (au moins 11 protéines). La perte d'un des composants du complexe IFT-B engendre des défauts de ciliogénèse alors que la perte d'un membre du complexe IFT-A entraîne une accumulation des particules du complexe IFT-B à l'extrémité ciliaire.

La kinésine-2 est responsable du transport antérograde. C'est une protéine hétéro-trimérique constituée de deux sous-unités motrices KIF3A et KIF3B (« kinesin-like protein ») et une sous-unité non motrice, KAP3 (« kinesin-associated protein 3 »). Elle entraîne les trains de particules à partir de la base ciliaire jusqu'à son extrémité. A l'inverse, la dynéine cytoplasmique 2 prend en charge le transport rétrograde.

3. Le contrôle de la taille du cil

La régulation de la taille des cils est opérée de manière très précise au sein des cellules. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer ce contrôle (Fort & Bastin 2014).

Le premier modèle stipule que la taille du cil est régulée par la disponibilité de ses composants au niveau du cytoplasme. Ainsi, lorsque la réserve est épuisée, le cil s'arrête donc de croître. Néanmoins, l'existence de réserves non utilisées a été démontrée dans de nombreuses espèces.

Un deuxième modèle postule que la taille est régulée par un équilibre entre l'assemblage et le désassemblage des sous-unités de tubuline. L'axonème est en constant renouvellement et perd des sous-unités de tubuline. Cette perte nécessite donc d'être compensée par l'acheminement de nouvelles sous-unités, et c'est cet équilibre instable qui permettrait de contrôler la longueur du cil (Marshall & Rosenbaum 2001). Ce mécanisme est donc régi par le transport intra-flagellaire et plusieurs hypothèses permettent d'expliquer cette régulation :

- L'acheminement des tubulines serait dépendant de la longueur du cil. Cette hypothèse prend pour fait que le nombre de trains de particules dans le flagelle est constant. Ainsi, plus le cil est long, plus les trains mettront du temps à délivrer les précurseurs, alors que le désassemblage est plus rapide. Le cil va donc raccourcir. A l'inverse, si le cil est court, le temps d'acheminement est réduit et l'assemblage est plus conséquent que le désassemblage et le cil s'allonge.

- Une deuxième hypothèse serait que la taille des trains varierait en fonction du stade d'élongation du cil. Ainsi, un train plus gros (lorsque le cil est petit) portant plus de tubulines permettrait un assemblage plus rapide et vice versa (Engel et al. 2009).

- Enfin, une équipe a montré que le taux de précurseurs transportés par unité de temps diminue en même temps que le cil s'allonge. Ainsi, le taux de chargement des trains régulerait la longueur ciliaire (Wren et al. 2013).

Enfin, un dernier modèle prône l'existence d'un senseur capable de détecter la taille du cil et de la moduler. Cao et collègues ont en effet mis en évidence chez *Chlamydomonas* que le niveau de phosphorylation de la protéine CALK (« Chlamydomonas aurora-like protein kinase ») augmente en

même temps que le cil s'allonge (Cao et al. 2013). Cette kinase pourrait ensuite moduler les niveaux d'assemblage et ainsi contrôler la longueur ciliaire.

Une étude récente démontre l'importance du complexe APC (« Anaphase Promoting Complex ») dans la régulation de la taille du cil (Wang et al. 2014). Ce complexe, associé à son cofacteur Cdc20 (« Cell division cycle protein 20 homolog »), est recruté au niveau du corps basal où il entraîne une dépolymérisation des microtubules de l'axonème du cil primaire, menant à sa résorption. *A contrario*, l'inhibition de ce complexe provoque l'allongement du cil.

4. La structure de l'axonème et la classification des cils

L'axonème est formé par l'addition de tubulines sur l'extrémité distale du corps basale et garde donc sa symétrie d'ordre 9. Il est recouvert d'une membrane à bicouche lipidique qui est continue avec la membrane plasmique mais de composition différente en récepteurs et en canaux ioniques.

Les cils sont généralement classés dans deux catégories : mobiles (encore appelés vibratiles) ou non-mobiles (appelés également immobiles) en fonction de leur structure axonémale.

L'axonème des cils mobiles est généralement composé de 9 doublets de microtubules (A et B) entourant une paire centrale de microtubules (9+2) alors que l'axonème des cils immobiles ne possède pas de paire centrale (9+0). Même si cette règle s'applique pour la grande majorité des cas, il existe plusieurs exceptions. Par exemple, les cils mobiles du nœud embryonnaire chez les vertébrés, responsables de l'asymétrie droite-gauche, présente une structure (9+0) avec des bras de dynéines externes engendrant un mouvement circulaire du cil (Hirokawa et al. 2006). Egalement, les cils mécano-sensoriels ou kinocils dans l'oreille interne ont une structure (9+2) mais sont considérés comme immobiles. Dans la partie I.E.3, nous décrirons les différents cils non conventionnels et leur fonction chez l'Homme. Plusieurs autres exemples de structures non canoniques sont retrouvés chez *Caenorhabditis elegans* ou chez les protistes.

Hormis les microtubules, le squelette de l'axonème comporte de nombreuses structures dont certaines sont corrélées à la mobilité du cil. Tout d'abord, chaque doublet de microtubules est relié à son voisin par un lien protéique constitué de nexines qui assure une intégrité structurale à l'ensemble des microtubules. Dans le cas des cils mobiles de structure (9+2), plusieurs autres appendices viennent compléter cette architecture (Figure 3) :

- De chaque doublet de microtubules est projetée vers l'intérieur du cil une fibre radiale afin de garder les microtubules en cercle autour du doublet central.

- Le doublet central est entouré par une gaine dont les projections interagissent avec les extrémités internes des fibres radiales, permettant là encore un mouvement coordonné de l'ensemble du squelette axonémal.

- Les dynéines forment deux types de bras reliant chaque doublet adjacent de microtubules (bras externes orientant vers l'extérieur du cil et bras internes orientant vers l'intérieur). Ces protéines permettent le glissement de deux doublets de microtubules adjacents l'un par rapport à l'autre (Summers & Gibbons 1971). D'autres protéines axonémales comme les nexines vont s'opposer à ce glissement et ainsi le convertir en flexion qui va se propager le long de l'axonème, produisant le battement ciliaire (Lindemann & Lesich 2010).

D. L'apparition du cil au cours de l'évolution

La morphologie structurale du cil (9+0) ainsi que sa distribution phylogénique ont permis de montrer sa forte conservation au cours de l'évolution et suggèrent sa présence au sein du dernier ancêtre commun eucaryote (LECA pour « Last Eucaryotic Common Ancestor »). De plus, des études récentes analysant la conservation de protéines impliquées dans la fonction ciliaire corroborent cette hypothèse (Hodges et al. 2010; Carvalho-Santos et al. 2010). Il en est de même pour le cil de structure (9+2) retrouvé dans tous les embranchements eucaryotes, ce qui supposerait une origine très ancienne du cil mobile et mettrait en avant l'avantage sélectif que représenterait sa présence au sein des cellules, à l'instar de l'apparition des mitochondries. Néanmoins, l'origine de son apparition fait débat.

Pour argumenter sur ce sujet, il est important de considérer le cil dans son intégralité. Tout d'abord, le cil est issu d'un centriole, qui représente un organite singulier capable de se répliquer de manière semi-conservative. Dès lors, comme le centriole fils provient du centriole père, il revient à se demander comment le centriole est apparu pour la première fois. Par ailleurs, comme nous l'avons vu précédemment, la structure complexe du cil est permise par la mise en place d'une machinerie de transport élaborée, elle-même issue de composants fabriqués par la cellule et non pas par le cil lui-même. Enfin, le centriole, qui a une origine cytoplasmique, doit gagner la membrane cellulaire pour engendrer le cil.

L'origine du cil est intrinsèquement liée à celle du centriole, mais également à l'apparition des machineries permettant la localisation membranaire du cil ainsi que l'acheminement de protéines nécessaires à sa formation. C'est en se basant sur ces différents aspects critiques de la mise en place du cil, que trois hypothèses ont pu être élaborées :

1. L'hypothèse endo-symbiotique bactérienne

Cette hypothèse, énoncée par Lynn Margulis, stipule que le cil proviendrait d'une symbiose entre une bactérie spirochète et une cellule eucaryote (Margulis et al. 2006). Cette microbiologiste américaine est célèbre pour avoir proposé une origine symbiotique de la mitochondrie et du chloroplaste. Cependant, l'hypothèse d'une origine endo-symbiotique bactérienne du cil a connu de nombreux détracteurs. Tout d'abord, aucune étude de génomique comparative n'a permis de retrouver des gènes impliqués dans la formation du cil chez les spirochètes. De plus, les flagelles des bactéries spirochètes sont très éloignés structurellement des cils eucaryotes et ne sont pas issus d'un centriole. Enfin, un cil issu d'une endo-symbiose devrait posséder deux membranes (provenant du spirochète et de la cellule hôte), ce qui n'est pas le cas (Satir et al. 2008).

2. L'hypothèse endo-symbiotique virale

Satir et collaborateurs proposent quant à eux une origine endo-symbiotique à partir d'un virus enveloppé à ARN de symétrie d'ordre 9. Selon elle, la structure de base du virus (sa capsid) aurait formé le cartwheel du centriole. Le génome du virus se serait alors intégré au sein de celui de la cellule hôte permettant alors sa reformation grâce à la machinerie cellulaire. Le virus encapsidé représentant l'ébauche d'un centriole aurait alors fusionné avec la membrane plasmique par des vésicules d'exocytose et une mutation propre à son encapsulation l'aurait contraint à être bloqué à la membrane. Ce n'est que plus tard que l'élongation des microtubules formant l'axonème serait apparue (Satir et al. 2008). Même si cette théorie tient compte de la composition structurale du cil, de son origine centriolaire, les arguments avancés sont difficilement testables. Tout d'abord, aucun virus avec une symétrie d'ordre 9 n'a été trouvé dans la nature. De plus, aucune protéine centriolaire n'a été retrouvée comme participant à la capsid d'un virus.

3. Le modèle endogène

Une troisième hypothèse imaginée par Pickett-Heaps prône une origine endogène des centrioles et du cil à partir d'un MTOC organisant les microtubules mitotiques et cytoplasmiques (Pickett-Heaps 1974). La symétrie d'ordre 9 relèverait alors d'une adaptation à la mobilité ciliaire au cours de l'évolution. Les deux arguments donnant du poids à cette théorie sont les suivants :

- Aucune protéine homologue aux protéines centriolaires ou ciliaires n'est retrouvée chez les bactéries, les archées ou les virus.

- Plusieurs protéines intervenant dans l'architecture ou la fonction du centriole ou du cil telles les tubulines, les dynéines ou des membres du transport intra-flagellaire sont également des

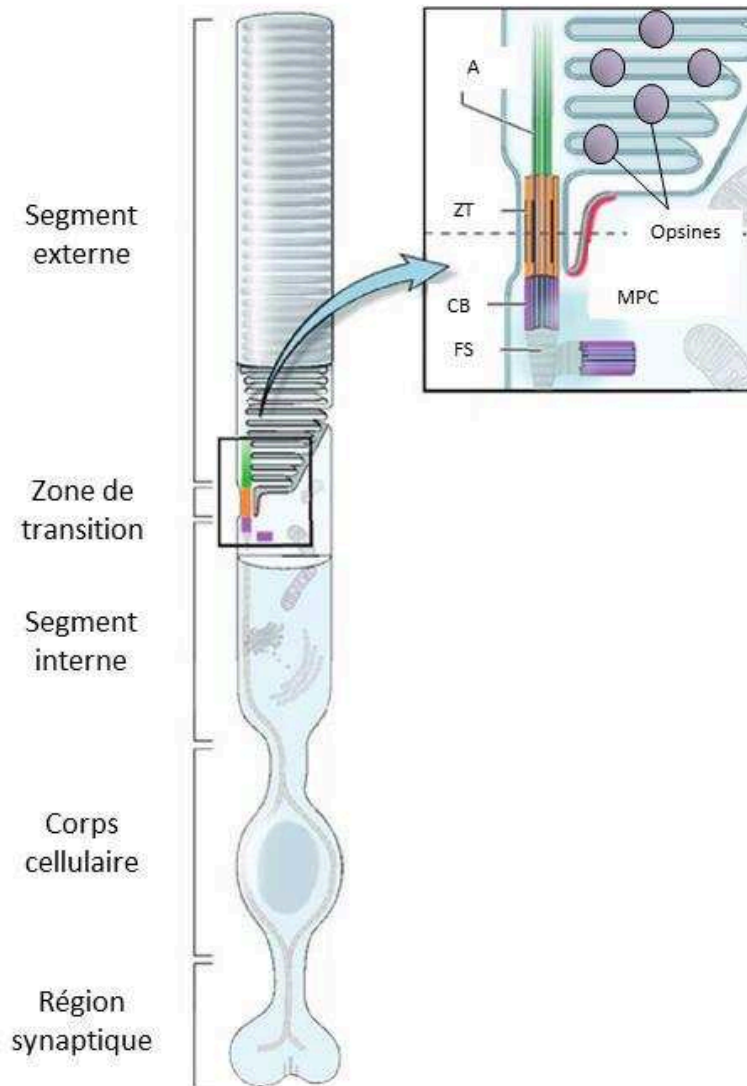


Figure 5 : Cellule photosensible (bâtonnet)

La membrane ciliaire du bâtonnet, située dans la région appelée segment externe, forme de multiples replis dans lesquels se situent les photorécepteurs appelés opsines, capables de transformer l'énergie lumineuse en signal chimique par l'hydrolyse de GMPc. A : Axonème ; ZT : Zone de transition ; MPC : Matériel Péricentriolaire ; CB : Corps basal ; FC : Fibres striées. (D'après Rachel et al., 2012)

protéines cytoplasmiques ayant d'autres rôles cellulaires comme la mise en place du fuseau mitotique.

E. Les fonctions ciliaires

Après avoir discuté de l'architecture globale du cil et de sa mise en place au sein de la cellule, je vais maintenant décrire ses différents rôles. Ces derniers varient en fonction de l'état de mobilité du cil, des espèces mais également des tissus considérés. En prenant des exemples chez l'Homme, je vais me focaliser dans cette partie sur le cil primaire immobile, puis sur les cils mobiles présents par centaines à la surface de cellules spécialisées appelées cellules multiciliées. Je terminerai cette partie en évoquant quelques exceptions infirmant la relation structure/mobilité.

1. Le cil primaire

A l'inverse des cils mobiles, présents uniquement au sein d'un nombre restreint de cellules spécialisées, le cil primaire non mobile est présent, au moins transitoirement, dans quasiment tous les types cellulaires des vertébrés, en une seule copie. Bien que longtemps considéré comme une structure vestigiale sans fonction cruciale, le cil primaire est maintenant reconnu comme senseur essentiel de la cellule, coordonnant un nombre important de voies de signalisation (Singla 2006). L'importance du cil primaire pour le développement des vertébrés a été mise en évidence pour la première fois chez la souris. L'équipe d'Anderson a en effet montré à l'aide de mutants de protéines impliquées dans le transport intra-flagellaire que le cil est indispensable à la survie de l'embryon et à la régionalisation des différentes structures cérébrales (Huangfu et al. 2003).

Je vais présenter de manière non exhaustive divers processus physiologiques dans lequel le cil primaire est impliqué, tels que son rôle dans la vision, son implication comme mécano-senseur dans le rein ou encore sa fonction dans la modulation des voies de signalisation.

a. Le cil primaire et la vision

Le cil primaire participe aux processus physiologiques de la vision. Les cellules photosensibles (les bâtonnets et les cônes) présentes au fond de l'œil permettent la conversion d'un signal lumineux en signal électrique (Figure 5) (Rachel et al. 2012). La photo-réception est permise par l'extrémité du cil primaire appelée segment externe composé d'un empilement d'une centaine de lamelles membranaires spécialisées dans la réception et la conduction de la lumière. Les récepteurs photosensibles (opsines), présents sur ce segment externe, sont activés par un signal lumineux (photons), ce qui va induire l'hydrolyse du second messager, la Guanosine MonoPhosphate cyclique

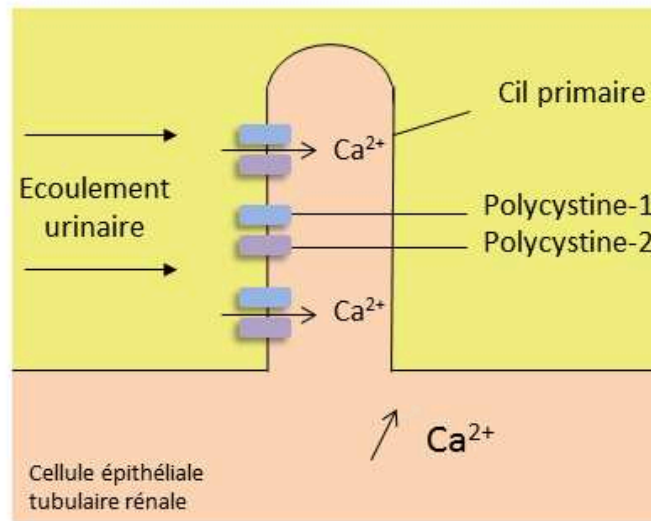


Figure 6 : Cil primaire dans le rein

Au niveau des cellules épithéliales tubulaires, le cil primaire est sensible à l'écoulement urinaire dont le flux active les canaux ioniques polycystines, entraînant une entrée massive de calcium dans la cellule.

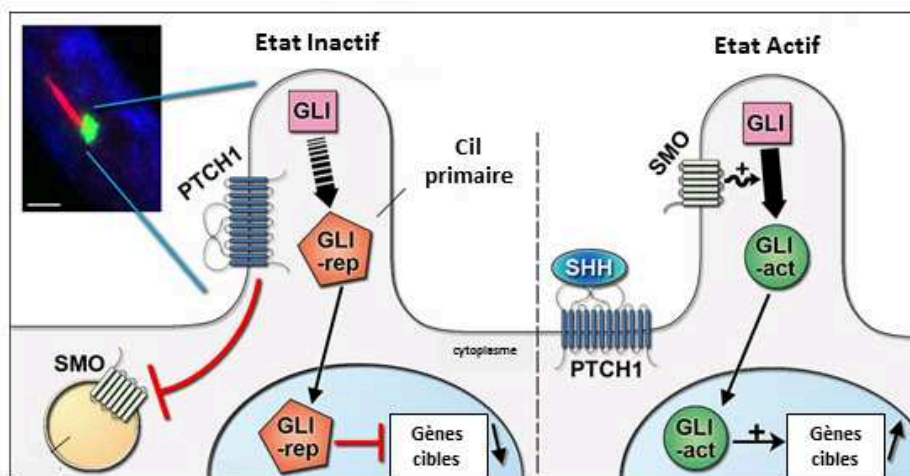


Figure 7 : Voie de signalisation Sonic Hedgehog et cil primaire

La fixation d'un ligand (ici SHH pour Sonic HedgeHog) sur le récepteur Patched-1 (PTCH1) entraîne une levée de répression de Smoothened (SMO). Celui-ci va pouvoir migrer dans le cil primaire et activer les facteurs GLI, qui à leur tour vont migrer dans le noyau afin d'activer la transcription de gènes cibles.

(GMPc). L'hydrolyse du GMPc entraîne la fermeture de canaux ioniques et l'hyperpolarisation des cellules photosensibles. La perturbation de l'activité électrique cellulaire est alors propagée par le nerf optique, puis vers le cerveau qui intègre le signal lumineux.

b. Le cil primaire comme mécano-senseur dans le rein

Au niveau des cellules épithéliales tubulaires du rein, le cil a un rôle mécano-sensoriel en fonction de l'écoulement de l'urine (Figure 6). En effet, l'écoulement d'urine dans les tubules rénaux provoque une courbure directionnelle du cil dépendamment du flux. En réponse à cette déflexion, un complexe dimérique de canaux ioniques appelés polycystine-1 et -2 s'active et permet l'entrée massive de calcium intracellulaire (Nauli et al. 2003). La concentration calcique intracellulaire élevée déclenche des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la prolifération ou de la différenciation de ces cellules. Des défauts au niveau de ce cil primaire peuvent causer des modifications inadéquates de courbure en réponse au flux urinaire et dérégler la balance calcique, engendrant une prolifération cellulaire non contrôlée et la formation de kystes, comme cela est observé dans la polykystose rénale (Bisceglia et al. 2006)

c. Le cil primaire comme modulateur des voies de signalisation

Le cil primaire étant apparenté à une « antenne » cellulaire capable de capter différents signaux physiques ou chimiques extracellulaires, son implication dans des cascades de signalisation cellulaires a été fortement soupçonnée. Huangfu et collaborateurs ont été les premiers à établir un lien fonctionnel entre le cil primaire et une voie de signalisation, la voie Hedgehog, au cours du développement embryonnaire chez la souris (Huangfu et al. 2003). Chez les vertébrés, la voie Hedgehog (Hh) commute entre un état inactif et un état actif par la conversion de facteurs de transcription appelés GLI (« zinc finger protein GLI ») d'une forme répressive à une forme activatrice (Figure 7). Deux protéines transmembranaires sont à l'origine de l'état d'activation des facteurs GLI, la protéine Smoothed (SMO) et le récepteur Patched-1 (PTCH1). En absence de signaux extracellulaires, PTCH1 séquestre SMO sous forme inactive et les facteurs de transcription GLI sont alors présents sous forme répressive à l'extrémité du cil primaire. Ils migrent ensuite jusqu'au noyau où ils inhibent le programme transcriptionnel HedgeHog. Lorsqu'un ligand Hh s'associe avec PTCH1, ce dernier libère SMO, qui va migrer au niveau du cil primaire où il va activer les facteurs GLI. Ces derniers vont ensuite migrer jusqu'au noyau pour activer un programme transcriptionnel (Corbit et al. 2005; Haycraft et al. 2005). En revanche, le blocage du transport de SMO dans le cil bloque la transduction du signal démontrant ainsi l'aspect essentiel du cil dans cette voie.

2. Les cils mobiles

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le grand nombre d'espèces en disposant suggère une apparition très ancienne du cil de structure (9+2). Ce très large panel d'organismes eucaryotes va de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas* à l'Homme. Les toutes premières fonctions associées à la mobilité du cil seraient liées au déplacement de l'organisme, notamment par glissement. Ce mécanisme est décrit dans quelques espèces comme *Chlamydomonas* (Bloodgood 1981). Plus tard, l'acquisition de mouvements élaborés comme la vibration ou la courbure du cil aurait permis de nouveaux avantages sélectifs. Ces mouvements, permettant de créer un courant dans le milieu extracellulaire favoriseraient l'apport de nutriments à l'organisme. De plus, l'ondulation aurait permis une forme de nage aux organismes immergés (Mitchell 2004).

Si certaines cellules eucaryotes ne comportent qu'un ou deux cils, d'autres cellules, hautement spécialisées, peuvent posséder jusqu'à plusieurs centaines de cils mobiles à leur surface, qui battent de manière coordonnée et synchrone. Ces cellules sont dites multiciliées (ou MCC pour « Multiciliated Cells »). Malgré leur importance, particulièrement chez l'Homme, nos connaissances sur ces cellules sont encore limitées. Notamment, leur origine évolutive demeure très floue. Malgré tout, le processus de multi-ciliation présent chez des organismes eucaryotes unicellulaires tels que *Tetrahymena thermophila* ou *Paramecium* met en évidence leur apparition très tôt dans le règne eucaryote. Dans le cas de ces organismes primaires, ces cils servent à la locomotion. Les MCC sont conservées chez les vertébrés et jouent un rôle essentiel dans la propulsion des fluides biologiques.

Les détails concernant les mécanismes de la différenciation des MCC chez les vertébrés seront abordés plus tard dans ce manuscrit (Cf Partie IV). A ce stade ne seront évoquées que les fonctions associées à ces MCC chez l'Homme ainsi que les pathologies associées à un défaut de ces cellules.

Chez l'Homme, les MCC sont retrouvées dans quatre tissus différents où elles sont associées à différentes fonctions en lien avec la propulsion de fluides.

a. *Les parois ventriculaires cérébrales*

Au niveau de la paroi des ventricules cérébraux, des MCC appelées épendymocytes vont participer à la circulation du liquide céphalorachidien. Ces cellules ciliées ont été observées pour la première fois en 1836 par Gabriel Gustav Valentin. Worthington et collaborateurs ont confirmé cette observation en 1963 après analyse de cerveaux humains après autopsie. Ils ont ainsi pu montrer que ces cils étaient effectivement mobiles et ont supposé leur implication dans le mouvement du liquide céphalorachidien (WORTHINGTON & CATHCART 1963). Les épendymocytes sont des cellules gliales cylindriques multiciliées et polarisées qui forment un tissu dit « pseudoépithélial ». La présence de cellules multiciliées épendymales a été observée dans les zones ventriculaires d'autres vertébrés

comme les poissons, les reptiles, les oiseaux (Ogino et al. 2016; García-Verdugo et al. 2002) mais aussi la souris.

b. Les voies respiratoires

Les voies respiratoires sont en contact permanent avec des particules toxiques ou des agents pathogènes présents dans l'air. L'épithélium respiratoire des voies supérieures présente la première ligne de défense vis-à-vis de ces agressions constantes. Les MCC, qui tapissent cet épithélium pseudo-stratifié participent à cette barrière physiologique en évacuant les particules inhalées piégées dans le mucus sécrété en surface de l'épithélium. Le battement coordonné des cils mobiles propulse le mucus vers l'extérieur de l'organisme où il peut être ensuite expectoré ou avalé. Ce mécanisme est appelé clairance mucociliaire. L'intégrité de cette barrière de défense dépend d'autres facteurs, comme les paramètres physico-chimiques du mucus, la sécrétion épithéliale de molécules antimicrobiennes et de cytokines capables d'induire une réponse immunitaire adaptée.

c. L'oviducte

Chez les mammifères, un épithélium mucocilié, composé de MCC et de cellules sécrétrices de mucus tapissent la lumière de l'oviducte (appelé aussi trompes de Fallope chez l'Homme). L'oviducte est divisé en 4 parties distinctes de l'ovaire à l'utérus : la fimbria, l'infundibulum, l'ampulla et l'isthmus. Environ 50% des cellules épithéliales sont multiciliées au niveau de la fimbria pour décroître à environ 30% au niveau de l'isthmus. Le battement ciliaire permet la migration de l'ovule dans les trompes de Fallope jusqu'au lieu de nidation, avec l'aide de contractions musculaires.

Halbert et collaborateurs ont d'ailleurs voulu évaluer la contribution des cils et des muscles dans le transport de l'ovule chez le lapin. En inhibant la contraction musculaire des trompes utérines avec de l'isoproterenol, ils ont démontré que l'ovule était tout de même capable de rejoindre le lieu de nidation, dénotant le rôle prépondérant des cils sur les muscles quant à la migration de l'ovule (Halbert et al. 1976). Récemment, une étude a permis de nuancer ces résultats puisque les auteurs ont montré que des femmes possédant des défauts ciliaires sévères ont été capables de donner naissance normalement, minimisant ainsi le rôle du battement ciliaire (Raidt et al. 2015). Il n'est donc pas impossible que les composantes ciliaires et musculaires soient mutuellement exclusives et que l'une fonctionne lorsque l'autre est à l'arrêt.

d. Les canaux efférents des testicules

Le tractus génital masculin est constitué de voies successives permettant la formation, la maturation et le transport des spermatozoïdes. Les tubes séminifères testiculaires (siège de la formation des spermatozoïdes) débouchent dans un réseau labyrinthique de canaux à épithélium pavimenteux, le rete testis. Ce dernier est ensuite connecté à la tête de l'épididyme par 10 à 12

canaux ou cônes efférents de 20 cm de long sur 0,2 mm de diamètre. La lumière de ces canaux efférents est dessinée par un épithélium pseudo-stratifié cylindrique, composé de MCC qui participent à la progression des spermatozoïdes déjà poussés par la pression du liquide séminal. L'épithélium est cerné par un manchon de quelques fibres musculaires lisses contenues dans un tissu conjonctif lâche très vascularisé. Les contractions péristaltiques de la tunique musculaire lisse participent aussi au transit des spermatozoïdes. De manière très intéressante, une étude récente a montré qu'un défaut de formation des MCC chez la souris rend les mâles stériles, mettant en évidence l'importance physiologique de ces cellules. En utilisant des souris KO (knock-out) pour des gènes indispensables à la formation de MCC, cette équipe a déterminé que leur absence entraîne une accumulation des spermatozoïdes dans les canaux efférents ainsi que dans le rete testis (Danielian et al. 2016).

3. Les autres types de cils

Bien que la structure du cil soit très largement corrélée à sa mobilité, il existe des contre-exemples de cils de structure (9+0) étant néanmoins mobiles comme dans le cas du cil primaire du nœud embryonnaire et des cils multiples retrouvés au niveau du plexus choroïde. A l'inverse les cils responsables de l'olfaction et l'audition sont de structure (9+2) et sont immobiles.

a. Le cil primaire du nœud embryonnaire

Au sein des vertébrés, la plupart des organes viscéraux possèdent une asymétrie gauche/droite par rapport à l'axe du corps. Cette asymétrie est acquise lors du développement embryonnaire grâce à une structure appelée nœud embryonnaire qui coordonne la mise en place des 3 axes majeurs de l'embryon (antéro-postérieur, dorso ventral, et droite gauche)(Hamada et al. 2002).

Nonaka et collaborateurs ont démontré en 1998, à l'aide de billes fluorescentes observées en vidéo microscopie, que c'est le mouvement des cils primaires de ce nœud embryonnaire qui initie la mise en place de cette asymétrie gauche/droite (Nonaka et al. 1998). Ces cils, de structure (9+0), sont animés d'un mouvement circulaire (tournant dans les aiguilles d'une montre lorsque l'on regarde depuis la face ventrale) d'environ 600 tours par minute, provoquant la formation d'un flux calcique vers la gauche autour du nœud. Plus récemment, plusieurs équipes ont précisé que la mise en place de l'asymétrie est due à la présence de deux types de cils primaires : des cils mobiles au centre du nœud possédant des bras de dynéines et générant le flux calcique, et des cils immobiles sensibles à ce gradient calcique asymétrique grâce à des récepteurs spécifiques (les polycystines) (McGrath et al. 2003; Yoshida et al. 2012). Cette vague calcique interprétée par les cellules de la face gauche du nœud via les polycystines va entraîner une seconde vague calcique dans les cellules

mésodermes avoisinantes déclenchant par la suite la cascade de signalisation aboutissant à la mise en place de l'asymétrie gauche/droite (Shiulou Yuan et al. 2015).

Par ailleurs, les souris mutantes pour des protéines majeures du cil primaire, telles que les kinésines kif3a et kif3b, présentent un flux nodal inexistant, et par conséquent possèdent des problèmes d'asymétrie gauche/droite (Nonaka et al. 1998; Takeda et al. 1999; Marszalek et al. 1999).

b. Les cils multiples des cellules du plexus choroïde

Le plexus choroïde est un tissu très vascularisé formant une saillie au sein des ventricules cérébraux. Les cellules épithéliales le tapissant ont pour principale fonction la production du liquide céphalo-rachidien (Damkier et al. 2013). Contrastant avec les épendymocytes voisins, ces cellules épithéliales du plexus choroïde possèdent une à deux douzaines de cils de structure (9+0) (Narita et al. 2010). La particularité de ces cils est leur mobilité transitoire lors de la période périnatale chez la souris. Leur battement est caractérisé par une faible fréquence, une faible amplitude ainsi qu'une orientation aléatoire ne permettant pas la propulsion du liquide céphalo-rachidien. Cette mobilité, dont le rôle est à ce jour inconnu, atteint un pic le jour de la naissance puis décline progressivement les 2 semaines suivantes (Narita & Takeda 2015).

c. Les cils de l'olfaction

L'olfaction est le sens qui permet d'analyser les substances chimiques volatiles (odorants) environnantes. Des complexes odorants se fixent sur des récepteurs olfactifs appartenant à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) exprimés par des neurones sensoriels olfactifs. Le corps cellulaire de ces neurones présente une longue dendrite qui se termine au niveau de la cavité nasale par un bouton olfactif composé de plusieurs cils non mobiles (9+2) sur lesquels sont exprimés les récepteurs olfactifs. La liaison d'un complexe odorant sur un récepteur déclenche une voie de signalisation de second messenger, principalement l'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique). Des niveaux élevés de second messenger engendrent par la suite une dépolarisation membranaire par activation de canaux ioniques également présents à la membrane ciliaire (Nakamura & Gold 1987). Ce signal induit par une molécule odorante est ensuite propagé jusqu'au bulbe olfactif pour y être analysé et intégré.

d. Les cils de l'équilibre

Dans l'oreille interne, le vestibule est une structure sensorielle située entre les canaux semi-circulaires en arrière et la cochlée en avant et jouant un rôle primordial dans l'équilibre du corps et dans l'orientation dans l'espace. Cette caractéristique est permise par des cellules ciliées (internes et externes) peuplant ce vestibule. Ces cellules sont composées d'un long cil appelé kinocil immobile de structure (9+2) jouxtant 40 à 70 « stéréocils » qui sont des excroissances de filaments d'actine

ordonnées en plusieurs rangées de tailles croissantes. Stéréocils et kinocil sont connectés par différents liens protéiques, si bien que lorsque le corps est en mouvement, l'inclinaison des stéréocils par rapport au kinocil va moduler un influx nerveux. En effet, un rapprochement des stéréocils vers le kinocil entraîne une dépolarisation de la cellule ciliée alors que leur éloignement cause une hyperpolarisation.

F. Les ciliopathies

Le terme « ciliopathies », utilisé pour la première fois par Heinz David en 1990, regroupe un ensemble de maladies dont l'étiologie repose sur la dysfonction des cils primaires ou des cils mobiles (David 1990). La difficulté du diagnostic de ces maladies repose sur la large hétérogénéité génétique en cause ainsi que le chevauchement phénotypique entre différents syndromes. Comme nous l'avons vu précédemment, des centaines de gènes ont été catalogués dans le ciliome et la mutation de l'un d'entre eux peut potentiellement causer une ciliopathie. C'est pourquoi un nombre croissant de pathologies, pourtant cliniquement reconnues, s'intègrent progressivement dans ce groupe au fur et à mesure de la découverte de leurs causes génétiques.

On distingue les ciliopathies affectant le cil primaire des ciliopathies affectant les cils mobiles appelées dyskinésies ciliaires.

1. Les ciliopathies du cil primaire

La présence quasi ubiquitaire du cil primaire dans les cellules des vertébrés ainsi que le large panel de fonctions qui lui sont attribuées permettent de comprendre la véritable mosaïque de phénotypes causées par sa dysfonction. Dans les ciliopathies par atteinte du cil primaire, les manifestations cliniques observables sont nombreuses et variées. Il peut s'agir de kystes rénaux, hépatiques ou pancréatiques, d'une dégénérescence rétinienne, d'une anosmie, d'une polydactylie, ou encore d'un retard mental ou d'une dysplasie osseuse. Le diagnostic repose alors sur la présence d'une combinaison précise de signes cliniques. Par ailleurs, chaque syndrome peut être associé à la mutation d'un ou plusieurs gènes, et une mutation sur un gène donné peut être responsable de différents tableaux cliniques.

Cette hétérogénéité génétique est bien illustrée par le syndrome de Joubert, une maladie autosomique récessive caractérisée par une atteinte du tronc cérébral et du cervelet. Chez le nourrisson, une hypotonie, des troubles du rythme respiratoire ainsi que des mouvements anormaux au niveau des yeux sont observés. Plus tard, des troubles de l'équilibre (ataxie), de la coordination



Figure 8: Exemple de polydactylie observée dans le syndrome de Bardet-Biedl

des mouvements ainsi que de l'apprentissage sont révélés. A ce jour, une vingtaine de gènes ont été associés à cette maladie. De manière très frappante, la grande majorité de ces gènes codent pour des protéines interagissant au sein de la zone de transition du cil primaire. Ce complexe multi-protéique forme donc un « module fonctionnel », pour lequel une ou plusieurs altérations (mutation d'un ou plusieurs membres) suffisent à engendrer les symptômes énoncés (Garcia-Gonzalo et al. 2011).

Des exemples similaires sont retrouvés pour les syndromes de Meckel et de Bardel-Biedl. En effet, ces ciliopathies résultent de mutations affectant des gènes codant pour des protéines associées à des complexes situées au niveau de la zone de transition.

Le syndrome de Meckel est associé à diverses manifestations telles que des kystes rénaux et hépatiques, des anomalies de développement du système nerveux central, une dysplasie des voies biliaires ainsi qu'une polydactylie. Là encore, les gènes incriminés codent pour des protéines de la zone de transition du cil (notamment MKS1, 2 et 3 pour « Meckel Syndrome »). Etonnament, plusieurs gènes sont à la fois associés au syndrome de Joubert et au syndrome de Meckel, dénotant les frontières parfois floues entre différentes ciliopathies.

Le syndrome de Bardet-Biedl (ou BBS) est une ciliopathie à atteintes multi-viscérales. Il est défini par une combinaison de signes cliniques dont la plupart ne se déclarent que quelques années après la naissance : une obésité, une rétinopathie pigmentaire, une polydactylie post-axiale, une atteinte de la fonction rénale, un hypogénitalisme et des difficultés d'apprentissage (Figure 8). La particularité génétique de cette maladie réside dans le fait qu'environ 80% des mutations observées pour ce syndrome ont été recensées dans des gènes codant pour des protéines présentes au sein du BBSome (18 gènes : BBS1-18), un complexe indispensable à la mise en place du cil (Nachury et al. 2007; M'hamdi et al. 2014).

Ces trois maladies démontrent la complexité génétique des ciliopathies et mettent en évidence l'importance de structures ciliaires dans l'établissement de phénotypes pathologiques. Par ailleurs, l'interconnexion de protéines regroupées en modules fonctionnels est elle aussi très complexe. Bachmann-Gagescu a tenté de mettre en évidence le réseau constitué par ces différents modules afin d'en souligner sa complexité dans la compréhension des ciliopathies (Figure 9) (Bachmann-Gagescu 2014).

2. Les dyskinésies ciliaires primitives

Les dyskinésies ciliaires primitives (DCP) sont des maladies génétiques rares liées à une anomalie fonctionnelle et/ou structurelle des cils mobiles. Contrairement aux ciliopathies

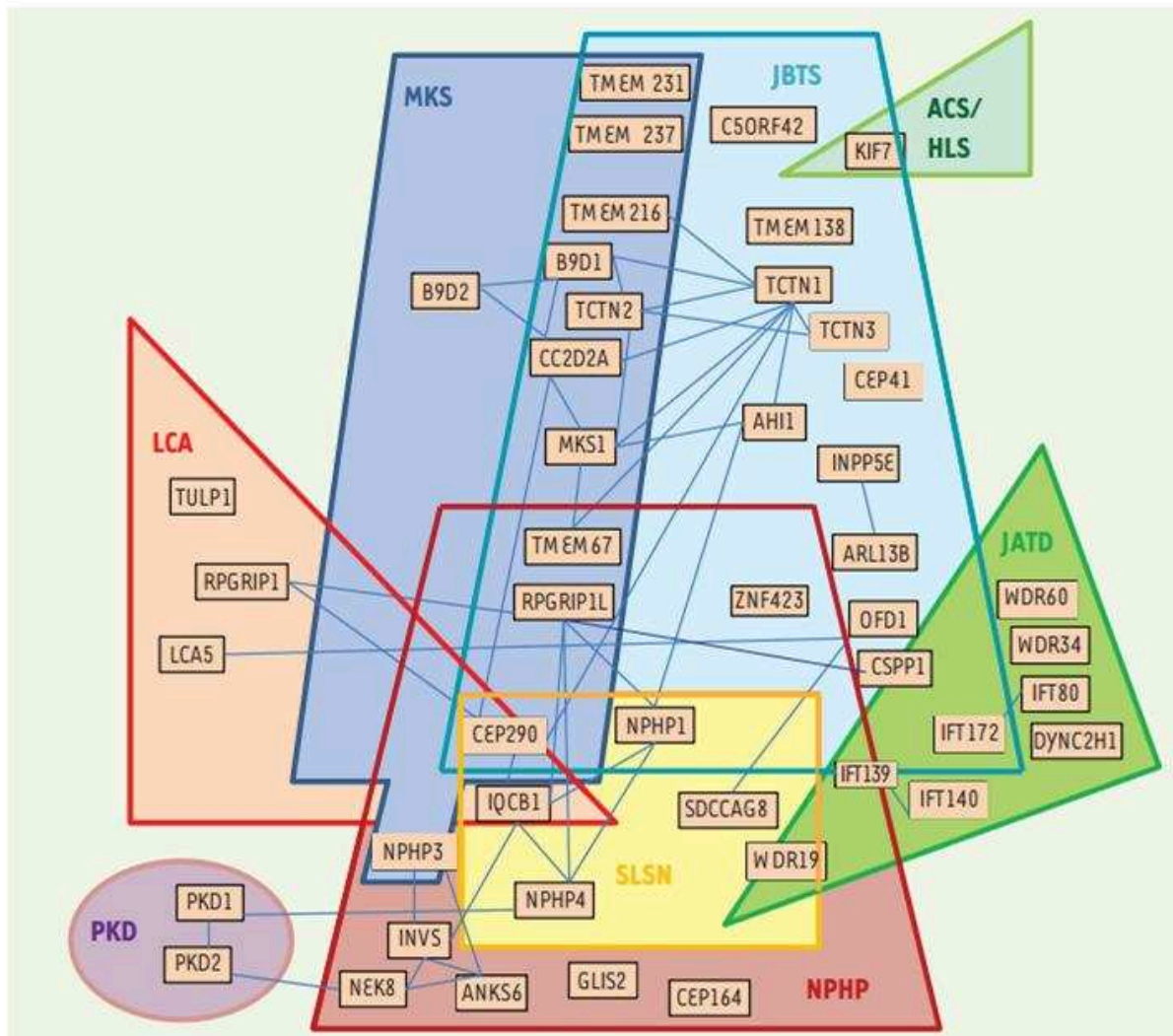


Figure 9 : Chevauchement des modules génétiques correspondant à diverses ciliopathies

Chaque forme géométrique regroupe les gènes atteints dans une ciliopathie donnée et les intersections des différentes formes indiquent les chevauchements génétiques entre divers syndromes. JSRD : syndrome de Joubert et maladies associées ; MKS : syndrome de Meckel ; JATD : dystrophie thoracique asphyxiante de Jeune ; NPHP : néphronophtise ; SLSN : syndrome de Senior-Løken ; PKD : maladie polykystique rénale dominante ; ACS : syndrome acrocalleux ; HLS : syndrome hydrolethalus fœtal ; LCA : amaurose congénitale de Leber. (Bachmann-Gagescu 2014)

précédemment énoncées, ces dernières vont affecter des tissus où sont présents les cils mobiles. Les défauts sont principalement respiratoires où l'on observe une dilatation des bronches, une augmentation de sécrétion de mucus ou encore des sinusites chroniques. La DCP est la deuxième maladie congénitale des voies respiratoires la plus fréquente après la mucoviscidose. Notamment, le défaut d'épuration mucociliaire, dû à la dysfonction des centaines de cils vibratiles des MCC, entraîne l'apparition d'infections respiratoires chroniques, et ceci dès la naissance.

Par ailleurs, dans 50% des cas, il existe un *situs inversus*, correspondant à une position dite « en miroir » des organes et des viscères. On parle alors de syndrome de Kartagener. Cette inversion est causée par la dysfonction des cils primaires du nœud embryonnaire, empêchant la mise en place de l'asymétrie gauche/droite.

Les cils mobiles étant également présents au niveau des épendymocytes ventriculaires, les formes sévères de DCP présentent parfois une hydrocéphalie, causée par le manque de drainage du liquide céphalo-rachidien.

Enfin, des problèmes de fertilité sont également retrouvés associés aux DCP, s'expliquant par le manque de mobilité ciliaire empêchant le bon transport des ovules et spermatozoïdes le long des voies génitales.

3. Les dyskinésies ciliaires secondaires

Les dyskinésies ciliaires secondaires (DCS) sont des pneumopathies avec atteinte des cellules épithéliales multiciliées causées par des lésions pulmonaires résultant d'infections respiratoires ou d'inflammation chronique. Elles ont pour conséquence d'altérer le transport mucociliaire dans les voies respiratoires, facilitant ainsi à nouveau la colonisation infectieuse des voies respiratoires supérieures et inférieures. Les principales DCS sont l'asthme, la mucoviscidose et les bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO). Je décrirai ces 3 pathologies succinctement.

a. *L'asthme*

L'asthme est une maladie respiratoire chronique caractérisée notamment par une inflammation des bronches et des bronchioles. Aux Etats-Unis, elle touche 25 millions de personnes et environ 8% des enfants (Moorman et al. 2007). Les manifestations cliniques de l'asthme sont une respiration difficile et sifflante, des épisodes répétés d'essoufflement, une toux récurrente. Ces symptômes sont causés par l'obstruction des voies respiratoires, conséquence d'une réponse exacerbée de l'ensemble des voies respiratoires à différents stimuli. C'est une maladie complexe, impliquant de nombreux acteurs cellulaires (Locksley 2010). Notamment, deux types cellulaires vont être critiques dans la pathogénicité de l'asthme : les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses.

Les cellules épithéliales initient l'inflammation et entraînent une production excessive de mucus, contribuant de manière importante à l'obstruction des bronches et bronchioles. Chronologiquement, les stimuli liés aux particules inhalées (allergènes, protéases, virus, polluants) déclenchent la sécrétion par les cellules épithéliales de cytokines TSLP (pour Thymic stromal lymphopoietin), d'interleukines IL-25 et IL-33. Ces médiateurs agissent par la suite sur les cellules immunes sub-épithéliales qui entraînent la libération de cytokines (principalement IL-5 et IL-13) par les lymphocytes Th2 (Barlow et al. 2013). Cette réponse initiale est ensuite amplifiée par le recrutement et la différenciation de certaines cellules T, engendrant une sécrétion continue de ces cytokines. Ces dernières agissent sur les cellules épithéliales et musculaires entraînant une réponse inadaptée contribuant aux symptômes énoncés. Notamment, les agressions chroniques vont entraîner un remodelage de l'épithélium caractérisé par une hyperplasie des cellules productrices de mucus, une fibrose sub-épithéliale ainsi qu'une hypertrophie et hyperplasie des cellules musculaires lisses.

La contribution des fibres musculaires lisses longeant les voies respiratoires est également importante dans la pathogénicité de l'asthme. En effet, les sujets atteints présentent une contractilité accrue de ces fibres, aboutissant au rétrécissement des voies aériennes, à la détresse respiratoire et pouvant entraîner la mort. Cette contraction anormale peut être induite par des neuromédiateurs (comme l'acétylcholine) libérés par le système nerveux parasympathique en réponse à des stimuli environnementaux. Les asthmatiques sont notamment hypersensibles à ces signaux nerveux. Par ailleurs, des cytokines libérées au cours d'un épisode asthmatique telles que l'IL-13 et l'IL-17 sont capables d'induire l'expression de la petite GTPase RhoA, qui est un effecteur important de la contractilité musculaire (Chiba et al. 2009; Kudo et al. 2012).

Biju Thomas et collègues ont évalué la fonction ciliaire chez des patients atteints d'asthme (B. Thomas et al. 2010). L'observation de l'ultrastructure de l'épithélium respiratoire leur a permis de mettre en évidence une diminution du nombre de MCC accompagnée d'une mauvaise orientation des cils ainsi qu'une réduction de leur fréquence de battement.

b. La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)

La BPCO est définie comme une maladie inflammatoire chronique obstructive des voies respiratoires partiellement réversible. Cette pathologie devient cliniquement apparente chez des sujets âgés (plus de 40 ans) bien que les causes primaires peuvent exister depuis l'enfance. Elle atteint plus de 3,5 millions de personnes et tue 16000 malades en France chaque année. La BPCO est très hétérogène en termes de symptômes, de progression et de réponse aux traitements (Postma et al. 2015).

Phénotypiquement, 3 altérations principales sont observées chez les patients avec BPCO :

- Une obstruction des bronches et bronchioles
- Un emphysème
- Une bronchite chronique

La principale cause de la BPCO est le tabagisme qui est un facteur de risque retrouvé chez 80% des patients. La fumée de cigarette provoque une perte de cellules ciliées et par conséquent une diminution de la clairance mucociliaire, une hypertrophie des glandes muqueuses et une augmentation de la sécrétion de mucus. Comme dans d'autres maladies chroniques inflammatoires du tissu respiratoire, le défaut de clairance du mucus associé à sa surproduction favorise la colonisation microbienne.

D'autres facteurs de risque existent, en particulier la pollution de l'air ainsi que les expositions professionnelles ou domestiques à des poussières et des substances chimiques. Des infections des voies respiratoires inférieures fréquentes au cours de l'enfance peuvent aussi créer un terrain propice au développement ultérieur de la BPCO.

Les symptômes cliniques observés, tels que la toux récurrente et la dyspnée dénotent d'un rétrécissement des voies aériennes, tout comme dans l'asthme. Néanmoins, ces deux pathologies, malgré un certain recouvrement, possèdent des caractéristiques bien distinctes et des mécanismes cellulaires sensiblement différents. Au niveau physiopathologique, les modifications de la musculature lisse bronchique et la déposition d'une matrice de collagène sous-épithéliale sont plus marquées dans l'asthme (James & Wenzel 2007). Dans la BPCO, la baisse de l'élasticité bronchique due à l'emphysème rétrécit davantage le diamètre bronchique. Ces phénomènes touchent principalement les petites voies aériennes (<2 mm) dans la BPCO, alors qu'ils touchent aussi les voies aériennes de plus grand calibre dans l'asthme.

La réponse inflammatoire est également différente entre asthme et BPCO. Typiquement, les patients asthmatiques présentent une réponse de type lymphocytes Th2, et une inflammation des voies aériennes dominée par la présence d'éosinophiles qui répond le plus souvent à une corticothérapie. Au contraire, dans la BPCO, l'inflammation est caractérisée par la présence de lymphocytes Th1, notamment CD8+ (« Cluster of Differentiation 8 positive ») et une inflammation à neutrophiles avec une mauvaise réponse à la corticothérapie.

Plusieurs études se sont intéressées aux MCC dans la BPCO. Il a notamment été observé que le nombre de MCC était diminué dans cette maladie ou suite à une exposition chronique au tabac, et cette diminution était accompagnée d'un raccourcissement de la taille des cils (Leopold et al. 2009; Hessel et al. 2014; AUERBACH et al. 1962). Une publication démontre que l'epidermal growth factor (EGF), dont l'expression est induite par le tabagisme, engendre une différenciation préférentielle des cellules basales en cellules productrices de mucus, au détriment des MCC (Shaykhiev et al. 2013).

Enfin l'équipe de Myrna Dolovich a révélé une baisse de la fréquence de battement ciliaire chez des sujets atteints de BPCO (Yaghi et al. 2012).

c. La mucoviscidose

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies héréditaires autosomiques récessives graves dans les populations d'origine européenne, avec une incidence d'environ une naissance sur 2500. Ceci permet d'évaluer à 1 sur 25 le nombre d'individus hétérozygotes porteurs d'un allèle muté, ce qui correspond à plus de deux millions de personnes en France. Cependant, la fréquence de l'affection varie selon l'origine géographique et ethnique des patients. En France, environ 250 nouveaux cas sont pris en charge chaque année. Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif. En l'absence de traitement palliatif, la médiane de survie est de 3 à 5 ans. La rapidité du diagnostic est donc décisive car la précocité des soins et de la prise en charge du malade par une équipe médicale spécialisée permet d'éviter l'apparition de lésions irréversibles. C'est un facteur essentiel qui permet d'augmenter considérablement la qualité et l'espérance de vie des malades qui est passée de 4 ans dans les années 50 à près de 50 ans en moyenne aujourd'hui. Néanmoins, la médiane de survie des patients CF, bien qu'ayant été améliorée par les progrès de la science et de la médecine, n'est que de 25 ans (Schmidt et al. 2016).

Le terme anglais pour désigner cette pathologie, « Cystic Fibrosis » (ou CF) provient d'une étude d'Andersen, en 1938, qui désignait alors la mucoviscidose comme « fibrose kystique du pancréas ». C'est Farber, en 1945, qui introduit le terme « mucoviscidosis », du fait que la maladie est caractérisée par une abondance de sécrétions de mucus anormalement épais.

La présentation clinique de la mucoviscidose est très polymorphe tant entre les patients de différentes familles qu'au sein d'une même famille. La maladie est le plus souvent diagnostiquée avant l'adolescence, mais quelques patients restent asymptomatiques jusqu'à l'âge adulte. La mucoviscidose est une génopathie des glandes exocrines dont la principale conséquence est une hypersécrétion de mucus anormalement visqueux qui obstruent différents organes (Davis et al. 1996). Néanmoins, les caractéristiques physico-chimiques du mucus de patients CF fait l'objet de débats dans la littérature puisque certaines études indiquent que ce mucus serait moins visqueux mais plus tenace dans la mucoviscidose (Rubin 2009). La mucoviscidose est une maladie qui affecte la plupart des organes comportant un tissu épithélial, siège de transports hydro-électrolytiques transépithéliaux. Dans cette maladie, le transport hydro-électrolytique est anormal et conduit à des troubles obstructifs pulmonaires chroniques associés à des infections bactériennes, à une insuffisance pancréatique et hépatique, à une sécrétion sudoripare anormalement concentrée et à une stérilité masculine sécrétoire due à une agénésie congénitale bilatérale des canaux déférents.

Environ 15% des enfants naissent avec un ileus méconial correspondant à une occlusion intestinale. C'est l'atteinte respiratoire qui est la plus préjudiciable puisqu'elle est responsable de plus de 90% de la morbidité et de la mortalité (Davis et al. 1996).

La mucoviscidose est la première maladie autosomique récessive dont le gène responsable a été isolé par clonage positionnel. En 1985, le locus *CF* a été localisé sur le bras long du chromosome 7 (7q31) (Tsui et al. 1985). C'est en 1989 que le gène impliqué dans la mucoviscidose a été finalement isolé, identifié et cloné (Kerem et al. 1989; Riordan et al. 1989; Rommens et al. 1989). Il s'agit du gène *CFTR* (« *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* »). Plus de 2000 mutations du gène *CFTR*, responsables de la maladie, ont été identifiées à ce jour, et sont regroupées en 5 classes selon leur effet sur la protéine CFTR. La mutation la plus répandue, retrouvée dans deux tiers des allèles mutés, est une délétion de trois paires de bases provoquant la perte d'un résidu phénylalanine en position 508 de la protéine (CFTR-F508del). Cette mutation affecte la synthèse de CFTR qui est alors rapidement dégradée.

Exprimée au pôle apical de la membrane de certaines cellules épithéliales, CFTR exerce plusieurs fonctions dans la cellule dont la mieux caractérisée est celle de canal Cl⁻, activé par l'AMPc et l'hydrolyse de l'ATP (Schwiebert et al. 1995; Stutts et al. 1995a). La fonction du CFTR a également été associée à la sécrétion directe et indirecte d'ions bicarbonate, d'ATP et une altération du pH (Ehre et al. 2014). CFTR pourrait par ailleurs réguler l'absorption de Sodium par les canaux ENaC, mais cette théorie fait débat dans la littérature (J.-H. Chen et al. 2010; Stutts et al. 1995b). Ainsi, une dysfonction du CFTR conduit à un défaut de transport d'anions qui perturbe la balance des échanges hydro-électrolytiques entre la surface de l'épithélium respiratoire et le milieu intérieur. Il en résulte une déshydratation du liquide périciliaire et de la couche de mucus qui recouvre la surface apicale de l'épithélium (Matsui et al. 1998). Cela a pour conséquence une réduction de la hauteur du liquide périciliaire et une concentration du mucus (Cf Partie II.C.1). Par conséquent, la clairance mucociliaire est fortement perturbée, favorisant la formation de niches hypoxiques propices à la colonisation microbiennes par des souches bactériennes telles que *Pseudomonas aeruginosa*, le pathogène opportuniste le plus fréquemment retrouvée chez les patients CF adultes (Matsui et al. 2006). Par ailleurs, une dysfonction du CFTR pourrait entraîner une élévation de la concentration des ions chlorure et sodique dans la couche périciliaire, ce qui entraverait l'activité anti-microbienne de certaines molécules telles que les β -défensines et donc nuirait à l'élimination de bactéries des voies aériennes (Goldman et al. 1997).

La relation qui existe entre les états d'inflammations et d'infections respiratoires chroniques demeure à ce jour mal élucidé. Il est difficile de savoir si l'inflammation précède l'infection ou bien si

elle en est la conséquence. L'état inflammatoire récurrent des organes tels que le pancréas, le foie ou les intestins, qui semblent le plus souvent dépourvus d'infection semble indiquer qu'il puisse exister une inflammation indépendamment du statut infectieux. Cette hypothèse est étayée par la présence anormalement élevée de médiateurs inflammatoires chez des enfants CF en absence d'infection détectable (Machen 2006).

Récemment, il a été développé un modèle CF-F508del de cochon qui présente spontanément de nombreuses caractéristiques pathologiques semblables à celles observées chez les patients CF telles que l'infection respiratoire, une obstruction bronchique par un mucus tenace et adhérent et une clairance mucociliaire ralentie (Stoltz et al. 2010). A la naissance, les porcs CF ne présentent pas d'inflammation, mais une charge bactérienne accrue, associée à une réduction du pH du liquide de surface des voies aériennes et un défaut de sécrétion de d'ions bicarbonate (Pezzulo et al. 2012; Stoltz et al. 2010; Ehre et al. 2014). Ces résultats tendent donc à démontrer que l'infection est primaire à l'inflammation.

Les épisodes inflammatoires et infectieux chroniques entraînent progressivement une perte fonctionnelle de l'épithélium des voies aériennes de patients CF associée à une régénération défectueuse (R Hajj et al. 2007). La réparation défectueuse de l'épithélium respiratoire CF est associée à une augmentation anormale du nombre de cellules sécrétrices de mucus et de cellules basales (R Hajj et al. 2007; Adam et al. 2014) ainsi qu'une disparition progressive des MCC (Vladar et al. 2016). Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires complexes qui gouvernent une régénération efficace de cet épithélium est un enjeu biomédical majeur dans le cadre de cette maladie.

II. Les voies respiratoires humaines

Les voies respiratoires humaines regroupent un ensemble de tissus dont l'organisation anatomique favorise l'échange gazeux entre le sang et le milieu extérieur. Dans ce chapitre, après avoir présenté de manière succincte l'anatomie des voies respiratoires, je décrirai plus en détail la structure et la fonction de l'épithélium respiratoire des voies supérieures, qui est le modèle d'étude prédominant de notre laboratoire.

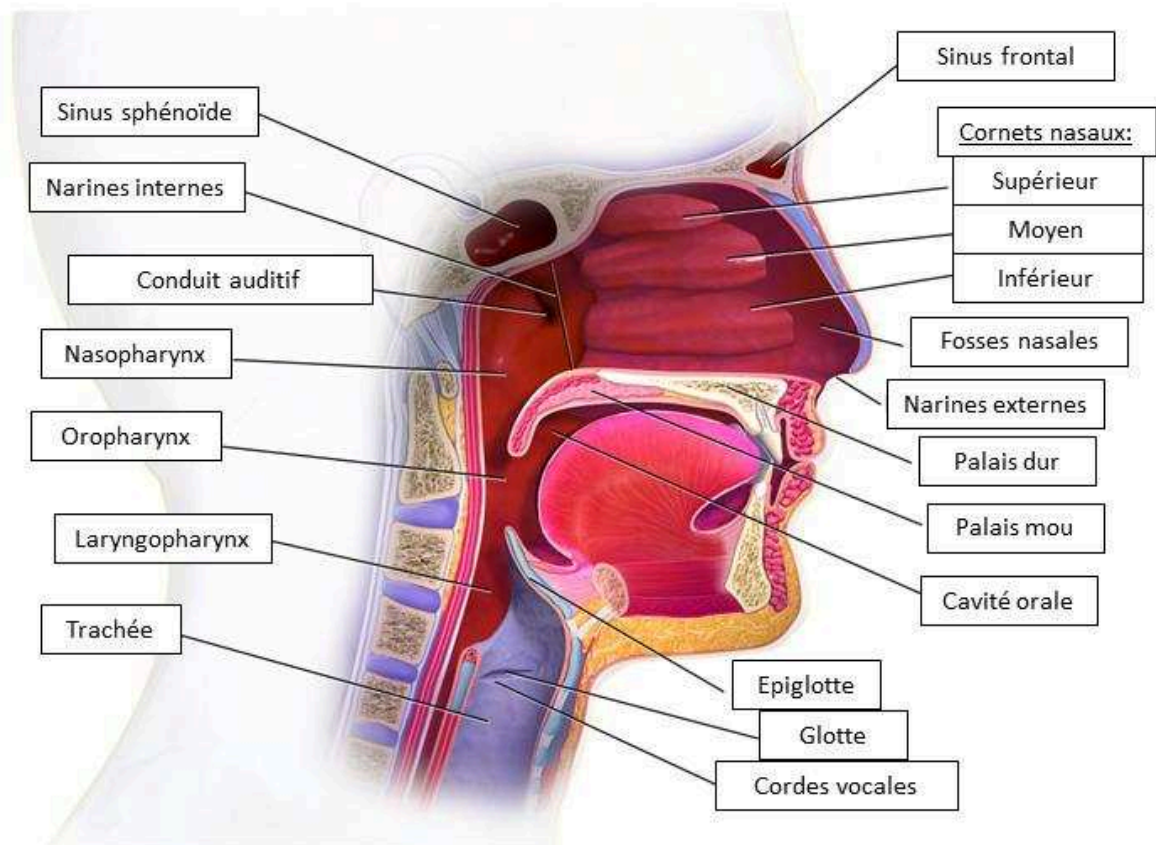


Figure 10 : Voies respiratoires supérieures chez l'Homme

A. Anatomie

Les voies respiratoires ou voies aériennes sont généralement divisées en deux modules formant une unité fonctionnelle indispensable à la respiration et aux échanges gazeux nécessaires à notre organisme. Ces deux compartiments sont :

- Les voies respiratoires supérieures, qui sont extra-thoraciques et se composent du nez et des fosses nasales, des sinus paranasaux du pharynx et du larynx.
- Les voies respiratoires inférieures (intra-thoraciques), formant l'arbre respiratoire, constituées par une zone de conduction composée par la trachée, les bronches et bronchioles et une zone d'échange caractérisée par les alvéoles pulmonaires.

Ces différents tissus vont permettre la bonne conduction de l'air en le purifiant, le réchauffant et l'humidifiant. Cet air va ainsi être acheminé jusqu'aux alvéoles où ont lieu les échanges gazeux avec le compartiment sanguin.

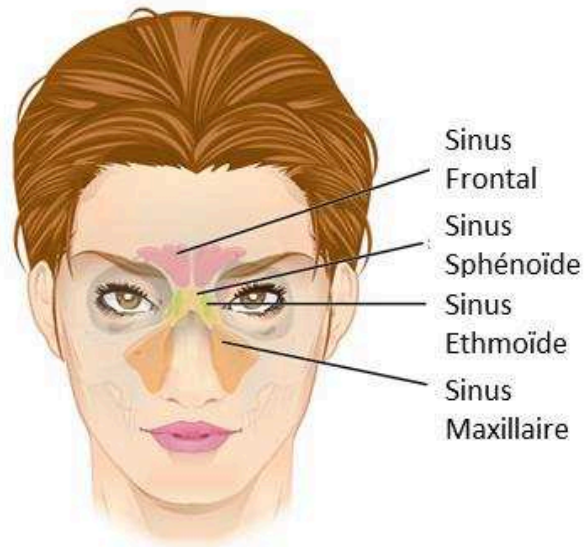
1. Les voies respiratoires supérieures

a. *Le nez et les fosses nasales.*

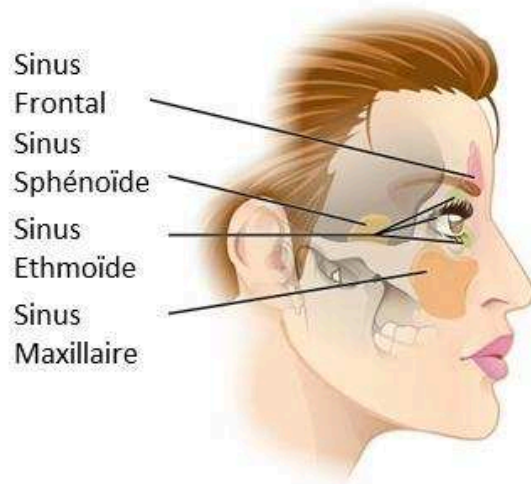
Le nez représente le premier compartiment en contact avec l'air extérieur. Les poils, situés au niveau des narines, vont filtrer les plus grosses particules de l'air inspiré telles que les poussières, les fibres et macromolécules comme le pollen. Juste derrière le nez se situent les fosses nasales qui forment deux grands vestibules séparés verticalement par une cloison osseuse appelée septum nasal (Figure 10). Ces fosses sont délimitées par les narines et communiquent avec le pharynx par les choanes, en forme d'entonnoir.

Les parois latérales des cavités nasales forment 3 protubérances occupant les fosses, correspondant à de minces lames osseuses enroulées sur elles-mêmes et recouvertes de la muqueuse nasale : le cornet nasal supérieur, le cornet nasal moyen et le cornet nasal inférieur (Figure 10). Ces saillies proéminentes permettent d'augmenter la surface en contact avec l'air inspiré. Il est estimé que chacune des fosses représente une surface de 75 cm^2 pour un volume de 10 cm^3 . Les cornets sont très vascularisés, ce qui va leur permettre d'adapter leur volume à différents stimuli. Ils vont avoir plusieurs fonctions essentielles :

- D'une part, ils vont permettre la purification de l'air inhalé. En effet, ces cornets présentent un épithélium de surface qui a été le modèle de prédilection de mon travail de thèse et sera décrit plus longuement par la suite. Cet épithélium est notamment composé de MCC qui vont, grâce aux battements coordonnés des cils à leur surface, permettre l'évacuation des particules



Vue de face



Vue de côté

Figure 11 : Les différents sinus paranasaux chez l'Homme

inhalées piégées dans un liquide visqueux appelé mucus, produit par des cellules sécrétrices également présentes au sein de cet épithélium. Ce mécanisme de nettoyage, appelé clairance mucociliaire, est initié au niveau des cornets nasaux mais se prolonge tout au long des voies de conduction jusqu'aux bronches.

- Par ailleurs, pour que les fonctions pulmonaires se déroulent de manière optimale, il est nécessaire que les gaz inspirés soient d'abord conditionnés avant de pénétrer dans les voies respiratoires inférieures. Pour cela, les muqueuses bordant les cavités nasales et notamment les cornets sont très vascularisées et permettent l'humidification ainsi que le réchauffement de l'air. En conditions normales, l'air inspiré pénètre dans le pharynx à environ 32°C et a été complètement humidifié. C'est dans la trachée que l'air est amené à la température de 37°C et qu'il atteint le degré requis d'hygrométrie de 44 mg/L.

Au niveau des fosses nasales coexistent différents types de muqueuses :

- Une muqueuse respiratoire, qui tapisse notamment les cornets nasaux décrits plus haut. Elle est composée d'un épithélium pseudostratifié constitué en majorité de MCC, de cellules basales, de cellules sécrétrices de mucus et de quelques cellules neuroendocrines. Cet épithélium est dit pseudo-stratifié car malgré l'apparence en différentes couches des cellules le constituant, toutes présentent une attache avec la lame basale. Cet épithélium repose sur un chorion qui est un tissu conjonctif très vascularisé et innervé possédant des tissus lymphoïdes associés, et de nombreuses glandes. En effet, sont retrouvées des glandes sous-muqueuses, des glandes muqueuses (qui sécrètent les mucines qui correspondent au constituant principal du mucus), et des glandes séro-muqueuses ou mixtes.

- Une muqueuse olfactive, qui est située sur la partie postérieure des deux fosses nasales, et qui est composée d'un épithélium neurosensoriel responsable de l'olfaction et composée de MCC non mobiles comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent.

- Une muqueuse vestibulaire, composée d'un épithélium épidermoïde pavimenteux stratifié, résistant aux agressions physiques imposées par sa situation à l'entrée des voies respiratoires.

b. Les sinus paranasaux

Les sinus paranasaux forment un groupe de 4 paires de cavités symétriques. (Figure 11). Les fonctions de ces sinus (maxillaires, éthmoïdaux, frontaux, sphénoïdaux) sont encore floues mais il semblerait que leurs rôles soient multiples. Ils permettraient notamment de réduire la masse du crâne, de faire résonance pour la voix ou encore de réchauffer et d'humidifier l'air inspiré grâce au

flux d'air très lent dans cette région. Il a également été proposé qu'ils servent de « tampon » lors d'un choc crânien.

c. Le pharynx

Le pharynx délimite la séparation entre les fosses nasales et le larynx. Il se sépare en 3 parties (Figure 10):

- Le nasopharynx ou rhinopharynx qui est la partie nasale à l'arrière des fosses par lesquelles il communique grâce aux choanes. Le plafond de sa paroi présente les tonsilles pharyngiennes (ou amygdales, appelées encore végétations adénoïdes) qui sont des tissus lymphoïdes. Les trompes d'Eustache s'ouvrent dans les parois latérales du nasopharynx et permettent d'équilibrer la pression de l'air dans l'oreille avec l'air extérieur.

- L'oropharynx est situé à l'arrière de la cavité orale. Il reçoit à la fois l'air provenant des fosses nasales mais également celui provenant de la bouche. C'est un véritable carrefour puisque les aliments avalés transitent également par ce tissu. L'oropharynx présente également 3 tonsilles : 2 tonsilles palatines de part et d'autre de la luette, visibles au fond de la gorge, et une tonsille linguale, à la base de la langue. Ces tonsilles ou amygdales, appartenant au tissu lymphatique, représentent une sorte de zone de contrôle immunitaire vis-à-vis des pathogènes transitant au niveau de ce carrefour aéro-digestif.

- Le laryngopharynx qui est la sub-division la plus distale du pharynx, s'étend jusqu'au larynx. C'est dans cette zone que divergent les voies respiratoires et digestives.

La muqueuse du pharynx évolue en descendant les voies respiratoires. Au niveau du nasopharynx, la muqueuse est la même que celle des fosses nasales. Dans l'oropharynx et le laryngopharynx, qui sont soumis à des contraintes physiques dues au passage du bol alimentaire, l'épithélium est squameux, pluristratifié, et non kératinisé.

d. Le Larynx

Le larynx est un tube qui communique avec le laryngopharynx dans sa partie proximale et la trachée dans sa partie distale. Il est entouré de 9 différents cartilages dont le plus grand forme deux lames plus connues sous le nom de pomme d'Adam. Le larynx permet la conduction de l'air jusqu'à la trachée mais également l'aiguillage des aliments dans l'œsophage. Lors du passage du bol alimentaire, les mouvements des cartilages vont soulever et fermer le larynx grâce à une structure appelée épiglotte, afin d'orienter les aliments vers l'œsophage (Figure 10). Lors de la clairance mucociliaire des voies respiratoires inférieures (trachée et bronches), le mucus expulsé vers

l'extérieur remonte au niveau du larynx où il sera avalé ou recraché. Le larynx a également pour rôle la phonation puisqu'il abrite les cordes vocales.

Le larynx étant dans le prolongement de la trachée, il présente une muqueuse de type respiratoire à l'exception de l'épiglotte et des cordes vocales où est observé un épithélium squameux puisque ces zones subissent des forces physiques importantes pour lesquelles un simple épithélium respiratoire ne serait pas assez solide.

2. Les voies respiratoires inférieures

a. La trachée

La trachée est un tube cartilagineux de 10 à 12 cm de longueur pour une lumière d'un diamètre d'environ 2,5 cm, pénétrant dans le thorax et faisant la liaison entre le larynx et les bronches. Elle est entourée de 16 à 20 anneaux incomplets de cartilages hyalins ayant la forme d'un « C ». Ces cartilages rendent la trachée rigide afin d'éviter de grandes amplitudes de son diamètre au cours de la respiration.

Tout au long de sa surface interne, la trachée est recouverte d'une muqueuse respiratoire caractérisée par l'épithélium pseudostratifié possédant un grand nombre de MCC indispensables pour la propulsion du mucus sécrété par les cellules sécrétrices de surface ainsi que par les glandes muco-séreuses. Ces glandes sont constituées majoritairement de cellules sécrétrices qui sont des cellules à mucus ou des cellules séreuses. Les cellules à mucus, situées dans la partie la plus proximale des glandes, sont caractérisées par la présence d'un très grand nombre de vésicules de sécrétion d'une taille d'environ 500 nm de diamètre chargées de mucines. Les cellules séreuses sont plus distales et permettent la sécrétion d'eau et d'électrolytes mais également de macromolécules telles que le lysozyme, la lactoferrine, des IgA sécrétoires ainsi que la peroxydase.

b. Les bronches et bronchioles

L'extrémité distale de la trachée se sépare en deux pour former deux bronches principales ou bronches souches. Ces deux bronches pénètrent chacune dans un poumon où elles se subdivisent en bronches lobaires ou secondaires correspondant aux différents lobes au nombre de 3 dans le poumon droit et 2 dans le poumon gauche. Ces bronches lobaires donnent naissance à des bronches tertiaires ou segmentaires qui elles-mêmes se subdivisent pour donner des bronches d'ordre plus grand et de calibre plus petit. Il existe 23 ordres de bronches et bronchioles dans les voies aériennes humaines, ce qui explique l'emploi de l'expression arbre respiratoire. Les bronchioles correspondent aux conduits inférieurs à 1 millimètre de diamètre. Au plus distal, les bronchioles dites respiratoires pénètrent dans les lobules pulmonaires.

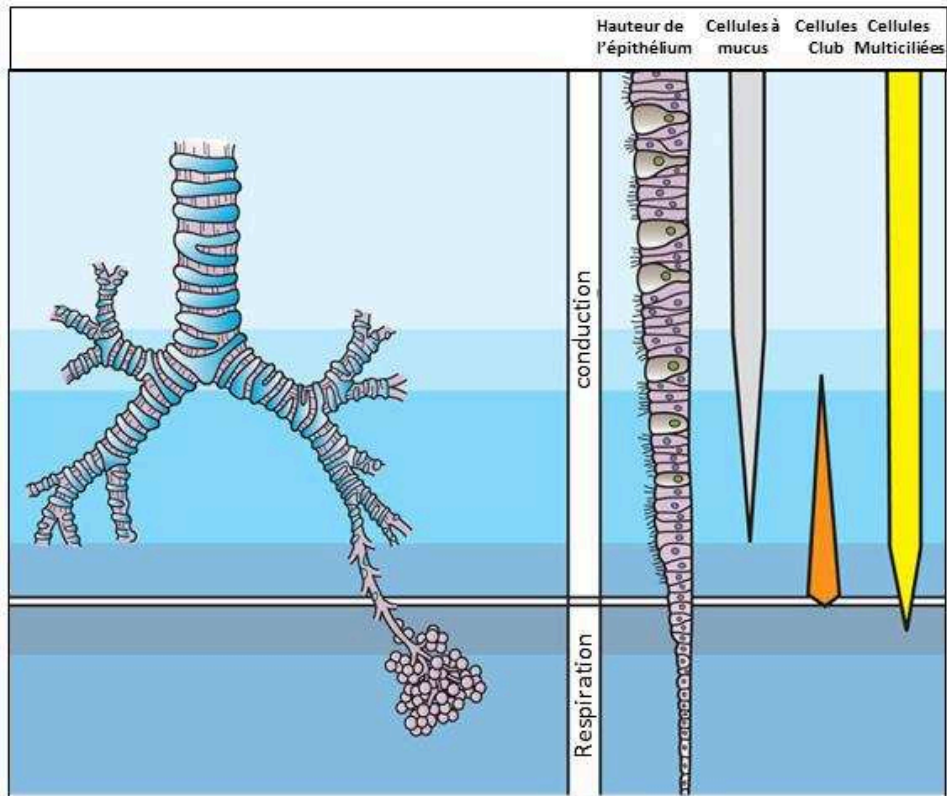


Figure 12 : Evolution de l'épithélium de surface le long du tractus respiratoire chez l'Homme

Au fur et à mesure de la descente vers les voies les plus distales du tractus respiratoire, la taille des cellules diminue et la population cellulaire évolue. Les cellules à mucus et les cellules multiciliées tendent à disparaître dans les parties plus distales des voies de conduction. A l'inverse, les cellules Club ne sont pas présentes sur la portion proximale de la trachée.

Plus on descend dans l'arbre bronchique, plus les parois et l'épithélium des bronches évoluent (Figure 12). En effet, les anneaux cartilagineux hyalins sont progressivement remplacés par des plaques cartilagineuses de plus en plus éparées. En outre, plus le diamètre des bronches diminue, plus la proportion de muscle lisse autour des bronches augmente, si bien que les bronchioles sont entièrement recouvertes de fibres musculaires lisses. Parallèlement, l'épaisseur de l'épithélium de surface diminue au fur et à mesure que l'on progresse dans l'arbre bronchique. Ce rétrécissement est accompagné d'une diminution progressive du nombre de MCC et de cellules à mucus au profit de cellules neuroendocrines et de cellules Club (anciennement dénommées cellules de Clara).

Les cellules de Clara ont été identifiées pour la première fois en 1937 par Max Clara, un anatomiste allemand ayant eu des liens étroits avec le parti Nazi pendant la deuxième guerre mondiale. Une grande partie de son travail était fondée sur des études réalisées sans le consentement des familles concernées sur les corps des victimes exécutées par le 3^e Reich (Winkelmann & Noack 2010). L'utilisation du nom Clara pour les cellules qu'il avait découvertes lui rendant honneur à titre posthume, il a aujourd'hui été modifié et ces cellules s'appellent désormais les cellules Club.

Les cellules Club sont des cellules non-ciliées en dôme, présentant à leur surface apicale des microvillosités (Cutz & Conen 1971). Ces cellules ont des rôles importants au niveau des bronchioles où leur concentration est la plus importante :

- Un rôle anti-inflammatoire et immuno-modulateur via la sécrétion de l'uteroglobine (ou CC10 pour « Club Cell protein 10kDa »). En effet, cette sécrétoglobine est capable d'inhiber la réponse inflammatoire médiée par les lymphocytes TH2 *via* la répression de la Chitinase-3-like protein 1 et l'ostéopontin (Hung et al. 2004; Wang et al. 2010; Wang et al. 2013; Liu et al. 2010).

- L'équipe de Burton Dickey a montré que les cellules Club ont la capacité de sécréter du mucus après stimulation à l'IL-13, dénotant une importante plasticité des molécules sécrétées (Evans et al. 2004). De manière étonnante, Elles permettent également d'inhiber l'hypersécrétion de mucus par l'intermédiaire de CC10 (Tokita et al. 2014).

- Les cellules Club participent à la protection des voies aériennes par la détoxification de xénobiotiques inhalés grâce à leur fort niveau d'expression de cytochromes P450 intracellulaire (Stripp & Reynolds 2008).

- Enfin, des études mettent en évidence la capacité de ces cellules à se transdifférencier pour former notamment des MCC ou des cellules à mucus (Lafkas et al. 2015; Rawlins & Hogan 2006; Cui et al. n.d.). De plus, plusieurs études leur attribuent un rôle de cellules progénitrices multipotentes,

permettant notamment la recolonisation de l'épithélium après lésion chez la souris (Evans et al. 1978; Hong et al. 2001).

c. Les alvéoles

A l'extrémité distale des voies respiratoires, le dernier ordre de bronchioles, les bronchioles respiratoires, se prolongent par les conduits alvéolaires. La paroi de ces conduits est composée d'anneaux de fibres musculaires lisses ainsi que de fibres élastiques et de collagène. Ces conduits débouchent sur des grappes d'alvéoles appelées saccules alvéolaires, chacune composée de plusieurs alvéoles pulmonaires, siège des échanges gazeux. Un réseau dense de capillaires enveloppe les alvéoles et forme avec la paroi alvéolaire une membrane alvéolo-capillaire, permettant la diffusion simple des gaz entre voies respiratoires et sang.

L'épithélium alvéolaire est constitué d'une seule couche cellulaire majoritairement composée par des pneumocytes de type I et de type II :

- Les pneumocytes de type I sont des cellules très particulières morphologiquement puisqu'elles sont très peu épaisses et très étendues, facilitant ainsi l'échange gazeux.
- Les pneumocytes de type II sont responsables de la production de surfactant. Ce tensioactif, majoritairement constitué de lipides (à hauteur de 90%), permet de maintenir la tension de surface à l'intérieur des alvéoles, afin d'éviter l'affaissement alvéolaire appelé collapsus.

B. Les différentes cellules de l'épithélium respiratoire des voies supérieures

Après avoir décrit l'anatomie globale des voies aériennes, je détaillerai à présent l'épithélium respiratoire des voies aériennes supérieures, qui a représenté le cœur de mon étude. Nous avons vu que la composition cellulaire et l'épaisseur de cet épithélium varie le long de l'arbre respiratoire. Je vais maintenant décrire les principaux types cellulaires retrouvés dans sa partie supérieure, des cavités nasales jusqu'au début des bronches. Cet épithélium est principalement constitué de cellules basales, de MCC, de cellules sécrétrices de mucus.

1. Les cellules multiciliées

Les MCC sont des cellules cylindriques ou pyramidales, d'une hauteur d'environ 20 μm , pour une largeur variant de 7 μm (du côté apical) à 2 μm (côté basal) (Breeze & Wheeldon 1977). Ces cellules sont majoritaires dans l'épithélium et Rhodin estimait en 1966 qu'il y avait environ 5 cellules multiciliées pour 1 cellule à mucus (Rhodin 1966). Elles représentent 56% de la population cellulaire

au niveau de la trachée alors qu'elle n'atteignent que 15% des cellules épithéliales dans les bronches distales (Serafini & Michaelson 1977).

Les MCC possèdent environ 250 cils mobiles à leur surface apicale d'environ 6 μm de long pour un diamètre d'environ 0.3 μm entre lesquels s'intercalent des microvillosités dont le nombre est estimé à la moitié de celui des cils (WATSON & BRINKMAN 1964). L'observation des voies respiratoires de la souris en microscopie électronique révèle que les cils des MCC raccourcissent au fur et à mesure de la descente dans l'arbre bronchique. En effet, Greenwood et Holland ont estimé que ces cils passent de 7 μm dans les voies supérieures à 3 ou 4 μm dans les bronches (Greenwood & Holland 1972). La structure des cils est la même tout au long des voies aériennes, indépendamment de leur longueur. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les axonèmes de ces cils sont de structure (9+2). La fréquence de battement des cils elle aussi évolue le long des voies respiratoires. En effet, les cils battent plus vite dans les bronches proximales que dans les bronches distales, pour une fréquence moyenne de 10 à 20 Hz (Zahm et al. 1990).

Le noyau des MCC est situé au niveau basal de la cellule alors que les mitochondries sont retrouvées très enrichies au pôle apical de la cellule afin de fournir l'énergie nécessaire au battement ciliaire (Hansell & Moretti 1969).

Outre leur rôle dans la clairance mucociliaire, les MCC ont également un rôle dans le transport d'eau et d'électrolytes (Nadel 1985), ainsi que dans la sécrétion de macromolécules (Varsano et al., 1987). En effet, elles expriment notamment sur leur membrane apicale les canaux ENaC (« Epithelial Na Channel ») (Barbry & Lazdunski 1996) et CFTR (Puchelle et al. 1992), impliqués dans les transports d'ions Na^+ et Cl^- .

Dans le chapitre IV, nous décrivons les mécanismes expliquant la différenciation de ces cellules et la formation des centaines de cils vibratiles à leur surface

2. Les cellules basales

Après les MCC, les cellules basales sont les cellules les plus nombreuses de l'épithélium. Leur proportion diminue en descendant le long de l'arbre bronchique et passe de 30% au niveau proximal à environ 6% de la population épithéliale dans les bronchioles (Boers et al. 1998). Morphologiquement, ce sont des cellules de petite taille, n'atteignant pas la lumière des voies respiratoires, et possédant un rapport noyau/cytoplasme très élevé. Ces cellules expriment des marqueurs intracellulaires qui leur sont propres et qui sont très utilisés dans les études pour distinguer ce type cellulaire des cellules cylindriques par exemple. Ces marqueurs peuvent être des cytokératines, comme la cytokératin-5 (KRT5) mais également des facteurs de transcription, comme

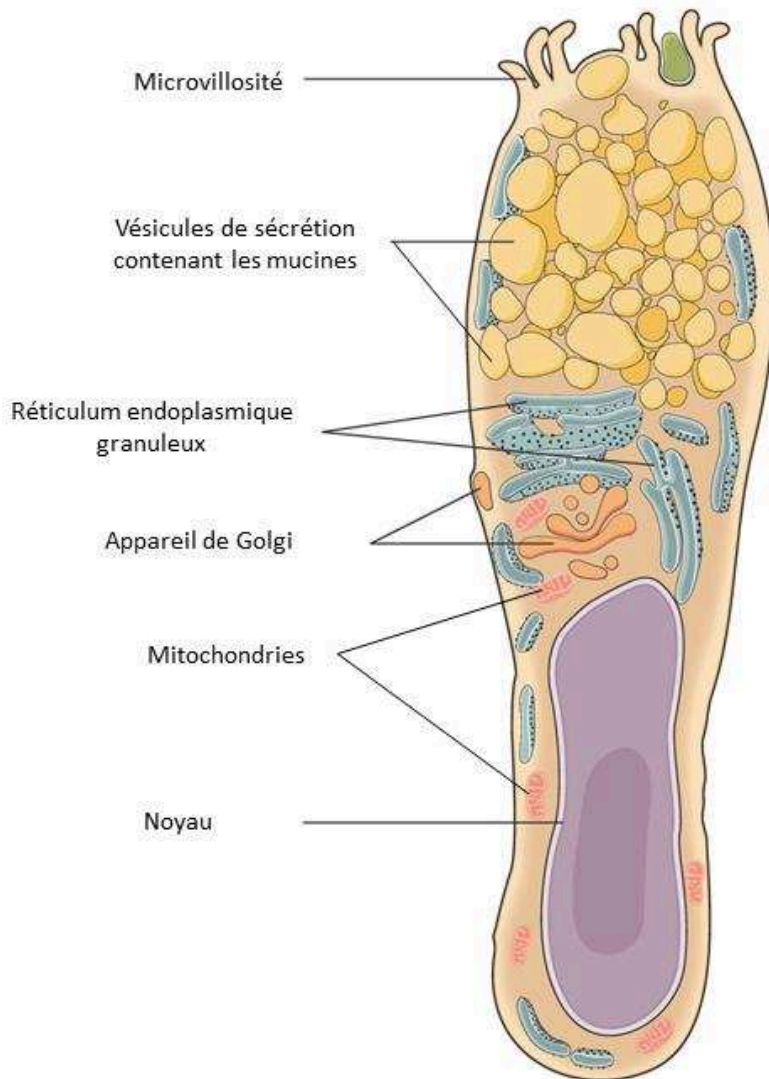


Figure 13 : Cellule sécrétrice de mucus

TP63 (« Tumor Protein P63 »). De manière intéressante, les souris déficientes pour TP63 n'ont plus de cellules basales dans l'épithélium trachéal (Daniely et al. 2004).

Les cellules basales possèdent deux rôles essentiels au sein de l'épithélium :

- Tout d'abord, ces cellules possèdent un rôle structural puisqu'elles permettent la cohésion de l'épithélium sur la lame basale. Mercer et collaborateurs estimaient en 1994 que la surface de contact des cellules basales avec la lame basale est d'environ $50 \mu\text{m}^2$ quand celle des cellules multiciliées est seulement de $1 \mu\text{m}^2$ et celle des cellules à mucus $8 \mu\text{m}^2$ (Mercer et al. 1994). Cette surface d'accroche à la lame basale, permise par des héli-desmosomes, permet un ancrage solide des cellules basales (le nom « cellules basales » provient de ce contact avec la lame basale). Par ailleurs, ces cellules forment des liaisons avec les cellules voisines (cylindriques) à l'aide de desmosomes. Dès lors, les cellules basales assurent le maintien de l'épithélium sur la lame basale (Evans et al. 1989; Evans & Plopper 1988; Shebani et al. 2005).

- Les cellules basales jouent également un rôle de cellules souches ou cellules progénitrices, capables de proliférer mais également de se différencier, notamment lors des mécanismes de réparation suite à une lésion, afin de reformer un épithélium fonctionnel. La capacité à former d'autres types cellulaires différenciés à partir de cellules basales a été mise en évidence grâce à des souris transgéniques exprimant un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur spécifique de cellules basales. En effet, Hong et collaborateurs ont pu montrer qu'après lésion de l'épithélium *in vivo*, les cellules multiciliées et sécrétrices de mucus néoformées dérivent toutes deux des cellules basales (Hong et al. 2004a; Hong et al. 2004b). De plus, deux études montrent que des cellules basales isolées par cytométrie en flux sont capables de reformer un épithélium mucocilié *in vitro* (J R Rock et al. 2009; Rodolphe Hajj et al. 2007). Une étude récente très intéressante propose que les cellules basales soient en fait le regroupement de deux sous-populations morphologiquement identiques, une population souche multipotente et une population de précurseurs engagés vers la différenciation (J. K. Watson et al. 2015).

Plusieurs auteurs démontrent également la présence de cellules dites parabasales (ou intermédiaires) car situées juste au-dessus des cellules basales. Ces cellules, qui représenteraient 25% des cellules basales, pourraient correspondre à des cellules en cours d'engagement, et leur abondance serait régulée par la signalisation de Notch3 (Boers et al. 1998; Mori et al. 2015).

3. Les cellules sécrétrices de mucus

Les cellules sécrétrices de mucus sont des cellules cylindriques également appelées cellules en gobelet (« goblet cell » en anglais) ou caliciforme à cause de leur forme (Figure 13). Comme les

cellules multiciliées, leur noyau est disposé dans la partie basale de la cellule. A l'inverse, toute la partie apicale est gorgée de vésicules de sécrétion de 800 nm de diamètre, constituées principalement de glycoprotéines riches en acide sialique, les mucines (composant majeur du mucus) (Figure 13). Cette sécrétion de mucines est préférentiellement réalisée de manière mérocrine (par vésicules d'exocytose) mais parfois par méthode apocrine (dans laquelle tout le pôle apical de la cellule se fragmente) (Rogers 1994). Le processus de relargage des vésicules est très rapide puisqu'il se déroule en une dizaine de millisecondes. Ces cellules sont également capables de produire des molécules à activité anti-bactérienne comme des IgA sécrétoires, lactoferrine, lysozyme défensines, etc... (Bals et al. 1999)

Ces cellules sont disséminées au milieu de MCC où elles représentent 15% des cellules cylindriques au sein de l'épithélium. Elles sont également et essentiellement retrouvées au niveau des épithéliums glandulaires où elles sont 40 fois plus nombreuses. De ce fait, 90% du mucus est sécrété via les glandes tubulo-acineuses de la muqueuse.

Bien que les cellules sécrétrices de mucus soient largement minoritaires au sein de l'épithélium, leur proportion peut augmenter drastiquement dans des conditions de stress ou pathologiques et notamment en réponse à l'IL-13 (K.-S. Park et al. 2006; Tyner et al. 2006). Dès lors, la balance MCC/cellules à mucus ne permet plus d'opérer une clairance mucociliaire optimale et peut amener à des obstructions, phénomènes retrouvés dans les maladies chroniques respiratoires (décrites dans le chapitre précédent).

C. L'épithélium mucocilié : unité fonctionnelle protectrice des voies respiratoires

Nous venons de voir que l'épithélium respiratoire tapisse une majeure partie des voies aériennes. En contact constant avec l'environnement extérieur, sa fonction principale est de protéger l'arbre respiratoire des agressions externes, et ainsi permettre la conduction d'un air purifié jusqu'aux alvéoles. Nous allons décrypter dans cette partie les mécanismes mis en place par les différentes cellules de cet épithélium pour faire barrière aux particules et pathogènes inhalés.

1. Mucus et liquide périciliaire : première ligne de défense

Chaque jour, un être humain inspire environ 10000 litres d'air, soit l'équivalent d'environ 5×10^{10} particules inhalées. La première ligne de défense de l'organisme vis-à-vis de l'air inhalé est constituée par un liquide de surface, formant une couche continue d'environ 5 μm d'épaisseur le long de l'épithélium respiratoire piégeant les particules aériennes à la façon d'un papier tue-mouche (Coraux et al. 2005). Ce liquide de surface se décompose en deux phases distinctes : une phase gel

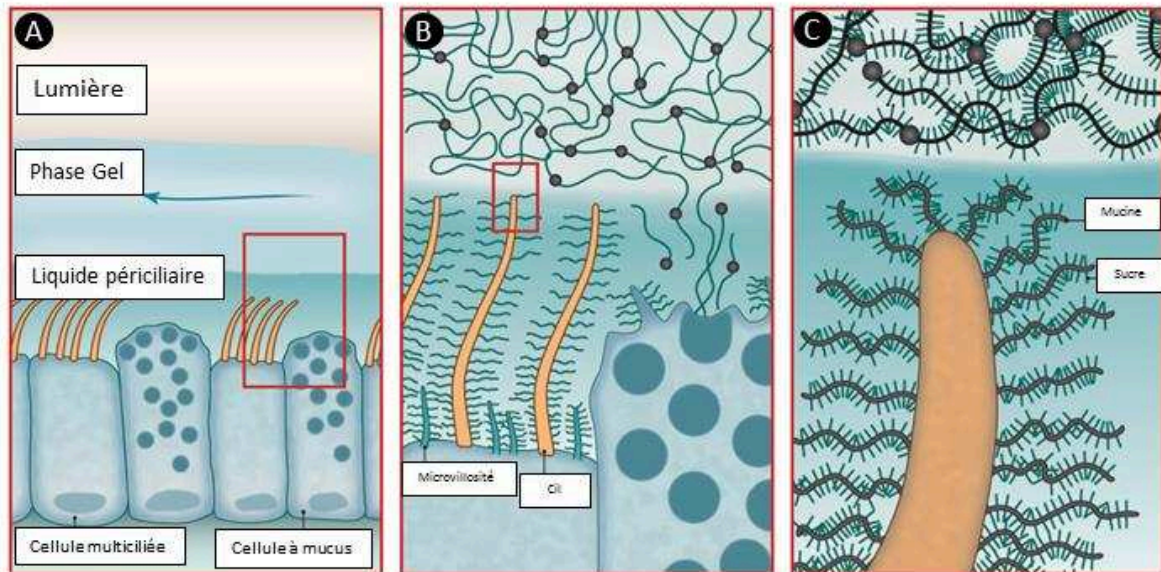


Figure 14 : Organisation en brosse des mucines à la surface des cils et des microvillosités

A. La couche de gel mobile, constituée notamment par les mucines, se déplace au-dessus d'une couche périciliaire immobile grâce à la propulsion permise par les cellules multiciliées.

B. Les cellules sécrétrices de mucus secrètent des mucines polymériques qui vont directement dans la phase de gel mobile. Cependant, des mucines sont également associées aux membranes des cils et microvillosités dans le liquide périciliaire.

C. Les mucines sont constituées d'une chaîne riche en sucres. Les mucines ainsi chargées vont générer des forces de répulsion indispensables au battement optimal des cils (d'après Dickel et al., 2012)

correspondant à la couche de mucus, qui est la couche la plus externe, et une phase de liquide périciliaire dans laquelle baignent les cils mobiles (Figure 14).

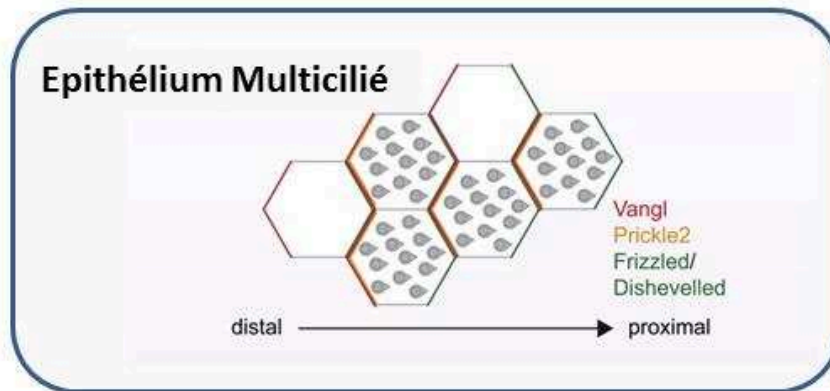
a. La phase gel

La phase gel possède des propriétés rhéologiques favorisant cette fonction de barrière physique. Cette phase est majoritairement composée d'eau (à hauteur de plus de 95%) mais également de glycoprotéines que sont les mucines. L'enchevêtrement de polymères de mucines forme un maillage dense conférant à la phase gel sa viscosité et son élasticité. Les mucines prédominantes participant à la formation de ce « gel » de mucus sont la Mucin-5AC (MUC-5AC) (produites par les cellules sécrétrices de l'épithélium) et la Mucin-5B (MUC-5B) (produites par les cellules sécrétrices glandulaires) (Bals et al. 1999; Widdicombe et al. 2015). En plus de son rôle de film protecteur, le mucus possède des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes, notamment grâce aux mucines (Lamblin et al. 1992). En effet, l'hétérogénéité des chaînes de sucres présentes à la surface de ces glycoprotéines représente un éventail de récepteurs sur lesquels les bactéries vont pouvoir se fixer, bloquant ainsi les microorganismes dans cette couche de gel. De plus, comme nous l'avons précisé plus haut, le mucus est composé de nombreuses molécules à activité antibactériennes : les Immunoglobulines A sécrétoires, la lactoferrine, le lysozyme, la bronchotransferrine, la phospholipase A2, la lactoperoxydase, l'inhibiteur de leucoprotéase sécrétoire (SLPI) et des défensines (Bals et al. 1999).

b. Le Liquide périciliaire

Le liquide périciliaire, situé sous la phase gel, correspond à la couche dans laquelle les cils peuvent se mouvoir. Longtemps considérées comme présentes uniquement dans la phase gel, les mucines sont aussi présentes et essentielles à la fonction du liquide périciliaire. Ces mucines s'organisent telles des brosses à la surface des cils (MUC-4 et MUC-20) et des microvillosités (MUC-1) formant un véritable réseau excluant les particules supérieures à 25 nm de diamètre (Kesimer et al. 2013) (Figure 14). Les forces de répulsion entre ces mucines chargées négativement vont permettre un battement optimal des cils, sans frottement (Hattrup & Gendler 2008). De plus, les charges des mucines créent une pression osmotique influençant la répartition de l'eau entre la phase gel et le liquide périciliaire (Button et al. 2012). Dans des situations pathologiques, l'hypersécrétion de mucus interfère avec cette pression osmotique, ayant pour conséquence un écrasement du liquide périciliaire et donc un battement des cils défectueux (Dickey 2012).

A



B

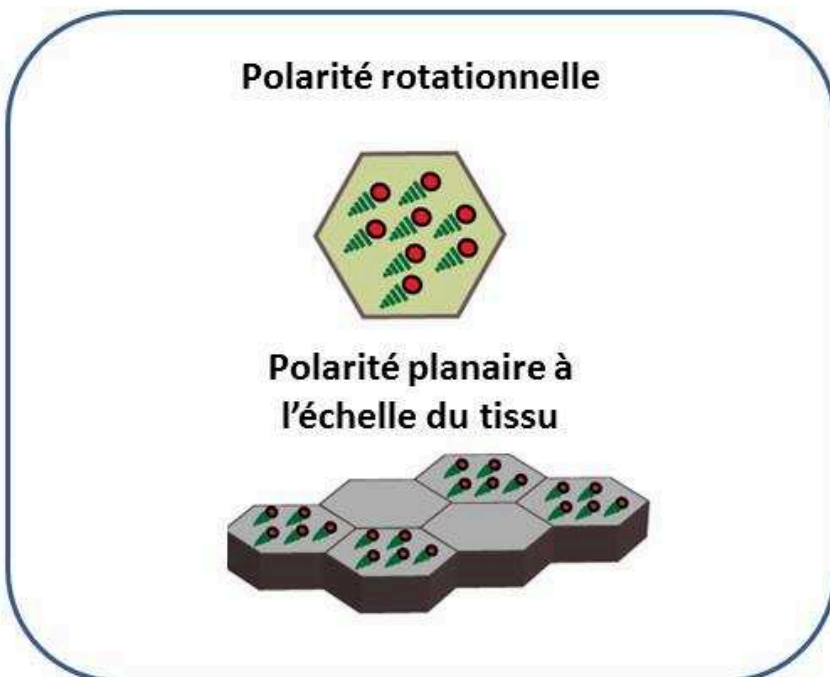


Figure 15 : La polarité planaire

A. Différentes protéines sont responsables de l'asymétrie proximo-distale des cellules multiciliées (représentées par les hexagones) au sein de l'épithélium. Les corps basaux sont représentés en gris.

B. La polarité rotationnelle permet l'orientation collective des corps basaux (représentés en rouge avec leurs fibres striées en vert) au sein d'une même cellule. La polarité à l'échelle de l'épithélium permet de coordonner l'orientation des cils de l'ensemble des cellules multiciliées du tissu.

(d'après Vladar et al., 2012)

2. La clairance mucociliaire

La protection optimale des voies aérienne ne consiste pas uniquement à piéger les particules dans le liquide de surface, mais également à les évacuer. C'est grâce au battement coordonné des cils des MCC que le mucus est progressivement drainé le long des voies respiratoires pour être expectoré puis craché ou avalé en passant dans le système digestif au niveau du larynx. Ces cils battent à une fréquence oscillant entre 10 et 20 Hz, entraînant un déplacement du mucus d'environ 5 mm/min (Wanner et al. 1996; Sanderson & Sleight 1981; Widdicombe et al. 2015).

a. Transport hydro-électrique épithélial

Comme nous venons de le voir, une osmolarité optimale du liquide périciliaire est nécessaire au battement ciliaire. Son degré d'hydratation doit donc être maintenu. La régulation du volume et de la composition du liquide de surface s'effectue par un transport hydro-électrolytique impliquant des canaux ioniques et des transporteurs, situés notamment au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales. C'est l'association du transport de cations (notamment le Na⁺), d'anions (principalement Cl⁻) et d'eau qui permet de réguler l'hydratation du liquide de surface (Tarran 2004). Dans des conditions pathologiques comme la mucoviscidose, la dysfonction du canal Cl⁻ CFTR perturbe la balance hydrique modifiant ainsi les propriétés physico-chimiques du liquide de surface (Richard C Boucher 2007; R C Boucher 2007).

b. La polarité planaire

Afin que la clairance mucociliaire soit efficace, les quelques 200 cils d'une même cellule multiciliée, mais aussi l'ensemble de ceux de la totalité du tissu respiratoire doivent subir une orientation précise et coordonnée. Cette orientation est mise en place par un mécanisme appelé polarité planaire (ou PCP pour « Planar Cell Polarity »). La polarité planaire détermine à l'échelle de la cellule et du tissu l'orientation vectorielle de l'ensemble des cils dans le plan de l'épithélium (Figure 15). Ce mécanisme complexe, décrit majoritairement et originellement chez la drosophile, n'est à ce jour que partiellement élucidé. La polarité peut être divisée en deux mécanismes interdépendants :

- La polarité dite rotationnelle permet l'espacement et l'orientation correcte des cils au sein d'une même cellule. L'équipe de Bryan Mitchell a réalisé un travail intéressant pour montrer la contribution de l'actine et des microtubules dans le positionnement et l'orientation des cils (Werner et al. 2011). En utilisant des agents dépolymérisant de l'actine et des microtubules (respectivement la cytochalasine D et le nocodazole), les auteurs ont démontré que l'actine et les microtubules

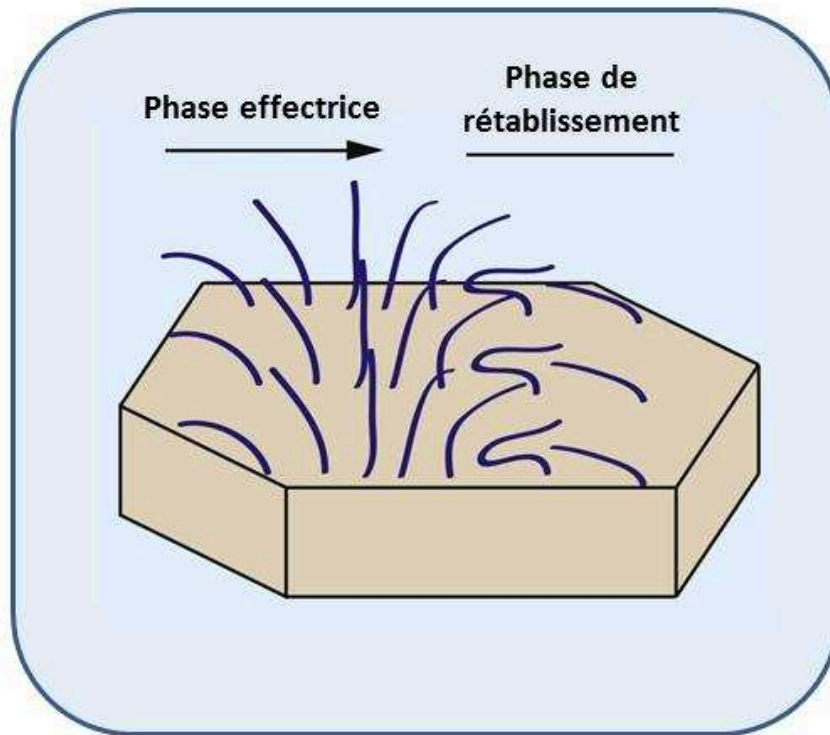


Figure 16 : Le cycle de battement du cil

Dans la phase effectrice, le cil est à la perpendiculaire du plan de la surface apicale cellulaire et bat selon un axe proximo-distal. Durant la phase de rétablissement, le cil va regagner sa position initiale en se courbant et formant un arc de cercle. (D'après Brooks et al., 2014)

forment un réseau complexe à la surface des MCC permettant de relier chacun des cils à ses voisins *via* le pied basal ou les fibres striées de leur corps basal.

- A l'échelle du tissu, la polarité planaire permet de coordonner l'orientation des cils de l'ensemble des cellules du tissu. Bien que de nombreux acteurs des voies de signalisation impliquées dans la PCP aient déjà été identifiés et caractérisés, Vladar et collaborateurs ont mis en évidence pour la première fois ce mécanisme au sein des MCC des voies respiratoires (Vladar et al. 2012). Cette polarité planaire est permise par un ensemble de protéines distribuées de manière asymétriques au sein des cellules, et ceci avant même la formation des cils. Par exemple, chez la souris, les protéines Frizzled et Dishevelled localisent sur la partie proximale de la cellule alors que les protéines Vangl et Prickle2 se situent dans la partie distale (Figure 15). Certaines de ces protéines étant des récepteurs membranaires, l'asymétrie peut être transmise aux cellules voisines. Cette étude montre tout d'abord que la déficience d'une de ces protéines engendre un défaut de polarisation des cils. Les auteurs ont mis également en évidence un double rôle des microtubules. Un premier rôle correspond au guidage des protéines de la PCP afin de les positionner de manière symétrique au sein de la cellule. La deuxième fonction des microtubules est de relier le réseau de corps basaux soumis à la polarité rotationnelle à la membrane plasmique *via* certains composants de la PCP et ainsi permettre l'orientation globale des cils d'une cellule dans l'axe proximal/distal déterminé par les protéines de la PCP.

c. Le cycle des battements ciliaires

Enfin, l'évacuation du mucus est permise par un cycle de battements très particulier des cils. Les différentes phases du battement ont pu être mises en évidence par Sanderson et Sleight en 1981 en observant les cils d'une trachée de lapin en microscopie électronique (Sanderson & Sleight 1981). Ce mouvement se caractérise par une phase effectrice pendant laquelle le cil est perpendiculaire au plan de l'épithélium et l'extrémité ciliaire est ancrée dans la couche de mucus. Le cil se déplace alors dans un plan et dans la direction de l'évacuation du mucus en formant une trajectoire d'environ 110°. Vient ensuite une phase de rétablissement, pendant laquelle le cil se courbe et fait un arc de cercle dans le sens des aiguilles d'une montre (vue de dessus) afin de revenir dans sa position initiale (Figure 16) (Brooks & Wallingford 2014).

Bien que l'on parle de battement synchrone des cils à la surface des MCC, leur mouvement est plutôt légèrement décalé dans le temps, provoquant ainsi une sorte de vague à la surface de l'épithélium. Ce léger décalage des cils serait dû aux interactions hydrodynamiques entre les cils (Gueron et al. 1997). Elgeti et Gompper ont par ailleurs montré à l'aide de simulations

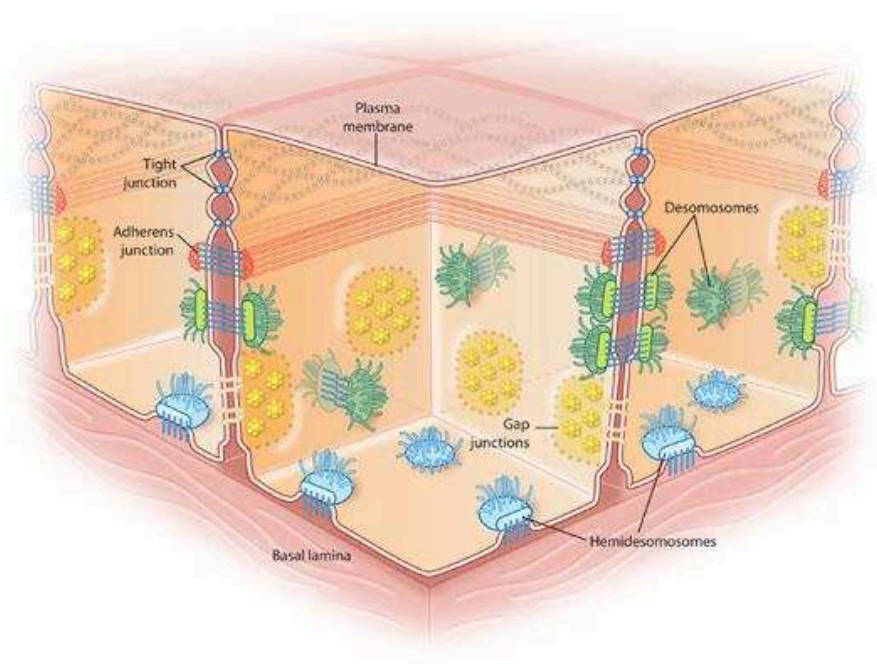


Figure 17 : Les différents types de complexes jonctionnels de la cellule épithéliale

Les jonctions serrées ou « tight junction » sont les plus apicales et les plus étroites. Les jonctions intermédiaires (ou « adherens junction ») forment une ceinture cohésive entre cellules adjacentes. Les jonctions communicantes (ou « gap junction ») forment des pores permettant la communication entre cellules. Les desmosomes représentent des zones d'ancrage résistantes aux contraintes physiques entre les cellules. Les hémidesmosomes permettent l'ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire. Basal lamina : lame basale ; Plasma membrane : membrane plasmique

informatiques qu'un battement asynchrone des cils engendre une efficacité de propulsion du mucus 10 fois supérieure et 3 fois plus rapide qu'un battement synchrone (Elgeti & Gompper 2013).

3. La barrière épithéliale

L'épithélium respiratoire forme une barrière physique entre l'environnement extérieur et l'organisme. L'intégrité de cette barrière nécessite une cohésion très forte de l'ensemble des cellules qui la constitue, rendant ainsi l'organisme imperméable aux aéro-contaminants et aux agents pathogènes inhalés. Comme nous l'avons vu précédemment, l'épithélium des voies respiratoires est lui-même protégé sur sa face luminale par le liquide de surface, et principalement une couche de mucus. Or, bien que le mouvement de la phase gel au sein des voies aériennes puisse être assimilé de manière simpliste à un tapis roulant continu, le concept le plus réaliste prône une discontinuité de cette couche de mucus (Sears et al. 2011). Dès lors, l'épithélium de surface est susceptible d'être exposé, au moins partiellement, aux particules aériennes. C'est pourquoi, au sein même de l'épithélium, plusieurs complexes jonctionnels assurent la cohésion physique ainsi que l'intégrité de cette barrière mais également déterminent la polarité des cellules épithéliales avec un compartiment apical et un compartiment basolatéral (Figure 17).

a. Les jonctions serrées

Les jonctions serrées (*zonula occludens*) sont situées à la frontière entre le domaine apical et le domaine latéral des cellules épithéliales cylindriques. Ce sont les jonctions les plus apicales et les plus étroites entre cellules adjacentes, d'où leur nom de serrées (Figure 17). Elles restent néanmoins perméables au passage de petites molécules. Elles constituent une barrière physiologique entre l'extérieur et l'intérieur de l'organisme en limitant le passage de molécules dans l'espace paracellulaire (FARQUHAR & PALADE 1963; Gumbiner 1993). Ces jonctions sont permises grâce à un ensemble de protéines transmembranaires faisant la liaison entre les deux cellules adjacentes telles que les claudines, les occludines ou les protéines JAM (pour « Junction Adhesion Molecules »). Du côté cytoplasmique de chacune des deux cellules, les protéines de la famille ZO (pour « zona occludens ») sont enrichies et ont un rôle primordial dans la formation de ces jonctions et dans leur connexion au réseau d'actine (Fanning et al. 1998; Giepmans & van IJendoorn 2009).

b. Les jonctions intermédiaires

Les jonctions intermédiaires représentent des domaines d'interaction entre cellules fournissant une force d'adhérence et de cohésion, d'où leur autre nom : *zonula adherens*. Elles forment une ceinture jonctionnelle autour des cellules épithéliales en dessous des jonctions serrées (Figure 17). Les protéines membranaires majeures de ces jonctions sont les cadhérines et notamment la cadhérine E. Dans l'espace extracellulaire, les cadhérines de cellules adjacentes

interagissent par un mécanisme dépendant du calcium, formant une structure cohésive stable. Chaque jonction intermédiaire est reliée au cytosquelette d'actine et au réseau de microtubules *via* les caténines (alpha et bêta) et les protéines ZO (Stehbens et al. 2006; Perez-Moreno et al. 2003). Ces jonctions interagissent également avec d'autres protéines cytoplasmiques telles que l'adenomatosis polyposis coli (APC) et la plakoglobine.

c. Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes (ou « gap junction ») assurent une communication intercellulaire en formant des pores de large diamètre permettant la diffusion passive de molécules de petite taille (<1 kDa) (Figure 17). Ces pores, assimilés à des canaux, sont très importants pour la conduction électrique, les signaux et la nutrition intercellulaires. L'ouverture et la fermeture de ces canaux sont régulées et hautement dynamiques (Goodenough et al. 1996). Ces pores sont constitués principalement d'hexamères de molécules de connexines (Falk 2000; Losa & Chanson 2015). Tout comme les autres types de jonctions, leurs interactions avec le réseau d'actine et de microtubules ont été mises en évidence.

d. Les desmosomes

Les desmosomes (*macula adherens*) représentent un ensemble de points d'adhésion en dessous de la ceinture des jonctions adhérentes (Figure 17). Ces jonctions d'ancrage sont cruciales pour l'intégrité de l'épithélium et notamment la résistance aux forces physiques appliquées. Les protéines transmembranaires des desmosomes (desmocollines et desmoglénines) interagissent avec les filaments intermédiaires intracellulaires *via* des plaques protéiques denses composées de desmoplakines, plakophilines et plakoglobines.

e. Les hémidesmosomes

Les hémidesmosomes, contrairement aux précédentes jonctions présentées, permettent l'interaction d'une cellule à la matrice extracellulaire (Figure 17). Ce sont des complexes protéiques de 0.1 à 0.5 μm , situés au pôle basale des cellules épithéliales basales (Shebani et al. 2005). Ces jonctions permettent un maintien stable des cellules, important pour la cohésion de l'épithélium, en connectant la matrice extracellulaire aux filaments intermédiaires de kératines intracellulaires notamment *via* des hétérodimères d'intégrine $\alpha 6\beta 4$. D'autres protéines majeures telles que la plectine, la dystonine et le collagène alpha-1(XVII) sont indispensables à la liaison des intégrines au cytosquelette.

4. La sécrétion de molécules antimicrobiennes

En plus du rôle de barrière physique énoncé précédemment, l'épithélium respiratoire est capable de répondre aux agressions externes par la sécrétion d'un ensemble de molécules ayant un rôle de défense mais aussi des molécules capables d'informer le système immunitaire pour une réponse adaptée.

- Le lysozyme est une enzyme sécrétée en très grande quantité (0,1 à 1 mg/mL dans les sécrétions respiratoires) par les cellules glandulaires et les cellules caliciformes de l'épithélium de surface (Konstan et al. 1982). Cet enzyme hydrolyse des liaisons de peptidoglycanes de la membrane bactérienne.

- La lactoferrine, ou lactotransferrine est une glycoprotéine globulaire de la famille des transferrines fixant des ions ferriques. Elle est sécrétée par des cellules à mucus glandulaires. Elle possède une activité antibactérienne au niveau des voies aériennes (Farnaud & Evans 2003). En effet, la lactoferrine se fixe sur les lipopolysaccharides de la paroi bactérienne et les ions ferriques entraînent la formation de peroxydes affectant la perméabilité membranaire.

- Les défensines, contenues dans le mucus, sont de petits peptides cationiques riches en cystéine dotés d'une activité antimicrobienne envers bactéries, parasites, moisissures et virus (Martin et al. 1995).

- Le SLPI (pour « Secretory Leukocyte Protein Inhibitor ») est une enzyme cationique produit par les cellules de l'épithélium respiratoire (Melrose et al., 1992). SLPI est abondamment retrouvé au niveau pulmonaire. Il possède des propriétés anti-inflammatoires, antibactériennes et antifongiques (Hiemstra et al. 1996; Williams et al. 2006).

- La cathélicidine (LL-37) est une protéine antimicrobienne retrouvée à la surface de l'épithélium mais également dans les cellules à mucus glandulaires où elle possède une large activité antimicrobienne agissant en synergie avec la lactoferrine et le lysosyme (Bals et al. 1998). LL-37 est également capable de déclencher une réponse immunitaire par les cellules épithéliales en activant l'epidermal growth factor receptor (EGFR) (Tjabringa et al. 2003). Cette protéine déclencherait l'apoptose des cellules de l'épithélium qui seraient infectées par un pathogène (Barlow et al. 2010).

- La lactopéroxydase est une enzyme également retrouvée dans le mucus. Il est estimé chez le mouton que cette protéine représente 1% des protéines solubles retrouvées dans les sécrétions pulmonaires. Son activité antimicrobienne, notamment sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Haemophilus influenzae*, repose notamment sur sa capacité à former un composant toxique, l'hypothiocyanite, à

partir de thiocyanate (Wijkstrom-Frei et al. 2003; Gerson et al. 2000). L'équipe de Conner a notamment montré que l'inhibition de la lactopéroxydase *in vivo* chez le mouton entraîne une diminution significative de la clairance bactérienne.

- En plus des molécules agissant directement sur les pathogènes inhalés, l'épithélium est également capable de sécréter des molécules qui vont engendrer une réponse immunitaire locale : ce sont les cytokines et les chimiokines (Gandhi & Vliagoftis 2015).

La réponse de l'épithélium s'initie par la reconnaissance des microbes ou des allergènes sur des ses récepteurs (Sha et al. 2004; Asokanathan et al. 2002). S'en suit le relargage de cytokines et chimiokines par l'épithélium, qui vont permettre le recrutement et l'activation d'effecteurs de l'immunité innée au site de l'infection. Ces médiateurs inflammatoires regroupent des interleukines comme l'IL-8, l'IL-6 ou l'IL-1 β , mais également le granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), la chimiokine CCL20, le granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), les transforming growth factor α (TGF- α) et β (TGF- β) ainsi que la thymic stromal lymphopoietin (TSLP) (Gómez & Prince 2008; Soumelis et al. 2002; Marcet et al. 2007). Le mécanisme immunitaire mis en jeu au niveau de l'épithélium respiratoire est très complexe, notamment du fait que chaque pathogène ou allergène est capable d'engendrer une réponse différente.

III. Les microARN

A. Historique des microARN

En 1993, les équipes de Victor Ambros (Lee et al. 1993) et de Gary Ruvkun (Wightman et al. 1993) découvraient simultanément et pour la première fois l'existence de petits ARN non codants endogènes régulant l'expression génique chez *Caenorhabditis elegans*. Sans le savoir, ils venaient de découvrir les microARN (miARN ou miR). Cette découverte a ouvert la voie à un champ de recherche dont l'objectif est de comprendre les mécanismes de biogénèse, de régulation et de fonctionnement de ces miARN. Dans ces deux études pionnières, les auteurs proposaient déjà de nombreux éléments de réponse.

Ils ont tout d'abord établi que le miARN découvert (*lin-4*) est un petit ARN de 22 nucléotides. L'équipe d'Ambros a également trouvé une forme plus longue, de 61 nucléotides, qui s'avèrera être une forme immature, le miARN précurseur (ou pré-miR, discuté plus loin). En parallèle, l'équipe de Ruvkun démontrait que l'inhibition se déroule à un stade post-transcriptionnel et que la région 3'-UTR du transcrit cible (ici *lin-14*) est suffisante pour induire l'inhibition observée. De plus, les auteurs précisent que les régions de complémentarité entre *lin-4* et *lin-14* au sein du 3'-UTR sont conservées entre espèces (à l'époque uniquement entre deux espèces de *Caenorhabditis*). Enfin, Lee et collègues

montrent que *lin-4* ne possède aucun cadre ouvert de lecture, soulignant ainsi l'aspect non codant de ce petit ARN. Les auteurs de ces deux études avaient dès lors mis en avant certaines caractéristiques essentielles propres aux miARN.

B. La nomenclature des microARN

Depuis leur découverte en 1993, le nombre de miARN identifiés a augmenté de manière spectaculaire et leur implication dans une pléthore de processus cellulaires, normaux ou pathologiques, a été largement décrite. A tel point qu'en 2006, l'équipe de Anton Enright a mis en place une base de donnée, miRBase, permettant de recenser tous les miARN identifiés chez de nombreuses d'espèces (Griffiths-Jones et al. 2006). La dernière version en date de miRBase (version 21) regroupe 434 micARN chez *C.elegans*, 466 chez *Drosophila melanogaster* et 2588 chez l'Homme. Néanmoins, la majorité des séquences de miARN recensés provient de séquençage à haut débit, une approche suffisamment sensible pour détecter des formes très minoritaires représentées par quelques lectures (notamment des formes dégradées). Dès lors, un nombre non négligeable d'entrées de cette base de données est biaisé. L'équipe de Bartel avait notamment estimé que dans la version 14 de miRBase, près d'un tiers des miARN annotés chez la souris sont des faux positifs (Chiang et al. 2010).

Chez la plupart des espèces, il existe plusieurs *loci* de miARN avec des séquences très proches, provenant principalement de phénomènes de duplication de gènes (Berezikov 2011). Bien qu'il n'y ait pas de règles formelles de nomenclature, des miARN possédant la même séquence entre les nucléotides 2 et 8 (appelée séquence « seed », discutée plus loin) sont considérés comme appartenant à la même famille. Ce sont donc 34 familles de miARN qui sont conservées de *C.elegans* à l'Homme et 196 au sein des mammifères. La nomenclature proposée stipule que des miARN d'une même famille sont identifiés par une lettre en suffixe (comme miR-449a, miR-449b et miR-449c). De plus, si plusieurs formes matures provenant de *loci* différents sont équivalentes, un suffixe numérique est ajouté (par exemple miR-125b-1 et miR-125b-2). Par ailleurs, la biogénèse des miARN génère deux séquences simples brins de miARN matures, une séquence en 5' de la structure en épingle (par exemple miR-125a-5p) et une autre séquence en 3' (par exemple miR-125a-3p). Généralement, un seul des deux brins est par la suite conservé et biologiquement actif (brin guide) comparé à l'autre généralement dégradé (brin passager ou miARN*).

Dans la partie qui suit, je vais détailler les mécanismes connus de la biogénèse des miARN, notamment chez l'Homme. J'évoquerai par la suite les mécanismes d'action par lesquels ces petits ARN non-codants provoquent l'inhibition de leur ARN messagers cibles puis je présenterai le concept

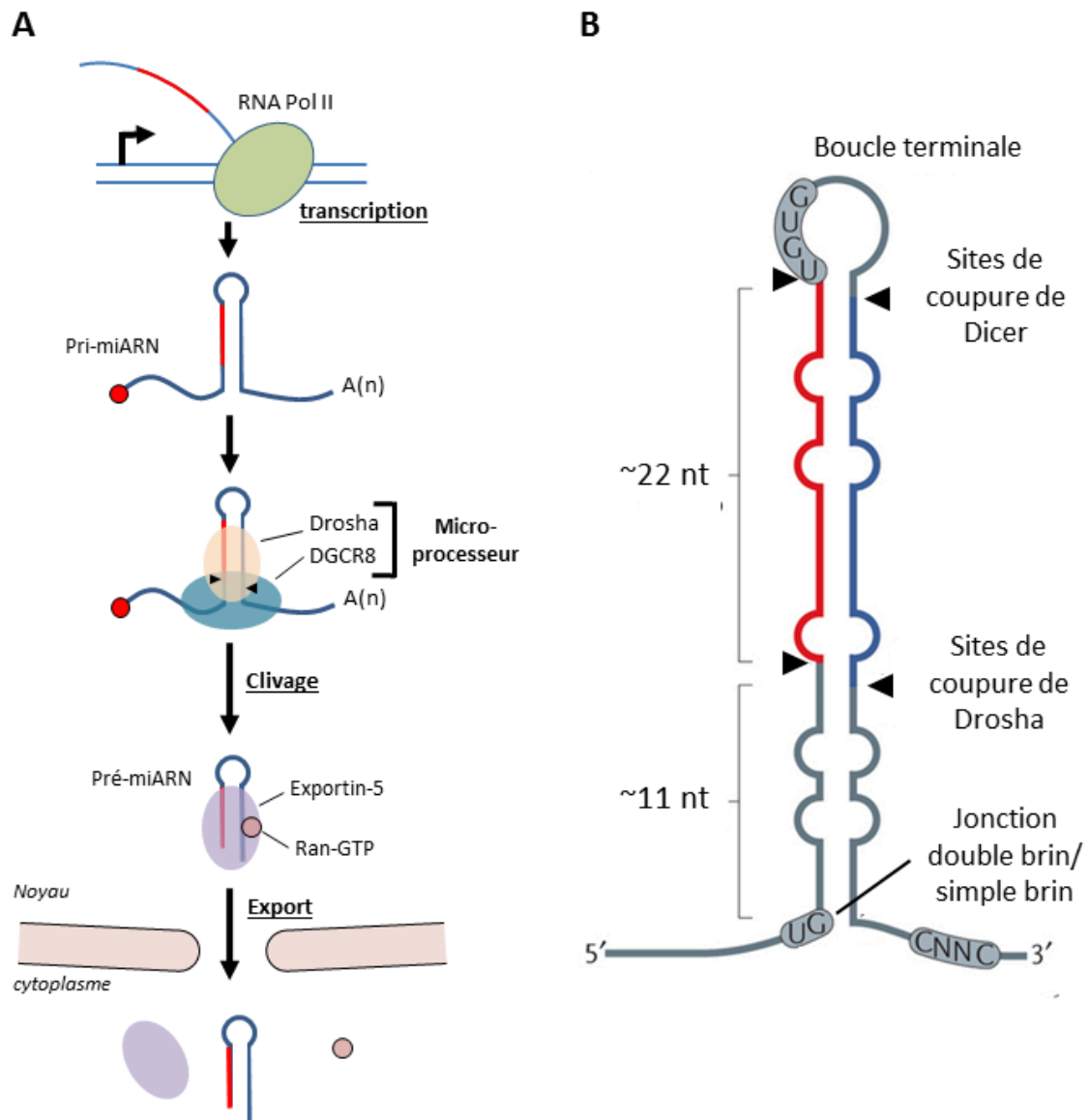


Figure 18 : Premières étapes de la biogénèse des miARN

A. Les miARN sont transcrits par l'ARN polymérase II sous forme de miARN primaires ou pri-miR. S'en suit le clivage de ce pri-miR par le microprocesseur constitué de Drosha et DGCR8. La molécule résultante d'environ 65 nucléotides (nt) appelée miARN précurseur (ou pré-miR) est prise en charge par le complexe formé des protéines exportin-5 (Exp5) et Ran-GTP afin d'être exportée dans le cytoplasme .

B. Le pri-miR présente une structure tige/boucle qui va subir deux étapes de clivage successifs aboutissant à des molécules avec une extrémité 3' cohésive de deux nucléotides. La première est réalisée par Drosha à environ 11 nt de la jonction double brin/simple brin et la deuxième par Dicer juste avant la boucle. Les motifs de séquence déterminants pour les coupures sont représentés (D'après Ha et al., 2014)

de variants de miARN appelés isomiR. Enfin, je prendrai l'exemple de la famille de miARN sur laquelle ma thèse s'est portée, miR-34/449.

C. La biogénèse des miARN

1. La transcription des miARN

Les séquences géniques à partir desquelles les miARN sont transcrits sont localisées dans différentes régions génomiques. Chez l'Homme, la plupart des séquences génomiques codant pour les miARN sont localisées dans des introns de gènes même si certaines sont situées dans des exons. Il n'est pas rare que plusieurs miARN soient réunis dans une région génomique très restreinte, formant ainsi une unité de transcription polycistronique. Les miARN introniques possèdent généralement le même promoteur que le gène hôte. Néanmoins, certains possèdent leur propre promoteur (Monteys et al. 2010). La transcription des miARN est réalisée principalement par l'ARN polymérase II même si certains miARN viraux sont transcrits par l'ARN polymérase III (Figure 18a) (Ha & Kim 2014).

2. La maturation nucléaire des microARN

A la suite de la transcription, les miARN primaires (ou pri-miR) subissent plusieurs étapes de maturation (Lee et al. 2002). Ces molécules de plusieurs kilobases contiennent des structures appelées « tige-boucle » dans lesquelles les miARN sont situés.

En 2003, l'équipe de Kim, souhaitant comprendre comment s'effectuait la maturation du pri-miR, a cloné et séquencé la forme intermédiaire dite miARN précurseur (décrite plus loin) ou pré-miR de miR-30a (Lee et al. 2003). Le séquençage de pré-miR-30a leur a permis de montrer que cette molécule a une forme de tige-boucle avec une extrémité cohésive de deux nucléotides en 3', caractéristique d'un clivage par une RNase de type III. Ils ont également mis en évidence le fait que les extrémités 5' et 3' de pré-miR-30a correspondent respectivement à l'extrémité 5' de miR-30a et l'extrémité 3' de miR-30a*, démontrant donc que cette maturation prédétermine les séquences terminales des miARN matures. Cette même équipe a identifié Drosha comme étant l'enzyme initiant les premiers clivages du pri-miR en coupant la structure tige-boucle, libérant ainsi un ARN en épingle à cheveux d'environ 65 nucléotides de long, le pré-miR (Figure 18a,b). Un an plus tard, deux équipes ont mis en évidence l'implication de DGCR8 (« Di George Critical Region 8 », appelée Pasha chez la drosophile), une autre protéine essentielle à la fonction de Drosha. Le duplex Drosha-DGCR8 forme ainsi un complexe protéique appelé microprocesseur (Gregory et al. 2004; Denli et al. 2004). Drosha et DGCR8 sont conservés chez les animaux alors que les plantes n'utilisent que des enzymes similaires à Dicer (cf infra) pour la maturation des miARN.

Comme nous venons de le voir, la coupure de la structure tige-boucle par Drosha détermine les extrémités des miARN matures. Dès lors, ce clivage se doit d'être précis. Le site de clivage est déterminé principalement par la distance (d'environ 11 nucléotides) par rapport à la jonction double brin / simple brin du pri-miR (Figure 18b). L'équipe de Kim a démontré en 2006 que DGCR8, et non Drosha, interagit directement avec le pri-miR au niveau de cette jonction (Han et al. 2006). Les auteurs supposent donc que DGCR8 est l'acteur essentiel du microprocesseur dans la reconnaissance du pri-miR, alors que Drosha ne serait que l'effecteur.

Plus récemment, une étude a montré que des motifs de séquences spécifiques situés dans la boucle ainsi que dans les régions simple brin entourant la tige-boucle sont déterminants pour leur reconnaissance par microprocesseur et donc pour la maturation du pri-miR (Auyeung et al. 2013) (Figure 18b).

Enfin, l'équipe de Dan Littman a montré chez la souris que l'absence de Drosha est létale au stade embryonnaire (au jour 7.5) reflétant le rôle essentiel des miARN au cours du développement (Chong et al. 2010).

3. L'export cytoplasmique des miARN

Une fois le clivage par Drosha réalisé, le pré-miR d'une soixantaine de nucléotides néoformé est exporté vers le cytoplasme où d'autres étapes de maturation vont pouvoir avoir lieu. C'est un complexe formé des protéines exportin-5 (Exp5) et Ran-GTP (pour « Ras-related Nuclear protein » couplée au GTP) qui va se charger du transport du pré-miR à travers les pores nucléaires (Bohnsack et al. 2004) (Figure 18a,19). Exp5 est capable de reconnaître un ARN double brin de plus de 14 nucléotides de long et possédant une extrémité 3' cohésive courte (1 à 8 nucléotides) (Gwizdek et al. 2003). Une fois le pore nucléaire franchi, le GTP est hydrolysé, provoquant le désassemblage du complexe et la libération du pré-miR dans le cytosol.

L'équipe de Bryan Cullen a montré, en réalisant une inhibition par siARN de *XPO5* (codant pour Exp5), que le niveau global de miARN diminue, mais sans accumulation nucléaire de pré-miR, suggérant ainsi qu'en plus d'un rôle de transport, Exp5 pourrait avoir un rôle de protection des pré-miR (Yi et al. 2003). Cependant, une étude très récente tend à nuancer ce résultat. En effet, l'équipe de Kim a montré, en utilisant une lignée cellulaire humaine, que la suppression de *XPO5*, ne diminue que très faiblement le niveau d'expression de la plupart des miARN (Kim et al. 2016). L'équipe en déduit que le gène *XPO5* est nécessaire mais non indispensable à la maturation des miARN.

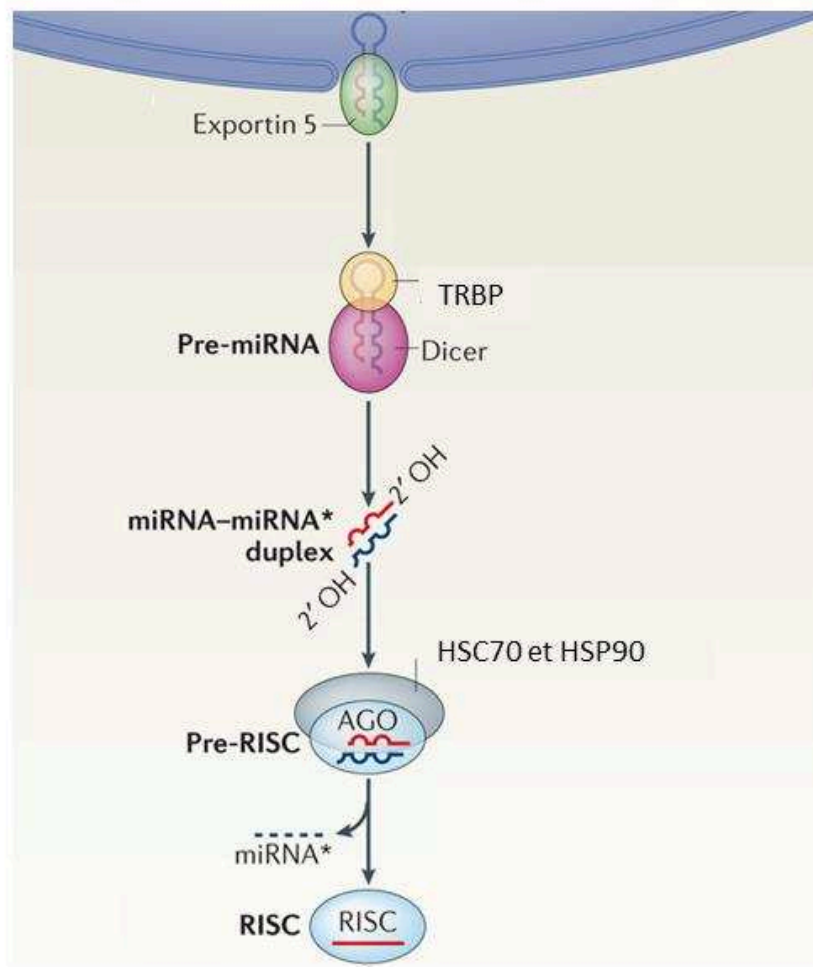


Figure 19 : Maturation cytoplasmique des miARN

Une fois exporté dans le cytoplasme, le pré-miARN subit une seconde étape de clivage par Dicer (associée à d'autres protéines comme TRBP) au niveau de sa boucle. Cette coupure entraîne la formation d'un duplex qui est ensuite pris en charge par la protéine AGO associée aux protéines chaperonnes HSC70 et HSP90. Ce complexe RISC pour « RNA-induced silencing complex » finit sa maturation en éliminant le brin passager du duplex (d'après Ameres et al., 2013).

4. La maturation cytoplasmique des miARN

Une fois le pré-miR relargué dans le cytoplasme, il est directement pris en charge par une deuxième endonucléase (RNase de type III) appelée Dicer, qui va cliver la structure du pré-miR au niveau de la boucle et ainsi produire un duplexe d'ARN d'une vingtaine de nucléotides (Bernstein et al. 2001; Hutvagner et al. 2001; Ameres & Zamore 2013) (Figure 19). Le gène et la fonction de la protéine Dicer sont très conservés dans le règne eucaryote, dénotant une nouvelle fois le rôle prédominant que jouent les miRNA dans les mécanismes cellulaires.

Dicer est une protéine de 200 kiloDaltons (kDa). Sa partie C-terminale contient deux domaines RNase III qui forment un dimère et établissent un site catalytique intramoléculaire, de manière similaire à Drosha (Zhang et al. 2004). Un domaine hélicase, situé sur l'extrémité N-terminale de Dicer permet quant à lui l'interaction avec la boucle du pré-miR (Tsutsumi et al. 2011). Le domaine PAZ (pour PIWI-AGO-ZWILLE) est composé de deux poches basiques fixant chacune une extrémité (5' et 3') du pré-miR, dès lors qu'une extrémité cohésive de 2 nucléotides est présente, ce qui explique la préférence de Dicer pour ce genre de structure générée par Drosha (Park et al. 2011; Tian et al. 2014).

La région séparant le domaine PAZ des domaines RNase III est positivement chargée et servirait à la bonne fixation du pré-miR mais également de repère afin que la coupure soit toujours à une distance fixe de l'extrémité 3' de la tige double brin du pré-miR (la règle de coupure en 3') (MacRae et al. 2007; Macrae et al. 2006). Park et collaborateurs suggèrent qu'une règle de coupure existe également du côté 5' à partir de l'extrémité phosphorylée du pré-miR (Park et al. 2011). Enfin, une dernière équipe a mis en évidence que la position de la coupure par rapport à la boucle est essentielle à une coupure efficace par Dicer (Gu et al. 2012). Les auteurs précisent que les pré-miR dont le site de clivage se situe à deux nucléotides de la boucle sont plus précisément clivés par Dicer.

Dicer est associée à des protéines possédant des domaines de liaison pour l'ARN double brin. Chez l'Homme, c'est le cas de la protéine TRBP (« TAR RNA-binding protein ») et la protéine PACT (« Protein activator of PKR »). Une étude a permis de comparer, sur des lignées cellulaires humaines, l'efficacité de clivage de Dicer seule ou complexée avec les cofacteurs PACT et TRBP. Le résultat montre que la maturation du pré-miRNA est comparable dans les deux conditions, suggérant un rôle non essentiel de ces cofacteurs dans le clivage par Dicer (Lee et al. 2006). L'équipe de Doudna a voulu comprendre le rôle de ces protéines en analysant leur structure cristallographique. Les auteurs ont mis en évidence que PACT et TRBP se fixent à Dicer d'une manière similaire et mutuellement exclusive. Ils ont également révélé que l'introduction dans des cellules de mammifères d'une forme de Dicer incapable de fixer ses deux cofacteurs entraînait des défauts dans la sélection du brin guide

du miARN (Wilson et al. 2015). En outre, deux équipes ont souligné que TRBP est capable de moduler le site de clivage produit par Dicer, générant ainsi différents variants de miRNA matures (ou isomiR, Cf Partie III.F) (Fukunaga et al. 2012; Lee & Doudna 2012).

5. Formation du complexe ribo-nucléo-protéique RISC

Le duplex d'ARN produit par Dicer est par la suite pris en charge par une protéine Argonaute (AGO) afin de former un complexe effecteur appelé RISC pour « RNA-induced silencing complex » (Hammond et al. 2001) (Figure 19).

Les protéines AGO (au nombre de 4 chez l'Homme : AGO1-4) possèdent une architecture bilobée avec un lobe N-terminal contenant un domaine PAZ et un lobe C-terminal présentant un domaine MID (Middle) et un domaine PIWI (Elkayam et al. 2012; Schirle & MacRae 2012). L'extrémité 5' monophosphate du miARN guide s'accroche au niveau d'une poche basique très conservée, à l'intersection des domaines MID et PIWI (Ma et al. 2005). De manière très intéressante, l'équipe de Nagar a démontré qu'une boucle au sein du domaine MID est discriminante vis-à-vis du nucléotide en 5' du brin guide. En effet, une adénine ou une uridine possède une affinité 30 fois supérieure avec cette boucle comparée à une cytosine ou une guanine (Frank et al. 2010). A partir de cet ancrage en 5', le brin guide se déploie le long d'un tunnel basique formé par les domaines MID et PIWI afin de rejoindre le domaine PAZ qui va fixer l'extrémité 3' du brin guide, en reconnaissant, comme pour Dicer, l'extrémité cohésive de deux nucléotides (Song et al. 2003). Il est intéressant de noter que les protéines AGO incorporent préférentiellement des duplex d'ARN possédant un mésappariement central (nucléotides 8-11).

La sélection du brin guide est déterminée avant le chargement du duplexe au sein d'AGO, principalement sur la base de la stabilité thermodynamique des extrémités du duplex (Khvorova et al. 2003; Schwarz et al. 2003). En effet, le brin possédant l'extrémité 5' la moins stable est généralement sélectionné comme brin guide.

Le relargage du brin passager et sa dégradation se déroule très rapidement après le chargement du duplexe sur AGO. Néanmoins, il nécessite préalablement la séparation des deux brins formant le duplexe. Bien que les mécanismes permettant ce « déroulage » soient inconnus à ce jour, un paramètre crucial semble être les zones de mésappariement au sein du duplexe. Ainsi, un mésappariement au niveau de la région « seed » ainsi que dans la région 3' du brin guide (entre les positions 12 et 16) sont nécessaires à la séparation des deux brins (Kawamata et al. 2009). De manière très surprenante, ces deux régions nécessaires à la séparation des brins sont primordiales pour la reconnaissance des cibles des miARN (Kawamata & Tomari 2010).

La prise en charge du duplex par AGO est un mécanisme coûteux en énergie. Les protéines chaperonnes HSC70 (« Heat Shock Cognate 70 ») et HSP90 (« Heat Shock Protein 90 ») vont utiliser de l'ATP pour disposer AGO dans une conformation dite ouverte, afin de fixer le duplex d'ARN (Iwasaki et al. 2010). Ce changement conformationnel induit des tensions intramoléculaires d'AGO et le relâchement, indépendant de l'ATP, va permettre le relargage du brin passager.

Il est important de préciser que la sélection du brin guide n'est pas une règle stricte, et que dans le cas de certains miARN, le brin passager peut également être sélectionné avec une fréquence variable. L'équipe de Bartel a par ailleurs mis en évidence des sélections de brins guides différentes selon les tissus (Chiang et al. 2010). Ce phénomène, appelé (échange de brin ou « arm switching » en anglais) peut notamment être expliqué par des coupures de Drosha alternatives, modifiant la stabilité des duplex de miARN.

Une fois le complexe ribo-nucléo-protéique RISC formé, il va pouvoir exercer son rôle répresseur auprès des ARN cibles du miARN chargé.

6. Biogénèse non canonique des miARN

Même si la grande majorité des miARN est générée par la voie canonique précédemment décrite, il existe plusieurs autres mécanismes de biogénèse atypiques. C'est en réalisant des expériences de séquençage de petits ARN sur des cellules déficientes pour Drosha, DGCR8 ou Dicer que plusieurs équipes se sont rendues compte que des miARN peuvent néanmoins être produits (Chong et al. 2010; Babiarz et al. 2008). Je citerai ici de manière succincte ces phénomènes atypiques:

- Le premier mécanisme de production de miARN non canoniques est celui des mirtrons (Ruby et al. 2007). Dans ce cas, le mécanisme d'épissage des ARN messagers (ARNm) va court-circuiter le clivage par Drosha. L'ARN ainsi formé se replie pour former une structure proche du pré-miR qui sera prise en charge par Dicer
- Certains ARN en épingle à cheveux peuvent être directement transcrits soit par l'ARN polymérase II soit l'ARN polymérase III, rendant une nouvelle fois le clivage par Drosha inutile.
- Des miARN peuvent provenir d'autres ARN non codants tels que les ARN de transfert, les snoARN (pour small nucleolar ARN) et ne pas avoir à subir de coupure par Drosha.
- Dans le cas de miR-451, la maturation ne nécessite pas de clivage par Dicer, qui sera réalisé par AGO2 directement (Cheloufi et al. 2010)
- Enfin, un dernier exemple concerne un groupe de pré-miR ayant la particularité de posséder une extrémité 3' cohésive d'un seul nucléotide uniquement. Ces derniers vont subir une étape

d'extension d'un nucléotide par monouridylation permise par les enzymes TUT (« Terminal Uridylyl Transferase »). Cette étape est indispensable pour la prise en charge par Dicer (Heo et al. 2012).

D. Reconnaissance des ARN par le complexe RISC

Les miARN illustrent parfaitement pour l'importance des ARN non codants dans la régulation de mécanismes cellulaires primordiaux. En effet, il est estimé que les miARN chez l'Homme sont capables de réguler plus de la moitié du transcriptome, représentant un impact fonctionnel dans quasiment tous les processus cellulaires (Lewis et al. 2005; Bartel 2009). Il n'est donc pas étonnant que leur dysfonction soit associée à un nombre important de pathologies (Sayed & Abdellatif 2011).

Une fois le complexe RISC mûré, le miARN chargé sur AGO va cibler ses ARNm par complémentarité. La reconnaissance miARN / ARNm est complexe et sujette à deux nombreuses régulations. Nous avons vu au début de ce chapitre que les deux premières études mettant en évidence l'existence de miARN posaient déjà quelques bases quant aux règles d'appariement du miARN avec son ARNm cible. En effet, les auteurs avaient remarqué que le miARN *lin-4* était partiellement complémentaire d'une région conservée, située dans le 3'-UTR de l'ARN cible *lin-14*. Bien que de nombreuses études aient contribué à l'amélioration des connaissances sur ce domaine de recherche, les propositions initiales concernant les mécanismes des miARN émises lors de leur découverte en 1993 demeurent, à ce jour, toujours valides.

1. Le miARN guide, déterminant majeur pour la reconnaissance des ARNm cibles

La petite taille des miARN (21 à 24 nucléotides) limite la spécificité de séquence vis-à-vis des ARNm cibles. De plus, chez les animaux, la très grande majorité des miARN ne forment qu'un duplex partiel avec leurs cibles. Cette faible spécificité explique donc qu'un seul miARN est capable de cibler plusieurs dizaines de transcrits.

Eric Lai a mis en évidence en 2002 le rôle prépondérant de la région 5' des miARN en observant, chez la drosophile, que différents miARN sont complémentaires, sur leur région 5', d'un motif consensus (k box) spécifiquement situé au sein du 3'-UTR de nombreux gènes (Lai 2002). Un an plus tard, l'équipe de Cohen a mis en place un criblage prédictif des 3'-UTR chez la drosophile, et a démontré l'importance d'une complémentarité parfaite entre l'ARNm et les nucléotides 2 et 8 du miARN (Stark et al. 2003).

Cette séquence, appelée « seed » est le déterminant le plus important pour le ciblage d'un ARN. En 2003, l'équipe de Bartel a confirmé le rôle prépondérant de cette région (Lewis et al. 2003).

Dans cette étude, les auteurs ont créé un algorithme afin d'identifier, *in silico*, les cibles potentielles des miARN chez les vertébrés. Ce programme, nommé Targetscan, combine un alignement de séquences avec une modélisation de l'interaction miARN : ARN au niveau du 3'-UTR selon des critères thermodynamiques. Targetscan, qui est aujourd'hui l'outil prédictif le plus utilisé pour la recherche de cibles de miARN, prend également en compte la conservation des régions 3'-UTR entre espèces.

L'importance de la séquence « seed » a également pu être démontrée expérimentalement. L'équipe de Phillip Sharp a construit différents 3'-UTR d'une cible connue d'un miARN avec différents mésappariements afin d'observer les régions indispensables à leur reconnaissance. Les auteurs ont pu déduire de leurs expériences que la fixation du miARN est largement gouvernée par ses 8 premiers nucléotides (Doench & Sharp 2004).

Stanley Chandradoss et collaborateurs ont utilisé récemment la méthode de transfert d'énergie par résonance en fluorescence pour étudier les mécanismes de reconnaissance de l'ARNm cible (Chandradoss et al. 2015). Cette technique permet l'émission d'un signal lumineux lorsqu'un accepteur fluorescent reçoit de l'énergie provenant d'un donneur fluorescent à faible distance. Ainsi, en fixant un donneur fluorescent au niveau d'un site cible sur un ARNm et un accepteur sur le miARN, les auteurs ont pu déterminer les événements spatio-temporels permettant la reconnaissance de l'ARNm cible. Ainsi, ils ont proposé qu'AGO scanne dans un premier temps des ARN possédant une complémentarité avec les nucléotides 2 à 4 du miARN. Cette interaction transitoire s'étend ensuite et devient stable lorsque l'appariement recouvre les nucléotides 2 à 8, motif minimum requis pour un duplex stable.

Néanmoins, plusieurs études ont mis en évidence l'importance non négligeable d'autres régions des miARN (centrales ou en 3') dans la reconnaissance de l'ARNm, notamment par des mécanismes compensatoires dans les cas où l'appariement en 5' n'est pas parfait (Vella et al. 2004; Moore et al. 2015; Shin et al. 2010).

Malgré toutes les démonstrations dénotant l'importance de la région « seed » pour la reconnaissance de l'ARNm, son rôle précis demeure encore mal élucidé. Etant donné l'ancrage du brin guide du miARN au sein d'AGO, notamment par la première base en 5', il n'est peut-être pas étonnant que ce premier nucléotide ne soit pas accessible pour les mécanismes de reconnaissance. On peut également supposer que la région « seed » corresponde à la partie du miARN mise à nue par la conformation d'AGO, permettant ainsi une hybridation avec l'ARN cible.

En outre, le fait que la grande majorité des sites cibles soit localisée dans le 3'-UTR des ARNm reste très peu discuté. Néanmoins, plusieurs études ont identifié la présence de sites aussi bien dans la séquence codante d'ARNm que dans la partie 5'-UTR (Bartel 2009; Lee et al. 2009; Liu et al. 2013). L'équipe de Brian Athey a également souligné l'existence d'une classe particulière d'ARN ciblés par les miARN (miBridge) correspondant à des ARNm possédant à la fois des sites dans leur 5'-UTR et dans leur 3'-UTR. De manière surprenante, alors que la fixation classique sur le 3'-UTR s'effectue *via* l'extrémité 5' des miARN, ces auteurs ont suggéré que la reconnaissance sur le 5'-UTR impliquerait l'extrémité 3' du miARN.

Une plus grande variabilité de séquence au niveau de l'évolution, combinée à un enrichissement de zones de faible complexité pourrait expliquer le ciblage préférentiel des miARN sur les régions 3'-UTR. Il est possible que les 3'-UTR aient évolué afin d'être ciblés par les miARN, permettant ainsi un contrôle affiné de l'expression d'un gène sans perturber sa séquence protéique. Enfin, la présence de larges complexes protéiques (notamment pour l'initiation de traduction) sur le 5'-UTR permettrait d'expliquer une préférence pour le 3'-UTR en termes de ciblage. Ces questions font toujours l'objet de débats.

2. Facteurs secondaires dans la reconnaissance d'ARNm cibles

Bien que le fondement de la reconnaissance miARN : ARN soit dicté par la complémentarité des deux molécules ribonucléotidiques, d'autres facteurs vont moduler la prise en charge de l'ARN cible par le complexe RISC.

Un critère permettant la formation du duplex miARN : ARN est l'environnement du site cible sur l'ARNm. En effet, la conformation de l'ARNm dans la région entourant le site doit être favorable à l'accès du complexe RISC. Il a d'ailleurs été montré que la plupart des sites sont entourés de régions riches en adénines ou uraciles, limitant les formations de structures secondaires intramoléculaires (Bartel 2009). Les sites situés sur le 3'-UTR sont généralement espacés du codon stop afin d'éviter toute interaction délétère avec les ribosomes terminant la traduction (Grimson et al. 2007). Par une combinaison d'approches computationnelles et expérimentales, les mêmes auteurs ont pu également suggérer qu'un site éloigné du centre de longs 3'-UTR entraînait un ciblage plus efficace. De plus, ils ont observé que des sites de miARN proches au sein d'un même 3'-UTR agissent de manière synergique dans le ciblage de l'ARNm. L'équipe de Rossi a noté qu'une répression optimale de l'ARNm cible est obtenue lorsque deux sites se situaient entre 13 et 35 nucléotides de distance (Saetrom et al. 2007).

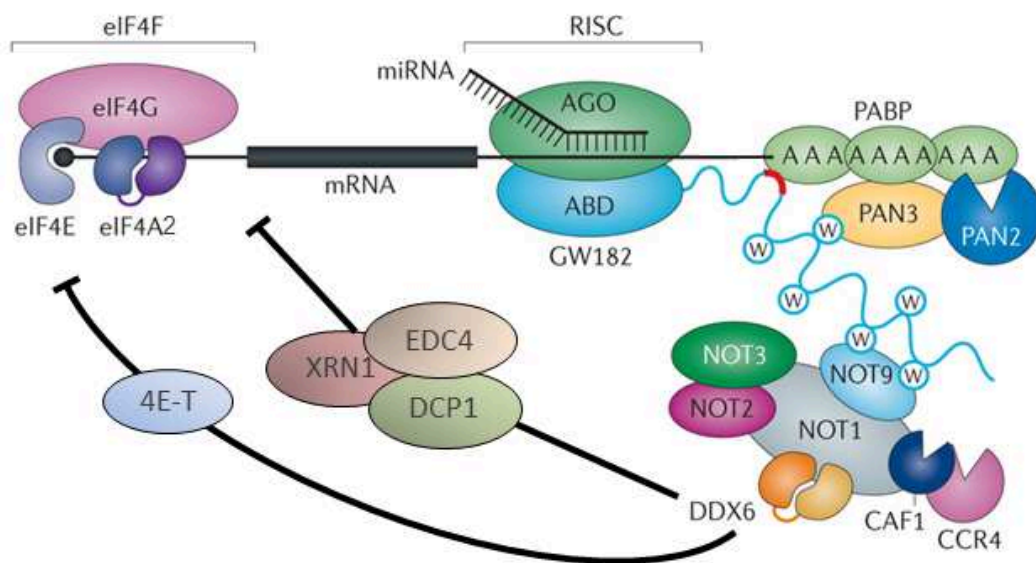


Figure 20 : Mécanismes de répression des miARN

Le complexe RISC interagit avec la protéine GW182 par le domaine ABD (« AGO Binding Domain »). GW182 permet le recrutement d'une multitude d'effecteurs de la répression des ARNm *via* les motifs tryptophane (W) sur sa partie C-terminale. La répression des ARNm consiste en leur déadénylation par les complexes CCR4-NOT et PAN2-PAN3, mais également le retrait de leur coiffe, le recrutement de la 5'-3' exonucléase (XRN1) et l'inhibition de l'initiation de la traduction par l'intermédiaire de la protéine DDX6 (d'après Jonas et al., 2015).

Par ailleurs, plusieurs ribonucléoprotéines (RNP), interagissant avec le 3'-UTR de l'ARNm, sont capables d'interférer avec la fixation du RISC ou sa fonction. Par exemple, chez l'Homme, la protéine HuR (« ELAV-like protein 1 »), exprimée dans des conditions de stress, se fixe sur le 3'-UTR du transcrite CAT-1 (codant pour « cationic amino acid transporter 1 ») au niveau de régions riches en adénine et uridine. Sa fixation va empêcher le ciblage normalement effectué par miR-122 (Bhattacharyya et al. 2006).

D'autre part, plusieurs protéines ont été décrites, chez différentes espèces, comme interagissant avec le complexe RISC et modulant son activité positivement ou négativement (Hammell et al. 2009; Neumüller et al. 2008). Néanmoins, ces mécanismes n'ont, à ce jour, pas été démontrés chez l'Homme.

Une étude récente révèle également un mécanisme de prise en charge d'ARNm totalement atypique. En effet, les auteurs soulignent qu'une région d'AGO couvrant une longueur équivalente à 10 nucléotides est capable de fixer des ARNm, indépendamment du miARN (Li et al. 2014).

E. Mécanismes de répression des microARN

Une fois le miARN fixé sur l'ARNm cible, le complexe RISC va réprimer ce transcrite par différents mécanismes aboutissant à une accélération de la dégradation de l'ARNm ainsi qu'une inhibition de la traduction (Fabian & Sonenberg 2012; Huntzinger & Izaurralde 2011). Il est estimé que la dégradation des ARNm représente le mécanisme majoritaire de répression. Pour quantifier la contribution de chaque mécanisme, l'équipe de Bartel a réalisé en parallèle un profilage ribosomique (consistant à déterminer les ARNm protégés par les ribosomes, et donc traduits), ainsi qu'un séquençage à haut débit des ARNm (Guo et al. 2010). Les auteurs suggèrent par cette expérience que 84% de la répression est attribuable à une diminution de l'expression des ARNm. Cette dégradation correspond à un enchaînement d'événements mêlant des mécanismes de déadénylation, de retrait de la coiffe des ARNm (décapping), et enfin leur clivage par des exonucléases. Ce couplage d'étapes est permis par des interactions physiques entre différents acteurs, permettant ainsi un ciblage efficace des transcrits cibles (Mathys et al. 2014; Chen et al. 2014). Notamment, une famille de protéines est centrale dans le recrutement de différentes unités effectrices générant la répression : il s'agit de la famille GW182 (Figure 20).

1. GW182, centre de recrutement pour la répression des ARNm

Les protéines GW182 sont indispensables à la répression induite par les miARN. En effet, leur déplétion empêche les effets inhibiteurs des miARN (Rehwinkel et al. 2005; Liu et al. 2005). Cette

famille de protéines est retrouvée chez tous les métazoaires. Chez les vertébrés, la famille comprend 3 paralogues (TNRC6A pour « Trinucleotide Repeat Containing 6A » appelée aussi GW182, TNRC6B et TNRC6C). Les 3 paralogues partagent la même structure caractérisée par un domaine N-terminal de fixation à AGO (domaine ABD pour « AGO Binding Domain ») et un domaine C-terminal dit « domaine inhibiteur » (Eulalio, Helms, et al. 2009; Eulalio, Tritschler, et al. 2009). Ces domaines sont caractéristiques puisqu'ils présentent de multiples motifs contenant des tryptophanes généralement entourés par des résidus avec des courtes chaînes latérales, et notamment des glycines (GW, d'où le nom de la protéine) (Eulalio et al. 2008).

L'utilisation de structures tridimensionnelles a permis de mieux comprendre l'interaction de GW182 avec ses multiples partenaires. Les résidus de tryptophane sont insérés au sein de poches hydrophobiques situées à la surface de protéines interagissant avec GW182, comme AGO par exemple *via* son domaine PIWI (Schirle & MacRae 2012). De manière intéressante, l'arrangement spatial de ces poches sur AGO permet la fixation consécutive de plusieurs tryptophanes s'ils sont écartés d'au moins 8 à 10 résidus. Même si l'interaction est principalement permise par les tryptophanes, les résidus avoisinants contribuent également à l'affinité de l'interaction.

Hormis la fixation impliquant ses différents motifs riches en tryptophane, GW182 présente une interaction avec la protéine conservée PABP (« Poly(A) Binding Protein ») *via* deux domaines situés dans son domaine inhibiteur (Figure 20). PABP est capable de se fixer sur les ARNm grâce à 4 domaines de reconnaissance (RRM1- RRM4 pour « RNA Recognition Motif »). Malgré que l'interaction entre PABP et GW182 ait été conservée au cours de l'évolution, le rôle précis de PABP reste à ce jour controversé. Plusieurs études, utilisant notamment la déplétion de cette protéine, semblent suggérer un rôle important de PABP, puisque son absence prévient la répression par les miARN (Huntzinger et al. 2013; Fabian et al. 2009). Il a été proposé que PABP serve d'ancrage au complexe RISC *via* GW182, augmentant ainsi l'affinité du complexe sur l'ARN cible. De plus, la fixation de GW182 à PABP peut interférer avec sa fonction de stimulation de traduction, participant ainsi à la répression (Huntzinger et al. 2010).

2. PAN2-PAN3 et CCR4-NOT, deux complexes de déadénylation de l'ARNm

Une fois GW182 fixées à AGO, ces protéines vont pouvoir recruter d'autres effecteurs par l'intermédiaire de leur domaine C-terminal. C'est le cas de deux complexes de déadénylation, PAN2-PAN3 (« PAB-dependent poly(A)-specific ribonuclease subunit ») et CCR4-NOT, qui vont, séquentiellement, déstabiliser l'ARNm en clivant leur queue poly(A) (Figure 20).

Dans le premier complexe, un dimère de PAN-3 va jouer le rôle d'adaptateur entre GW182 et la déadénylase PAN-2. En effet, il va pouvoir fixer PAN-2 par l'extrémité C-terminal de PAN-3, alors qu'il fixe GW182 du côté N-terminal à l'aide d'une poche de fixation au tryptophane (Wolf et al. 2014; Schäfer et al. 2014; Jonas et al. 2014; Christie et al. 2013). De plus, il semblerait que PAN-3 soit également capable de se fixer directement sur l'ARN messenger grâce à un domaine en doigt de zinc du côté N-terminal (Wolf et al. 2014).

GW182 est également capable de recruter un deuxième complexe crucial pour la répression induite par les miARN : le complexe CCR4-NOT. Ce complexe est constitué de différents modules centrés autour de la protéine NOT1, qui joue un rôle d'échafaudage (Figure 20). Cette protéine possède un domaine MIF4G (« Middle domain of eukaryotic initiation factor 4G »), qui va pouvoir fixer le module catalytique du complexe, constitué de deux déadénylases CAF1 (« CCR4-associated factor 1 ») et CNOT6 (« CCR4-NOT transcription complex subunit 6 ») (Petit et al. 2012; Basquin et al. 2012). NOT1 se fixe également à NOT9 et c'est ce complexe qui va interagir avec GW182, notamment via un domaine riche en poches de fixation au tryptophane présentes sur NOT9 (Chen et al. 2014).

La contribution de chacun des deux complexes de déadénylation reste mal élucidée. La déplétion du premier complexe PAN2 – PAN3 n'agit que faiblement sur l'efficacité de répression (Braun et al. 2011). Dès lors, CCR4-NOT serait certainement capable de compenser l'absence de PAN2-PAN3 (Wahle & Winkler 2013; Yamashita et al. 2005). Le modèle actuellement proposé stipule que PAN2-PAN3 déclenche une phase précoce de déadénylation au cours de laquelle la queue poly(A) est raccourcie. L'ARNm prédécoupé est ensuite pris en charge par CCR4-NOT qui continue la déadénylation.

3. CCR4-NOT recrute d'autres répresseurs de l'ARNm

En plus de son rôle fondamental dans la déadénylation des ARNm cibles, le complexe CCR4-NOT va participer, *via* le recrutement d'autres protéines, au retrait de la coiffe de l'ARNm ainsi qu'à l'inhibition de la traduction. A ce titre, plusieurs équipes ont mis en évidence, chez le xénope, la drosophile et l'Homme, que CCR4-NOT était capable d'inhiber la traduction indépendamment des mécanismes de déadénylation (Cooke et al. 2010; Zekri et al. 2013; Bawankar et al. 2013).

CCR4-NOT serait capable de se fixer à une ARN hélicase, eIF4A2 (« eukaryotic initiation factor 4A-II »), qui est un facteur d'initiation de la traduction. eIF4A2 déroule les structures secondaires situées sur le 5'UTR des ARNm et permet ainsi l'accès au complexe 43S de pré-initiation de la traduction de se fixer. Dès lors, sa fixation avec CCR4-NOT l'immobiliserait au niveau du 5'-UTR, empêchant ainsi une traduction efficace (Meijer et al. 2013).

Séquence du pri-miR

AAUCAGCAGCUACAUCUGGCUACUGGGUCUCUGAU



Figure 21 : Les différentes formes d'isomiR

Les 5'- et 3'-isomiR diffèrent du miR canonique par l'addition ou la suppression de nucléotides. Les nucléotides ajoutés sont dits « alignés » s'ils correspondent à des nucléotides présents sur le pri-miR (représentés en orange) ou « non alignés » (représentés en vert). (D'après Neilsen et al., 2012)

Par ailleurs, CCR4-NOT interagit avec DDX6 (« DEAD box protein 6 ») qui possède une fonction répressive triple (Figure 20). Dans un premier temps, DDX6 va entraîner le retrait de la coiffe des ARNm cibles en formant un complexe avec plusieurs protéines (EDC3, EDC4 pour « Enhancer of mRNA-decapping protein 3-4 » et DCP1A et DCP1B pour « Decapping mRNA 1A-B ») (Rehwinkel et al. 2005; Behm-Ansmant et al. 2006). De plus, Braun et collaborateurs ont démontré qu'EDC4 et DCP1 interagissent avec XRN1 chez l'Homme et la drosophile (Braun et al. 2012). XRN1, qui est une exonucléase de 5' à 3', va cliver l'ARNm ne possédant plus de coiffe protectrice. D'autre part, DDX6 va entraîner la répression de la machinerie traductionnelle. En effet, cette protéine recrute la protéine 4E-T (« Eukaryotic translation initiation factor 4E transporter ») qui réprime l'initiation de la traduction par compétition, en se fixant sur eIF4E et en empêchant ainsi sa fixation avec eIF4G (Kamenska et al. 2016).

Nous avons vu à travers ce chapitre la complexité des mécanismes de répression induits par les miARN. En multipliant les différents points de contrôle (déadénylation, décapping, dégradation 5' vers 3', inhibition de la traduction), les miARN assurent une inhibition efficace, fine et spécifique des ARNm cibles.

F. Les isomiR

Nous venons de voir qu'un pré-miR engendre la formation d'un miARN mature (ou deux dans certains contextes où le brin passager est sélectionné). Néanmoins, l'analyse de données de séquençage haut débit révèle l'existence de multiples formes dérivées d'un seul miARN. Ces séquences ont pendant longtemps été considérées comme des artéfacts de séquençage. Pourtant, des nouvelles techniques bio-informatiques et l'introduction d'ARN synthétiques contrôlés ont permis l'identification d'un nombre grandissant de ces variants, généralement conservés au cours de l'évolution, dont l'expression laisse entrevoir un nouveau niveau de complexité dans la régulation par les miARN (Wyman et al. 2011). Ces molécules, pouvant différer du miARN mature canonique par la longueur mais également par la séquence, sont réunis sous le nom « d'isomiR ». La preuve de leur existence est récente, et de nombreuses études cherchent désormais à élucider leur rôle physiologique.

1. Les différentes formes d'isomiR

L'équipe de Cameron Bracken a proposé de catégoriser les isomiR selon 3 grandes classes (Nielsen et al. 2012) (Figure 21) :

- Les 5'-isomiR
- Les 3'-isomiR

- Les isomiR polymorphiques

Les deux premières classes correspondent à des isomiR différant du miARN canonique en longueur par l'ajout ou la suppression de nucléotides en 5', ou en 3'. Les additions sont dites « alignées » ou « non-alignées » dès lors que les nucléotides surnuméraires s'alignent ou non sur la séquence génomique du miARN. La dernière classe d'isomiR correspond à des mutations (ou éditions) au sein même de la séquence du miARN mature, sans en modifier la taille.

Il est important de noter que la très grande majorité des isomiR appartient à la deuxième classe, celle des 3'-isomiR. Ce résultat est mis en évidence par le nombre de miARN touchés par ce type de modifications mais aussi par l'abondance des variants engendrés (Wyman et al. 2011; Lee et al. 2010; Burroughs et al. 2010; Newman et al. 2011).

L'observation de ces différents variants dans les analyses de séquençage soulève une première question essentielle : Comment un mécanisme contrôlé de biogénèse de miARN permet une telle hétérogénéité de séquences ? La réponse est complexe. La diversité des séquences retrouvées peut être imputable à des coupures variables lors des étapes de biogénèse, mais également à des événements indépendants de la biogénèse, tels que des additions ou clivages, ou des polymorphismes.

Comme nous l'avons précédemment abordé, les extrémités 5' et 3' des miARN sont déterminées par les coupures successives par Drosha et Dicer. Les isomiR différant en longueur du miARN canonique peuvent donc provenir d'un clivage imprécis par l'une et/ou l'autre des ribonucléases (Starega-Roslan et al. 2011). Des études ont validé expérimentalement ce phénomène fréquent en réalisant des essais de clivage d'ARN *in vitro* dans lesquels des précurseurs de miARN (pri-miR ou pré-miR) ont été co-incubés avec Dicer ou Drosha (Starega-Roslan et al. 2011; Wu et al. 2009). Le clivage imprécis est imputable préférentiellement à Dicer (Zhou et al. 2012) plutôt qu'à Drosha, même si des contre-exemples existent, comme celui de miR-142 (Wu et al. 2009; Zhou et al. 2012). Néanmoins, les déterminants justifiant la susceptibilité de certains miARN à présenter différents variants sont, à ce jour, mal connus. En étudiant les structures secondaires de 19 pré-miR, l'équipe de Wlodzimierz Krzyzosiak suggère que leur structure influence le clivage par Dicer. Notamment, la présence de mésappariements le long de la tige, causant des boucles ou des renflements, serait une cause majeure d'hétérogénéité de longueur des isomiR. Les auteurs ajoutent que le clivage par Dicer est également flexible, ajoutant ainsi à l'imprécision du clivage. L'observation et l'analyse à grande échelle des séquences génomiques avoisinant les miARN permettraient peut-être de définir un environnement plus ou moins favorable à la fixation de DGCR8 et/ou la coupure

précise par Drosha. De même, la comparaison des différentes conformations des boucles des pré-miR engendrant des variants, fournirait de nouvelles règles de clivage imputables à Dicer.

Le deuxième phénomène expliquant les variants en longueur réside dans l'existence d'enzymes pouvant modifier post-transcriptionnellement les précurseurs par l'addition ou le clivage de nucléotides. Ces mécanismes n'ont été observés, à ce jour, que sur l'extrémité 3' de miARN chez l'Homme. Comme nous venons de le voir, la grande majorité des variants de miARN sont des 3'-isomiR. Cette disproportion est partiellement explicable par la disponibilité de l'extrémité 3' des miARN lorsqu'ils sont chargés sur AGO, dès lors plus facilement sujette à l'action d'exonucléases ou de nucléotidyltransférases (Elkayam et al. 2012; Schirle & MacRae 2012; Martin & Keller 2007). A l'inverse, l'extrémité 5' étant piégée dans une poche basique présente à l'intersection des domaines MID et PIWI d'AGO, est protégée de toute modification (Ma et al. 2005).

Deux études parallèles chez la drosophile mettent en évidence l'importance d'une exonucléase de 3' en 5', appelée nibbler. Sa déplétion est létale et conduit à la perte de 3'-isomiR, dénotant l'importance de cette enzyme pour la formation de 3'-isomiR, mais également l'importance des isomiR (Liu et al. 2011; Han et al. 2011). L'équipe de Stepanka Vanacova a montré chez l'Homme que l'exonucléase DIS3L2 (« DIS3-like exonuclease 2 ») cible les pré-miARN de la famille let-7 possédant une uridine en 3' (Ustianenko et al. 2013). Un autre exemple est donné par miR-451 dont la biogénèse est particulière puisque sa maturation ne nécessite pas de clivage par Dicer. Yoda et collaborateurs ont mis en évidence une ribonucléase, PARN (« poly(A)-specific ribonuclease ») capable de couper ce miARN pour générer sa forme mature (Yoda et al. 2013).

Les nucléotidyltransférases sont des enzymes capables quant à elles de catalyser l'addition de nucléotides aux extrémités de molécules d'ARN. La plupart de ces protéines sont des polymérases de 5' vers 3' ce qui explique l'ajout préférentiel de nucléotides non-alignés en 3'. Chez l'Homme, ces enzymes sont au nombre de 12, dont 7 sont impliquées dans la biogénèse des isomiR (Wyman et al. 2011). Ces enzymes possèdent des activités adényltransférase et/ou uridylyltransférase, ce qui corrobore les observations montrant que l'adénylation et l'uridylation sont les modifications les plus courantes retrouvées sur les 3'-isomiR (Burroughs et al. 2010). C'est l'équipe de Kim qui a montré pour la première fois l'implication chez l'Homme d'une de ces enzymes dans la modification de miARN (Heo et al. 2008). Les auteurs ont démontré que Lin-28a et Lin-28b répriment la biogénèse des miARN de la famille let-7 en induisant l'uridylation des pré-miR. Les travaux de Wyman et collaborateurs ont permis d'évaluer le niveau de modifications (en particulier les additions non alignées) des miARN à grande échelle et la contribution de différentes nucléotidyltransférases dans la formation d'isomiR (Wyman et al. 2011). Les auteurs démontrent que ces modifications sont

fréquentes mais hétérogènes puisqu'elles sont très fortement retrouvées chez certains microARN, alors que d'autres microARN ne présentent aucune modification. En analysant 9 ensembles de données de séquençage haut débit chez l'Homme, ils montrent que la distribution des nucléotides ajoutés est très uniforme avec une nette prédominance pour une mono-adénylation en 3' (50% des additions répertoriées) suivie d'une mono-uridylation (25% des additions). En réalisant des expériences d'ARN interférence sur différentes nucléotidyltransférases, cette équipe montre que sur 8 enzymes inhibées, 7 entraînent la diminution d'expression d'au moins un variant en 3'. Les TUTases 2 et 3 (« Terminal uridylyltransferase 2-3 ») sont majoritairement responsables des additions d'adénine en 3' alors que U6-TUTase et TUTase 7 sont responsables des uridyliations en 3'. D'autres exemples démontrent également l'importance de certaines de ces enzymes pour la modification de certains miARN. C'est le cas de miR-21 adénylé par TUTase 3 (Boele et al. 2014) ou encore miR-26a uridylylé par TUTase 4 (Jones et al. 2009).

2. Spécificité d'expression des isomiR

La comparaison des profils d'expression des isomiR dans différents types cellulaires démontre que la biogénèse de certains isomiR pourrait être spécifique à tel ou tel tissu. Burroughs et collaborateurs ont comparé les niveaux d'uridylation et d'adénylation en 3' pour différents *loci* de miARN dans 4 différentes lignées cellulaires. Ils observent une bonne corrélation pour les uridyliations en 3' mais non pour les adénylations en 3' (Burroughs et al. 2010), suggérant un mécanisme spécifique de certaines cellules pour entraîner cette modification. Une autre équipe a montré, grâce à l'utilisation de Northern Blot, que la proportion d'isomiR provenant d'un même miARN, pouvait différer selon le type cellulaire ou tissulaire (Tan et al. 2014). L'équipe d'Eulalia Marti a montré que la répartition d'expression de miR-101 et de son 5'-isomiR dépendait des tissus observés (Llorens et al. 2013).

A l'inverse, Wyman et collaborateurs ne trouvent pas de différences importantes entre 9 différents ensembles de données de séquençage chez l'Homme (correspondant à différents tissus) (Wyman et al. 2011). En revanche, ces derniers démontrent sur des cellules souches embryonnaires humaines que les additions en 3' évoluent au cours de la différenciation de ces cellules, suggérant un mécanisme physiologiquement régulé. Newman et collaborateurs arrivent à la même conclusion en observant des changements d'uridylation dans la famille de miARN let-7 en fonction du stade de différenciation (Newman et al. 2011).

Ces résultats sont particulièrement intéressants, puisqu'ils suggèrent que la biogénèse d'isomiR n'est pas forcément aléatoire mais peut-être dynamique et sujette à régulations. Néanmoins, la présence d'isomiR est un phénomène très fréquent, alors que la régulation de leur production est

très rare, voire anecdotique. De plus, à ce jour, aucune étude n'a décortiqué les mécanismes expliquant l'expression de certains variants dans un contexte particulier.

3. Stabilité des isomiR

Etant donnée la grande diversité de variants regroupés sous le terme d'isomiR, il est difficile d'énoncer une règle générale permettant d'établir la stabilité des différents isoformes d'un microARN. Katoh et collaborateurs ont démontré chez l'Homme que l'adénylation de miR-122 par la TUTase 2 (ou hGLD-2) augmente sa stabilité alors que sa déadénylation par PARN et CUG-BP1 le déstabilise (Katoh et al. 2009; Katoh et al. 2015). A l'inverse, Burroughs et collaborateurs suggèrent, en utilisant des cellules déficientes pour des nucléotidyltransférases et notamment hGLD-2, que l'addition d'adénine en 3' n'affecte pas la stabilité des isomiR (Burroughs et al. 2010). De même, l'uridylation de miR-26a par TUTase 4 ne montre aucun effet sur sa stabilité (Jones et al. 2009).

Une étude récente a cherché à déterminer l'impact de l'extrémité des séquences de microARN sur leur stabilité (Guo et al. 2015). En bloquant la transcription dans des fenêtres de temps précises, les auteurs ont pu estimer la stabilité des miARN. Ils ont ainsi pu déterminer que les miARN dont la première base est un G ou un C sont très instables, alors que les miARN débutant par un U sont très stables. Ces données sont en phase avec les règles de chargement sur AGO, avec une préférence pour une adénine ou une uracile (Frank et al. 2010). A l'inverse, les auteurs notent que la présence d'une cytosine en dernière position du miARN le déstabilise contrairement à une guanine, qui elle le stabilise. Il faut cependant préciser que ces observations en 3' ne prennent pas en compte les additions non alignées, contrairement aux études citées plus haut. Cette étude laisse donc imaginer, bien que cela n'ait pas été démontré, que les 5'-isomiR peuvent présenter des profils de stabilité différents. En effet, la première base en 5' étant discriminante pour le chargement au sein d'AGO, les 5'-isomiR pourront dès lors présenter des prises en charge différentes, influençant ainsi leur stabilité et leur ciblage.

4. Fonction des isomiR

Une des questions primordiales à laquelle la plupart des chercheurs du domaine essayent de répondre est de savoir si les isomiR ont un ciblage différent et donc un rôle physiologique qui leur est propre. Bien que le nombre d'études tentant d'élucider cet aspect ne cesse de croître, la réponse demeure à ce jour encore floue.

Le problème est à scinder dès lors que l'on parle d'3'-isomiR, ou bien d'5'-isomiR et isomiR polymorphiques. En effet, les deux derniers pouvant entraîner un décalage ou une modification de la séquence « seed », le ciblage des ARN a de grandes chances d'être modifié.

En 2009, Jones et collaborateurs ont montré pour la première fois un effet fonctionnel différent d'un isomiR vis-à-vis de son miR canonique. En effet, les auteurs soulignent que la TUTase 4 rajoute des uridines en 3' de miR-26, ce qui a pour effet de supprimer son ciblage sur l'IL-6 (Jones et al. 2009). Cette perte d'activité de l'isomiR peut être expliquée, au moins partiellement, par un défaut de maturation ou de prise en charge au sein d'AGO. Une autre étude a mis en évidence que l'uridylation en 3' de pré-miR engendre le blocage de la prise en charge par Dicer (Heo et al. 2009). L'équipe de Carsten Daub a quant à elle analysé l'effet d'addition de nucléotides en 3' de miARN sur la prise en charge par AGO et donc sur l'efficacité des isomiR (Burroughs et al. 2010). Pour cela, les auteurs ont comparé les niveaux d'expression de miARN obtenus sur cellules entières et après immunoprécipitation des différentes protéines AGO (AGO1, 2 et 3). Ils ont ainsi pu montrer que l'addition d'adénine en 3' réduit la prise en charge des isomiR par AGO2 et AGO3 mais non par AGO1, alors que l'addition d'autres nucléotides n'a globalement aucun effet. En parallèle, les auteurs ont montré à l'aide de plusieurs exemples que l'ajout d'une adénine entraîne une diminution, bien que mineure, de l'inhibition de certains ARNm cibles. Ces études suggèrent qu'un défaut de maturation ou un chargement préférentiel sur AGO pourrait influencer l'activité d'un miARN. Cloonan et collaborateurs nuancent cependant les précédents résultats en comparant les séquences de miARN obtenues sur cellules entières ou associées aux RISC. Ils révèlent ainsi que les variants de miARN (de tous types) détectés dans les deux fractions sont globalement identiques (Cloonan et al. 2011).

L'équipe de Yukihide Tomari a analysé l'influence du clivage en 3' par PARN de miR-451 sur son activité répressive (Yoda et al. 2013). En utilisant des ARN possédant des sites cibles de miR-451, ils ont pu observer que la forme clivée entraîne la même activité répressive que la forme non clivée.

De nombreux polymorphismes sur un nucléotide (ou SNP pour « Single Nucléotide Polymorphism ») ont été imputés aux miARN dans des ensembles de données de séquençage, et parfois associés à des pathologies (Mullany et al. 2015; Zorc et al. 2012; D. Wu et al. 2014; Bagheri et al. 2016). Cependant, ces études mettent en évidence des SNP au sein des 3'-UTR des ARNm cibles, et non sur le miARN. A ce jour, aucune étude n'a analysé l'influence de ces mutations sur la stabilité du miARN ni sur son efficacité de ciblage, même lorsque le SNP se situe dans la région « seed » du miARN. Cela pourrait suggérer que de tels polymorphismes ne sont pas sélectionnés au cours de l'évolution.

Les 5'-isomiR présentent un décalage au niveau de la séquence « seed », suggérant ainsi des effets fonctionnels différents de leur miARN canonique. En 2011, Cloonan et collaborateurs ont réalisé un travail pertinent afin de comparer la prise en charge et l'activité des miARN canoniques ou des isomiR (Cloonan et al. 2011). Les auteurs ont couplé des miARN synthétiques (correspondant à

différents isomiR d'un même miARN) avec de la biotine avant de les transfecter dans des cellules. Par la suite, ils ont récupéré, grâce à la streptavidine, les complexes formés par les miARN et leur cibles au sein d'AGO, et ont séquencé les ARNm afin d'établir le « targetome » de chaque miARN ou isomiR. Ils concluent, par l'exemple de miR-10 et ses variants, que les isomiR ciblent un grand nombre d'ARNm en commun avec le miARN canonique. Une autre étude s'est intéressée à caractériser un variant de miR-101 (Llorens et al. 2013). Les auteurs ont révélé que le 5'isomiR-101 est capable de diminuer l'expression de 5 cibles validées de miR-101, mais dans une moindre mesure. Une autre publication récente s'intéressant au 5'-isomiR de miR-142-3p a montré que ce variant possède des sites de fixation distincts du miR canonique sur différents ARNm. Dès lors, cet isomiR est capable de cibler des ARNm distincts de miR-142-3p, mais également certains en commun (Manzano et al. 2015).

Ces résultats surprenants montrent que les 5'-isomiR, bien que possédant un « seed » différent, sont capables d'agir de manière coopérative avec les miARN canoniques. Cela suppose donc que des cibles agissant dans une même signalisation cellulaire ont évolué de manière à être ciblées par tel ou tel variant d'un microARN. Cette pression de sélection a pu être avantageuse pour réguler de manière intense un processus, ou bien pour cibler des ARNm présents dans un tissu ou un seul des variants est exprimé. Il est intéressant de noter que le décalage du « seed » n'est pas forcément délétère pour la fixation du miARN sur sa cible, dès lors que cette dernière présente une séquence permettant un appariement décalé. Par exemple, dans le cas d'isomiR présentant un nucléotide en plus en 5', il suffit que le site cible présente la base complémentaire en 3' pour permettre l'appariement du nouveau « seed ».

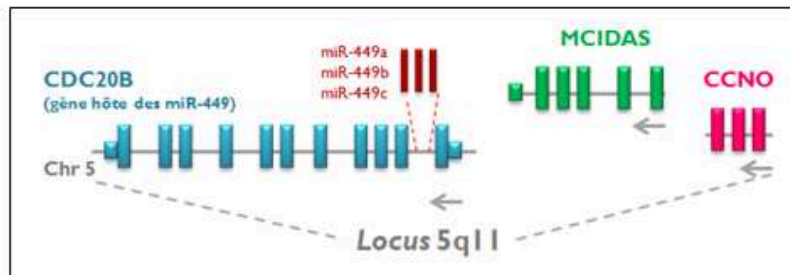
Malgré les efforts récents afin de comprendre la biogénèse et le rôle physiologique de ces variants naturels et pour la plupart conservés, de nombreuses zones d'ombre subsistent. Le manque d'outils permettant de contrôler (et notamment bloquer) de manière spécifique l'expression d'un seul variant empêche d'avoir une vision complète sur la fonction de ces isomiR. Cependant, ces nombreuses découvertes révèlent un nouveau niveau de complexité du monde des miARN.

G. Les miARN de la famille miR-34/449

1. Localisation génomique chez l'Homme

La famille miR-34 est composée de 3 miARN, miR-34a/b/c. Tandis que les membres miR-34b et miR-34c sont exprimés à partir du même transcrite primaire issu d'une région située sur le chromosome 11 chez l'Homme (*locus* 11q23), miR-34a est quant à lui transcrit à partir du chromosome 1 (*locus* 1p36). La famille miR-449 est également composée de 3 membres, miR-449a/b/c, qui sont quant à eux regroupés au sein d'une même région génomique sur le chromosome

locus des miR-449



locus des miR-34b/c

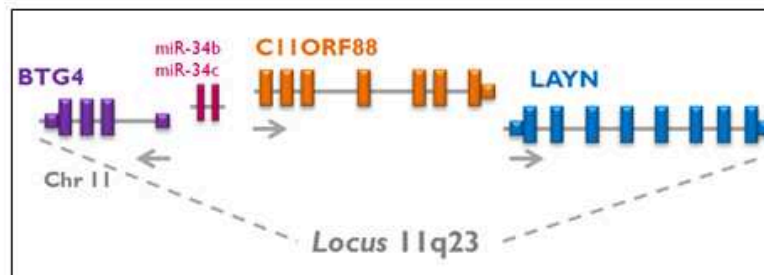


Figure 22 : Localisation génomique des *loci* des miR-449 et des miR-34b/c chez l'Homme

Les miR-449 (a, b, c) sont situés dans le 2^e intron de leur gène hôte *CDC20B*. Ce *locus* regroupe également les gènes clés de la multiciliogénèse *CCNO* et *MCIDAS*. Les miR-34b/c sont localisés dans le chromosome 11 au sein du *locus* 11q23.

5 (*locus* 5q11). Plus précisément, les miR-449a/b/c sont localisés au niveau du deuxième intron du gène *CDC20B* codant pour une protéine dont la fonction, qui est actuellement inconnue, fait l'objet d'études au laboratoire (Figure 22).

Du fait de leur forte homologie de séquence notamment de leur région « seed » (Figure 23), les familles miR-34 et miR-449 ont été regroupées dans une même superfamille nommée miR-34/449.

2. Leur conservation au cours de l'évolution

Les miR-34 et les miR-449 sont extrêmement conservés au cours de l'évolution. Les miR-449 sont retrouvés dans la quasi-totalité des vertébrés et notamment chez le xénope (Marcet, Chevalier, Luxardi, et al. 2011; Marcet, Chevalier, Coraux, et al. 2011). De manière surprenante, les autres gènes du locus 5q11 ont globalement évolué de la même manière que les miR-449. Leur conservation parallèle pourrait suggérer que chacun des membres du locus aurait une fonction complémentaire dans le contrôle d'un même processus biologique. Étonnamment, les miR-449, tout comme leur gène hôte *CDC20B*, seraient absents du génome du poisson zèbre. Cette particularité sera discutée dans le chapitre IV.A.1.a.

Les miR-34 ont une conservation encore plus importante que leurs homologues miR-449 puisqu'ils sont également retrouvés chez des invertébrés tels que la drosophile (Soni et al. 2013; Liu et al. 2012) ou encore le ver annélide marin *Platynereis* (Christodoulou et al. 2010).

Il est probable que ces 6 miARN proviennent d'une seule séquence ancestrale qui se soit ensuite dupliquée au cours de l'évolution, suggérant que ce phénomène ait pu apporter un avantage sélectif aux organismes concernés. Les séquences ont légèrement divergé avec le temps (Figure 23) et ont pu apporter, en plus d'une redondance, une certaine complémentarité.

3. Profil d'expression tissulaire chez l'Homme

Cinq des six membres de la famille miR-34/449 partagent une expression tissulaire très similaire. En effet les miARN miR-34b/c et -449a/b/c, malgré leur localisation génomique distincte sur deux chromosomes différents, possèdent un profil d'expression équivalent. L'équipe de Matthias Dobbstein ainsi que mon équipe d'accueil ont mis en évidence leur expression très importante au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire (Marcet, Chevalier, Coraux, et al. 2011; Marcet, Chevalier, Luxardi, et al. 2011; Muriel Lizé et al. 2010). Plus particulièrement, mon équipe d'accueil a démontré la spécificité d'expression de ces miARN dans les MCC de vertébrés aussi bien dans l'épithélium respiratoire humain que dans l'épiderme d'embryon de xénope (Marcet, Chevalier, Luxardi, et al. 2011). D'autres études ont par la suite identifié leur

miR-449a	U GGCAGUGU AUUGUUAGCUGGU---
miR-449b	A GGCAGUGU AUUGUUAGCUGGC---
miR-449c	A GGCAGUGU AUUGCUAGCGGCUGU-
miR-34a	U GGCAGUGU C---UUAGCUGGUUGU
miR-34b	A GGCAGUGU C--AUUAGCUGAUUGU
miR-34c	A GGCAGUGU A--GUUAGCUGAUUGC

Séquence
« seed »

Figure 23 : Séquences des miR-34/449 matures

Les miR-34 et miR-449 partagent la même séquence « seed ». D'autres nucléotides (en rouge) sont parfaitement alignés, notamment du côté 3' de ces miARN

expression dans d'autres tissus composés de MCC tels que les ventricules cérébraux, les trompes utérines ou les testicules (Jingwen Wu et al. 2014a; Comazzetto et al. 2014; R Song et al. 2014). En revanche, miR-34a possède un profil d'expression beaucoup plus ubiquitaire suggérant d'un rôle partiellement distinct.

4. Fonction des miR-34/449

Historiquement, miR-34a est le premier membre de la famille à avoir été fonctionnellement décrit. En 2007 et 2008, plusieurs publications ont révélé que l'expression de miR-34a est sous le contrôle de la protéine Cellular tumor antigen p53 (p53) et que ce miARN a une action pro-apoptotique et bloque le cycle cellulaire, mettant en avant son rôle de suppresseur de tumeurs chez l'Homme (Chang et al. 2007; Tarasov et al. 2007; Raver-Shapira et al. 2007; Yamakuchi et al. 2008). MiR-34a est notamment capable de cibler l'histone déacetylase SIRT1, et ainsi permettre à p53 d'être sous sa forme active. Ceci met donc en évidence une boucle de régulation positive entre p53 et miR-34a (Yamakuchi et al. 2008). Le contrôle de miR-34a par p53 a été par la suite étendu à tous les miR-34 (Bommer et al. 2007).

Plus tard, le rôle des autres membres de la famille miR-34/449 sur le cycle cellulaire et l'apoptose chez l'Homme a été rapporté (Yang et al. 2009a; Bou Kheir et al. 2011; Sun et al. 2008). Certains acteurs associés à ces processus ont été validés comme cibles de différents membres de la famille miR-34/449, soulignant la redondance d'action de ces miARN sur certains transcrits. Très récemment, la famille miR-34/449 a été également décrite comme contrôlant l'orientation du fuseau mitotique au niveau du cerveau (Fededa et al. 2016)

En 2011, mon laboratoire d'accueil a été le premier à révéler le rôle conservé chez les vertébrés de la famille miR-34/449 dans le contrôle de la différenciation des cellules multiciliées (ou multiciliogénèse) réprimant à la fois le cycle cellulaire et la voie de signalisation Notch (Marcet, Chevalier, Coraux, et al. 2011; Marcet, Chevalier, Luxardi, et al. 2011). Je développerai plus loin les résultats de cette étude, à partir de laquelle mon travail de thèse s'inscrit (Cf Résultats). Ces résultats ont par la suite été largement confirmés par trois études qui ont montré que des souris invalidées pour les miR-34/449 présentent des défauts de multiciliogénèse (Rui Song et al. 2014; J Wu et al. 2014; Comazzetto et al. 2014). Le double KO des miR-449a/b/c et miR-34b/c est suffisant pour perturber la formation des MCC dans les différents tissus concernés, excluant ainsi un rôle de miR-34a dans ce processus (Jingwen Wu et al. 2014a; Comazzetto et al. 2014). Ces souris présentent des défauts de fertilité (Oligoasthénospermie), de développement du cerveau et des désordres respiratoires. Song et collègues ainsi que l'équipe de Kintner ont par ailleurs rapporté un rôle plus

tardif de miR-34/449, en réprimant la protéine centriolaire Cp110, évènement crucial préalable à la mise en place des cils vibratiles (Rui Song et al. 2014; Walentek et al. 2016)

Cette famille de miARN a également été associée à différents cancers où leur expression est généralement diminuée (Noonan et al. 2009; Jeon et al. 2012). Leurs fonctions de bloqueurs du cycle cellulaire, d'effecteurs de l'apoptose et de suppresseurs de tumeurs suggèrent un rôle potentiel de ces miARN dans le traitement des cancers. D'ailleurs, miR-34 a été le premier miARN à atteindre les phases cliniques pour le traitement du cancer (Ling et al. 2013). La phase 1 en cours depuis avril 2013 s'est malheureusement soldée par un échec suite à des effets secondaires graves (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01829971>).

5. La régulation des miR-34/449

A l'heure actuelle, plusieurs mécanismes de régulation de la famille miR-34/449 ont été dévoilés dans divers contextes cellulaires. Comme nous l'avons vu précédemment, p53 est capable d'activer directement l'expression des miR-34a/b/c dans différentes lignées cellulaires (Bommer et al. 2007). Pour cela, les auteurs ont combiné des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine et de gènes rapporteurs.

En 2009, Yang et collègues ont révélé que le régulateur du cycle E2F1 (« Transcription factor E2F1 ») est capable d'activer directement l'expression de miR-449a et miR-449b dans des cellules cancéreuses (Yang et al. 2009b). Les auteurs ajoutent que dans ces lignées cancéreuses, l'expression de ces deux miARN est contrainte épigénétiquement par la triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27). L'induction des miR-449a/b par E2F1 a été par la suite confirmée par l'équipe de Dobbstein, qui précise que l'expression du gène hôte *CDC20B* est lui aussi contrôlé par ce facteur de transcription (M Lizé et al. 2010a).

Quelques années plus tard, l'implication de longs ARN non codants dans le contrôle de ces miARN a été démontrée. En 2014, l'équipe de Jin Fen Lei a souligné la modulation indirecte de miR-449a par le long ARN non codant ANRIL (« CDKN2B-AS1 ») dans les cancers gastriques (Zhang et al. 2014). Un an plus tard, un autre long ARN non codant NEAT1 (« Nuclear enriched abundant transcript 1 ») a été identifié comme un inhibiteur de miR-449b dans les gliomes (Zhen et al. 2016). Dans cette étude, les auteurs montrent, grâce à des expériences d'immunoprécipitation d'ARN combinées à des tests de gènes rapporteurs, que NEAT1 et miR-449b interagissent physiquement de manière spécifique. NEAT1 joue le rôle « d'éponge moléculaire » en fixant un maximum de molécules de miR-449b et bloquant ainsi son effet sur ses cibles.

Par ailleurs, Toyota et collaborateurs ont révélé le contrôle épigénétique de l'expression de miR-34b et miR-34c dans des cancers colorectaux (Toyota et al. 2008). En effet, les auteurs soulignent une hyperméthylation au niveau du promoteur de ces miARN dans ces cancers, bloquant leur expression. Récemment, l'équipe de Peng a montré que miR-29c cible les méthyltransferases de l'ADN 3a et 3b, augmentant ainsi l'expression de miR-34b/c mais également miR-449a dans des cancers nasopharyngés (Niu et al. 2016).

Une étude très récente a mis en évidence un phénomène unique de régulation des miARN par l'exemple de miR-34 (Salzman et al. 2016). Les auteurs ont en effet découvert un « réservoir » cellulaire de miR-34 inactifs qui vont pouvoir être activés (par phosphorylation en 5') en réponse à des dommages à l'ADN.

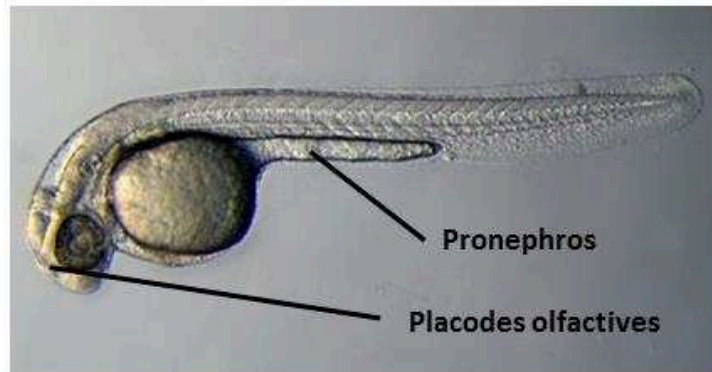
Tous les mécanismes cités concernent des contextes de cancer. En revanche, à ce jour, les déterminants modulant directement l'expression de cette famille de manière physiologique dans la multiciliogénèse restent inconnus. Cependant, très récemment, une étude a montré par immunoprécipitation de la chromatine que des facteurs de transcription clé de la multiciliogénèse (décrits dans la section IV.C.6.b) possèdent des sites de liaison dans les promoteurs de ces miARN (Walentek et al. 2016). En effet, les protéines Forkhead box protein J1 (Foxj1) et Regulatory factor X 2 (RFX2) sont capables de se fixer dans le promoteur de miR-34b/c alors qu'E2F4 peut se lier au promoteur de miR-449a/b/c, suggérant leur rôle inducteur au cours de la différenciation.

IV. La différenciation des cellules multiciliées

Cette dernière partie du manuscrit sera consacrée à l'état des lieux des connaissances relatif à la différenciation des cellules multiciliées. Nous évoquerons les différents mécanismes qui ont été mis à jour afin d'expliquer comment une cellule pluripotente indifférenciée peut évoluer vers une cellule différenciée hautement spécialisée telle que la cellule multiciliée.

Une meilleure compréhension de ces mécanismes est indispensable pour mieux appréhender les différentes étapes de la mise en place de l'épithélium respiratoire au cours du développement, mais également lors de son renouvellement normal dans le tissu adulte, ou encore lors de sa régénération après lésion. Les processus mis en jeu étant sensiblement différents le long du tractus respiratoire, nous nous focaliserons sur la partie supérieure des voies respiratoires humaines, correspondant aux tissus sur lesquels j'ai travaillé au cours de ma thèse.

A



B

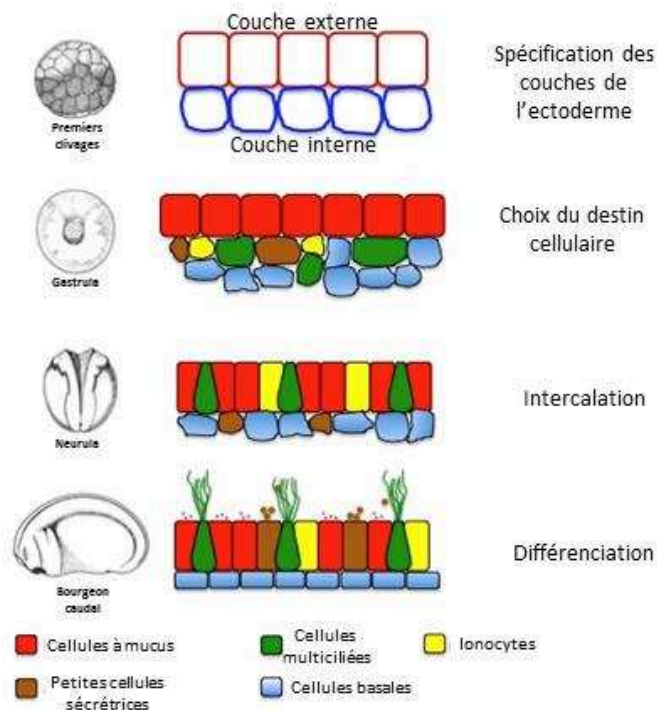


Figure 24 : Le poisson zèbre et le xénope comme modèles d'études de la multiciliogénèse

A. Photographie d'un embryon de poisson zèbre 60h post-fécondation. Les deux organes représentés sont composés de cellules multiciliées.

B. Représentation des différentes étapes de maturation de l'ectoderme en épiderme chez l'embryon de xénope. Lors des premiers clivages de l'embryon se réalise la spécification des deux couches de l'ectoderme, la couche interne et la couche externe. Plus tard, au stade gastrula, le destin cellulaire au sein de ces deux couches se décide. A noter que les cellules à mucus se spécifient dans la couche externe alors que les cellules multiciliées le font dans la couche interne. S'en suit le stade neurula où les cellules de la couche interne (cellules multiciliées et ionocytes) s'intercalent dans la couche externe. Enfin, au stade de bourgeon caudal, les différents types cellulaires entrent en différenciation terminale.

Je vais d'abord présenter les différents modèles d'étude de la différenciation multiciliée. Par la suite, j'introduirai les voies de signalisation impliquées et sur lesquelles nous avons choisi de nous focaliser au sein du laboratoire. Ensuite, je tenterai de détailler les différentes étapes de cette différenciation ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents qui les contrôlent.

A. Les modèles d'étude

Cette partie sera focalisée sur les différents modèles utilisés pour l'étude des cils et notamment des MCC. Sans rentrer pleinement dans les détails de chacun d'eux, l'objectif de cette partie est de donner quelques bases et de souligner les différents outils disponibles pour l'analyse de la multiciliogénèse.

1. Les modèles *in vivo*

a. Le poisson zèbre (zebrafish)

Le poisson zèbre est un modèle particulièrement intéressant dans l'étude des cils pour plusieurs raisons (Malicki et al. 2011). Tout d'abord, l'embryon est transparent et présente de nombreux organes possédant des cils à des stades précoces au cours du développement embryonnaire. De plus, les embryons mutants pour des gènes ciliaires présentent souvent une courbure de l'axe du corps, qui est très facilement observable lors de criblages génétiques. Enfin, le poisson zèbre permet l'utilisation rapide et peu coûteuse de morpholinos, qui sont des oligonucléotides antisens permettant de réprimer l'expression de gènes spécifiquement (Eisen & Smith 2008; Nasevicius & Ekker 2000). Voici brièvement les organes présentant des MCC chez le zebrafish (Figure 24a).

- Le pronephros représente l'équivalent du rein chez l'embryon du poisson zèbre. Les canaux du pronephros sont recouverts par deux populations de cellules ciliées : des cellules monociliées et des MCC.

- Les cellules des placodes olfactives sont également multiciliées et présentent des cils sensoriels ayant des structures axnonémales mixtes (9+0 et 9+2) (Wloga et al. 2009).

Ces organes représentent donc des modèles de choix dans l'étude de la multiciliogénèse. En revanche, plusieurs propriétés de ces cellules chez le zebrafish sont à prendre en considération. Alors que les MCC humaines regroupent plus d'une centaine de cils, les cellules du pronephros ou des placodes olfactives n'en comptent qu'un maximum de 16 (Kramer-Zucker et al. 2005; Hansen & Zeiske 1993). De plus, certains gènes importants de la multiciliogénèse semblent absents du génome du poisson zèbre. C'est le cas de *CCDC67* (« coiled-coil domain containing 67 ») codant pour Deup1

(Meunier & Azimzadeh 2016) (Cf Partie IV.C.5.b) mais également de *CDC20B* dont le deuxième intron regroupe les miR-449 (Marcet, Chevalier, Luxardi, et al. 2011). Dès lors, il est fort probable que les mécanismes de multiciliation chez le zebrafish soient partiellement différents de ceux chez les autres vertébrés.

b. Le xénope

Les embryons de grenouille ou de xénope respirent à travers leur épiderme. Cet épiderme est constitué de MCC qui génèrent un flux dans l'eau dans laquelle les embryons sont immergés (Figure 24b). Ce flux est nécessaire au renouvellement de l'oxygène, indispensable à une respiration viable. Historiquement, la peau d'embryon d'amphibiens représente l'un des premiers tissus observés où les cils génèrent un mouvement fluide. En plus des MCC, l'épiderme est également constitué de cellules à mucus, de petites cellules sécrétrices et d'ionocytes (Figure 24b). L'épithélium multicilié se développe très rapidement au cours de l'embryogénèse. De plus, afin de générer un flux efficace autour de l'embryon, les MCC présentent une polarité planaire. Par ailleurs, de nombreux outils moléculaires et génétiques (tels que les morpholinos) sont disponibles chez le xénope. Ainsi, ces nombreuses caractéristiques associées à la vitesse de développement des embryons font de cet animal un modèle extrêmement robuste et flexible pour l'étude de la différenciation mucociliée, mais également la polarité planaire (Werner & Mitchell 2012). Certaines différences sont cependant notables entre l'épiderme de xénope et l'épithélium respiratoire humain. Notamment, les proportions cellulaires sont assez différentes. Les cellules à mucus représentent environ 60 % des cellules de l'épiderme de xénope contre seulement 16% de MCC. De plus, le nombre de cils par cellule est seulement de plusieurs dizaines (Dubaisi & Papalopulu 2011). En revanche, tous les acteurs cruciaux des différentes étapes de la multiciliogénèse (présentés plus loin) sont présents chez le xénope, et ce modèle a grandement contribué aux recherches dans ce domaine.

c. Modèles de souris transgéniques

Outre les modèles *in vivo* précédemment cités qui ont l'avantage d'une grande flexibilité et d'une rapidité de mise en place, l'utilisation d'outils de recombinaison pour la création de souris transgéniques ont permis des avancées considérables dans la compréhension des mécanismes de différenciation au sein de l'épithélium respiratoire.

Le modèle de recombinaison dit « Cre-Lox » est le plus utilisé à l'heure actuelle et a été développé en 1987 par Brian Sauer (Sauer 1987). Cette technologie dérive d'un processus naturel utilisé par les bactériophages. Ce système utilise la capacité d'une enzyme, la Cre recombinase (ou « Cre » pour « Causes recombination ») à catalyser la recombinaison entre deux courtes séquences spécifiques appelées Lox. Dès lors, l'épissage réalisé entre ces deux sites de reconnaissance va

permettre la délétion du matériel génétique. Grâce à cette propriété, il est possible de réprimer l'expression d'un gène (lorsque sa séquence est située entre les séquences Lox) ou bien de l'activer (lorsqu'une séquence répressive de ce gène est flanquée entre les séquences Lox).

Cette technologie est transposable *in vivo*, notamment chez la souris (Sauer & Henderson 1988). Généralement, un croisement est réalisé entre une souris exprimant la Cre, et une souris exprimant la séquence d'intérêt sous contrôle des séquences Lox. Dès lors, cette approche offre un grand nombre de possibilité pour générer différents types de souris transgéniques.

Une application très utile est l'expression conditionnelle de la Cre, en plaçant sa séquence codante sous le contrôle d'un promoteur spécifique à un tissu ou un type cellulaire (Rajewsky et al. 1996; Gu et al. 1993). Ainsi, le transgène sous le contrôle des séquences loxP sera exprimé ou réprimé dans les mêmes cellules exprimant Cre. Ceci permet donc un contrôle spatial de l'expression du transgène.

Par ailleurs, l'expression de Cre peut être dépendante d'un stimulus exogène, et alors définie comme inductible. En effet, dans le système le plus couramment utilisé appelé Cre-ER (pour « Cre Estrogen Receptor »), la Cre est fusionnée à un récepteur aux œstrogènes contenant une mutation dans le domaine de liaison aux œstrogènes. Ce mutant étant alors incapable de lier les ligands endogènes (Metzger et al. 1995). Cette fusion séquestre le complexe dans le cytoplasme. L'administration d'un antagoniste des récepteurs aux œstrogènes (comme le tamoxifène) permet, en se liant au récepteur muté, d'induire la translocation de Cre dans le noyau où l'enzyme pourra agir sur les séquences Lox et induire ou réprimer l'expression du transgène sous leur contrôle. D'autres modèles d'inductions existent également en utilisant des molécules telles que la tetracycline ou la doxycycline (Bockamp et al. 2002). Dans ces différents cas, le contrôle de l'expression est temporel.

Ces différentes possibilités font de ces modèles des outils très puissants pour contrôler l'expression d'un gène d'une manière spatio-temporelle. Ces propriétés ont été largement utilisées afin de découvrir les mécanismes de différenciation de l'épithélium mucocilié notamment *via* le lignage de cellules. Dans ces exemples, la Cre est sous le contrôle d'un promoteur d'un gène spécifique d'un type cellulaire d'intérêt, et les séquences Lox entourent une séquence répressive bloquant l'expression d'un gène rapporteur tel que la protéine fluorescente GFP ou YFP (pour « Green or Yellow Fluorescent Protein ») (Rawlins & Hogan 2008; Rawlins, Okubo, et al. 2009) Les cellules d'intérêt sont donc fluorescentes et leur devenir peut être analysé. De plus, si le marquage des cellules veut être réalisé dans une fenêtre temporelle précise, (par exemple dans des modèles de blessure) une Cre-ER sera préférée.

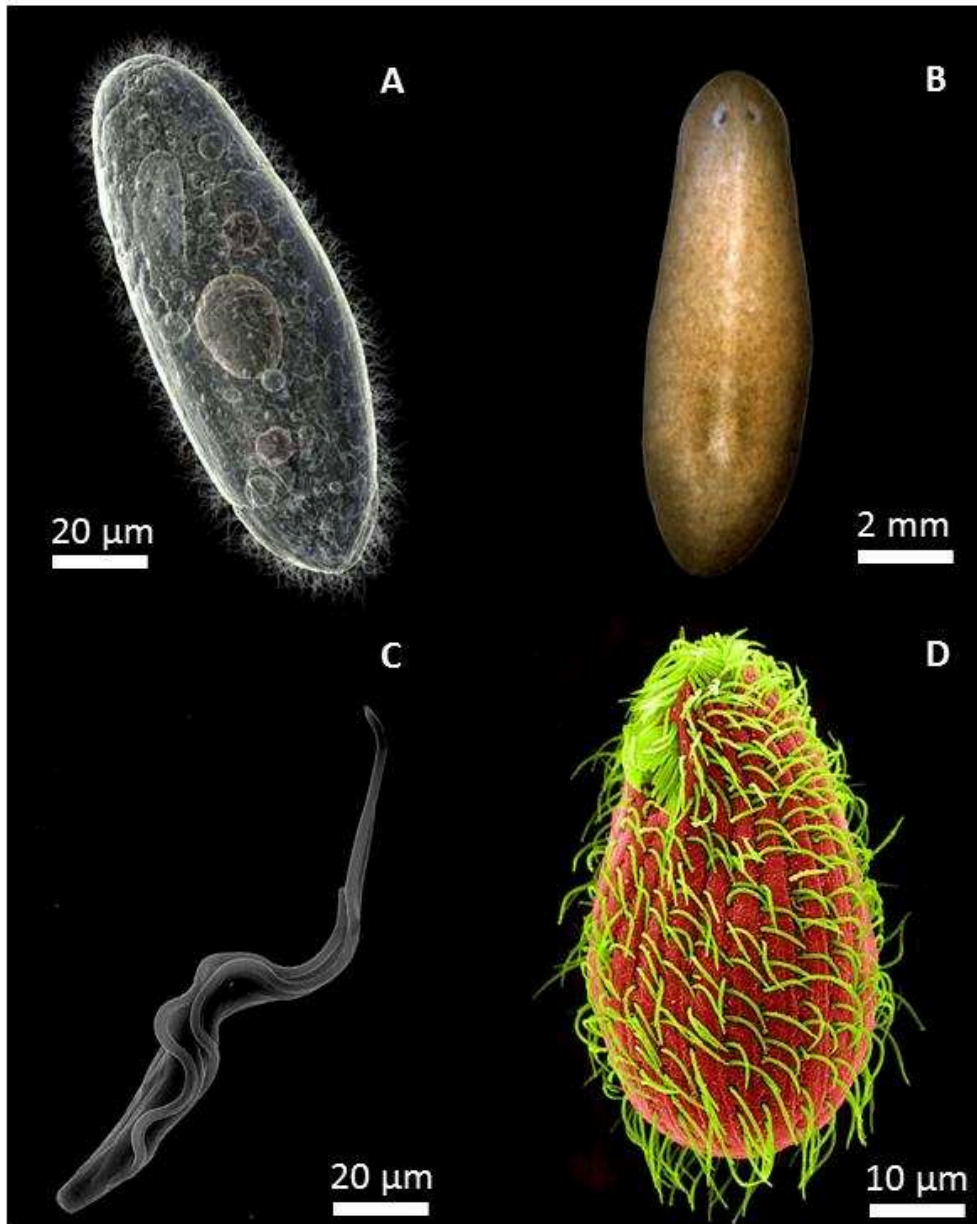


Figure 25 : Petits organismes modèles dans l'étude des cils

A. *Paramecium*. B. *Schmidtea mediterranea*. C. *Trypanosoma vivax*. D. *Tetrahymena thermophila*.

Outre les différents modèles *in vivo* précédemment énoncés, plusieurs organismes simples sont également décrits dans la littérature comme modèles d'étude des cils et des centrioles (Figure 25). C'est notamment le cas du planaire d'eau douce *Schmidtea mediterranea* (Azimzadeh et al. 2012; Basquin et al. 2015; Azimzadeh et al. 2016) mais également des protozoaires tels que *Tetrahymena thermophila* (Kilburn et al. 2007), la paramécie (Yano et al. 2015; Aubusson-Fleury et al. 2015) ou encore le trypanosome servant en particulier à l'étude du transport intra-flagellaire (Kohl et al. 2003; Bhogaraju et al. 2013; Fort et al. 2016).

2. Le modèle *in vitro* d'interface Air/Liquide (IAL)

En plus des modèles *in vivo* précédemment présentés, un modèle très pertinent a également fortement contribué à l'essor des recherches dans la différenciation mucociliée : le modèle IAL pour Interface Air/Liquide. Ce modèle *in vitro* a été développé chez l'Homme et la souris pour l'étude des voies respiratoires. Il a été élaboré en 1988 par l'équipe de Reen Wu (Whitcutt et al. 1988). Concrètement, des cellules épithéliales respiratoires sont récupérées après digestion enzymatique de tissus des voies aériennes (cornets nasaux ou polypes chez l'Homme et trachée chez la souris). Ces cellules sont par la suite mises en culture sur un filtre semi perméable préalablement traité au collagène de type I chez la souris et IV chez l'Homme. A ce stade, plusieurs types cellulaires sont présents sur le filtre (cellules basales, MCC et cellules à mucus). Dans un premier temps, ces cellules sont immergées dans un milieu de culture riche au niveau apical et basolatéral du filtre afin de permettre la prolifération des cellules basales (Wu, Nolan, et al. 1985; Wu, Yankaskas, et al. 1985; Gruenert et al. 1995). Le milieu est composé de nombreux suppléments indispensables tels que l'hydrocortisone, l'extrait pituitaire bovin, l'Epidermal Growth Factor (EGF), la transferrine, l'épinéphrine, l'insuline, la triiodothyronine ou encore l'acide rétinoïque. Au moment où les cellules arrivent à confluence, caractérisé par un changement de résistance trans-épithéliale, le milieu sur la face apicale est retiré afin de former l'interface air/liquide, et de mimer ainsi les conditions physiologiques des voies respiratoires. Cette mise en interface air-liquide est associée à un changement de milieu dans lequel les concentrations en calcium et en acide rétinoïque sont augmentées, favorisant la polarisation et la différenciation des cellules (L. A. Sachs et al. 2003; Martin et al. 1991). L'épithélium pleinement différencié présente un grand nombre de cellules basales (formant plusieurs couches chez l'Homme), des MCC et quelques cellules à mucus éparses. Les cellules humaines mettent entre 20 et 25 jours à former un épithélium mucocilié pleinement différencié et les cellules de souris 7 à 10 jours. Au cours de ma thèse, j'ai pu mettre en place le modèle IAL murin au sein de notre laboratoire. Ces modèles, bien que contraignants (en termes de manipulation, de temps et d'argent), ont l'avantage de reproduire les différentes étapes de la différenciation des MCC. De plus, ce modèle présente l'avantage de pouvoir utiliser des cellules

isolées de tissus humains afin d'étudier les mécanismes qui sont censés refléter ceux mis en jeu physiologiquement chez l'Homme.

Il existe à l'heure actuelle d'autres modèles *in vitro* développés et permettant l'étude de la multiciliogénèse que je ne détaillerai pas dans cette partie. Par exemple, la culture de cellules épendymales de souris se réalise sur lamelles de verre après expansion en flasque (Delgehyr et al. 2015). Egalement, l'utilisation très récente de modèles de culture en 3 dimensions appelés organoïdes semble très prometteuse. En effet, à partir de cellules basales pluripotentes, il est maintenant possible de recréer des organes microscopiques présentant différents types cellulaires, permettant ainsi de simuler l'intégrité d'un organe dans son environnement physiologique (Dye et al. 2015; Hild & Jaffe 2016).

B. Les voies de signalisation impliquées dans la différenciation multiciliée

Les mécanismes moléculaires dirigeant le destin cellulaire et la différenciation d'une cellule sont régis par différents signaux extracellulaires qui vont être transduits à l'intérieur de la cellule où ils déclenchent afin de déclencher un ensemble de programmes géniques spécifiques. Les voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la différenciation d'une cellule multiciliée sont nombreuses et leurs interconnexions complexes. Au sein de notre laboratoire, l'étude des mécanismes génomiques impliqués dans la différenciation multiciliée nous a amené à nous intéresser à certaines de ces voies de signalisation. La compréhension des rouages de ces voies est importante pour intégrer les différentes étapes de la multiciliogénèse. Ce chapitre sera donc consacré à préciser les différents acteurs et les mécanismes d'action de 3 de ces voies, à savoir la voie Notch, la voie BMP et la voie des petites GTPases. Leur mise en perspective dans la différenciation sera réalisée dans la partie suivante.

1. La voie Notch

La voie de signalisation Notch joue un rôle important dans de multiples modèles et des systèmes variés. Très conservée au cours de l'évolution, cette voie de signalisation possède un rôle crucial au cours du développement ainsi que dans l'homéostasie du tissu adulte (Artavanis-Tsakonas & Muskavitch 2010; Artavanis-Tsakonas et al. 1999; Bray 2006; Lai 2004). De plus, son importance est révélée par le nombre de maladies engendrées ou renforcées par sa dysfonction. Notch, qui signifie entaille en anglais, est un récepteur transmembranaire identifié il y a presque 100 ans chez un mutant de la drosophile présentant justement des entailles au niveau de ses ailes (Morgan 1917).

Malgré sa large implication dans divers contextes, les mécanismes opérationnels de cette voie de signalisation sont globalement simples. En effet, le mode d'action de la voie Notch requiert

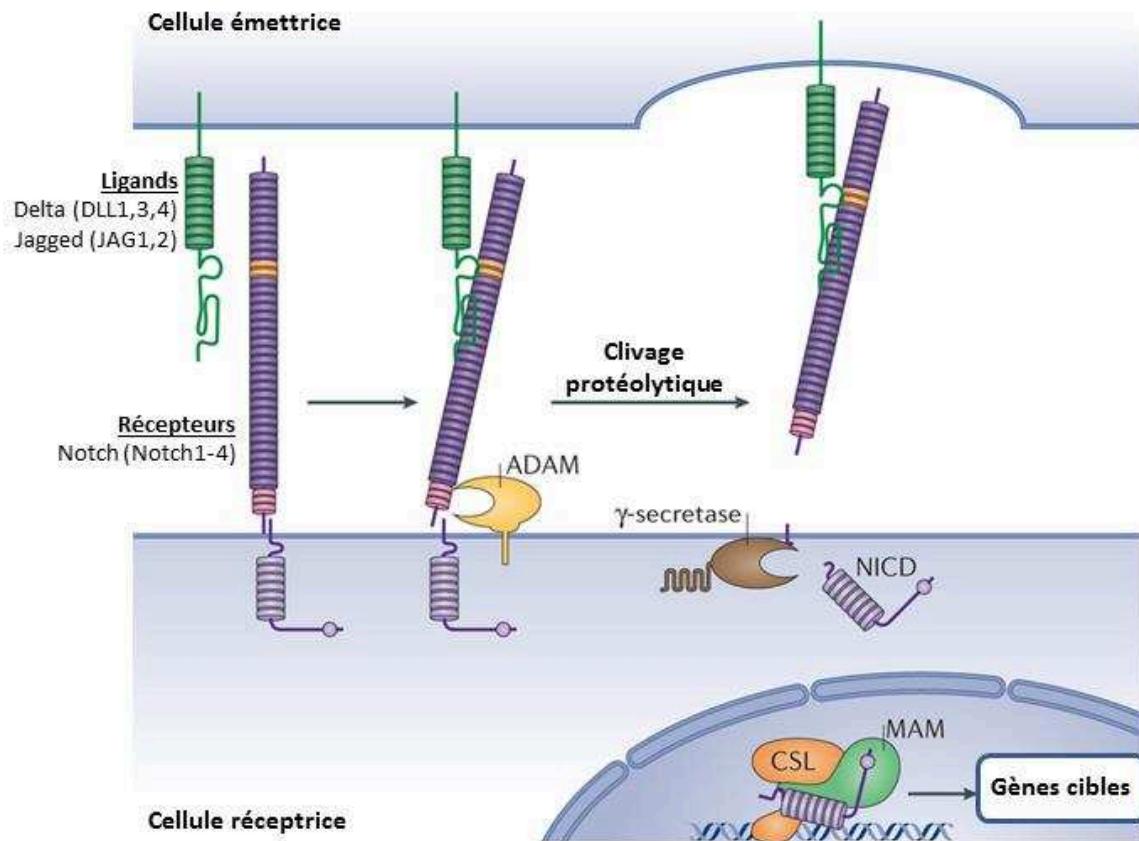


Figure 26 : La voie de signalisation Notch

L'interaction d'un ligand d'une cellule émettrice avec un récepteur d'une cellule réceptrice va entraîner le clivage protéolytique de ce récepteur. Le fragment intracellulaire formé (NICD) va migrer dans le noyau pour s'associer à des co-facteurs et entraîner la transcription de gènes cibles (d'après Bray et al., 2016).

classiquement la présence de deux cellules : une cellule émettrice qui présente à sa surface des ligands membranaires qui vont interagir avec des récepteurs situés à la surface d'une cellule réceptrice (Figure 26) (Bray 2016). La liaison de ligands sur les récepteurs transmembranaires entraîne une série de clivages protéolytiques réalisés par ADAM (pour « A Disintegrin And Metalloproteinase Domain ») et la γ -sécrétase aboutissant à la libération d'un fragment intracellulaire du récepteur (Figure 26). Ce fragment appelé NICD (pour « Notch IntraCellular Domain ») pénètre par la suite dans le noyau et s'associe avec la protéine de liaison à l'ADN CSL (pour « CBF1–Suppressor of Hairless–LAG1 » également connu sous le nom de RBPJ pour « Recombining binding protein suppressor of hairless ») ainsi que le coactivateur MAM (MAML1 chez l'Homme pour « Mastermind-like protein 1 ») (Figure 26). Ce complexe est ensuite capable de stimuler la transcription de gènes cibles (Bray 2006; Kitagawa 2016; Kopan & Ilagan 2009). Parmi eux, des facteurs de transcription à domaine de liaison bHLH (« basic helix loop helix ») de type répresseur, appartenant aux familles des gènes Hes (« hairy/enhancer of split ») et Hey (« Hes-related with YRPW motif »), ont été identifiés et caractérisés (Bray 2006).

La relative simplicité de cette voie de signalisation ne permet pas d'expliquer pleinement le spectre d'action de la voie Notch. En effet, sa myriade de rôles s'explique notamment par la régulation fine et dynamique au niveau spatio-temporel de l'expression des acteurs de la voie de signalisation Notch, tout comme l'expression de ses gènes cibles. Nous allons voir plus loin que Notch, au niveau des voies respiratoires, joue un rôle central dans la décision du destin cellulaire.

2. La voie BMP

Les BMP (« Bone Morphogenetic Protein ») sont des membres de la superfamille du TGF β (« Transforming Growth Factor β »). Comme leur nom l'indique, BMP provient de la découverte de leur rôle dans l'induction de la formation de structures osseuses (Nogami & Urist 1970; Urist 1965). Depuis, la voie de signalisation BMP a été largement étudiée et son implication dans de nombreux processus physiologiques a été mise en évidence.

L'importance de cette voie est soulignée par sa conservation au cours de l'évolution, puisqu'il est estimé qu'elle était déjà présente il y a 1,2 milliard d'année (Huminiacki et al. 2009). Les analyses phylogénétiques démontrent que les acteurs de la voie sont très largement conservés dans le règne animal (Kahlem & Newfeld 2009). De manière surprenante, la conservation des séquences protéiques est telle qu'il a été montré que des ligands de la drosophile sont capables d'induire la formation d'os chez les mammifères (Sampath et al. 1993).

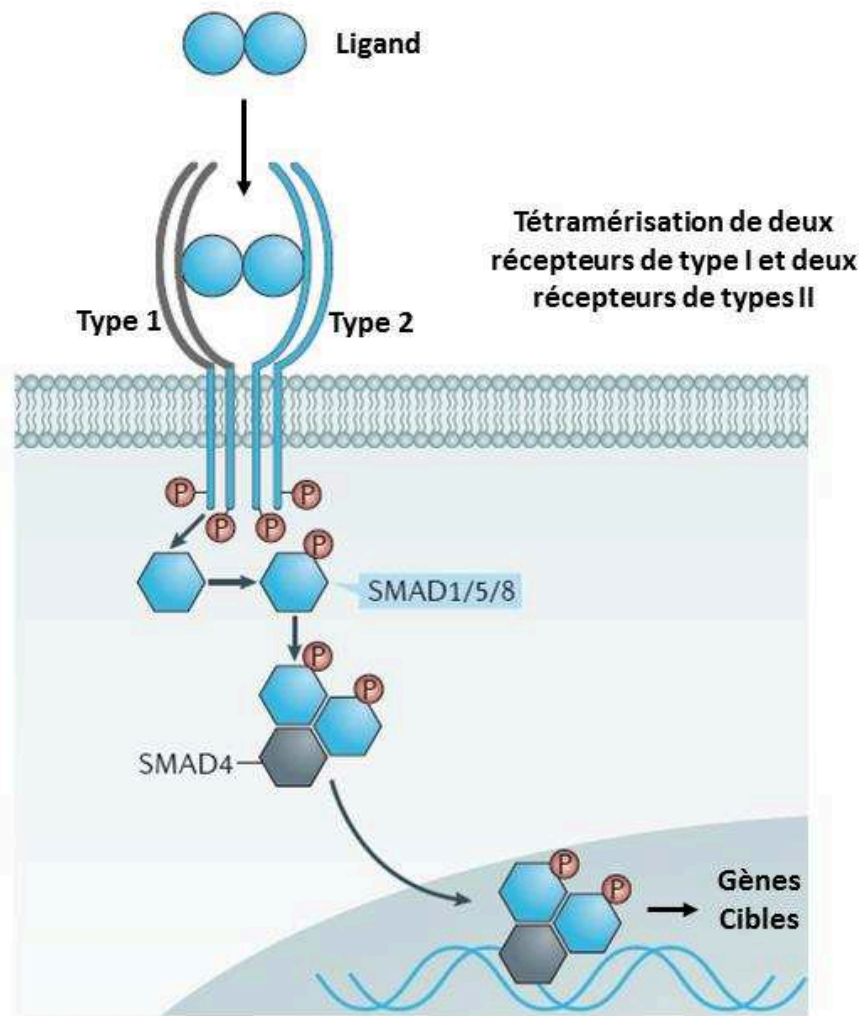


Figure 27 : La voie de signalisation BMP

La fixation d'un ligand de la voie BMP sur ses récepteurs provoque leur tétramérisation. Une série de phosphorylation en cascade va activer des médiateurs intracellulaires, les SMAD 1/5/8 qui, vont, avec leur cofacteur SMAD4, migrer dans le noyau et stimuler la transcription de gènes cibles. (D'après Salazar et al., 2016)

La voie de signalisation BMP canonique repose sur une source de ligands sécrétés capables de se fixer à la surface d'une cellule cible exprimant des récepteurs membranaires serine/thréonine kinase de type I et de type II (Figure 27) (Salazar et al. 2016). La fixation de ces ligands entraîne la tétramérisation des récepteurs (deux récepteurs de type I et deux de type II) (Feng & Derynck 2005). Les récepteurs de type II, dont la fonction kinase est constitutivement active, vont phosphoryler les récepteurs de type I. Les récepteurs de type I vont recruter et phosphoryler à leur tour des médiateurs intracellulaires appelés SMAD (« Mothers against decapentaplegic homolog ») (SMAD 1/5/8). Ces SMAD vont alors pouvoir s'associer avec le facteur SMAD4 et ce complexe va pouvoir pénétrer dans le noyau et s'associer à d'autres facteurs de transcription afin d'activer l'expression de gènes cibles (Figure 27)(Kretzschmar & Massagué 1998). Pour indication, une voie parallèle mais pourtant fonctionnellement différente implique également des SMAD (SMAD 2/3) mais sous le contrôle d'autres ligands (de type TGF β) et d'autres combinaisons de récepteurs.

La diversité des processus dans lesquelles la voie BMP est impliquée est notamment due au nombre important de ligands, de récepteurs et de SMAD qui peuvent y participer, entraînant à chaque fois des réponses diverses. A ce jour, 7 récepteurs de type I, 5 récepteurs de type II, 8 SMAD et plus de 30 ligands sécrétés ont été identifiés chez l'Homme. Les programmes transcriptionnels engendrés par cette voie sont donc dépendants de la présence de ces différents acteurs, permettant une grande flexibilité selon le contexte cellulaire. Nous verrons par la suite le rôle de la voie BMP dans la différenciation multiciliée.

Au niveau des voies respiratoires, la voie BMP est active au cours du développement embryonnaire. L'équipe de Hogan a identifié BMP4 comme acteur clé de la morphogénèse des voies respiratoires selon l'axe proximal-distal (Weaver et al. 1999). Dans cette étude, l'utilisation d'antagonistes de la voie BMP tels que la molécule endogène Noggin, entraîne des défauts de régionalisation des cellules soulignés par la présence de MCC dans les régions distales des voies aériennes. Sountoulidis et collaborateurs ont utilisé des souris transgéniques exprimant une GFP sous le contrôle du promoteur du gène ID1, qui est un gène répondant à la voie BMP, afin d'observer l'activité de cette voie au cours du développement mais également à l'homéostasie et dans des mécanismes de réparation épithéliale (Sountoulidis et al. 2012). Les auteurs ont ainsi confirmé la stimulation de cette voie au cours de l'embryogénèse en précisant le caractère indifférencié des cellules concernées. A l'âge adulte, la voie BMP est très peu active au niveau épithélial sauf suite à une lésion, résultat également retrouvé par Masterson et collègues (Masterson et al. 2011). Dans ce dernier cas, l'activité de BMP est enrichie dans des progéniteurs et est associée à l'expression de marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse, suggérant des mécanismes de réépithélialisation. Dès lors, BMP, aussi bien au cours du développement que pendant la

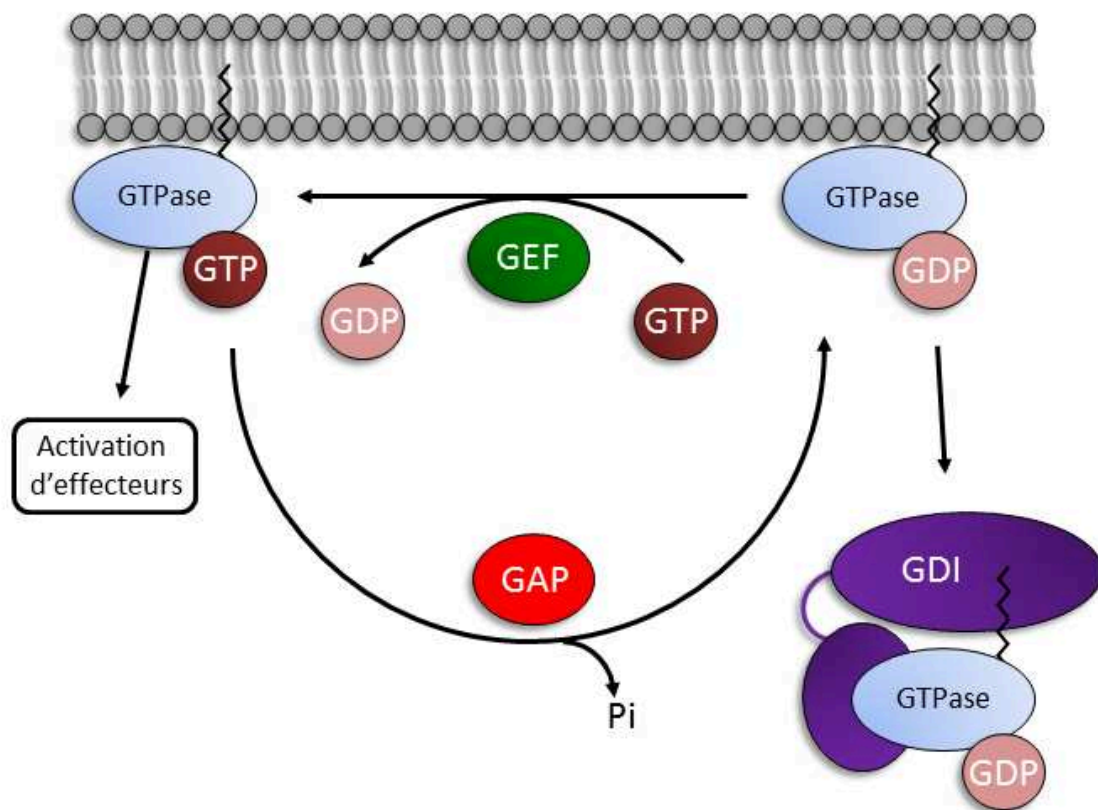


Figure 28 : Les différentes régulations des petites GTPases

Les petites GTPases passent d'un état inactif, liées au GDP, à un état actif, liées au GTP, où elles peuvent activer différents effecteurs. Les GEF favorisent la dissociation du GDP des petites GTPases alors que les GAP accélèrent l'hydrolyse du GTP par les petites GTPases. Dans certains cas, les GDI séquestrent les petites GTPases en piégeant leur extrémité lipidique, empêchant ainsi leur localisation membranaire.

régénération de l'épithélium, semble contrôler l'architecture des voies respiratoires, notamment en modulant la régénération des voies respiratoire après blessure.

3. La voie des petites protéines GTPases

La découverte des petites GTPases remonte à l'identification de l'oncogène Ras, qui a ensuite ouvert la voie à la caractérisation d'un grand nombre de protéines similaires regroupées sous le terme de petites GTPases (Cox & Der 2010; Bourne et al. 1990). Les petites GTPases sont maintenant reconnues comme des régulateurs clés de fonctions cellulaires cruciales liées à la dynamique du cytoplasme et notamment du cytosquelette (Cherfils & Zeghouf 2013).

Ces molécules alternent leur conformation d'une forme active liée au GTP à une forme inactive liée au GDP (Figure 28) (Vetter & Wittinghofer 2001). La forme active est ensuite capable de fixer des effecteurs et d'entraîner ainsi une cascade de signalisation. Malgré leur nom suggérant leur capacité à hydrolyser le GTP, cette action est très lente quand elle est réalisée par les petites GTPases seules (Cherfils & Zeghouf 2013). Ces molécules vont donc nécessiter l'aide de cofacteurs. D'une part, les GEFs (pour « Guanine nucleotide Exchange Factors ») vont faciliter la dissociation du GDP et les GAP (pour « GTPases Activating Proteins ») vont stimuler l'hydrolyse du GTP (Bos et al. 2007). Certaines petites GTPases, possédant un groupement lipidique du côté carboxy-terminal, sont capables d'alterner leur localisation cellulaire entre membrane et cytoplasme. En effet, des facteurs appelés GDIs (pour « Guanine Dissociation Inhibitors ») viennent recouvrir cette région lipidique rendant les petites GTPases solubles dans le cytoplasme (Figure 28).

Il existe 5 familles de petites GTPases :

- Les petites GTPases Ras comprenant 36 membres chez les mammifères. Leur fonction est principalement associée à la différenciation, la croissance et la survie cellulaire (Reuther & Der 2000).

- Les petites GTPases Rho (22 membres chez les mammifères) dont le rôle est intimement lié au remaniement du cytosquelette et au trafic vésiculaire, notamment en régulant les dynamiques de l'actine (Ridley 2006)

- Les petites GTPases Rab et Arf regroupent plus de 60 membres et sont des régulateurs essentiels du trafic intracellulaire (D'Souza-Schorey & Chavrier 2006; Hutagalung & Novick 2011; Behnia & Munro 2005)

- Enfin, les petites GTPases Ran représentent des acteurs clés du transport à travers les pores nucléaires et sont également importants pour la mise en place du fuseau mitotique et la formation de l'enveloppe nucléaire (Stewart 2007).

Au cours de ma thèse, mon travail s'est porté sur les deux premières familles (Ras et Rho), qui jouent un rôle essentiel au cours de la différenciation des MCC, notamment via le remaniement du cytosquelette d'actine.

C. Les différentes étapes de la différenciation multiciliée

L'épithélium respiratoire est un tissu dont la fréquence de renouvellement est très lente. Brigid Hogan et Emma Rawlins ont montré en 2008 que les cellules ciliées de souris avaient un temps de demi-vie de 6 mois au niveau de la trachée et 17 mois dans les bronchioles (Rawlins & Hogan 2008). En utilisant une technique de suivi de lignage génétique chez la souris (Cf Partie IV.A.1.c), les auteurs ont tracé le devenir de cellules marquées par la protéine fluorescente GFP sous contrôle du promoteur de Foxj1 (« Forkhead box protein J1 »), marqueur de MCC (Cf partie IV.C.6.b). Grâce à un modèle mathématique, l'analyse de la décroissance du signal fluorescent au cours du temps a permis d'estimer le taux de renouvellement des cellules.

Au contraire, lors d'une blessure au niveau du tissu respiratoire, le taux de renouvellement est très nettement accéléré, permettant ainsi de restaurer au plus vite les fonctions épithéliales (Hong et al. 2004b; Jason R Rock et al. 2009). La dérégulation de ce système efficace de réparation contribue à la physiopathologie de maladies chroniques respiratoires telles que la mucoviscidose, l'asthme, ou encore la BPCO et la fibrose pulmonaire (Chilosi et al. 2002; Rock et al. 2010).

La compréhension des mécanismes contrôlant le renouvellement des MCC de l'épithélium dans un contexte normal ou de lésion est un prélude indispensable à l'élaboration de nouvelles pistes thérapeutiques régénératives de l'épithélium respiratoire.

1. Les progéniteurs des cellules multiciliées.

Le renouvellement d'un épithélium à l'homéostasie ou après une lésion nécessite d'une part la prolifération de cellules, afin de garder le même nombre global de cellules, et d'autre part la différenciation de cellules permettant la régénération de tout type cellulaire de l'épithélium. A l'heure actuelle, il est généralement accepté que ce soit le même type cellulaire qui entretient ces deux différentes fonctions.

Cependant, ces cellules progénitrices sont différentes le long du tractus respiratoire. En effet, dans les régions les plus distales de l'appareil respiratoire, les cellules alvéolaires de type 2 chez l'adulte représentent les cellules progénitrices capables d'auto-renouvellement ainsi que de différenciation pour former les cellules alvéolaires de type 1 (Desai et al. 2014; Barkauskas et al. 2013). L'équipe de Hogan a notamment montré chez la souris par un outil génétique de traçage (Cf Partie IV.A.1.c) que les cellules alvéolaires de type 2 ont une demi-vie d'environ un an. De plus,

l'ablation de certaines de ces cellules conduit à une rapide expansion clonale des survivantes (Barkauskas et al. 2013). En revanche, chez l'embryon, il semblerait que ce soit un progéniteur bipotent caractérisé par l'expression du gène *Id2* (pour « inhibitor of differentiation 2 ») qui donne naissance aux deux types de cellules alvéolaires (Treutlein et al. 2014; Rawlins, Clark, et al. 2009).

Au niveau des bronchioles, ce sont les cellules Club qui assurent le rôle de progéniteur, notamment des MCC (Evans et al. 1978; Reynolds et al. 2000; Rawlins, Okubo, et al. 2009; Tata et al. 2013). En utilisant un traceur de lignage fluorescent sous le contrôle du promoteur de *CC10*, une protéine sécrétée spécifiquement par les cellules Club, l'équipe de Hogan a suivi le devenir de ces cellules. Les auteurs ont ainsi démontré le potentiel d'auto-renouvellement et de différenciation de ces cellules chez la souris, et ceci lors du développement post-natal, à l'homéostasie à l'âge adulte mais également en réponse à une lésion (Rawlins, Okubo, et al. 2009).

Dans l'épithélium pseudo-stratifié des voies supérieures, qui représente notre modèle d'étude, les cellules basales sont une population de cellules indifférenciées douées de capacités prolifératives et de différenciation en MCC et en cellules sécrétrices de mucus. Ces qualités sont conservées du développement post-natal à l'état d'équilibre chez l'adulte mais également après blessure. Leurs capacités de régénération et de différenciation après blessure ont été mises en évidence pour la première fois chez la souris par l'équipe de Stripp en 2004 (Hong et al. 2004b). Une étude très novatrice a mis en évidence la caractéristique stochastique du renouvellement et de la différenciation des cellules basales chez l'Homme à l'homéostasie (Teixeira et al. 2013). Ces auteurs ont utilisé pour ceci une méthode originale et non invasive de lignage de cellules basé sur le suivi de l'accumulation de mutations dans le temps de l'ADN mitochondrial. Ainsi, l'identification de groupes de cellules possédant la même mutation permet de suggérer un lien de descendance à partir d'une même cellule progénitrice mutée.

Les cellules basales de souris expriment des marqueurs spécifiques tels que TP63, NGFR (« nerve growth factor receptor ») mais également la cytokératine 5 (KRT5) (J R Rock et al. 2009; Tata et al. 2013). De manière intéressante, 20 % des cellules basales expriment également KRT14 (Cole et al. 2010) et cette cytokératine est surexprimée dans la plupart des cellules basales après une blessure (Hong et al. 2004b; Ghosh et al. 2011). Dès lors, la question de l'existence de deux sous-populations de cellules basales à potentiels distincts est soulevée. L'équipe de Emma Rawlins a partiellement répondu à cette question en combinant des expériences de suivi de lignage avec des modèles mathématiques (J. K. K. Watson et al. 2015). Les auteurs proposent un modèle dans lequel il existe deux populations morphologiquement identiques de cellules basales. L'une est douée d'auto-renouvellement et génère la deuxième qui est caractérisée par l'expression de la cytokératine-8

(KRT8). Cette deuxième population est ensuite capable de se différencier et donner les cellules cylindriques. En revanche, les auteurs affirment que le marqueur KRT14 n'est pas un marqueur identitaire de cellules souches.

Deux études dénotent la capacité des cellules Club à jouer le rôle de cellules progénitrices dans les voies respiratoires supérieures chez la souris, notamment suite à une blessure (Rawlins, Okubo, et al. 2009; Tata et al. 2013). Rawlins et collaborateurs suggèrent que ces cellules présentent une capacité de renouvellement et de différenciation transitoire, capacité qui est accrue à la suite d'une lésion. De leur côté, l'équipe de Rajagopal a montré qu'après ablation des cellules basales (par délétion conditionnelle des cellules KRT5+), les cellules Club sont capables de se dédifférencier en cellules basales qui vont ensuite proliférer pour ré-épithélialiser la lésion. De manière surprenante, les auteurs ont également démontré que le contact physique direct d'une cellule Club avec une cellule basale empêchait sa dédifférenciation. Ce résultat est très intéressant puisqu'il met en évidence des interactions entre cellules indifférenciées et différenciées permettant un contrôle robuste de la mise en place d'un épithélium fonctionnel après blessure. On peut en effet imaginer qu'une lésion importante entraînant l'ablation de cellules basales nécessite l'intervention d'une autre population prenant le relais de manière transitoire telle que les cellules Club.

Ces différentes études au niveau distal (bronchioles et alvéoles) et proximal (voies supérieures) révèlent des concepts majeurs concernant les cellules progénitrices pulmonaires. Tout d'abord, chaque région des voies respiratoires utilise différents types de précurseurs afin de maintenir ou réparer l'épithélium de surface. De plus, ces précurseurs peuvent être des cellules normalement différenciées (cellules club ou cellules alvéolaires de type 2) qui vont être capables de se dédifférencier, de proliférer et de se redifférencier ou se transdifférencier (transformation d'une cellule différenciée en un autre type de cellule différenciée) dans certaines conditions (Hogan et al. 2014; Tata et al. 2013). Dès lors, les stratégies permettant le maintien et la régénération de l'épithélium sont multiples et impliquent des mécanismes variés, mal élucidés à ce jour.

2. La spécification des cellules basales en cellules multiciliées

Après avoir identifié des cellules indifférenciées capables de se différencier en MCC, il est important de comprendre quels sont les signaux guidant le destin d'une cellule basale vers un phénotype différencié déterminé.

Au cours du développement, il semblerait que le phénotype multicilié soit la voie d'engagement par défaut des cellules souches. En effet, l'équipe d'Anton Jetten a montré que des cellules précurseurs exprimant TP63 se différencient en premier lieu en MCC dans la trachée et dans

l'œsophage de l'embryon de souris (Daniely et al. 2004). Ce n'est qu'après la naissance que les cellules souches acquièrent des marqueurs de cellules basales comme KRT5. D'une manière surprenante, les souris déficientes pour le gène p63 présentent un épithélium multicilié sans cellules basales (Daniely et al. 2004; Marshall et al. 2016).

a. Le rôle de l'acide rétinoïque

Le rôle de l'acide rétinoïque dans la morphogénèse des voies respiratoires a été démontrée (Malpel et al. 2000; F. Chen et al. 2010). Son implication dans la différenciation des cellules basales a été caractérisée par plusieurs équipes (Wu, Yankaskas, et al. 1985; L. Sachs et al. 2003; Gruenert et al. 1995; Million et al. 2001). En cultivant des cellules issues de polypes ou de cornets nasaux *in vitro* par le modèle IAL, l'importance de l'ajout d'acide rétinoïque dans le milieu pour permettre la différenciation de l'épithélium a été mise en évidence. En effet, la déplétion en acide rétinoïque entraîne un phénotype épithélial de type squameux, avec plusieurs couches de cellules. De plus, les auteurs montrent que la stimulation des trois types de récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR α , RAR β , RAR γ pour « Retinoic Acid Receptor ») induit la différenciation multiciliée alors que la différenciation en cellules à mucus est favorisée par la stimulation de RAR α et dans une moindre mesure par RAR β (Million et al. 2001). Ces résultats n'ont jamais été ré-exploités et pourraient cependant permettre de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans la différenciation. Par ailleurs, la nécessité de l'acide rétinoïque pour la différenciation a été mise en évidence en induisant la différenciation de cellules souches pluripotentes en cellules épithéliales respiratoires (Huang et al. 2014; Firth et al. 2014).

b. La fonction de la voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch semble également jouer un rôle critique dans la spécification des cellules basales. Bien que deux travaux aient été réalisés préalablement chez le xénope (Hayes et al. 2007; Deblandre et al. 1999), deux équipes ont montré en 2009 pour la première fois l'implication de Notch dans les voies respiratoires proximales de la souris et humaines (Tsao et al. 2009; Guseh et al. 2009). En utilisant des souris transgéniques exprimant Notch1 de manière constitutive, l'équipe de Rajagopal a montré chez l'embryon que la voie Notch inhibe la formation de MCC et augmente significativement la formation de cellules à mucus. Ces résultats ont également été corroborés en stimulant des explants de trachées de souris ou des cultures des cellules épithéliales respiratoires humaines en IAL avec le ligand de Notch DLL4. A l'inverse, l'inhibition de Notch avec un inhibiteur de la γ -sécrétase (enzyme responsable du clivage du NICD) inverse le rapport MCC/cellules à mucus. De plus, les auteurs montrent que l'augmentation du nombre de

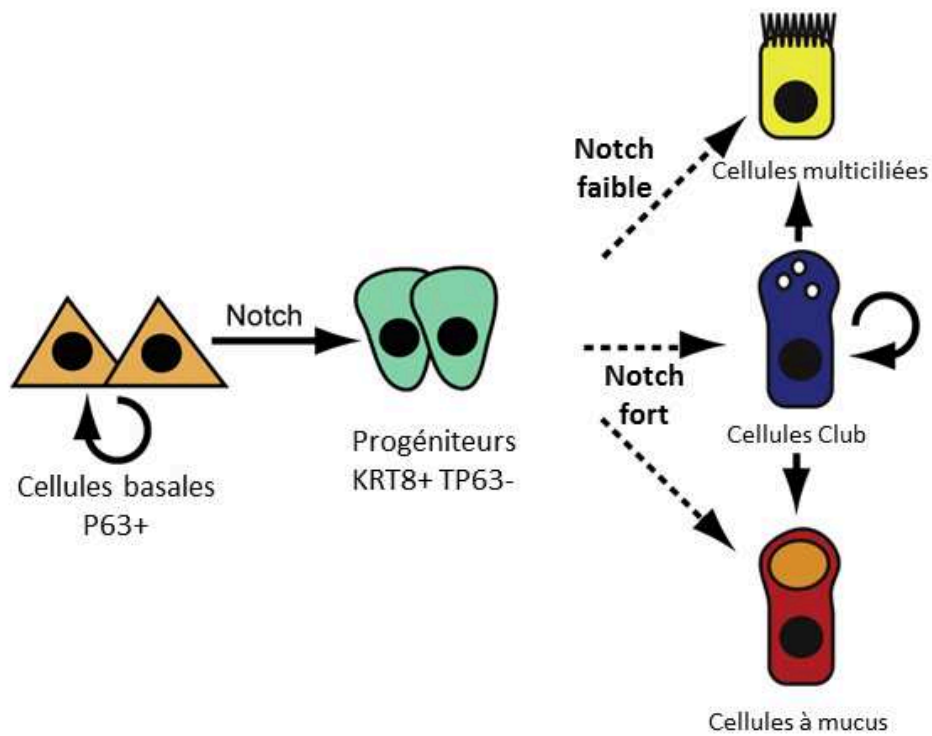


Figure 29 : Modèle de différenciation dépendant de Notch proposé chez la souris

Dans ce modèle proposé par Rock et collègues (Rock et al., 2011), Notch est tout d'abord nécessaire à un temps précoce pour la formation de progéniteurs. Ensuite, le niveau d'activation de cette voie de signalisation guide le type de spécification. Une forte activité de Notch conduit à un phénotype sécrétoire alors qu'une faible activité de Notch favorise la formation de cellules multiciliées.

MCC induite par l'inhibition de Notch est reproduite dans un modèle pathologique induisant la formation de cellules à mucus par traitement à IL-13.

Deux ans plus tard, l'équipe de Hogan a démontré dans les voies respiratoires humaines et murines que la voie Notch est active dans un petit nombre de cellules à l'équilibre et stimulée lors des mécanismes de réparation (Rock et al. 2011). En effet, après tri cellulaire par cytométrie, les auteurs ont mesuré l'expression de transcrits de la famille Notch dans des cellules basales et cylindriques (représentant les MCC et les cellules à mucus). Les cellules basales présentent un net enrichissement pour les ARNm de *Notch1*, *Dll1*, *Jag2* (codant pour « Jagged-2 »), et dans une moindre mesure *Jag1*. Par ailleurs, grâce à des expériences de perte et de gain de fonction (génétiques et pharmacologiques), cette équipe a démontré que la voie Notch est nécessaire pour la formation de progéniteurs précoces caractérisés par l'expression de KRT8 (Figure 29). Ces progéniteurs vont ensuite pouvoir former différents types de cellules différenciées en fonction du niveau d'activité de la voie Notch (Figure 29). Une activation forte entrainera un phénotype sécrétoire alors qu'un niveau faible engagera les cellules vers un phénotype multicilié. Dès lors, ces résultats montrent que la voie Notch est tout d'abord nécessaire précocement et doit être inhibée par la suite pour induire le phénotype multicilié. C'est au sein de notre laboratoire qu'ont été caractérisés pour la première fois des mécanismes entraînant l'inhibition de la voie de signalisation Notch et induisant la multiciliogénèse (Marcet, Chevalier, Luxardi, et al. 2011). En utilisant un modèle d'épiderme d'embryon de xénope *in vivo* et un modèle IAL humain *in vitro*, mon laboratoire a mis en évidence le rôle conservé chez les vertébrés de la superfamille de miARN miR-34/449 (miR-34b, miR-34c, miR-449a, miR-449b, miR-449c) dans le contrôle de la multiciliogénèse. En maintenant la répression à la fois des acteurs du cycle cellulaire, du ligand *DLL1* et de son récepteur *NOTCH1* de la voie de signalisation Notch, les miR-34/449 permettent aux progéniteurs des MCC déjà spécifiés de progresser dans des étapes plus tardives de différenciation. Ces résultats, que je détaillerai dans la section Résultats, ont récemment été confirmés par deux études *in vivo* qui montrent que des souris déficientes pour la famille de miARN miR-34/449 présentent des défaut de multiciliogénèse (Jingwen Wu et al. 2014a; R Song et al. 2014).

De manière intéressante, Morimoto et ses collègues ont analysé la contribution de chacun des récepteurs de Notch (Notch1, Notch2 et Notch3) dans la différenciation des cellules basales chez la souris. Les auteurs ont montré pendant le développement des voies respiratoires de la souris que l'inhibition de Notch2 permet de spécifier vers le phénotype cilié, alors que Notch1 et 3 y contribuent seulement de manière négligeable (Morimoto et al. 2012). Plus récemment, Danahay et ses collègues ont utilisé des anticorps spécifiques pour bloquer les différents récepteurs Notch sur des cellules épithéliales humaines mises en culture (Danahay et al. 2015). Ainsi, les auteurs ont montré que les

anticorps anti-Notch2 diminuent grandement l'expression des marqueurs de cellules à mucus tout en augmentant les marqueurs de MCC. De plus, l'utilisation d'anticorps anti-Notch2 est capable *in vivo* de rétablir le phénotype multicilié sur des souris préalablement traitées à l'IL-13 (utilisée pour induire la formation de cellules à mucus).

L'équipe de Rajagopal est allée encore plus loin dans la caractérisation de Notch2 dans l'engagement vers un phénotype multicilié chez la souris. En 2013, cette équipe a montré qu'après lésion des cellules basales, les cellules Club sont capables de se différencier et de proliférer afin de reformer un épithélium fonctionnel (Tata et al. 2013). Dans deux études récentes effectuées chez la souris (Pardo-Saganta, Law, et al. 2015; Pardo-Saganta, Tata, et al. 2015), ces mêmes auteurs ont démontré l'implication de Notch dans le destin des cellules basales et cellules Club. Dans ce modèle, les cellules basales expriment à leur surface le ligand Jag2 de la voie Notch qui va interagir avec son récepteur Notch2 localisé à la surface des cellules Club, et ainsi maintenir leur phénotype à l'équilibre en empêchant leur différenciation en MCC. Dès lors, la perte d'interaction entre cellules basales et cellules Club, comme dans le cas d'une lésion des cellules basales, engendre, par défaut, la différenciation des cellules Club en MCC. Il est important de noter que le rôle joué par les cellules Club dans la différenciation multiciliée est dépendant du contexte de blessure, contrairement aux études précédentes. Comme l'avait suggéré l'équipe de Hogan en 2009, les cellules Club sont des cellules « de renfort » dont le rôle d'amplification et de différenciation est prévalent lors d'une réparation. Une autre étude récente vient corroborer le fait que Notch permet de maintenir le phénotype des cellules Club (Lafkas et al. 2015). En effet, en utilisant des anticorps bloquant les ligands Jag1 et Jag2 *in vivo* chez la souris, les auteurs montrent une diminution du nombre de cellules Club et une augmentation du nombre de MCC. De manière surprenante, et contrairement aux résultats de Rajagopal et ses collaborateurs qui observent une induction de différenciation des cellules Club en MCC lorsque l'interaction entre Jag2 et Notch2 est empêchée (Pardo-Saganta, Tata, et al. 2015), Lafkas et ses collègues montrent que l'anticorps bloquant anti-Jag2 n'a aucun effet seul alors qu'il agit en synergie avec l'anticorps bloquant anti-JAG1 sur l'induction du phénotype multicilié des cellules Club (Lafkas et al. 2015).

Enfin, en utilisant des cultures IAL de cellules épithéliales respiratoires de souris, Mori et ses collègues ont montré que Notch3 joue également un rôle dans la différenciation des cellules basales en progéniteurs, et ce par un mécanisme dépendant de Jag1 et Jag2 (Mori et al. 2015).

Dès lors, toutes ces études récentes mettent en exergue le rôle prépondérant de la voie Notch dans la décision du phénotype vers lequel vont se spécifier les cellules progénitrices. Il est important de comprendre que la multitude de modèles utilisés dans ces études (Homme, souris,

modèle à l'équilibre, modèle de régénération...) génère parfois des résultats en apparence contradictoires. Il faut donc être très prudent afin de ne pas en tirer des conclusions hâtives. Notamment, l'épithélium trachéal de l'Homme et de la souris ne présentent pas la même proportion de cellules Club, dont le rôle dans la réparation est très important. Egalement, les mécanismes à l'équilibre et lors de la régénération d'un épithélium lésé, semblent quelque peu différents, bien que s'accordant sur le rôle essentiel de Notch.

c. L'implication de la voie BMP

Une étude récente menée en collaboration avec l'IBDML à Marseille, nous a permis d'être les premiers à démontrer le rôle conservé chez les vertébrés de la voie de signalisation BMP dans la différenciation mucociliée de l'épithélium (Cibois et al. 2015). En utilisant des cultures *in vitro* en IAL des cellules épithéliales respiratoires issues de patients sains ou atteints de mucoviscidose (CF pour Cystic Fibrosis), nous avons montré qu'une inhibition de la voie BMP à un stade précoce de différenciation augmente fortement le nombre de MCC et de cellules à mucus. A l'inverse, une suractivation de cette voie BMP induit la formation d'un épithélium squameux confirmée par la surexpression de marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse tels que la transglutaminase 1 et l'involucrine. Nos résultats ainsi que ma contribution à cette étude seront détaillés dans la section Résultats (page 112). Plus récemment, l'équipe de Hogan a observé la contribution de la voie BMP pendant le mécanisme de réparation chez la souris (Tadokoro et al. 2016). Dans leur modèle, les auteurs confirment que la stimulation de BMP4 inhibe la différenciation. Par ailleurs, ils suggèrent qu'après lésion, des antagonistes de la voie BMP, comme la follistatine, sont transitoirement surexprimés afin de permettre la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales. Enfin, une étude très récente a également été réalisée chez la souris par l'équipe de Rajagopal (Mou et al. 2016). Dans cette publication, les auteurs suggèrent que la double activation de la voie SMAD (SMAD 2/3 par TGF β et SMAD 1/5/8 par BMP) permet la différenciation mucociliée. A l'inverse la double répression permet l'expansion de cellules basales provenant de différents tissus, capables par la suite de reformer un épithélium complet. Dans ce cas, l'inhibition de BMP combinée à celle de TGF β bloque toute différenciation terminale, alors que nous avons montré que l'inhibition de BMP stimule, au contraire, la spécification. Les auteurs n'ont pas précisé la contribution précise de chacune des voies SMAD.

d. Le rôle des cytokines

L'épithélium mucocilié des voies respiratoires constitue la première ligne de défense du tissu respiratoire à plusieurs titres. Dans un premier temps il met en jeu la clairance mucociliaire (Cf Partie II.C.2) afin d'éliminer des voies respiratoires les pathogènes piégés dans le mucus. De plus,

l'épithélium des voies respiratoires est capable de sécréter de nombreuses molécules antimicrobiennes (défensines, chimiokines...) ainsi que de nombreuses cytokines et autres médiateurs qui lui permettent d'interagir étroitement avec les cellules immunes (cellules dendritiques, lymphocytes...) et les cellules mésenchymateuses environnantes. En conséquence, cette interaction étroite entre l'épithélium des voies respiratoires, le système immunitaire et le tissu mésenchymateux sous-jacent permet à l'organisme d'adapter *in situ* la réponse immune et la réparation tissulaire (prolifération, migration, différenciation) dans des situations de stress, d'infection ou de blessure. Ces signaux ont été notamment mis en évidence dans des contextes pathologiques comme par exemple dans l'asthme. Cette maladie a été associée à la sécrétion des interleukines IL-13 et d'IL-4 qui vont déterminer la différenciation de l'épithélium vers un phénotype sécrétoire (Munitz et al. 2008; Laoukili et al. 2001; Kuperman et al. 2002; Grünig et al. 1998). Récemment, une étude a souligné l'importance de l'IL-6 sur la différenciation multiciliée (Tadokoro et al. 2014). En utilisant des modèles *in vitro* de cellules humaines et murines cultivées sur matrigel ou en IAL et un modèle *in vivo* chez la souris, les auteurs ont montré que cette interleukine, sécrétée par les cellules du stroma lors d'un mécanisme de réparation, est capable d'induire la phosphorylation du facteur de transcription STAT3 (« Signal transducer and activator of transcription 3 »). Une fois phosphorylé, STAT3 va à son tour entraîner l'inhibition de Notch1 et induire la multiciliogénèse. Les auteurs soulignent la capacité de l'IL-6 à induire l'expression de gènes clés de la différenciation multiciliée tels que MCIDAS, ou FOXJ1 (Cf parties IV.C.4.a et IV.C.6.b).

e. Le rôle de la voie des β -caténines

En 2011, l'équipe de Susan Reynolds a suggéré pour la première fois chez la souris un rôle de la voie des β -caténines dans la détermination du phénotype multicilié à partir de cellules basales (Brechtbuhl et al. 2011). Les auteurs ont démontré que la stabilisation de la β -caténine dans les cellules basales augmente la différenciation multiciliée. Dans cette étude, les auteurs ne précisent aucune mécanistique. Un an plus tard, la même équipe a confirmé ce rôle de la β -caténine *in vivo* chez la souris (Smith et al. 2012).

f. Le rôle du facteur de transcription GRHL2

L'équipe de Hogan a récemment suggéré l'implication d'un autre facteur de transcription, GRHL2 (pour « Grainyhead-like 2 ») dans la différenciation multiciliée (Gao et al. 2013; Gao et al. 2015). En effet, sur des modèles *in vitro* de souris et humain, l'inhibition de GRHL2 empêche la différenciation en cellules multiciliées. Les auteurs proposent que GRHL2 stimule l'expression de Notch3, qui serait impliqué dans la formation de progéniteurs (Mori et al. 2015), et inhibe l'expression de Notch1 et 2, engageant ainsi ces progéniteurs vers un phénotype multicilié.

g. Le rôle du facteur de transcription YAP

Trois études parues récemment ont mis en évidence le rôle du facteur de transcription YAP (« Yes-associated Protein ») dans la différenciation des cellules basales chez la souris *in vivo* au cours du développement et *in vitro* (modèle IAL) à l'âge adulte. La première équipe a mis en évidence une localisation différentielle de cette protéine en fonction de l'état de différenciation des cellules (Mahoney et al. 2014). En effet, dans les cellules basales, YAP est sous forme déphosphorylée et est séquestrée dans le noyau. Les auteurs suggèrent que ce facteur de transcription maintiendrait ainsi le phénotype des « cellules basales ». En revanche, sa localisation hors du noyau, en fonction de son état de phosphorylation, permet aux cellules de débiter leur programme de différenciation. Un an plus tard, la même équipe a précisé le mécanisme induisant la localisation de YAP hors du noyau et permettant ainsi la différenciation (Szymaniak et al. 2015). Les auteurs suggèrent que la protéine CRB3 (« Crumbs3 ») exprimée spécifiquement dans la partie apicale des cellules en cours de différenciation, permet la localisation apicale de YAP ainsi que de deux kinases, Lats1/2, entraînant la phosphorylation du facteur de transcription et ainsi son maintien hors du noyau. En parallèle, l'équipe de Rajagopal a également démontré l'importance de YAP dans les mêmes modèles (Zhao et al. 2014). Les auteurs ont montré qu'une surexpression de YAP dans les cellules club entraîne leur dédifférenciation. Ce résultat pourrait expliquer un des mécanismes impliquant la dédifférenciation des cellules Club lors des mécanismes de régénération.

h. Le rôle des facteurs de transcription E2F4 et E2F5

En 2007, l'équipe de Jacqueline Lees a mis en évidence le rôle du facteur de transcription E2F4 dans la différenciation multiciliée chez la souris (Danielian et al. 2007). Les auteurs ont observé que l'épithélium nasal des souris déficientes pour E2F4 est dépourvu de MCC tandis qu'il contient un nombre accru de cellules sécrétrices de mucus. L'absence d'E2F4 cause également un défaut de formation de cellules Club. Néanmoins, les auteurs ne proposent pas de mécanisme et n'évoque pas de lien potentiel avec la voie Notch. Neuf années plus tard, cette même équipe a complété le tableau préalablement décrit mais cette fois-ci au niveau des testicules (Danielian et al. 2016). En effet, les auteurs ont démontré que la suppression d'E2F4 ou d'E2F5 empêche la formation de MCC au niveau des canaux efférents, structures impliquées dans la maturation des spermatozoïdes en permettant leur progression jusqu'à l'épididyme (Cf partie I.E.2.d).

Le prochain chapitre nous permettra de détailler plus précisément la contribution des facteurs E2F4 et E2F5 dans le contrôle transcriptionnel précoce des MCC.

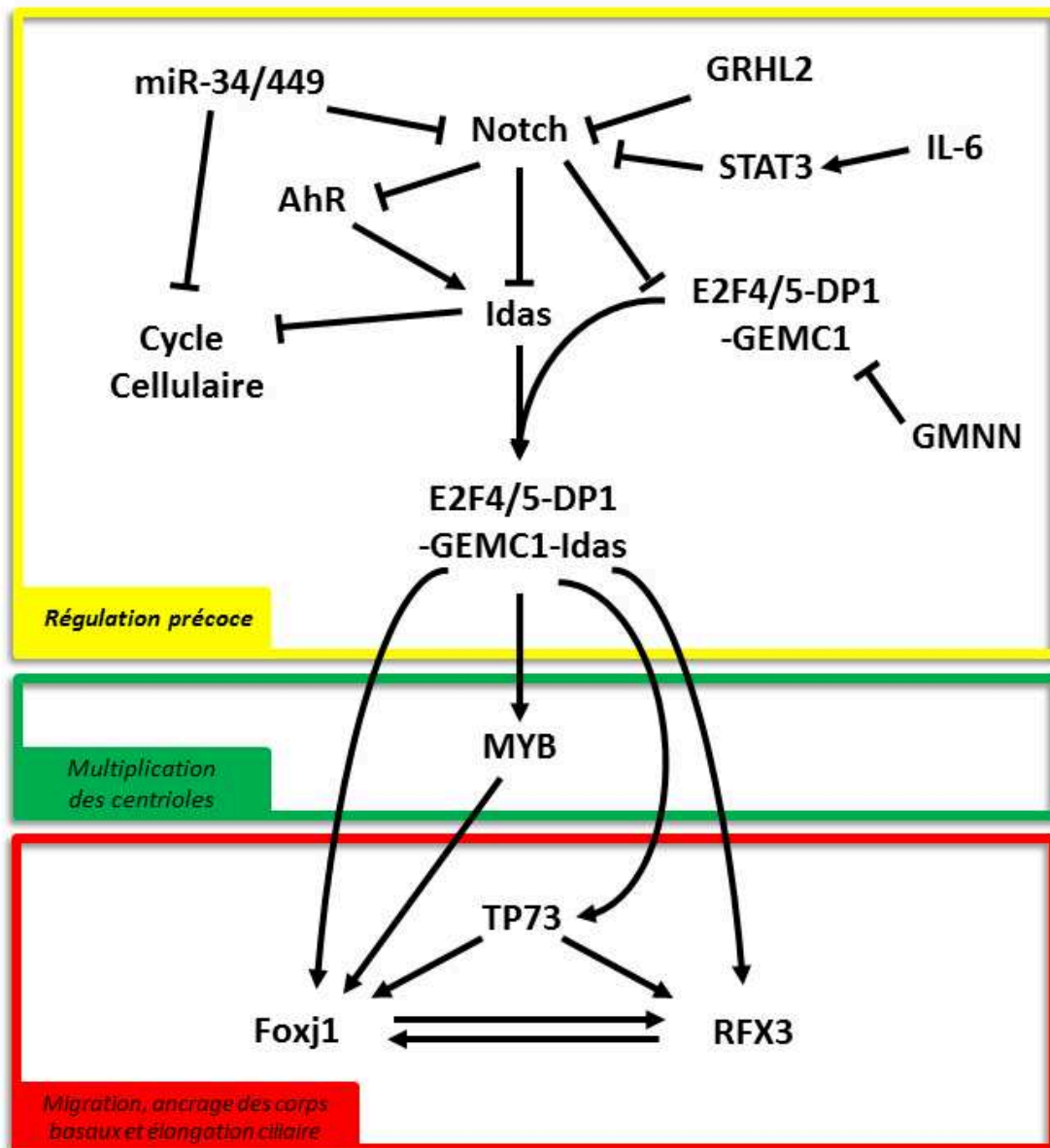


Figure 30 : Modèle récapitulant les différentes régulations transcriptionnelles de la multiciliogénèse

Chacun des régulateurs clés a été regroupé dans une des trois phases que sont : la régulation précoce (en jaune), la multiplication des centrioles (en vert) et la migration, l'ancrage des corps basaux ainsi que l'élongation ciliaire (en rouge).

3. L'arrêt du cycle cellulaire

D'une manière générale, les mécanismes de différenciation terminale des cellules sont accompagnés d'un arrêt complet du cycle cellulaire. Cette règle est applicable au cas des MCC. Et bien que les mécanismes impliqués dans ce type de différenciation soient intensément étudiés, peu d'informations demeurent disponibles quant aux acteurs permettant la sortie du cycle cellulaire. Sous cet aspect, mon laboratoire d'accueil a montré que l'expression des microARN de la famille miR-34/449 induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 en réprimant directement différents acteurs majeurs du cycle cellulaire tels que l'amphiréguline, les cyclines B1 et E2 (*CCNB1* et *CCNE2*) ainsi que *CDC25A* (« cell division cycle 25 homologue A ») (Cf partie Résultats) (Marcet, Chevalier, Coraux, et al. 2011; Marcet, Chevalier, Luxardi, et al. 2011). Une autre étude suggère l'inhibition de *CDK6* (Cyclin-Dependent Kinase 6) par cette famille de miARN (M Lizé et al. 2010b). Par ailleurs, l'équipe de Kintner a mis en évidence le rôle de la Multiciline ou Idas, codée par le gène *MCIDAS* (pour « Multiciliate Differentiation And DNA Synthesis Associated Cell Cycle Protein ») chez l'Homme, une protéine indispensable à la multiciliogénèse (Cf Partie IV.C.4.a), dans l'arrêt du cycle, sans en préciser les mécanismes (Stubbs et al. 2012). Enfin, une étude récente suggère que le facteur de transcription P73 pourrait moduler l'expression d'une autre cycline *CDKN1A* (« Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A ») et ainsi permettre l'arrêt du cycle cellulaire (Marshall et al. 2016).

4. La mise en place d'un réseau transcriptionnel précoce

Une fois la cellule basale orientée vers le phénotype multicilié, une cascade d'événements transcriptionnels va être déclenchée. Ce programme génique est très complexe et implique un grand nombre de composants, qui vont, tour à tour, engendrer l'expression de facteurs clés de la multiciliogénèse.

a. La multiciline au cœur d'un complexe majeur de régulation

La multiciline (ou Idas) est le premier régulateur transcriptionnel identifié agissant à un stade précoce de la multiciliogénèse (Figure 30). En effet, en 2012, Stubbs et ses collègues ont identifié ce gène qui est le plus régulé par la modulation de la voie Notch dans l'épiderme de xénope (Stubbs et al. 2012). En modulant l'expression d'Idas chez la souris et le xénope, les auteurs ont constaté que cette protéine est indispensable à la multiciliogénèse. De plus, en utilisant une protéine de fusion SAS-6 fluorescente, ils ont souligné le rôle de la multiciline dans l'assemblage des centrioles, un prérequis indispensable à la formation des multiples cils mobiles. Par ailleurs, ils ont démontré que *mcidas* est contrôlée négativement par la voie Notch. Enfin, leurs résultats indiquent que la multiciline induit l'expression de gènes impliqués dans la différenciation tels que *foxj1* (décrit plus loin). Cependant, l'aspect direct de cette régulation est seulement supposé, étant donné que cette

protéine ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN. Deux ans plus tard, le même groupe a proposé un mécanisme moléculaire de régulation par la multiciline (Ma et al. 2014). La multiciline forme un complexe ternaire avec les facteurs de transcription E2F4 (ou E2F5) et DP1. Ce complexe va ensuite induire l'expression de gènes clés de la différenciation multiciliée. Cette étude rejoint ainsi les observations de l'équipe de Jacqueline Lees, qui avait montré que la déficience de E2F4 ou E2F5 bloquait la différenciation multiciliée (Danielian et al. 2007; Danielian et al. 2016). L'utilisation d'un mutant de la protéine E2F4 entraîne chez le xénope un blocage de l'assemblage des corps basaux. Ce résultat est confirmé par une diminution de l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la biogénèse des centrioles chez le mutant d'E2F4 comparé à son équivalent sauvage. Les auteurs ont également comparé les gènes régulés négativement par le mutant E2F4 et les gènes régulés positivement par la surexpression de la multiciline et ont confirmé un chevauchement significatif des gènes dans les deux conditions. Enfin, sur des embryons de xénope exprimant ou non la multiciline, une immunoprécipitation de la chromatine à l'aide d'un anticorps E2F4 suivie d'un séquençage (CHIP-seq) ont été réalisés et comparés. Comme attendu, un grand chevauchement des conditions est retrouvé mais la présence de la multiciline entraîne un net enrichissement de régions correspondant à des gènes de biogénèse des centrioles.

La même année, cette même équipe a montré chez l'Homme qu'une mutation de la multiciline était retrouvée chez des patients présentant une maladie caractérisée par la réduction du nombre de MCC (RGMC en anglais pour « Reduced Generation of Multiple Cilia ») (Boon et al. 2014). Par ailleurs, une équipe a récemment constaté que l'IL-13, induite dans les pathologies chroniques comme l'asthme, inhibe la multiciline d'une manière indépendante de la voie Notch (Gerovac & Fregien 2016).

Enfin, un groupe d'études récentes a mis en évidence un autre acteur relié à Idas, GEMC1 (pour « Geminin Coiled-Coil Domain Containing 1»). Les trois premières études suggèrent que GEMC1, qui est inhibé par la voie Notch et par la Gémimine (GMNN), stimule l'expression de Idas chez la souris, le xénope et le poisson zèbre (Kyrrousi et al. 2015; Zhou et al. 2015; Arbi et al. 2016). La dernière étude démontre que GEMC1 interagit à la fois avec E2F4/5-DP1 et Idas pour former un complexe quaternaire. Le modèle proposé est donc que GEMC1 va d'abord former un complexe avec E2F4/5-DP1 pour induire des gènes de la différenciation et notamment Idas. Une fois exprimée, Idas s'associe au complexe et renforce l'induction de gènes indispensables à la différenciation multiciliée tels que *MYB*, *FOXJ1* ou *RFX3* (Cf parties IV.C.5.a et IV.C.6.b) (Figure 30).

b. TAP73, nouveau facteur de transcription majeur de la multiciliogénèse

Deux études très récentes publiées à moins de deux mois d'intervalle ont mis en évidence le rôle de TAP73 dans le contrôle précoce de la multiciliogénèse (Marshall et al. 2016; Nemajerova et al.

2016). Les souris déficientes pour ce facteur de transcription homologue de p53 présentent des infections respiratoires chroniques, une stérilité et une hydrocéphalie. Tous ces symptômes sont la conséquence d'une absence de MCC dans les différents tissus concernés. Les deux études réalisées chez la souris ne s'accordent pas sur la spécificité d'expression de TAP73. En effet, l'équipe de Pietenpol identifie cette protéine à la fois dans les cellules basales et les MCC, alors que le groupe de Lizé ne les observe que dans les MCC. Cette dernière équipe a décortiqué précisément le phénotype des souris déficientes et a observé que les cellules demeurent capables d'amplifier le nombre des corps basaux, ce qui sous-entend que TAP73 ne contrôle pas la multiplication des centrioles. En revanche les corps basaux ne sont pas capables de s'ancrer à la membrane apicale, ne sont pas polarisés et ne donnent pas naissance aux cils mobiles. Marshall et ses collaborateurs suggèrent des rôles très précoces de TAP73. Pourtant, des expériences de séquençage d'ARN couplées au séquençage après immunoprécipitation de la chromatine avec TAP73 mettent en évidence une régulation de gènes impliqués dans la formation de cils, suggérant ainsi une action à un stade plus tardif de la différenciation. Ces deux études s'accordent sur le fait que TAP73 régule des facteurs clés de la biogénèse des cils mobiles, tels que les facteurs de transcription Foxj1, RFX2 et RFX3 (Figure 30). Enfin l'équipe de Lizé précise que TAP73 agit en aval de Idas qui le contrôle.

c. AhR, quand l'environnement agit sur la différenciation

Un autre acteur crucial pour la régulation précoce de la multiciliogénèse vient d'être mis en évidence très récemment par l'équipe de Andreas Wack (Villa et al. 2016). Ce facteur de transcription, AhR (pour aryl hydrocarbon receptor) était alors connu pour sa capacité à engendrer la détoxification de polluants de l'air. Dans cette étude, les auteurs établissent le contrôle de la multiciliogénèse par ce facteur d'une manière dépendante à l'exposition à l'air. C'est la première fois qu'une équipe propose la contribution de l'air inhalé comme déterminant de la différenciation. La déficience d'AhR bloque la multiciliogénèse précocement puisque la multiplication des centrioles est perturbée. L'expression de nombreux gènes indispensables à la multiciliogénèse est effondrée en absence d'AhR, notamment des gènes très précoces comme la multiciline (Figure30). L'inhibition de la voie Notch dans des souris déficientes pour AhR n'induit pas la différenciation, prouvant ainsi qu'AhR agit en aval du blocage de cette voie de signalisation.

Au travers ce chapitre, nous avons mis en avant les facteurs de transcription précoces identifiés à ce jour comme ayant un rôle majeur dans la différenciation multiciliée. Ces acteurs vont être capables d'activer des gènes responsables d'une cascade d'événements globalement séquentiels, eux-mêmes sous le contrôle de facteurs de transcription clés.

5. Multiplication des centrioles ou centriologénèse.

a. *Le facteur de transcription MYB*

Une des étapes majeures de la différenciation d'une cellule multiciliée correspond à la formation des centaines de corps basaux, à partir desquels l'élongation des cils s'opère. Ce phénomène implique une multiplication massive des centrioles (centriologénèse), suivie de leur migration puis de leur ancrage dans le réseau apical d'actine pour devenir des corps basaux. Deux études ont montré que la centriologénèse est sous le contrôle du facteur de transcription MYB (Pan et al. 2014; Tan et al. 2013). En effet, les souris déficientes présentent un blocage de l'amplification des centrioles au cours du développement et un défaut d'expression d'un autre régulateur clé plus tardif, Foxj1 (Figure 30). De manière surprenante, MYB semble également important dans la différenciation des cellules à mucus (Pan et al. 2014). Bien que son rôle soit clairement établi, ses cibles transcriptionnelles directes n'ont pas été précisément identifiées. Par ailleurs, la famille de miARN miR-34/449 est également impliquée dans la multiplication des centrioles puisque mon laboratoire d'accueil a mis en évidence que leur inhibition par des antagomiR (Cf Figure 34) altère la centriologénèse (Marcet, Chevalier, Luxardi, et al. 2011). Je présenterai ces données dans la section suivante (Cf partie Résultats). L'équipe de Kintner a également appuyé ces résultats en démontrant que la régulation fine de CP110 par miR-34/449 est indispensable à la maturation des centrioles en corps basaux (R Song et al. 2014; Walentek et al. 2016).

b. *La multiplication massive des centrioles*

Dans une cellule non quiescente en condition physiologique, les centrioles se dupliquent une seule fois par cycle cellulaire. Dès lors, une cellule progénitrice de cellule multiciliée doit utiliser des mécanismes différents de la voie centriolaire classique, pour permettre, à partir d'une paire de centrioles, d'obtenir des centaines de centrioles. Cette voie, appelée acentriolaire ou *de novo*, met principalement en jeu des acteurs spécifiques gravitant dans une structure cytoplasmique dense proche des centrioles appelée deuterosome, uniquement retrouvée dans les cellules en cours de multiciliation (Sorokin 1968). Bien que son identification remonte à près de 50 ans, la composition moléculaire du deuterosome a été partiellement élucidée que très récemment.

C'est en 2013 que les premières protéines importantes de ce complexe ont été mises en évidence (Klos Dehring et al. 2013). Ce groupe a en effet identifié CCDC78 (« coiled-coil domain containing protein 78 ») comme protéine du deuterosome conservée chez les vertébrés (xénope et souris). CCDC78, qui est sous le contrôle de la multiciline, colocalise au niveau des deuterosomes avec SAS-6, Cep152 et PLK-4, qui sont des protéines structurales indispensables à la duplication des centrioles. De manière intéressante, l'inhibition de CCDC78 entraîne une diminution du nombre de

centrioles dans les MCC. De plus, à l'aide de billes fluorescentes, les auteurs révèlent que la répression de cette protéine diminue la vitesse du flux liquidien induit par le battement des cils mobiles. La surexpression de Cep152, composant le plus précoce crucial pour la duplication de centrioles, entraîne une augmentation du nombre de centrioles dans les MCC chez le xénope. Cette surexpression est dépendante de CCDC78, ce qui met en évidence l'importance de cette nouvelle protéine dans les étapes précoces d'amplification centriolaire dans les MCC.

La même année, une autre étude a élégamment montré l'importance d'une autre protéine, Deup1, dans le contrôle de la multiplication des centrioles via le deutérosome en utilisant une approche de microscopie à très haute résolution (3D-SIM pour « Structured Illumination Microscopy ») (Zhao et al. 2013). Les auteurs ont supposé que les voies centriolaires et acentriolaires devaient partager des bases structurales. Lors de la duplication centriolaire classique, Cep63 et Cep152 forment un anneau servant d'échafaudage pour le recrutement d'autres protéines de structure du centriole (Lukinavičius et al. 2013; Brown et al. 2013). Ils ont ainsi focalisé sur Deup1, qui est un paralogue de Cep63 (homologie de 37%) résultant de sa duplication ancestrale. Deup1 est spécifiquement et transitoirement exprimée dans les cellules en cours de multiciliation et localise au niveau du deutérosome. Les auteurs révèlent que Deup1 représente la base structurale sur laquelle les différents composants du deutérosome viennent s'assembler, à la manière de son paralogue Cep63 dans la duplication centriolaire classique. Ainsi, Zhao et ses collègues soulignent l'existence de deux voies de production de centrioles parallèles dépendantes de deux protéines paralogues ayant divergé pour permettre l'amplification massive de centrioles dans les MCC.

Récemment, un autre acteur important du deutérosome a été identifié (J Wallmeier et al. 2014; Funk et al. 2015a). L'équipe de Kintner a tout d'abord observé que des patients atteints d'anomalie de clairance mucociliaire présentaient des mutations dans le gène codant pour la cycline O (CCNO). Les mutations ou la déplétion de cette protéine entraînent un défaut d'amplification et d'ancrage des centrioles, ayant pour conséquence un nombre réduit de cils mobiles (J Wallmeier et al. 2014). Les auteurs ont donc classifié la maladie comme tel : RGMC en anglais pour « Reduced Generation of Motile Cilia ». CCNO, dont l'expression est contrôlée positivement par Idas et AhR (Ma et al. 2014; Villa et al. 2016), localise au niveau des deutérosomes (Funk et al. 2015a). Funk et ses collègues ont observé que les souris mutantes pour CCNO présentent un nombre réduit de deutérosomes, de tailles plus importantes que dans les souris sauvages et à partir desquelles sont générés un plus petit nombre de centrioles. CCNO s'impose donc comme acteur majeur de la formation des deutérosomes, bien que ses interactants moléculaires et sa fonction n'aient pas été déterminés à ce jour.

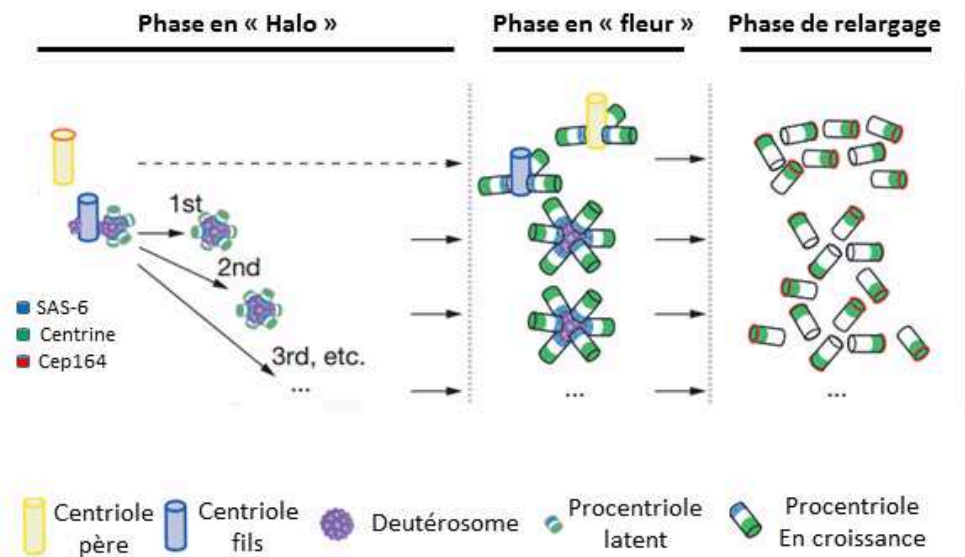


Figure 31 : Modèle de l'amplification des centrioles dans les cellules multiciliées

L'amplification débute par une phase en « Halo » pendant laquelle les deuterosomes sont recrutés tour à tour sur le centriole fils et donnent naissance à des procentrioles. En parallèle, des procentrioles se forment sur le centriole père et le centriole fils de manière indépendante des deuterosomes. Par la suite, ces différents procentrioles vont s'allonger pendant la phase en « fleur » pour être enfin relargués (d'après Al Jord et al., 2014).

Enfin, une dernière étude récente a permis de revisiter les axiomes concernant l'amplification centriolaire dans les MCC (Jord et al. 2014). En effet, jusqu'alors, l'amplification de la majorité des centrioles était supposée *de novo*, de manière indépendante du centrosome, *via* le deutérosome. Meunier et ses collaborateurs ont révélé que tous les centrioles néoformés dérivent du centrosome préexistant. Précisément, deux types d'amplification ont lieu de manière concomitante (Figure 31). Une première lors de laquelle jusqu'à 5 procentrioles émergent des parties proximales des centrioles père et fils. La seconde implique le recrutement de deutérosomes dans la partie proximale du centriole fils uniquement. Ainsi, plus de 90% des centrioles néoformés proviennent des deutérosomes alors que moins de 10% proviennent des centrioles centrosomaux. Chronologiquement, le ou les deutérosomes (observation de centrioles avec deux deutérosomes simultanés) sont recrutés sur le centriole fils où environ 5 procentrioles émergent. Cette phase dite en « halo » est aussi caractérisée par la nucléation de procentrioles sur les centrioles père et fils, indépendamment du deutérosome. Après plusieurs tours de recrutement de deutérosomes au cours desquels les procentrioles restent latents, s'en-suit une phase dite en « fleur » durant laquelle les centrioles s'allongent et s'épaississent pour former des structures semblables à des pétales (Figure 31). Au final les centrioles néoformés sont relargués. L'équipe d'Alice Meunier démontre ainsi une nouvelle vision de l'amplification centriolaire soulignant une nouvelle asymétrie entre centrioles père et fils. Cependant, les acteurs moléculaires permettant de basculer d'une duplication classique à cette amplification massive demeurent inconnus. De la même façon, les facteurs induisant le recrutement des deutérosomes peut-être *via* *Deup1*, sont encore à découvrir.

6. La migration et l'ancrage des corps basaux à la membrane apicale

a. *Le rôle du cytosquelette d'actine*

Une fois les centrioles formés par les mécanismes précédemment décrits, leur adressage et leur ancrage sous la membrane apicale est un préalable indispensable à l'élongation des cils mobiles.

En 1988, l'équipe de Sandoz a établi pour la première fois le rôle du cytosquelette d'actine dans la migration et l'ancrage des centrioles au pôle apical des MCC d'oviducte de caille (Lemullois et al. 1988; Boisvieux-Ulrich et al. 1990). En bloquant la polymérisation d'actine avec la cytochalasine D, les auteurs ont noté une inhibition de la ciliogénèse mais non de la centriologénèse, soulignant un défaut de migration des centrioles.

Au pôle apical, l'actine forme un réseau dense au cours de la différenciation des MCC (Pan et al. 2007). Ce maillage d'actine va dans un premier temps servir de « guide » pour la bonne migration des corps basaux au pôle apical.

Cette migration est autorisée d'une part par des molécules de la voie des PCP (Cf partie II.C.2.b), qui permettent le recrutement au niveau des corps basaux de régulateurs clés de l'assemblage de l'actine (Pan et al. 2007; Park et al. 2008a; Yasunaga et al. 2015; Miyatake et al. 2015). C'est notamment le cas de la protéine Dishevelled qui est capable de phosphoryler la petite GTPase RhoA, phénomène indispensable à la mise en place du réseau apical d'actine (Park et al. 2008b; Pan et al. 2007). Une autre protéine PCP, Intuned, va également jouer un rôle majeur dans la migration des corps basaux. En effet, ce connecteur, va permettre de relier d'une part le corps basal en interagissant avec la protéine NPHP4 mais également le réseau apical d'actine en formant un complexe avec DAAM1 (« Disheveled-associated activator of morphogenesis 1 ») (modulateur de l'élongation d'actine) et en recrutant Dishevelled et RhoA (T. J. Park et al. 2006; Yasunaga et al. 2015). Dishevelled semble également pouvoir s'associer à deux protéines DLG3 (« Disks large homolog 3 ») et Flattop, importantes pour l'ancrage des corps basaux (Gegg et al. 2014). De plus, l'équipe de Wallingford a montré que Dishevelled est également nécessaire à l'association des corps basaux à des vésicules permettant leur transport au pôle apical (Park et al. 2008b). De la même façon, l'équipe de Takemaru a réalisé une étude convaincante sur l'implication d'une protéine du corps basal, Chibby dans le transport des corps basaux (Burke et al. 2014). Chibby interagit avec Cep164 au niveau des appendices distaux des centrioles, où elle va permettre le recrutement et l'assemblage de vésicules, responsables de la migration et de l'ancrage des corps basaux à la membrane apicale. Nishida et ses collaborateurs ont récemment élucidé le rôle d'une protéine kinase, ERK7 (« Extracellular Signal-Regulated Kinase »), dans la régulation de la multiciliogénèse chez le xénope et la souris (Miyatake et al. 2015). Les auteurs ont montré que l'inhibition d'ERK7 réprime la migration apicale des corps basaux et bloque la formation du réseau apical d'actine. D'un point de vue mécanistique, ERK7, avec l'aide de Dishevelled, phosphoryle un de ces substrats CapZIP (« CapZ-interacting protein »), qui est un régulateur de l'actine important pour la ciliogénèse (Oishi et al. 2006).

Une fois activée, RhoA va phosphoryler des protéines de liaison à l'actine telles que les protéines Ezrine/Radixine/Moésine (regroupées sous le terme d'ERM), ce qui favorise leur relocalisation membranaire, leur permettant ainsi de relier l'actine à la membrane apicale. (Bretscher et al. 2002; Shaw et al. 1998). Notamment, Gomperts et ses collègues ont montré par microscopie électronique que l'Ezrine s'associe avec les corps basaux au niveau de la membrane apicale (Gomperts et al. 2004). L'Ezrine est notamment capable de recruter la protéine EBP50 (« ERM Binding Protein 50 ») qui interagit avec des membres de la PCP pour organiser le réseau apical d'actine (Huang et al. 2003a; Treat et al. 2016). Récemment, Epting et ses collègues ont mis en évidence l'interaction de l'Ezrine avec ELMO (pour « Engulfment and Cell Motility »), le facteur

d'échange de la petite protéine G Rac1 (Epting et al. 2015). Ainsi, ELMO pourrait permettre la modulation du niveau de phosphorylation de l'Ezrine *via* Rac1, mécanisme indispensable à la migration et l'ancrage des corps basaux au pôle apical.

Outre le rôle de l'actine dans la migration des corps basaux, ce maillage dense apical va également faciliter un ancrage solide des corps basaux au niveau de la membrane apicale. La meckeline joue en particulier un rôle important pour l'ancrage des corps basaux. Cette protéine, codée par le gène MKS3 dont les mutations ont été identifiées chez les patients atteints par le syndrome de Meckel-Gruber (Cf partie I.F.1) est exprimée au niveau des centrioles. Deux études ont démontré son interaction à la membrane apicale avec des protéines de liaison à l'actine telles que la Filamine-A et la Nesprine-2 (Adams et al. 2012; Dawe et al. 2009). A l'aide d'ARN interférence, les auteurs ont mis en évidence le rôle important de ces différentes molécules dans l'ancrage des corps basaux et la ciliogénèse. Néanmoins, ces expériences ont été réalisées dans des cellules monociliées. Leur validation dans un modèle multicilié est donc nécessaire.

Par ailleurs, l'équipe de Skourides a révélé chez le xénope l'importance de Nubp1 (Nucleotide Binding Protein 1) dans l'organisation du réseau apical d'actine, indispensable pour la migration et l'ancrage des corps basaux dans les MCC (Ioannou et al. 2013). De manière surprenante, les auteurs ont mis en évidence dans cette étude un réseau d'actine cytoplasmique plus basal qui maintient les corps basaux groupés et les relie à la périphérie de la cellule à des stades précoces de différenciation (Ioannou et al. 2013). Une dysfonction de ce réseau cytoplasmique d'actine interfère avec la bonne migration des corps basaux, montrant l'importance de cet événement précoce. La même équipe a présenté l'année suivante une étude sur la contribution des protéines impliquées dans les points focaux d'adhésion dans ce mécanisme (Antoniades et al. 2014). Dans cette publication, les auteurs ont révélé l'association de protéines des points focaux d'adhésion (Vinculine, Paxilline, FAK pour Focal Adhesion Kinase) avec les corps basaux, formant ainsi des complexes d'adhésion. Ces complexes permettent de relier les corps basaux au réseau d'actine. Cette équipe propose par ailleurs l'existence de deux niveaux distincts du réseau d'actine : un niveau apical et un niveau sous-apical comme l'avait précédemment suggéré l'équipe de Mitchell (Werner et al. 2011). Ces deux réseaux permettent à la fois le bon espacement entre les corps basaux et leur polarisation. Au niveau du réseau d'actine sous-apical, les complexes d'adhésion connectent les corps basaux entre eux selon deux directions (Figure 32). Un premier lien s'établit entre l'extrémité des fibres striées d'un corps basal et le corps basal devant lui dans l'axe antéro-postérieur déterminé grâce à la polarité planaire (Cf partie II.C.2.b). Le deuxième lien est perpendiculaire et relie un corps basal à son voisin de gauche ou de droite (Figure 32).

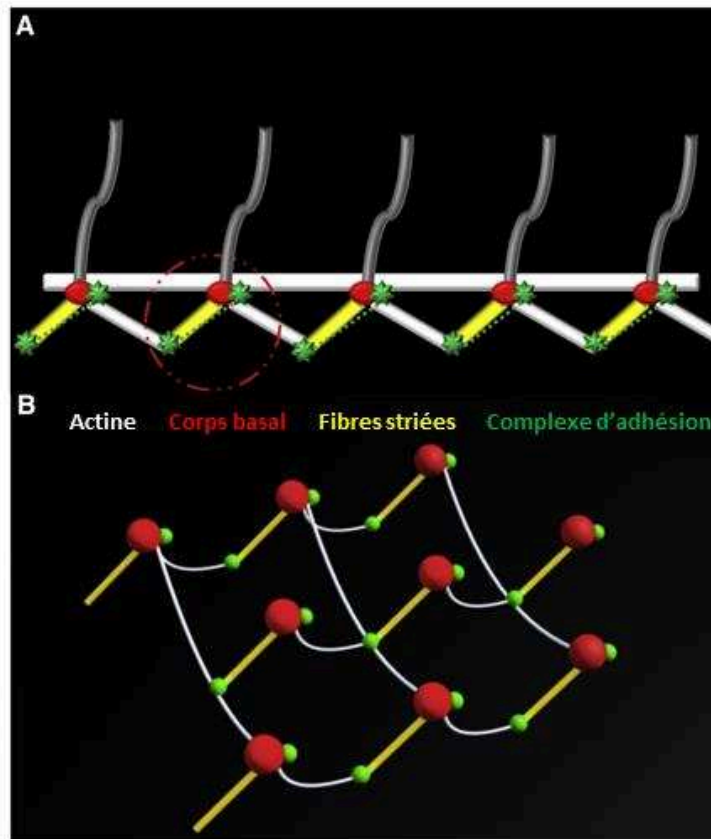


Figure 32 : Liaison des corps basaux au réseau d'actine par les complexes d'adhésion ciliaires

Les complexes d'adhésion ciliaires se lient aux corps basaux et permettent leur connexion au réseau apical d'actine.

A. Vue de profil selon l'axe antéro-postérieur. Un complexe d'adhésion présent à l'extrémité des fibres striées d'un corps basal est relié à un autre complexe situé sur le corps basal de devant par des fibres d'actine. Le cercle discontinu rouge souligne la présence de deux complexes d'adhésion sur un même corps basal

B. Modèle proposé de l'arrangement des corps basaux selon l'axe proximo-distal mais également selon un axe perpendiculaire au premier (d'après Antoniadou et al., 2014).

Néanmoins, à ce jour les mécanismes régissant la mise en place précise de l'un et l'autre des réseaux (apical et subapical) sont, à ce jour, inconnus. Le réseau le plus apical est mis en place très tôt et finit sa maturation uniquement une fois que les corps basaux sont ancrés (Meunier & Azimzadeh 2016). Le réseau subapical se met en place quant à lui plus tard. Une des hypothèses à confirmer serait que le réseau d'actine cytoplasmique précoce (regroupant et reliant les corps basaux à la périphérie cellulaire) évolue par la suite en formant le réseau subapical.

Enfin, une étude très récente a mis en avant le rôle des microtubules au niveau apical dans l'organisation et notamment l'alignement des corps basaux (Herawati et al. 2016).

b. FOXJ1 et RFX2-3, régulateurs transcriptionnels tardifs de la multiciliogénèse

Nous avons décrit plus haut les facteurs de transcription précoces impliqués dans l'identité multiciliée. Nous avons ensuite souligné le rôle de MYB dans l'étape de biogénèse des corps basaux. Dans cette partie nous allons évoquer la fonction de facteurs de transcription majeurs mais agissant à un stade plus tardif de la multiciliogénèse.

Historiquement, Foxj1 a été le premier facteur de transcription décrit pour être associé à la multiciliogénèse. A la fin des années 90, quelques études pionnières ont permis l'identification de Foxj1 comme régulateur majeur de la formation des cils mobiles. En 1998, Chen et ses collègues ont observé que la déficience pour ce gène chez la souris entraînait une absence totale de cils accompagnée d'un défaut de détermination de symétrie gauche/droite (Chen et al. 1998). Les auteurs ont suggéré que Foxj1 serait capable de contrôler l'expression de dynéines ciliaires. L'année d'après, deux autres équipes ont démontré que Foxj1 est exprimé spécifiquement au niveau des cellules à cils mobiles dans les voies respiratoires mais également au niveau des ventricules cérébraux, des trompes de Fallope, des testicules, et du nœud embryonnaire (Brody et al. 2000; Blatt et al. 1999; Tichelaar et al. 1999). Dès lors, la localisation spécifique de ce facteur de transcription et les défauts observés lors de son invalidation laissent présager du rôle primordial de Foxj1 dans la ciliogénèse. Par la suite, deux autres études ont souligné le fait que les MCC de souris déficientes pour Foxj1 présentent un défaut de migration et/ou d'ancrage apical des centrioles (Brody et al. 2000; You et al. 2004). Le spectre d'action de Foxj1 s'élargit donc de la fabrication du cil mobile à la maturation des corps basaux néo-synthétisés. Plusieurs études ont précisé que Foxj1 est capable de réguler la formation du réseau apical d'actine nécessaire à l'ancrage des corps basaux. En effet, Pan et ses collègues ont montré que Foxj1 active RhoA (Pan et al. 2007). De plus, L'équipe de Hackett a prouvé chez la souris que la perte de Foxj1 entraîne la diminution d'expression de l'Ezrine et d'EBP50, deux protéines nécessaires à l'ancrage apical des corps basaux (Gomperts et al. 2004).

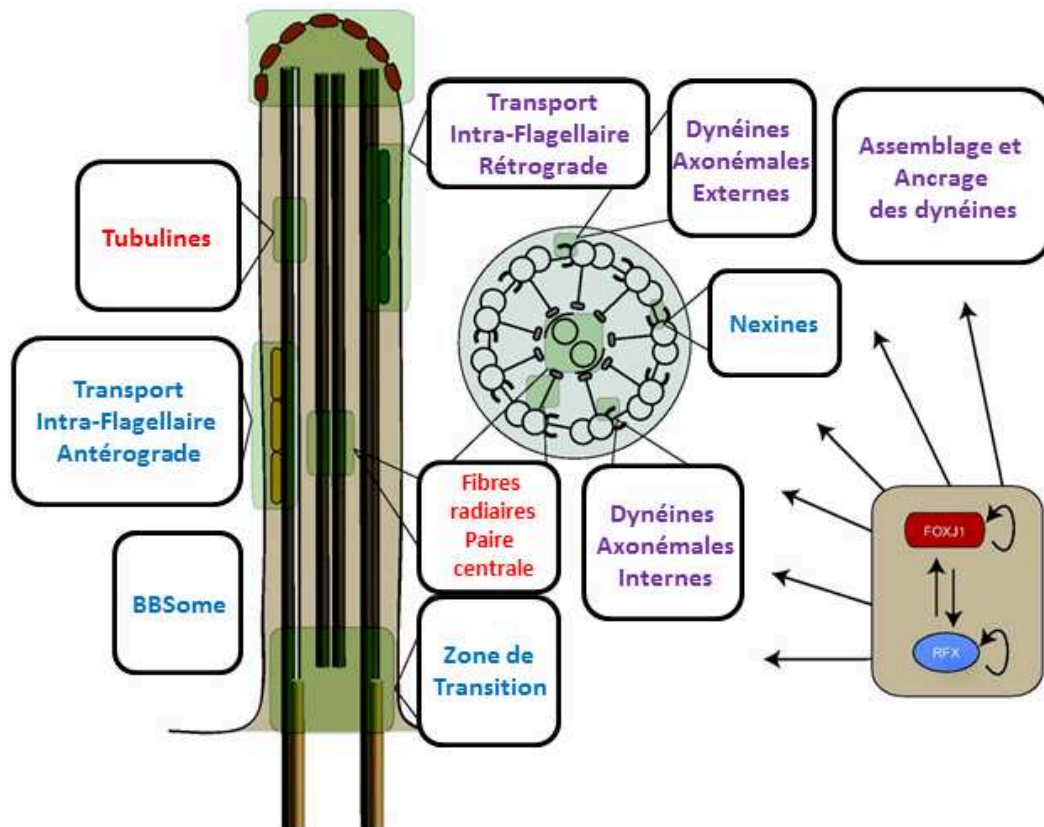


Figure 33 : Cibles ciliaires directes et indirectes des facteurs de transcription Foxj1 et RFX

Les facteurs de transcription Foxj1 et RFX sont capables d'induire directement ou indirectement l'expression d'une multitude de protéines reliées à la structure ou la fonction du cil (regroupées ici par modules). La couleur rouge indique un contrôle par Foxj1, la couleur bleue par RFX et le violet par les deux facteurs de transcription (d'après Choksi et al., 2014).

Miyatake et ses collègues ont également mis en évidence le contrôle d'ERK7 par Foxj1, processus indispensable à la formation du réseau d'actine apical (Miyatake et al. 2015).

Plus récemment, une étude a étudié le rôle de Foxj1 au cours de l'évolution et notamment son rôle sur la génération de cils mobiles au-delà des vertébrés (Vij et al. 2012). Les auteurs ont observé que les gènes homologues à *FOXJ1* sont retrouvés chez tous les Unikontes (taxon représentant les cellules eucaryotes possédant à l'origine un unique flagelle postérieur) et que des espèces lointaines utilisant des cils mobiles pour leur locomotion présentent des importants défauts ciliaires en l'absence de Foxj1.

Une étude pertinente a évalué par des outils de transcriptomique les gènes dont l'expression était induite par Foxj1 (Semil P Choksi et al. 2014). Ces auteurs ont montré que 38% des gènes stimulés par ce facteur de transcription correspondent à des gènes préalablement reliés au cil (Figure 33). De plus, en caractérisant de manière fonctionnelle 50 gènes aléatoirement choisis parmi les gènes restant, ils se sont aperçus que 60% étaient nécessaires à la différenciation ou à la fonction ciliaire (notamment au battement).

Enfin, l'expression de Foxj1 est contrôlée par les facteurs de transcription précoces de la multiciliogénèse. En effet, TAP73, MCIDAS et MYB ont été montrés comme induisant l'expression de *FOXJ1* (Nemajerova et al. 2016; Boon et al. 2014; Ma et al. 2014; Tan et al. 2013).

Foxj1 s'impose donc comme acteur central agissant sur des étapes essentielles tardives de la différenciation multiciliée telles que la migration et l'ancrage des corps basaux *via* le remodelage du cytosquelette d'actine, mais également la formation des cils mobiles *via* l'expression de composants indispensables à l'élongation et la mobilité de l'axonème (Figure 33) (J. Thomas et al. 2010; Yu et al. 2008).

Les facteurs de transcription RFX (pour « Regulatory Factor binding to the X box ») ont été associés pour la première fois à la fonction ciliaire en 2000 (Swoboda et al. 2000). Cette famille est composée de neuf membres, mais seulement 3 (RFX2, RFX3 et RFX4) présentent un lien fonctionnel avec le cil (S P Choksi et al. 2014). Swoboda et ses collaborateurs ont reporté chez *C.elegans* que la déficience d'un gène homologue aux RFX entraîne une absence de cil au niveau des neurones sensoriels. Les mêmes effets ont ensuite été reproduits dans les mêmes cellules chez la drosophile (Dubruille et al. 2002) mais également au niveau des cellules ciliées du nœud embryonnaire chez souris ou de la vésicule de Kupffer chez le zebrafish, provoquant une perte d'asymétrie gauche/droite (Bonnafe et al. 2004; Bisgrove et al. 2012). Dans ces travaux, les auteurs ont identifié plusieurs gènes de structure du cil possédant des éléments de réponse aux facteurs RFX, appelés

boîtes X, dans leur promoteur (Figure 33). En 2006 est parue la première étude reliant RFX aux MCC. Dans cette étude, les auteurs ont montrés que la déficience de *Rfx3* perturbait la différenciation des cellules ciliées épendymales de souris (Baas et al. 2006). Par la suite, la même équipe a utilisé des cultures primaires d'épendymocytes pour révéler que RFX3 régule la taille des cils et leur mobilité, notamment par l'intermédiaire de sa fixation sur le promoteur de dynéines et l'activation de leur expression (El Zein et al. 2009). Les facteurs RFX induisent l'expression d'un grand nombre de gènes codant pour des protéines participant à la structure du cil et notamment de la machinerie de transport intra-flagellaire (Figure 33)(J. Thomas et al. 2010; Chung et al. 2012). Tout comme *Foxj1*, Piasecki et ses collègues ont mis en avant la conservation des facteurs RFX au cours de l'évolution chez tous les Unikontes (Piasecki et al. 2010). Par ailleurs, l'équipe de Wallingford a publié deux articles soulignant l'importance de RFX2 dans la différenciation multiciliée chez le xénope (Chung et al. 2012; Chung et al. 2014). Les auteurs ont exploré le rôle de ce facteur de transcription et ont découvert son implication dans diverses facettes de la différenciation, et notamment dans l'expansion de la surface apicale des MCC (Chung et al. 2014). Malheureusement, les auteurs ne décrivent pas plus précisément les mécanismes mis en jeu.

Des données obtenues dans des cultures de cellules humaines et de souris ont enfin mis en évidence les interactions entre les facteurs *Foxj1* et RFX. *Foxj1* peut induire l'expression de RFX2 et RFX3 (Didon et al. 2013) et inversement, RFX3 peut se fixer sur le promoteur de *Foxj1* et induire son expression (El Zein et al. 2009) (Figure 33). Dans les cultures humaines, la surexpression seule de *Foxj1* est capable d'induire l'expression de gènes de mobilité ciliaire. RFX3, en revanche, ne peut induire d'expression par lui-même mais augmente significativement la transcription dépendante de *Foxj1* (Didon et al. 2013). De plus, RFX3 et *Foxj1* co-immunoprécipitent, suggérant donc que RFX3 pourrait agir comme co-facteur de *Foxj1*. Dans d'autres modèles cependant, comme la souris, les deux protéines semblent agir de manière redondante, puisque la déficience de *Foxj1* au niveau de la plaque neurale n'affecte ni l'expression de RFX3, ni la formation des cils (Cruz et al. 2010).

Au final, les facteurs RFX semblent réguler une partie de leurs gènes cibles par eux-mêmes mais coopèrent également avec *Foxj1* pour induire l'expression d'autres gènes. Il serait intéressant à grande échelle d'étudier la fixation de chacun de ses facteurs sur les promoteurs de gènes importants dans la différenciation afin de déterminer leur éventuelle collaboration.

A travers cette introduction, nous avons focalisé notre attention sur le cil, cet organite cellulaire très conservé et pourtant encore mal connu, qui possède un large panel de fonctions physiologiques primordiales. Nous nous sommes intéressés aux MCC de l'épithélium respiratoire qui arborent plusieurs centaines de ces cils, dont le battement permet d'orchestrer la clairance

mucociliaire afin d'éliminer les particules inhalées piégées dans le mucus. Une dysfonction de ce processus, observée dans des maladies respiratoires chroniques telles que la dyskésie ciliaire primitive, l'asthme, la mucoviscidose ou la BPCO, conduit à des obstructions et infections bronchiques évoluant vers une insuffisance respiratoire sévère. Une meilleure compréhension des mécanismes gouvernant la différenciation des MCC pourrait ouvrir la voie à des stratégies thérapeutiques plus ciblées.

Depuis la caractérisation par mon laboratoire d'accueil du rôle des miR-34/449 comme régulateurs conservés de la différenciation multiciliée, leur implication dans ce processus a été largement confirmée par plusieurs études. L'ensemble de ces résultats soulignent néanmoins la complexité d'action de ces microARN pour réguler la fabrication des cils mobiles. Le premier objectif de mon travail de thèse a ainsi visé à élucider les différents mécanismes d'action par lesquels ces miARN contrôlent les étapes clés de la multiciliogénèse. Par des expériences de perte et gain de fonction associées à des approches de séquençage d'ARN et d'identification de cibles, nous avons mis en évidence un autre mode d'action de ces petits ARN régulateurs sur le contrôle de l'expression et de l'activité de la voie des petites GTPases pour déclencher la réorganisation apicale du cytosquelette d'actine, un prérequis indispensable à l'ancrage des corps basaux sous la membrane apicale et à l'élongation des cils.

Incidentement, une analyse fine des différentes séquences des miR-34/449 issues de séquençage à haut débit, m'a conduit à identifier et caractériser fonctionnellement deux variants de la famille miR-34/449, appelées isomiR-34/449. Ces résultats ajoutent un niveau de complexité dans le mode d'action de ces miARN pour contrôler un même processus biologique.

Enfin un autre aspect de mon projet a consisté à évaluer la contribution de la voie de signalisation BMP dans la multiciliogénèse et à déterminer les mécanismes moléculaires reliant les effecteurs de cette voie aux acteurs clés de la multiciliogénèse.

RESULTATS

1- Les microARN de la famille miR-34/449 sont des régulateurs clés de la différenciation des cellules multiciliées chez les vertébrés

Article 1 : Chevalier B*, Adamiok A*, **Mercey O***, Revinski DR, Zaragosi LE, Pasini A, Kodjabachian L, Barbry P, Marcet B. miR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways. *Nature Communications*. (2015). 6:8386, (*, contribution équivalente).

Article 2 : **Mercey O**, Kodjabachian L, Barbry P, Marcet B. MicroRNAs as key regulators of GTPase-mediated apical actin reorganization in multiciliated epithelia. *Small GTPases*. (2016). 7(2):54-8. (contribution à la rédaction de l'article)

Article 3 : **Mercey O**, Chevalier B, Kodjabachian L, Barbry P, Marcet B. MicroRNAs pull the strings of motile cilia. *Médecine/Sciences*. (2015). 31(12):1078-80. (contribution à la rédaction de l'article)

2- Caractérisation des isomiR de la famille miR-34/449 : quand la famille s'agrandit !

Article 4 : **Mercey O**, Lebrigand K, Popa A, Paquet A, Cavard A, Chevalier B, Pons N, Nottet N, Magnone V, Zaragosi LE, Ponzio G, Barbry P, Marcet B. Characterizing isomiR variants in the microRNA-34/449 family. (Soumis). (contribution à la rédaction de l'article)

3- Implication de la voie de signalisation BMP dans la différenciation des cellules multiciliées chez les vertébrés

Article 5 : Cibois M*, Luxardi G*, Chevalier B*, Thomé V, **Mercey O**, Zaragosi LE, Barbry P, Pasini A, Marcet B#, Kodjabachian L#. BMP signalling controls the construction of vertebrate mucociliary epithelia. *Development*. (2015). 142: 2352-2363, (*, contribution équivalente, #, Co-senior)

I. Les microARN de la famille miR-34/449 sont des régulateurs clés de la différenciation des cellules multiciliées chez les vertébrés

A. Contexte de l'étude

Comme nous l'avons vu dans l'introduction (Cf Partie I.E.2 et IV.A.1), certains tissus chez les vertébrés, comme les voies respiratoires, les ventricules cérébraux, le tractus génital féminin, les placodes olfactives du poisson zèbre ou encore l'épiderme d'embryon de grenouille, sont tapissés de MCC, possédant à leur surface des centaines de cils vibratiles. Leur battement coordonné permet un mouvement liquidien efficace qui joue un rôle important dans divers processus physiologiques comme l'évacuation des particules inhalées piégées dans le mucus, la circulation du liquide céphalo-rachidien ou la progression de l'embryon dans le tractus génital. Un dysfonctionnement ou une diminution du nombre de ces cils vibratiles peut être la cause ou aggraver les symptômes de nombreuses pathologies telles que des ciliopathies (comme les dyskinésies ciliaires touchant le système respiratoire) ou des maladies respiratoires chroniques (comme la mucoviscidose, l'asthme ou les broncho-pneumopathies chroniques obstructives).

La multiciliogénèse intervient au cours du développement embryonnaire, ainsi que lors de la régénération de certains épithéliums spécialisés tels que l'épithélium mucocilié des voies respiratoires. Ce processus nécessite plusieurs étapes clés successives : (1) la sortie du cycle cellulaire, (2) l'acquisition de l'identité « cellule multiciliée », (3) la réorganisation du réseau apical d'actine, (4) la multiplication massive de centrioles, qui vont migrer et s'ancrer dans le réseau apical d'actine pour devenir des corps basaux, et enfin (5) l'élongation des axonèmes des cils vibratiles à partir de ces mêmes corps basaux qui jouent le rôle de centre organisateur des microtubules à la base de chaque cil.

Plusieurs facteurs de transcription, comme FoxJ1 ou certains membres de la famille RFX, de même que la voie de signalisation Notch, étaient déjà connus pour agir à plusieurs étapes clés de la multiciliogénèse. L'élucidation des mécanismes qui gouvernent la multiciliogénèse est un prélude indispensable à la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces pour lutter contre les pathologies associées à des désordres ciliaires. Sous cet aspect, mon laboratoire d'accueil s'est concentré depuis une dizaine d'année sur l'étude du rôle potentiel des microARN dans ce mécanisme à partir de deux exemples d'épithélium mucociliaire : le premier borde les voies aériennes des mammifères ; le second correspond à l'épiderme d'embryon de xénope. Tous deux sont des épithéliums mucociliés qui disposent à la fois de cellules sécrétrices de mucus et de MCC.

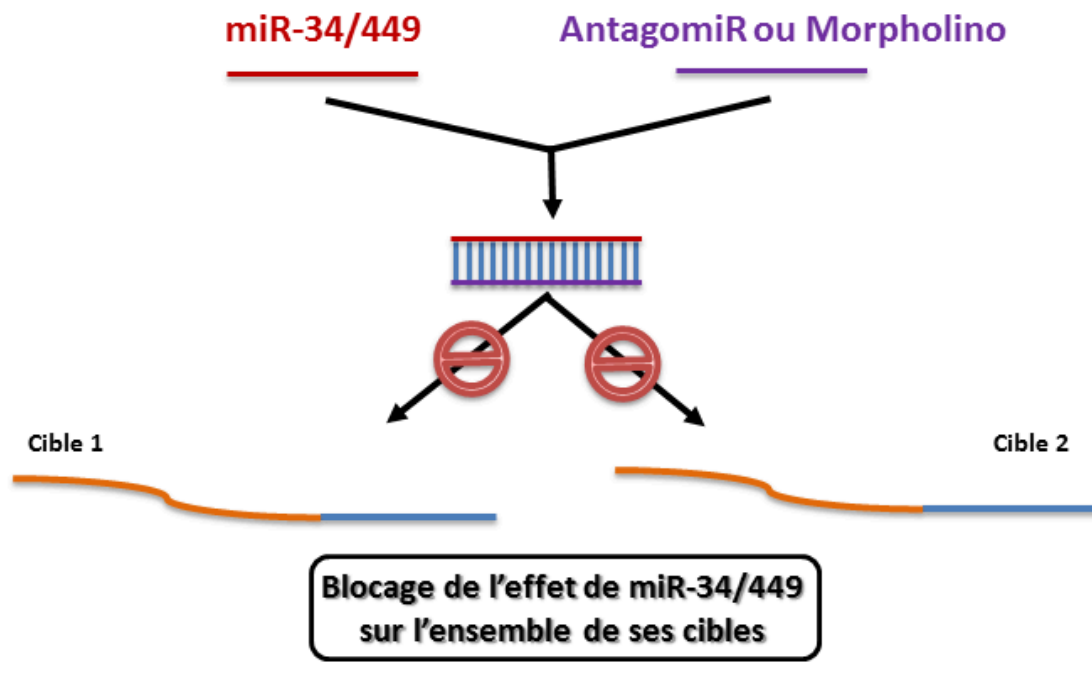
Dans cette perspective, notre équipe a d'une part mis en place, en collaboration avec le groupe du Dr Christelle Coraux (Inserm, Reims), un modèle d'étude permettant de récapituler, *in vitro* en Interface Air Liquide (IAL), les différentes étapes de la différenciation mucocilié de l'épithélium respiratoire humain ou murin. D'autre part, elle a établi une collaboration étroite avec l'équipe du Dr Laurent Kodjabachian (IBDML, Marseille) qui est experte dans l'étude du modèle *in vivo* que représente l'embryon de xénope.

Partant du principe émis par le célèbre généticien Théodore Dobzhansky selon lequel « *rien en biologie n'a de sens qu'à la lumière de l'évolution* », mon laboratoire d'accueil a initié une stratégie qui consiste à effectuer une étude comparative systématique chez deux tétrapodes distants pour identifier les mécanismes conservés contrôlant la multiciliogénèse. Le succès de cette approche originale a permis au laboratoire de publier une étude en 2011, dans laquelle, il a été le premier à établir un lien fonctionnel, conservé des amphibiens jusqu'à l'Homme, entre la famille de miARN miR-34/449 et la multiciliogénèse (Marcet, Chevalier, Luxardi, et al. 2011; Marcet, Chevalier, Coraux, et al. 2011)

Cette étude comparative systématique de ces différents modèles a d'abord permis d'identifier les miARN et leurs gènes cibles impliqués et conservés dans la mise en place de la multiciliogénèse. Les signatures des miARN au cours de la différenciation mucociliaire obtenues par séquençage à haut débit ont montré que les miR-449a/b/c et les miR-34b/c, cinq membres appartenant à la superfamille miR-34/449, sont les plus fortement induits pendant la multiciliogénèse chez les deux espèces.

Ensuite, la spécificité d'expression des miR-449 et miR-34b/c dans les MCC dans ces deux modèles a été mise en évidence par différentes approches combinant hybridation *in situ*, histochimie, tri cellulaire et séquençage. Une analyse de synténie du gène hôte *CDC20B* du cluster miR-449 a révélé la conservation du locus *CDC20B*/miR-449 (appelé locus 5q11 chez l'Homme) dans tous les génomes de vertébrés examinés. La protéine Cdc20b, dont la fonction encore inconnue fait encore l'objet d'étude au laboratoire, est localisée au niveau des corps basaux dans les MCC. De plus, l'expression du gène *CDC20B* est co-régulée avec celle des miR-449 pendant la multiciliogénèse. Ces données ont suggéré une possible coopération entre les miR-449 et leur gène hôte *CDC20B* dans l'établissement de la multiciliogénèse. Cette question est en cours de résolution au laboratoire.

A



B

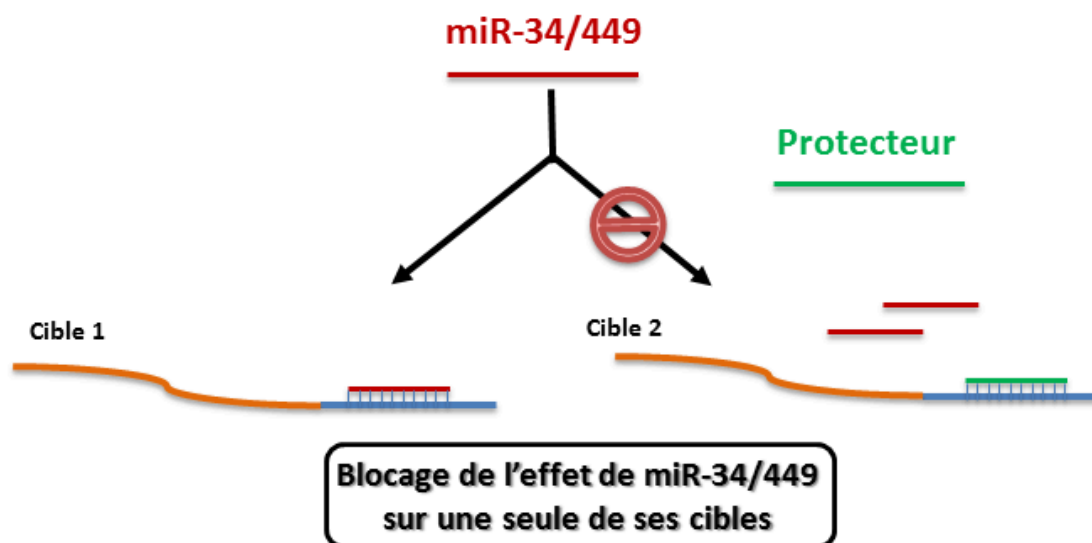


Figure 34: Description des différentes stratégies de modulation de l'effet des miR-34/449

A. L'utilisation d'angomiR (chez l'Homme) ou de morpholinos (Chez le xénope et le poisson zèbre) permet de bloquer l'effet des miARN sur toutes leurs cibles.

B. Le protecteur empêche spécifiquement la fixation des miARN sur une seule de ses cibles sans perturber la répression des autres cibles.

Chez les deux espèces, l'inactivation spécifique des miR-34/449 (à l'aide d'oligonucléotides antisens) (Figure 34) réprime fortement la multiciliogenèse, causant la réduction concomitante du nombre de cellules exprimant la tubuline acétylée (un marqueur des cils vibratiles) et la Centrine-2 (un marqueur des corps basaux). Malgré leur différenciation avortée, les cellules déficientes pour miR-34/449 sont capables de maintenir leur identité de précurseurs de MCC et continuent d'exprimer l'ARNm *FOXJ1*, qui code pour un régulateur clé de la multiciliogenèse chez les vertébrés. En revanche, l'inactivation des miR-34/449 n'altère pas la ciliogénèse des cellules monociliées portant un cil vibratile unique, suggérant une action spécifique des miR-34/449 sur la multiciliogenèse, c'est-à-dire sur la fabrication de multiples cils vibratiles. Ces résultats indiquent également que les miR-34/449 sont requis pour le déclenchement de la multiciliogenèse à une étape précoce, avant la centriologénèse.

En analysant le transcriptome au cours de la différenciation ou en réponse à la surexpression des miR-34/449, plusieurs cibles potentielles des miR-34/449 ont pu alors être identifiées. 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 des miR-34/449 à bloquer le cycle cellulaire, une étape cruciale avant l'engagement dans la centriologénèse. Le second groupe de cibles validées dans les deux espèces correspond au récepteur Notch1 et à son ligand Delta-1 (DLL1). Chez les deux espèces, l'activation de la voie de signalisation Notch est incompatible avec la différenciation des MCC. Les régions des transcrits *DLL1* et *NOTCH1* contenant les sites de fixation des miR-34/449 sont conservées de la grenouille à l'Homme. Chez l'Homme, les miARN de la famille miR-34/449 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 ont permis de montrer que, dans les deux modèles, les miR-34/449 contrôlent la multiciliogenèse en agissant directement sur la voie de signalisation Notch : (1) l'expression des transcrits et des protéines DLL1 et/ou Notch1 est réprimée par la surexpression des miR-34/449 tandis que l'effet opposé est observé après leur inactivation ; (2) DLL1 et/ou Notch1 sont faiblement exprimées dans les MCC qui expriment fortement miR-34/449 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 des miR-34/449 réprime la multiciliogenèse, tout comme le fait la perte des miR-34/449 ; (4) des oligonucléotides complémentaires des sites de liaison conservés des miR-34/449 dans les transcrits *Notch1* ou *Dll1* protègent ces transcrits contre l'action des miR-34/449 (Figure 34). 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 des miR-34/449 sur la multiciliogenèse sont ainsi mimés par des agents bloquant

l'interaction entre miR-34/449 et leurs cibles de la voie Notch ; (5) enfin, l'invalidation de *Dll1* ou *Notch1* augmente la multiciliogenèse et la rétablit de manière efficace dans les embryons de xénope invalidés pour miR-34/449. L'ensemble de ces données a permis de démontrer la conservation du mécanisme selon lequel les miR-34/449 déclenchent le processus de multiciliogenèse en réprimant directement les cibles DLL1 et Notch1.

En conclusion, cette étude, pionnière dans le domaine, réalisée par mon laboratoire d'accueil, a permis de révéler pour la première fois le rôle joué par les miARN de la famille miR-34/449 en tant que régulateurs clés et conservés de la multiciliogenèse chez les vertébrés. Les miR-34/449, favorisant la centriogenèse et la différenciation des MCC en bloquant à la fois le cycle cellulaire et la voie Notch, deux étapes précoces de la différenciation « multiciliée », apparaissent ainsi comme des chefs d'orchestre modulant simultanément plusieurs voies de signalisation importantes afin de promouvoir le phénotype multicilié. La pertinence de ces résultats est attestée par leur confirmation par deux études montrant que des souris invalidées pour miR-34/449 présentent des défauts de multiciliogénèse (Rui Song et al. 2014; Jingwen Wu et al. 2014a).

Etant donné que les miARN de la famille miR-34/449 demeurent fortement exprimés dans des cellules multiliées pleinement différenciées, nous nous sommes demandé si ces miARN pouvaient être impliqués dans le contrôle d'autres étapes reliées à la multiciliogénèse. D'ailleurs, en accord avec notre hypothèse, les travaux de Song et ses collègues ont suggéré que la protéine centriolaire Cp110, dont l'expression doit être réprimée pour permettre la maturation des corps basaux, représenterait une cible supplémentaire importante des miR-34/449 (R Song et al. 2014). Ainsi, l'identification de nouvelles cibles des miR-34/449 et des voies de signalisation qu'ils contrôlent devrait permettre de déterminer de nouveaux acteurs de la multiciliogenèse. Dès lors, mes travaux de thèse se sont inscrits dans cette perspective.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction de cette thèse (Cf partie IV.C.6.a), un des prérequis à l'établissement de la multiciliogénèse est le remaniement du cytosquelette d'actine au niveau apical de la cellule. En effet, cette étape est indispensable à la migration et l'ancrage des corps basaux à la membrane apicale. Mon premier objectif a donc été de caractériser la contribution de miR-34/449 dans le remodelage de l'actine au cours de la multiciliogénèse.

B. Résultats

Article 1 : Chevalier B*, Adamiok A*, **Mercey O***, Revinski DR, Zaragosi LE, Pasini A, Kodjabachian L, Barbry P, Marcet B. miR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways. *Nature Communications*. (2015). 6:8386, (*contribution équivalente).

Article 2 : **Mercey O**, Kodjabachian L, Barbry P, Marcet B. MicroRNAs as key regulators of GTPase-mediated apical actin reorganization in multiciliated epithelia. *Small GTPases*. (2016). 7(2):54-8.

Article 3 : **Mercey O**, Chevalier B, Kodjabachian L, Barbry P, Marcet B. MicroRNAs pull the strings of motile cilia. *Médecine/Sciences*. (2015). 31(12):1078-80.

1. Caractérisation du réseau d'actine des cellules multiciliées chez l'Homme et le Xénope

Nous avons dans un premier temps cherché à caractériser la réorganisation du réseau d'actine au cours de la différenciation « multiciliée » dans nos deux modèles d'étude précédemment cités, que sont les cellules épithéliales respiratoires humaines en culture IAL et l'épiderme d'embryon de xénope. A l'aide d'un marquage fluorescent de la phalloïdine (toxine se fixant à l'actine et bloquant sa dépolymérisation), mais également celui de l'Ezrine, protéine de liaison à l'actine, nous avons montré que les MCC (mises en évidence par un marquage fluorescent de la tubuline acétylée exprimée dans les cils vibratiles) présentent un réseau dense d'actine à leur pôle apical. Les corps basaux, eux-mêmes marqués grâce à un anticorps anti tubuline γ , semblent enfouis dans ce réseau dense apical.

La phosphorylation de l'Ezrine et de la Cofiline-1 étant importante pour le remodelage de l'actine (Bravo-Cordero et al. 2013; Shaw et al. 1998; Huang et al. 2003b), j'ai contribué à observer que le niveau de phosphorylation de ces deux protéines augmente au cours de la différenciation et que leur localisation est spécifique du pôle apical des MCC.

2. Les miR-34/449 contrôlent la formation du réseau apical d'actine

Nous avons par la suite voulu déterminer si les miR-34/449 jouent un rôle dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Dans un premier temps, nous avons bloqué l'action de ces miARN au cours de la différenciation dans nos deux modèles à l'aide d'oligonucléotides antisens, comme précédemment cité (Figure 34). L'invalidation spécifique des miR-34/449 aussi bien dans l'épiderme d'embryon de xénope que dans l'épithélium respiratoire humain, perturbe fortement à la fois la multiciliogénèse comme attendu, mais également la formation du réseau apical d'actine. Par

ailleurs, dans les cellules respiratoires humaines en prolifération, physiologiquement dépourvues de miR-34/449 à ce stade, j'ai pu montrer que l'expression des miR-34/449 favorise la formation des fibres de stress d'actine et des points focaux d'adhésion, structures d'actine stables impliquées dans l'adhésion cellulaire. L'ensemble de ces données nous a donc suggéré que les miR-34/449 pourraient contrôler la formation du réseau apical d'actine chez les deux espèces.

3. Le rôle des miR-34/449 sur la réorganisation du réseau apical d'actine est indépendant de la voie Notch

Sachant que les miR-34/449 contrôlent la multiciliogénèse en réprimant la voie Notch à une étape précoce de la différenciation, j'ai examiné la contribution de cette voie de signalisation sur la réorganisation du réseau d'actine.

En premier lieu, j'ai observé que dans des cellules épithéliales respiratoires humaines en prolifération, l'inhibition de la voie Notch avec du DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester, inhibiteur de la gamma-sécrétase, enzyme qui permet la libération du fragment intracellulaire effecteur de Notch, NICD) n'a aucun effet ni sur la formation des fibres de stress ni sur le nombre de points focaux d'adhésion. Le blocage de la voie Notch n'affecte pas non plus l'état de phosphorylation des ERM (protéines de liaison à l'actine, (Cf partie IV.C.6.a) telles que l'Ezrine, contrairement à ce que nous avons observé en réponse à une surexpression des miR-34/449. Ces premiers résultats suggèrent donc que les miR-34/449 contrôlent la réorganisation du cytosquelette d'actine et la phosphorylation des ERM, indépendamment de la répression exercée par ces mêmes miARN sur la voie Notch.

En second lieu, la protection du transcrite *NOTCH1* vis-à-vis de l'action des miR-34/449 (PO-*NOTCH1*) (à l'aide d'oligonucléotides complémentaires de leur site cible sur le 3'-UTR, comme précédemment cité (Figure 34)) bloque de manière coordonnée la formation à la fois des cils mobiles mais également celle du réseau apical d'actine chez l'Homme. Ce résultat est également obtenu avec la même approche chez le Xénope mais en protégeant le transcrite *Dll1* (PO-*Dll1*). Le blocage de la formation du réseau apical d'actine par la protection de *NOTCH1* ou de *Dll1* s'explique donc par le fait que la modulation de la voie Notch est l'étape la plus précoce de la différenciation multiciliée et que toutes les étapes en aval sont donc bloquées. De plus, nous avons observé que chez le xénope, le pourcentage de cellules présentant un défaut du réseau apical d'actine est plus élevé dans les morphants (embryons invalidés) miR-34/449 que pour les morphants PO-*Dll1*, suggérant que les miR-34/449 peuvent réguler l'expression de cibles supplémentaires.

Par ailleurs nous avons révélé une double boucle de régulation négative entre la voie Notch et les miR-34/449. En effet, en plus de l'effet répressif déjà établi des miR-34/449 sur *NOTCH1* et *DLL1*, nous avons montré que la protection de *NOTCH1* ou *DLL1* entraîne une diminution de l'expression des miR-34/449 alors que l'inhibition de la voie Notch par du DAPT stimule fortement l'expression de ces miARN. Nous avons alors émis l'hypothèse que cette boucle provoquerait une accumulation massive de miR-34/449 tout au long de la différenciation leur permettant ainsi d'interagir à différents stades de la multiciliogénèse avec d'autres cibles pour réguler d'autres processus.

4. Les miR-34/449 régulent la voie des petites GTPases

Les petites GTPases ayant été largement décrites pour leur fonction régulatrice de la dynamique du cytosquelette d'actine, nous avons cherché à déterminer si les miR-34/449 pouvaient cibler des acteurs des voies des petites GTPases.

Nous avons tout d'abord montré que l'expression des miR-34/449 induit une augmentation de l'activité de la petite protéine G RhoA, régulateur clé du cytosquelette d'actine, et ce d'une manière indépendante de la voie Notch. A l'inverse, l'inhibition des miR-34/449 entraîne une diminution modeste mais significative de l'activité de RhoA. Chez le xénope, l'inhibition des miR-34/449 bloque la réorganisation apicale du réseau d'actine et la multiciliogénèse, tandis que l'activité RhoA est toujours détectable. Ces résultats suggèrent l'implication d'autres cibles des miR-34/449, en aval de la voie RhoA et indépendantes de la voie Notch, dans le contrôle de la réorganisation apicale du réseau d'actine qui s'opère lors de la multiciliogénèse.

A l'aide d'outils bioinformatiques de prédiction de cibles, nous avons identifié des candidats putatifs ciblés par les miR-34/449. Parmi ceux-ci, nous avons sélectionné les transcrits dont l'expression est diminuée au cours de la différenciation (donc inversement corrélée à l'expression de miR-34/449) ainsi qu'en réponse à une surexpression des miR-34/449. Par cette approche, nous avons identifié trois candidats reliés aux voies des petites GTPases et à la réorganisation du réseau d'actine : ARHGAP1, un membre de la famille des Rho-GAP ; ARHGDIB (également appelé Rho-GDI2) ; et R-Ras (« Ras-related protein »), un membre de la famille des petites GTPases Ras (Cf Partie IV.B.3).

Mon travail a permis de contribuer à la validation de ces trois cibles dans des cultures cellulaires humaines par des tests de rapporteur luciférase dans lesquels la partie 3'-UTR (cible des miARN) de chaque transcrite cible est clonée en aval d'une séquence codant pour une enzyme catalysant une réaction de bioluminescence, la luciférase. La surexpression des miR-34/449 diminue significativement l'activité luciférase, témoignant de l'aspect répressif des miARN sur ces cibles. A l'inverse, des mutations ponctuelles sur les sites de fixation des miR-34/449 sur le 3'-UTR empêchent

tout effet inhibiteur de ces miARN. Par ailleurs, j'ai pu mettre en évidence que ces 3 cibles sont également réprimées au niveau protéique en réponse à l'expression des miR-34/449. Ces expériences valident ces trois transcrits comme cibles pertinentes des miR-34/449. Parallèlement, nous avons observé par immunomarquages fluorescents que l'expression de ARHGDI1B et R-Ras (ARHGAP1 n'ayant pu être testé ici car l'anticorps disponible ne fonctionnait pas pour cette expérience) est restreinte aux cellules basales qui sont dépourvues de miR-34/449, mais est exclue des MCC dans lesquelles les miR-34/449 sont fortement exprimés. Ces observations viennent corroborer les résultats précédents suggérant que ces cibles sont directement réprimées par les miR-34/449. Chez le xénope, le profil d'expression de *rras* est inversement corrélé à celui de miR-34/449 au cours de la différenciation. De la même façon que chez l'Homme, des expériences d'hybridation *in situ* soulignent l'exclusion de *rras* des MCC. En revanche, *arhgap1* présente un marquage très faible et non spécifique d'un type cellulaire et *arhgdib* n'est pas détecté dans l'épiderme d'embryon de xénope, indiquant que seul R-Ras représente une cible des miR-34/449 conservée de l'amphibien à l'Homme.

Ma contribution a également consisté à démontrer que dans des cellules épithéliales respiratoires humaines en prolifération la répression de *RRAS* ou *ARHGAP1* (mais pas *ARHGDI1B*) par des siARN augmente la formation de fibres de stress et de points focaux d'adhésion, mimant ainsi l'action des miR-34/449. De plus, l'inhibition de *RRAS* augmente l'activité de RhoA, bien que cet effet reste moins important que celui produit par la surexpression de miR-34/449. Par contre, l'inhibition d'*ARHGAP1* et *ARHGDI1B* n'induit aucun effet détectable sur l'activité de RhoA. Ces résultats indiquent que l'induction d'activité de RhoA par miR-34/449 pourrait être en partie expliquée par l'inhibition de *RRAS*, sans exclure la possible implication d'autres régulateurs.

5. Les miR-34/449 contrôlent la réorganisation apicale du réseau d'actine en réprimant l'expression de R-Ras

Etant donné la conservation du ciblage de R-Ras par miR-34/449 chez l'Homme et le xénope, ainsi que sa localisation exclue des MCC, nous avons voulu déterminer si l'effet des miARN sur le cytosquelette d'actine au cours de la différenciation était dépendant de R-Ras.

Pour cela, une approche de protection de cible a été réalisée chez l'Homme et le xénope à l'aide d'oligonucléotides (Figure 34) faisant compétition avec miR-34/449 sur leur site cible dans le 3'UTR de R-Ras. De manière intéressante, la protection de R-Ras dans nos deux modèles provoque une perte de l'enrichissement apical d'actine accompagnée d'une absence de formation de cils mobiles, mimant ainsi les effets obtenus par l'invalidation des miR-34/449. Il est à noter que, chez l'Homme, une invalidation trop précoce du gène *RRAS* à l'aide d'une stratégie d'interférence utilisant

un siARN affecte le remodelage apical d'actine et la multiciliogénèse, tout en augmentant l'activité RhoA, suggérant que R-Ras est probablement nécessaire aux premiers stades de la multiciliogénèse et que son niveau d'expression doit être finement régulé pour permettre la mise en place du réseau d'actine apical, indispensable aux étapes tardives de la multiciliogénèse. Dans les embryons de xénope, l'inactivation de R-Ras dans les cellules où R-Ras est protégée restaure la formation du réseau d'actine apicale et la multiciliogénèse, indiquant la spécificité de R-Ras dans ce processus.

Enfin, mon travail a permis de montrer que la répression de R-Ras par miR-34/449 aboutit à une relocalisation de la Filamine-A, une protéine de liaison à l'actine, à proximité des corps basaux, et à la stabilisation du réseau apical d'actine, pré-requis indispensable pour l'ancrage des corps basaux.

C. Conclusion

Cette étude nous a permis de démontrer que la répression spécifique de R-Ras par miR-34/449 permet de contrôler, d'une manière indépendante de la voie Notch, le remodelage apical du réseau d'actine au cours de la multiciliogénèse chez les vertébrés. En identifiant ce nouvel acteur clé de la différenciation des MCC, ces résultats nous permettent de confirmer le rôle central de miR-34/449 dans ce processus, en agissant à la fois à des temps précoces *via* la répression de la voie Notch et du cycle cellulaire, mais également plus tardivement sur d'autres étapes clés.

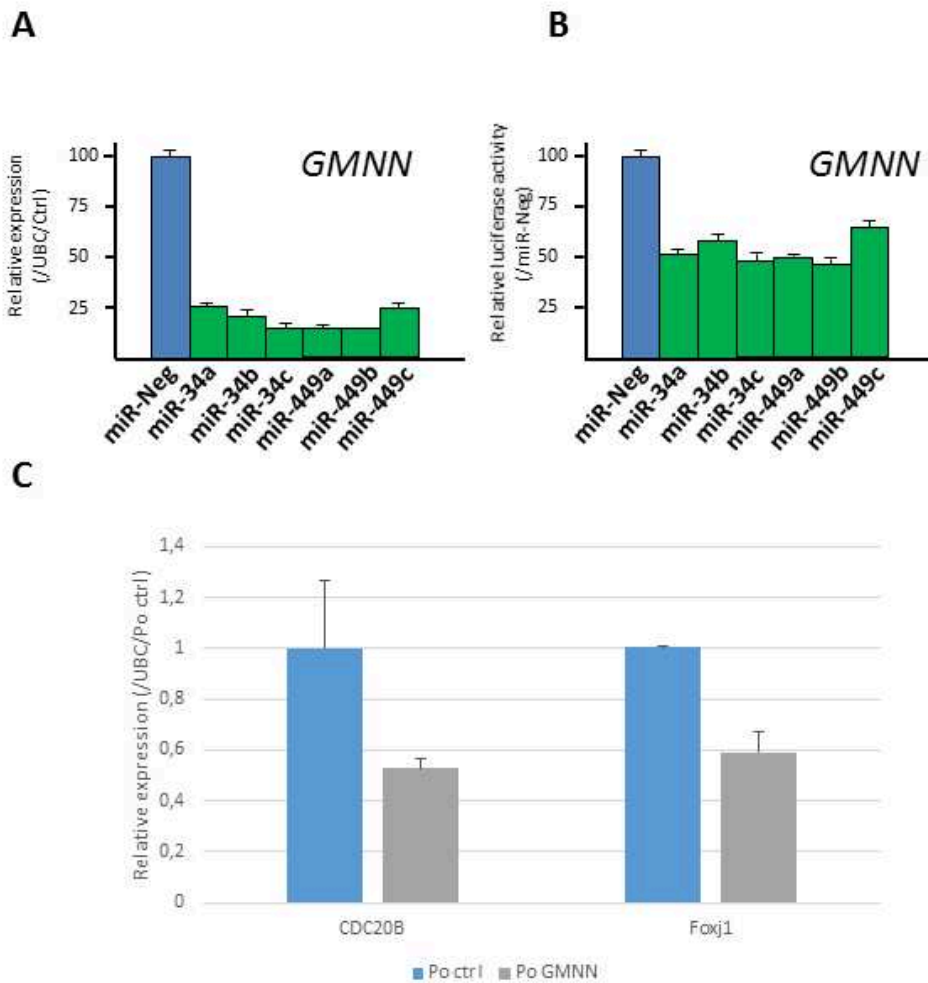


Figure additionnelle 1: *GMNN* semble être une cible directe de miR-34/449 et sa protection envers les miR-34/449 semble bloquer la multiciliogénèse

A. L'expression de *GMNN* est très fortement diminuée par la transfection des miR-34/449 (n=3 donneurs en qPCR). B. L'activité de la luciférase sous le contrôle du 3'UTR de *GMNN* est réduite de 50% en réponse à la transfection des miR-34/449 (n=3). C. La protection du site cible de miR-34/449 sur l'ARNm de la *GMNN* entraîne une diminution de l'expression génique de marqueurs de différenciation tels que *CDC20B* ou *FOXJ1*.

D. Résultats Additionnels

1. La Géminine : nouvelle cible de miR-34/449

Récemment, plusieurs études ont identifié un nouveau régulateur transcriptionnel de la multiciliogénèse appelé GEMC1, une protéine de la famille des Géminines codée par le gène *GMNC*. Ces travaux ont montré que la mise en place de la différenciation multiciliée nécessite à un stade précoce la formation d'un complexe transcriptionnel entre GEMC1, E2F4/5 et Idas (Figure 30). De manière intéressante, Idas est un régulateur transcriptionnel de la multiciliogénèse qui appartient également à la famille des Géminines et dont le gène est localisé sur le locus 5q11 à proximité des miR-449 (Figure 22). L'activité de GEMC1 est inhibée par une autre protéine nucléaire, la Géminine (*GMNN*), elle-même décrite pour être modulée par Idas (Stubbs et al. 2012). Grâce aux résultats récents de puces transcriptomiques, de qRT-PCR et de tests rapporteurs luciférase, j'ai pu démontrer que les miR-34/449, en plus de leurs actions sur la voie Notch et la réorganisation du cytosquelette d'actine, sont capables de réprimer fortement l'expression de la Géminine dans des cellules épithéliales respiratoires humaines (Figure Additionnelle 1A,B). Des expériences de protection de cible de *GMNN* ont également été réalisées et démontrent que la protection de *GMNN* vis-à-vis des miR-34/449 bloque partiellement l'expression génique de marqueurs de différenciation tels que *CDC20B* et *FOXJ1* (Figure Additionnelle 1C). Une régulation de l'expression de la Géminine par miR-34/449 et/ou Idas semble être nécessaire à la différenciation des MCC. Des analyses fonctionnelles complémentaires sont actuellement en cours afin de démontrer ce nouveau niveau de régulation de la famille miR-34/449 sur la multiciliogénèse.

ARTICLE

Received 7 Jul 2015 | Accepted 17 Aug 2015 | Published 18 Sep 2015

DOI: 10.1038/ncomms9386

OPEN

miR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways

Benoît Chevalier^{1,2,*}, Anna Adamiok^{3,*}, Olivier Mercey^{1,2,*}, Diego R. Revinski³, Laure-Emmanuelle Zaragosi^{1,2}, Andrea Pasini³, Laurent Kodjabachian³, Pascal Barbry^{1,2} & Brice Marcet^{1,2}

Vertebrate multiciliated cells (MCCs) contribute to fluid propulsion in several biological processes. We previously showed that microRNAs of the miR-34/449 family trigger MCC differentiation by repressing cell cycle genes and the Notch pathway. Here, using human and *Xenopus* MCCs, we show that beyond this initial step, miR-34/449 later promote the assembly of an apical actin network, required for proper basal bodies anchoring. Identification of miR-34/449 targets related to small GTPase pathways led us to characterize R-Ras as a key regulator of this process. Protection of *RRAS* messenger RNA against miR-34/449 binding impairs actin cap formation and multiciliogenesis, despite a still active RhoA. We propose that miR-34/449 also promote relocalization of the actin binding protein Filamin-A, a known *RRAS* interactor, near basal bodies in MCCs. Our study illustrates the intricate role played by miR-34/449 in coordinating several steps of a complex differentiation programme by regulating distinct signalling pathways.

¹CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), UMR-7275, 660 route des Lucioles, 06560 Sophia-Antipolis, France. ²University of Nice-Sophia-Antipolis (UNS), Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, 660 route des Lucioles, Valbonne, 06560 Sophia-Antipolis, France. ³Aix-Marseille Université, CNRS, UMR7288, Institut de Biologie du Développement de Marseille (IBDM), 13288 Marseille, France. * These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.B. (email: barbry@ipmc.cnrs.fr) or to B.M. (email: marcet@ipmc.cnrs.fr).

Multiciliated cells (MCCs), characterized by the presence of multiple motile cilia at their apical surface, have been described in many vertebrates^{1,2}. Coordinated ciliary beating allows efficient fluid movement and is required for physiological processes such as elimination of mucus from the respiratory tract, circulation of the cerebrospinal fluid or migration of the embryo in the fallopian tubes¹. The physiological importance of MCCs is highlighted by the ever growing number of human disorders associated with defects of the motile cilia^{1,3–5}. Multiciliogenesis, which occurs during normal development and during regeneration of damaged tissues, can be studied in experimental setups, such as primary cultures of human airway epithelium⁶ and *Xenopus* embryonic epidermis⁷. Several characteristic steps are observed as follows: (i) exit from the cell cycle of MCC precursors, (ii) massive postmitotic multiplication of centrioles (centriogenesis), (iii) reorganization of the apical actin cytoskeleton into a dense cortical meshwork of actin, (iv) migration of the newly synthesized centrioles towards the apical pole of the cell, where they anchor to the actin meshwork and mature into ciliary organizing centres known as basal bodies, and (v) elongation of one cilium from each basal body^{8–15}. Several key regulators of multiciliogenesis have been identified, such as Notch and bone morphogenetic protein (BMP) pathways^{16,17}, the transcription factors FOXJ1, MYB and RFXs (regulatory factor X)^{18–24}, and the geminin-related nuclear protein Multicilin²⁵. During multiciliogenesis, the reorganization of the apical actin cytoskeleton is controlled by several factors including FOXJ1, Multicilin, the ERK7 mitogen-activated protein kinase and small GTPases such as RhoA^{14,19,20,25–28}. Following FOXJ1- and RhoA-pathway-dependent phosphorylation, proteins of the ezrin-radixin-moesin (ERM) family, which link actin to the cell membrane, can interact with cortical actin^{29,30}. The subcellular localization of ezrin and its interacting protein EBP50 at the apical membrane of airway MCCs also appears to be mediated by a FOXJ1-dependent mechanism^{14,19,31,32}. Focal adhesion proteins are also required for the interaction between basal bodies and apical actin network during multiciliogenesis³³. The action of small GTPases on actin cytoskeletal dynamics is regulated by a complex network of interactions with additional GTPases, such as the Ras family member R-Ras^{34–39}, and other regulatory factors including guanine nucleotide exchange factors, GTPase-activating proteins (GAPs), GDP-dissociation inhibitors (GDIs)^{40,41} and microRNAs (miRNAs)⁴². Recent work has also highlighted the importance of interactions between the Rho GTPase signalling and the planar cell polarity pathway in controlling the assembly of apical actin filaments, as well as the docking and planar polarization of the basal bodies in MCCs^{43,44}. miRNAs or miRs are a class of small single-stranded and non-coding regulatory RNAs that control many biological processes by limiting the stability and the translation of their target mRNAs^{45,46}. Abnormal miRNA activity has been associated with a wide variety of human pathologies including airway diseases⁴⁷. We have previously demonstrated that the miR-34/449 family is important for the initiation of human and *Xenopus* MCC differentiation. Members of this family share high sequence homology and miR-449a/b/c, which are located on the same genomic locus as Multicilin, were identified as the most strongly induced miRNA species in human and *Xenopus* during MCC differentiation. We showed in these two species that miR-34/449 promote cell cycle exit and entry into differentiation by repressing several components of the cell cycle control machinery and of the Notch signalling pathway⁹. Their inactivation was sufficient to block centriole amplification and multiple motile cilia formation⁹. Two recent studies confirmed our findings by showing that miR-34/449-deficient mice exhibited impaired multiciliogenesis^{48,49}.

Song *et al.*⁴⁸ also showed that the centriolar protein Cp110 is an additional important miR-34/449 target that must be repressed to allow the maturation of basal bodies. Thus, beyond their initial effect on cell cycle exit and entry into differentiation, miR-34/449 probably regulate later steps of the complex multiciliogenesis process. As the development of functional motile cilia appears exquisitely sensitive to the reorganization of the actin cytoskeleton, we reasoned that miR-34/449 may also regulate one or more molecules associated with actin dynamics or small GTPase pathways. Here we show that miR-34/449 indeed contribute to the establishment of the apical actin cytoskeleton, via a mechanism involving the direct repression of the small GTPase R-Ras. This further establishes miR-34/449 as a central control system of multiciliogenesis acting at several distinct levels of this complex physiological process.

Results and Discussion

The apical actin network of human and *Xenopus* MCCs. Apical actin cytoskeleton formation was examined at several time points during differentiation of primary cultures of human airway epithelial cells (HAECs) grown at an air–liquid interface (ALI) and in *Xenopus* embryonic epidermis⁹. Formation of the apical meshwork of filamentous actin (F-actin) was monitored directly by staining with fluorescent phalloidin and indirectly by staining for ezrin or phospho-ERM. In human and *Xenopus*, the acetylated tubulin-positive MCCs displayed a strong enrichment of apical F-actin (human: Supplementary Fig. 1a–d; *Xenopus*: Supplementary Fig. 1f). Basal bodies, which are positive for γ -tubulin labelling, are embedded within an apical F-actin and ezrin meshwork (Supplementary Fig. 1b). Reorganization of actin filaments involves cofilin, a ubiquitous G-actin-binding factor⁵⁰. As unphosphorylated cofilin depolymerizes actin filaments, cofilin phosphorylation appears essential for cytoskeletal reorganization⁵⁰. Phosphorylation of cofilin-1 also contributes to actin network stabilization and formation of focal adhesions⁵¹. Focal adhesion proteins indeed participate to ciliary adhesion complexes in MCCs and allow interactions between basal bodies and the apical actin network³³. In HAECs, the levels of phosphorylated cofilin-1 and ezrin increased during MCC differentiation (Supplementary Fig. 1e). We noticed a parallel increase in the expression of the ERM-binding protein EBP50 (Supplementary Fig. 1e), an adapter protein required for the maintenance of active ERM proteins at the apical membrane of polarized epithelia^{14,32}. Interestingly, we also observed a punctate labelling of phosphorylated cofilin-1, which was localized sub-apically close to basal bodies in MCCs, but was absent from non-ciliated cells (Supplementary Fig. 1c,d).

miR-34/449 control apical actin network assembly in MCCs.

We examined whether the miR-34/449 family can control the formation of the apical actin network, a prerequisite for basal body anchoring and cilium elongation. To invalidate miR-449 or miR-34b/c activity in human, we transfected HAECs with a cholesterol-conjugated antagomiR directed against miR-449 (Antago-449) or against miR-34 (Antago-34) and assessed MCC differentiation. Antago-449 as well as antago-34 strongly blocked miR-449a/b, whereas antago-34 blocked miR-34a/b/c more efficiently than antago-449 (Supplementary Fig. 2b). Antago-449 and antago-34 blocked to the same extent the formation of MCCs and no additive effect was observed (Supplementary Fig. 2c). The huge induction of miR-449 expression at early ciliogenesis (stage EC) suggests that early effects were mainly mediated through miR-449, without excluding a later role for miR-34 (Supplementary Fig. 2a). This could also explain the lack of

compensation of miR-34 in our antago-449 conditions, which do not alter the expression of miR-34. In HAECs, miR-449 silencing caused a decrease of $51\% \pm 3.5$ in the number of acetylated tubulin-positive cells and of $33\% \pm 7$ in the number of ezrin-positive cells (Fig. 1b). In *Xenopus* epidermis, miR-449a and miR-34b were both specifically expressed in MCCs, and their levels in the developing epidermis showed a similar evolution (Supplementary Fig. 2d, see also ref. 9). Previously, we knocked down miR-449 in *Xenopus* MCCs by injecting a cocktail of morpholino antisense oligonucleotides against miR-449a/b/c (449-MOs) into the prospective epidermis at the eight-cell stage⁹. In *Xenopus*, miR-34b was detected in MCCs (Supplementary Fig. 2d–f), and *in situ* hybridization (ISH) experiments also revealed that 449-MOs not only blocked the expression of miR-449 but also blocked the expression of miR-34b (Supplementary Fig. 2f), suggesting that 449-MOs collectively inhibit miR-34/449 miRNAs (Supplementary Fig. 2e,f). MiR-449 knockdown suppressed multiciliogenesis and apical actin web formation in both HAECs (Fig. 1a,b) and *Xenopus* embryonic epidermis (Fig. 2a,b). In embryos injected with 449-MOs, the number of acetylated tubulin-positive cells went down to $18\% \pm 13$ of the control and the number of apical actin cap-positive cells decreased to $9\% \pm 8$ of the control (Fig. 2a/b). These results establish that the miR-34/449 family interferes with MCC apical actin meshwork formation in both models. As miR-34 and miR-449 miRNAs share the same targets, we only used miR-449 in the rest of this study. The impact of miR-449 on the actin cytoskeleton was further investigated by monitoring the formation of focal adhesion and stress fibres, which are thick and relatively stable actin filaments involved in cell adhesion and morphogenesis^{52,53}. We found that in proliferating A549 cells, a human lung cell line devoid of miR-449 and miR-34b/c, miR-449 overexpression increased actin stress fibres and focal adhesion formation (Fig. 1c,d, see also Supplementary Fig. 3d,e). In addition, western blot analysis revealed increased ERM phosphorylation following miR-449 transfection in proliferating HAECs (Fig. 1e), consistent with the regulatory role of phospho-ERM during actin cytoskeleton dynamics^{50,54}. Thus, our data show that the miR-34/449 family clearly contributes to actin cytoskeleton remodelling in several independent models. Next, we addressed the precise mode of action of miR-34/449 in the construction of the apical actin network in MCCs.

Mutual repression between miR-449 and the Notch pathway.

As the miR-34/449 family represses the Notch pathway during MCC differentiation⁹, we assessed the contribution of the Notch signal to the actin web reorganization. We treated proliferating HAECs or human lung A549 cells (which both are devoid of endogenous miR-449) either with miR-449 or with N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT), a γ -secretase inhibitor that blocks Notch activation. As expected, both ectopic expression of miR-449 in proliferating HAECs and DAPT repressed the expression of the Notch target gene *HES1* (Fig. 1g). In proliferating A549 cells, Notch inhibition with DAPT alone had neither impact on the formation of actin stress fibres and focal adhesions (Fig. 1c,d) nor on ERM phosphorylation in proliferating HAECs (Fig. 1e). This suggests that miR-449 cause a rise of levels of phosphorylated ERM independently of Notch repression.

We observed that preventing the binding of miR-34/449 on *Notch1* (PO-*Notch1* in HAECs, Fig. 1a,b) or on the Notch ligand *Dll1* (PO-*Dll1* in *Xenopus*, Fig. 2c–f) with protector oligonucleotides coordinately blocked multiciliogenesis and apical actin network formation. This is consistent with the need for an early repression of the Notch pathway by miR-34/449, to allow

MCC differentiation. Of note, in *Xenopus*, the percentage of cells exhibiting defective apical actin meshwork was higher in miR-34/449 morphants (Fig. 2b) than in PO-*Dll1* morphants (Fig. 2d), suggesting that miR-34/449 may affect additional targets. We also noticed a reduction of miR-449 levels when preventing miR-34/449 binding on *Notch1* in differentiating HAECs (Fig. 1f) and on *Dll1* in frog epidermis (Fig. 2f). Conversely, miR-449 expression was increased after treatment of differentiated HAECs with DAPT (Fig. 1f). Altogether, these data reveal the existence of a double-negative feedback loop between miR-449 and the Notch pathway. We hypothesize that once this loop is locked in a state of high miR-449 expression, interactions of miR-449 with additional targets expressed at subsequent steps of multiciliogenesis remain possible (see Fig. 8d). According to a recent work, CP110 would represent one such target. Its repression by miR-34/449 appears to affect centriole maturation, but not apical actin network assembly⁴⁸. We thus looked for other possible targets of miR-34/449 that would be directly related to actin dynamics.

miR-34/449 targets components of the small GTPase pathways.

Several small GTPase proteins such as RhoA or Rac1 act as key regulators of multiciliogenesis^{14,27,55,56}. We assessed the functional impact of miR-449 on the activity of RhoA and Rac1,2,3 by transfecting proliferating HAECs with miR-449 and differentiated HAECs with antago-449. In proliferating primary HAECs, miR-449 overexpression caused a 50% increase in the level of active RhoA-GTP, similar to the effect of the Rho activator calpeptin (Fig. 3a), while it decreased by $35 \pm 14\%$ Rac1,2,3 activity (Supplementary Fig. 3a), as previously observed in another cellular context with miR-34a (ref. 57). In contrast, Notch pathway inhibition by DAPT had no impact on RhoA activity in proliferating HAECs (Fig. 3a), indicating that exogenous miR-449 modulated the RhoA pathway in a Notch-independent manner in this assay. MiR-449 silencing caused a modest but significant reduction of RhoA activity in differentiating HAECs (Fig. 3a). Conversely, DAPT caused a significant increase in RhoA activity in differentiating HAECs (Fig. 3a), consistent with the concomitant upregulation of miR-449 expression (Fig. 1f)⁹. RhoA activation was also examined in *Xenopus* MCCs by injecting embryos with an RNA encoding the Rhotekin rGBD-GFP, a sensor of activated RhoA⁵⁶. The rGBD-GFP signal was detected in MCCs from control embryos but not in embryos injected with Notch-ICD, in which MCC differentiation was abolished (Fig. 3b). In control embryos and in miR-34/449 morphants, almost all rGBD-GFP-positive cells expressed the early MCC differentiation marker α -tubulin (Fig. 3c). By contrast, in miR-34/449 morphants only 13% of rGBD-GFP-positive cells displayed acetylated tubulin ciliary staining, compared with 96% in the control situation (Fig. 3b,c). Thus, following the experimental inhibition of miR-34/449 in *Xenopus*, RhoA activation can still be detected in MCCs unable to grow cilia. However, we cannot rule out discrete changes in the sub-cellular localization of activated RhoA in miR-34/449-deficient embryos.

Collectively, these results suggest that, although the modulation of RhoA activity by miR-34/449 may play a role in the control of apical actin polymerization, other miR-34/449 targets contribute to the profound disruption of the actin cap observed after miR-34/449 inactivation.

In a bid to identify such additional factors, we applied several miRNA target prediction tools⁵⁸ to identify putative miR-34/449 targets among the small GTPase pathways. Specifically, we looked for relevant miR-34/449 mRNA targets that were repressed during MCC differentiation and after overexpression of miR-34/449 in proliferating HAECs (Gene Expression Omnibus

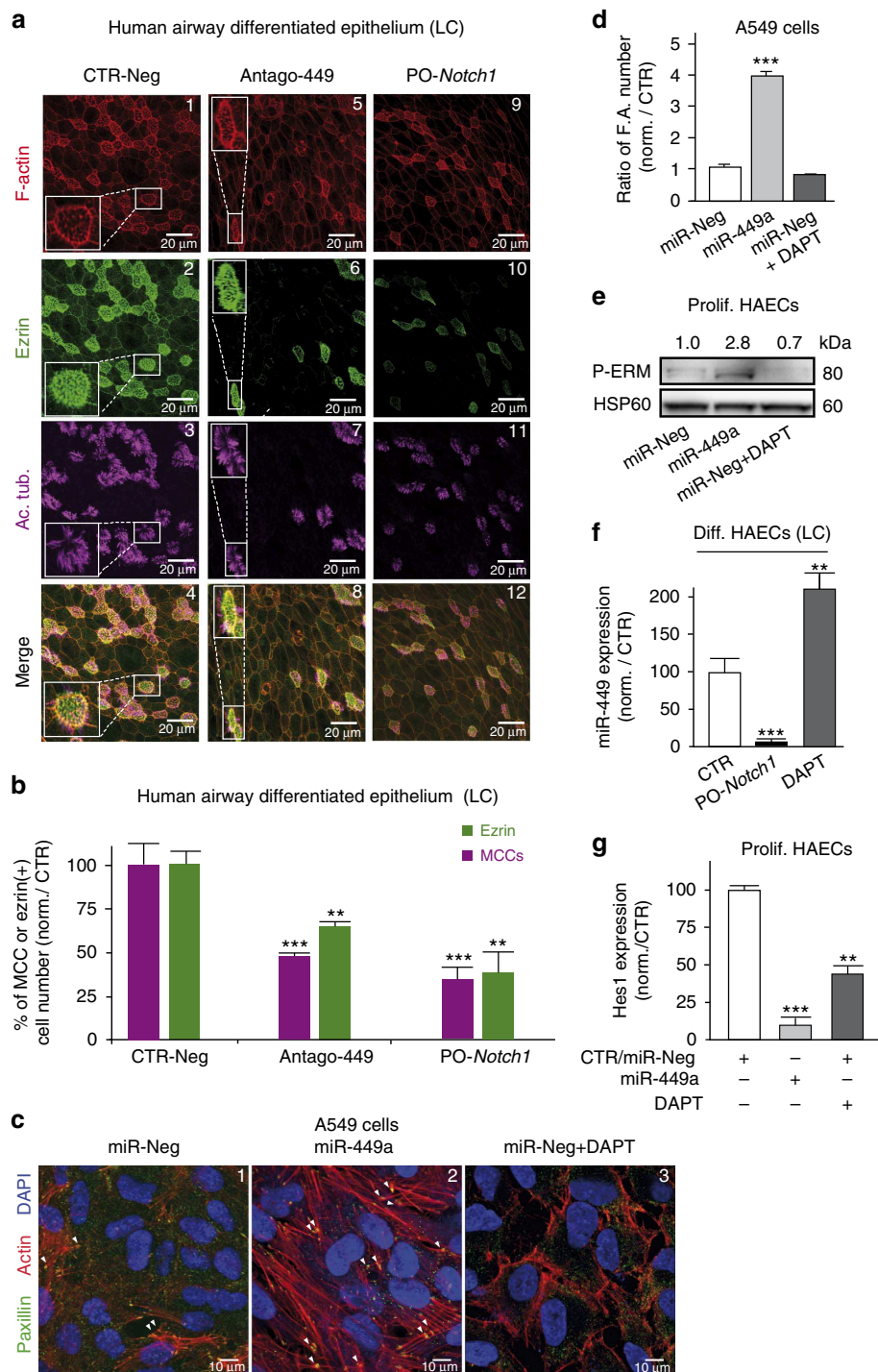


Figure 1 | MiR-449 affects actin network remodelling and multiciliogenesis in HAECs. (a–c) Effect of a treatment by control antagomiR (CTR-Neg), anti-miR-449a/b (Antago-449) and miR-449:*Notch1* protector (PO-Notch1) on differentiating HAECs. (a) Staining for F-actin (a1,5,9), ezrin (a2,6,10) and acetylated tubulin (a3,7,11), at LC stage. (b) The histogram indicates the average percentage of MCCs (in magenta) and apical ezrin-positive (in green) cell number relative to control (means \pm s.d. from nine and three donors for MCC and ezrin quantifications, respectively). $***P < 0.001$, $**P < 0.01$; Student's *t*-test). (c) Immunostaining of focal adhesions protein Paxillin (in green), F-actin (in red) and nuclei (in blue) in A549 epithelial cells transfected for 72 h with control miRNA (miR-Neg), miR-449a or miR-Neg plus 10 μ M DAPT. (d) Ratio of focal adhesion number per cell, normalized to control ($n = 5$ fields in three independent experiments; $***P < 0.001$; Student's *t*-test). (e) Effect of miR-449 overexpression and DAPT (10 μ M) on ERM phosphorylation in proliferating HAECs. Phosphorylated protein levels were normalized with non-phosphorylated ERM and with an antibody against HSP60 as a loading control. Normalized fold changes are indicated on the corresponding bands. Experiments were representative of three donors. (f) Effect of PO-Notch1 and DAPT (10 μ M) in differentiating HAECs at LC stage on miR-449 expression, normalized with RNU44. (g) Real-time RT-PCR of *HES1* transcripts in control, DAPT (10 μ M, 48 h)-treated or miR-449-overexpressing proliferating HAECs. Transcript levels of *HES1* were normalized against *UBC* transcript as an internal control. (f,g) Data represent the mean and s.d. of three independent experiments ($***P < 0.001$, $**P < 0.01$; Student's *t*-test).

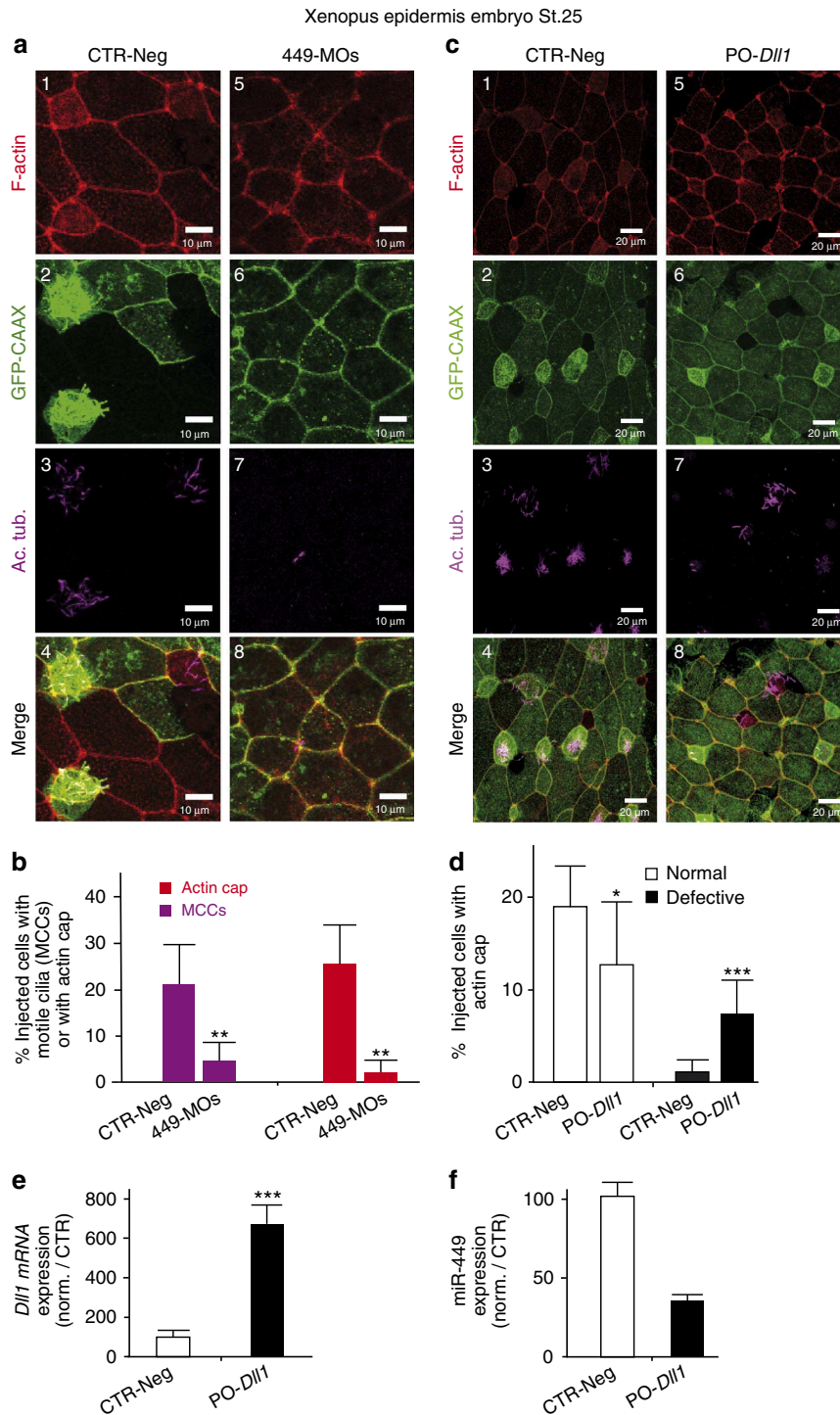


Figure 2 | MiR-449 affects actin network remodelling and multiciliogenesis in *Xenopus* epidermis. (a-d) The epidermis precursor blastomeres (eight-cell stage *Xenopus* embryos) were injected with negative control morpholinos (CTR-Neg) (a,c), with morpholinos against miR-449 (449-MOs) (a,b) or with protector morpholinos of *Dll1* (PO-*Dll1*) (c,d). Staining at stage 25 for F-Actin (in red, a1,5 and c1,5) and motile cilia (Ac. Tub. in magenta, a3,7 and c3,7). Injected cells were detected by the expression of a synthetic mRNA coding for membrane-bound GFP (GFP-CAAX in green, a2,6 and c2,6). (b) The histogram indicates the percentage of GFP-CAAX-positive injected cells that develop motile cilia or apical actin cap in controls (Stage 24 + 25: $n = 5$ fields/583 injected cells) and in miR-449 morphants (Stage 24 + 25: $n = 8$ fields/625 injected cells; P -value_{st.24+25} = 0.0087; Mann-Whitney test with two-tailed P -value). (d) Percentage of injected cells positive for GFP fluorescence with normal or defective actin cap in control ($n = 30$ fields per 1,345 injected cells) versus PO-*Dll1* morphants ($n = 32$ fields per 1,268 injected cells; P -value (normal versus defective in control)_{st.24+25} < 0.0001, P value (normal versus defective in PO-*Dll1*-injected_{st.24+25} = 0.0033; Mann-Whitney test with two-tailed P -value). (e) Effect of protecting the *Dll1* mRNA from the interaction with miR-449 (PO-*Dll1*) in *Xenopus* epidermis on *Dll1* expression (normalized with *ornithine decarboxylase* (ODC)). (f) Effect of PO-*Dll1* in *Xenopus* epidermis on miR-449 expression, normalized with U6. Data are means \pm s.d. of two independent experiments.

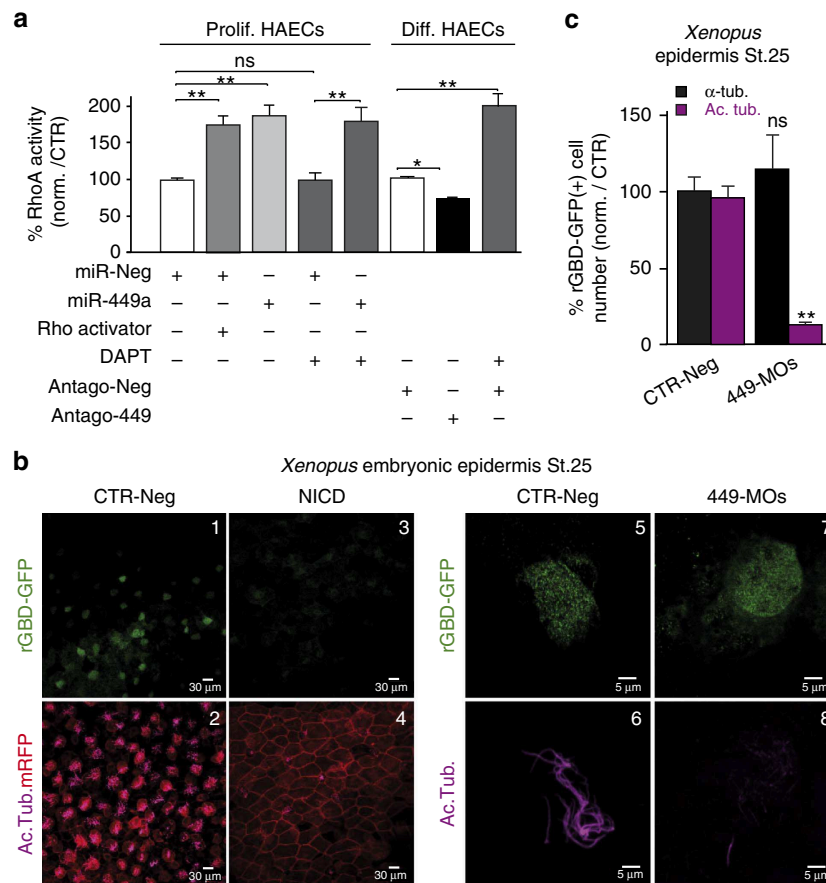


Figure 3 | miR-449 controls small GTPase pathways during MCC differentiation. (a) Left (Prolif. HAECs): RhoA activity in proliferating HAECs transfected for 72 h with miR-Neg, miR-449a and/or incubated with DAPT (10 μ M) or a Rho activator (calpeptin, 1 U ml⁻¹, 2 h). Right (Diff. HAECs): RhoA activity in differentiating HAECs at Po stage treated for 72 h with antago-Neg, antago-449 or DAPT (10 μ M). RhoA activity is expressed as a percentage relative to control. Data are mean \pm s.d. from at least three independent experiments (* P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001; Student's t -test). (b) RhoA activity in *Xenopus* epidermis at stage 25, assessed by measuring the fluorescence of rhotekin rGBD-GFP, an active RhoA sensor (green, upper panels). Injected cells are identified by the membrane-bound RFP (mRFP in red, lower panels). Cells were either untreated (CTR-Neg, **b1,2,5,6**), injected with miR-449 morpholinos (449-MOs, **b7,8**) or with Notch intracellular domain NICD (**b3-4**). Motile cilia's staining is in magenta (lower panels). (c) The histogram indicates the percentage of rGBD-GFP-positive cells stained for α -tubulin mRNA (α -Tub. in black) or acetylated tubulin (Ac. Tub. in magenta) in miR-449 morphants (449-MOs, n = 68) relative to negative control (n = 110). Data are mean \pm s.e.m. (** P < 0.005, ns, not significant, one-way analysis of variance with Dunnett's test).

(GEO) data set GSE22147). This survey led us to identify several candidates related to small GTPase signalling and actin cytoskeleton remodelling: (1) ARHGAP1, a member of the Rho-GAP family⁵⁹; (2) ARHGDIB, also called Rho-GDI2 (ref. 40); (3) DAAM1, the diaphanous-related formin Dishevelled-associated activator of morphogenesis⁶⁰; (4) NDRG1, N-myc downstream-regulated gene 1, an iron-regulated metastasis suppressor⁶¹; (5) R-Ras, a member of the superfamily of small GTPases, related to Ras³⁸.

By looking more precisely at the three major families of regulators of small GTPases expressed during HAECs differentiation or after miR-34/449 transfection, we detected 23 distinct ARHGAPs, including ARHGAP1; we also detected 22 distinct ARHGEF transcripts but none of them were predicted as direct miR-34/449 targets; regarding the three known mammalian ARHGDI transcripts⁴⁰, only ARHGDIB was further analysed, as ARHGDI expression levels did not change during HAECs differentiation or after miR-34/449 transfection and ARHGDIG was not detected (Supplementary Fig. 3b, see also GEO GSE22147).

The transcripts ARHGAP1, ARHGDIB, DAAM1, NDRG1 and RRAS are all modulated during HAEC differentiation (Fig. 4a, see also GEO GSE22147). Figure 4a shows that the transcript level of

ARHGAP1, DAAM1 and NDRG1 decreased at late ciliogenesis (LC). The expression of ARHGDIB transcript slightly decreased at the onset of differentiation (that is, polarization step, Po) but rose again during the phase of multiciliogenesis (Fig. 4a). The RRAS transcript level decreased throughout the whole time course of MCC differentiation (Fig. 4a). In proliferating HAECs, miR-449 overexpression strongly reduced the transcript levels of ARHGDIB, ARHGAP1 and RRAS, whereas the expression of DAAM1 and NDRG1 transcripts was slightly decreased (Fig. 4b). These putative targets were further investigated using a dual luciferase reporter assay in HEK293 cells. MiR-449a and miR-449b reduced the relative luciferase activity of chimeric constructs containing the wild-type 3'-untranslated regions (3'-UTRs) of ARHGAP1, ARHGDIB, NDRG1 and RRAS, but not of DAAM1 3'-UTR (Fig. 4c). Next, we focused on the three most significantly regulated miR-34/449 targets ARHGAP1, ARHGDIB and RRAS. MiR-449-mediated silencing of either ARHGAP1, ARHGDIB or RRAS was respectively abolished when miR-34/449-predicted binding sites were mutated (Fig. 4c). Among the four miR-449-binding sites in the 3'-UTR of RRAS, the strongest effect was observed for the most 3'-site, which also corresponds to the unique conserved site between human and

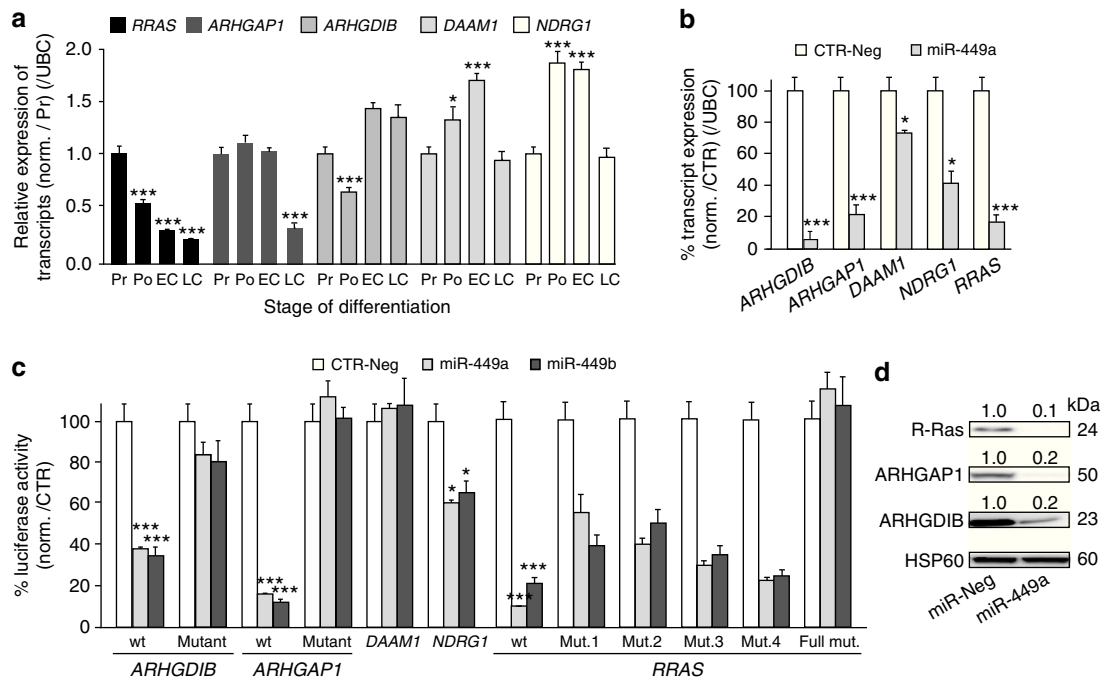


Figure 4 | ARHGAP1, ARHGDB and RRAS are targeted by miR-449 in HAECs. (a,b) Transcript expression levels of ARHGAP1, ARHGDB, DAAM1, NDRG1 or RRAS were analysed using real-time RT-PCR during HAEC differentiation (a) or following miR-449a overexpression (48 h) in proliferating HAECs (b), and normalized with UBC transcript as an internal control. (c) Specific interaction between miR-449a/b and the 3'-UTRs of ARHGAP1, ARHGDB, DAAM1, NDRG1 and RRAS mRNAs was assessed using luciferase reporter assay on constructs carrying either the wild-type (wt) or mutants (mut.) 3'-UTR-binding sites for miR-449. Values were normalized with the internal Renilla luciferase control. (d) Detection of ARHGAP1, ARHGDB and R-Ras proteins after miR-449 overexpression in proliferating HAECs for 72 h. HSP60 is used as an internal control. Quantification of protein levels are indicated above each corresponding band. All data are means \pm s.d. of at least three independent experiments (*** P < 0.001, ** P < 0.01 and * P < 0.05; Student's t -test).

Xenopus (Fig. 4c and Supplementary Fig. 4a). The protein levels of ARHGAP1, ARHGDB and R-Ras proteins were also dramatically decreased after transfection of proliferating HAECs with miR-449 (Fig. 4d). These results establish ARHGAP1, ARHGDB and RRAS transcripts as *bona fide* targets of miR-34/449. Consistent with this conclusion, both ARHGDB and R-Ras proteins were excluded from acetylated tubulin-positive MCCs, while being enriched in non-ciliated CD151-positive basal HAECs^{9,62} (Fig. 5a,b). This is consistent with a recent gene expression profiling study performed in mouse trachea, which reported a higher level of expression of RRAS transcripts in non-ciliated cells than in ciliated cells⁶³ (GSE42500). We could not address this possibility for ARHGAP1 as none of the antibodies that we tested worked in immunofluorescence. In differentiating HAECs, both R-Ras and ARHGAP1 protein level strongly and continuously decreased from Po to LC, concomitantly with the increase in miR-449 expression (Fig. 5c,d). Conversely, ARHGDB protein level increased during human HAEC differentiation (Fig. 5d). As ARHGDB protein was mainly excluded from human MCCs (Fig. 5a,b), the global protein increase observed during HAEC differentiation in western blotting is probably explained by its stronger expression in non-ciliated HAECs. In *Xenopus* epidermis, *rras* expression measured by quantitative reverse transcriptase-PCR (qRT-PCR) became detectable at neurula stage 16, then dramatically increased until stage 20, before multiciliogenesis and subsequently dropped (Fig. 5f,g). Interestingly, *rras* transcript levels were anti-correlated with miR-449a levels during the course of MCC differentiation (Fig. 5g). When analysed by ISH, *rras* transcripts were primarily detected in inner-layer cells that were negative for the MCC marker α -tubulin, at stages 16 and 19 (Fig. 5e). In contrast,

arhgap1 expression was very faint at similar stages and did not show any specific pattern of distribution (Fig. 5e). No *arhgdib* signal was detected in the *Xenopus* epidermis at any developmental stage (Supplementary Fig. 3i).

The silencing of ARHGDB, ARHGAP1 and RRAS using specific small interfering RNAs (siRNAs) in proliferating HAECs strongly reduced the level of expression of the corresponding proteins (Supplementary Fig. 3c). In proliferating human A549 cells, the silencing of RRAS or ARHGAP1 but not ARHGDB increased actin stress fibres and focal adhesion formation (Supplementary Fig. 3d,e), and mimicked the effects observed after miR-449 overexpression (Fig. 1c,d and Supplementary Fig. 3d,e). These effects were abolished when cells were treated with an inhibitor of Rock (Y27632), an important RhoA effector⁵⁵ (Supplementary Fig. 3e). In proliferating HAECs, we also found that RhoA activity increased after silencing of RRAS but not of ARHGAP1 or ARHGDB. This effect remained however smaller than the one induced by miR-449 expression (Supplementary Fig. 3f). Rac1,2,3 activity was slightly reduced by miR-449 expression, whereas it was not affected by a silencing of RRAS (Supplementary Fig. 3a). These observations point to the participation of miR-34/449 and R-Ras to actin network reorganization and their capacity to alter the RhoA activity. They are in agreement with a previous work showing that RRAS deficiency is associated with cortical actin reorganization in adult haematopoietic progenitor cells³⁸. Our data suggest that the induction of RhoA activity by miR-449 may at least in part involve the silencing of RRAS, notwithstanding possible contributions by additional regulators. The lack of effect on RhoA activity after ARHGAP1 and ARHGDB silencing is probably in line with the existence of redundant or compensatory mechanisms controlling RhoA activity in the

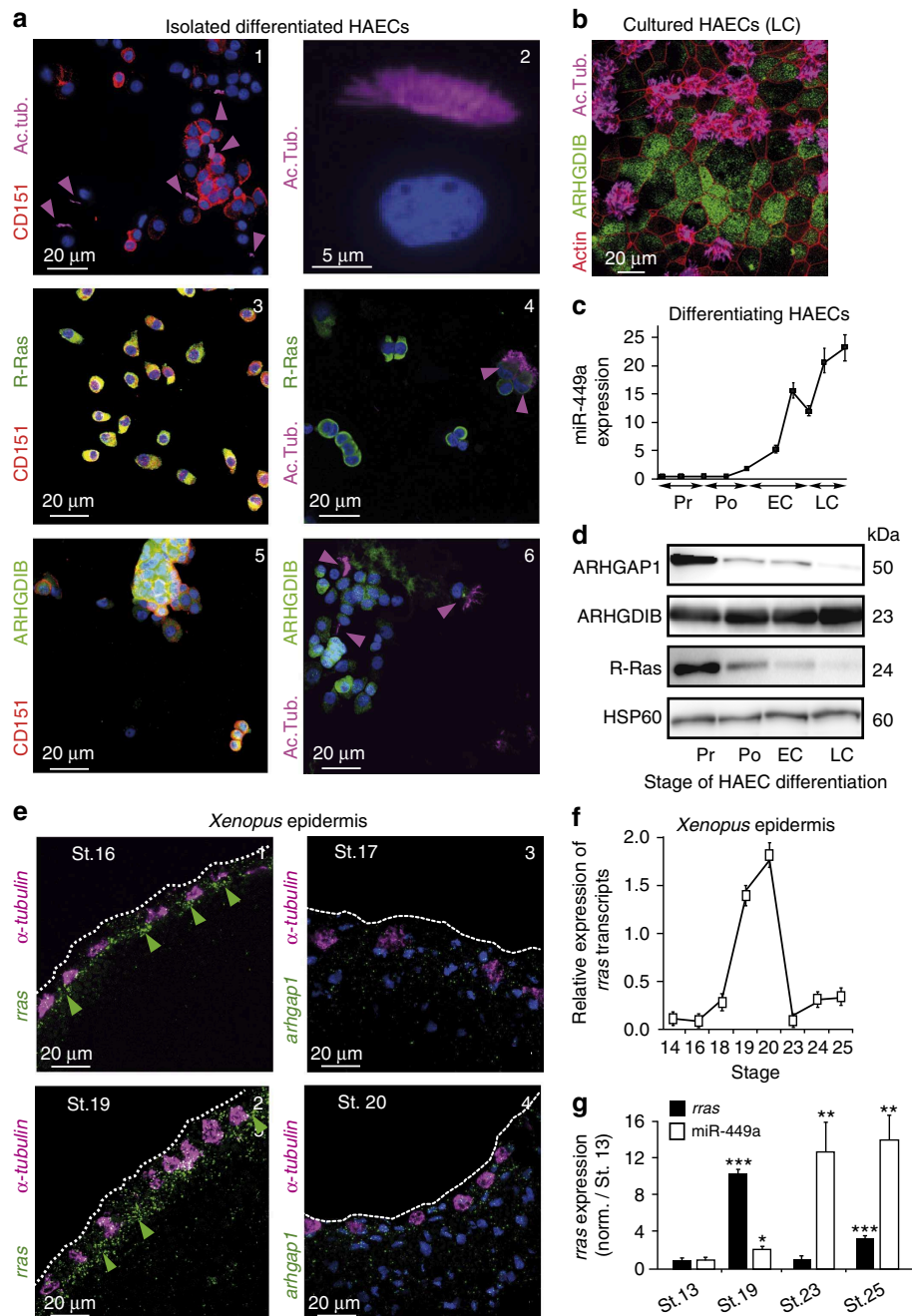


Figure 5 | Cellular specificity of expression of ARHGAP1, ARHGDIB and R-Ras during MCC differentiation. (a,b) Fluorescence immunocytochemistry experiments on cytopins from dissociated HAECs (a1–6) and primary HAEC cultures at LC step (b) illustrate the cell-specific expression of human ARHGDIB (in green, a5–6,b) and R-Ras proteins (in green, a3,4). Basal and ciliated cells are CD151+ (in red, a1,3,5) or acetylated tubulin+ (in magenta a2,4,6 and b), respectively. Panel a2 is a magnification of an isolated acetylated tubulin-positive MCC. HAECs are stained for nuclei with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; in blue, a1–6), F-Actin with phalloidin (in red, b). Expression levels of miR-449a (c) and of ARHGAP1, ARHGDIB and R-Ras proteins (d) during HAEC differentiation. MiR-449 levels are normalized with *RNU44* (c) and HSP60 was used as a loading control (d). (e) FISH analysis of *rras* (e1,2) and *arhgap1* (e3,4) mRNA on sections of *Xenopus* embryonic epidermis at stages 16 and 19 (e1,2) or at stages 17 and 20 (e3,4). MCC precursors are positive for α -tubulin (magenta; e1–4). DAPI staining is in blue and white dotted lines indicate the surface of the outer layer. (f) Real-time RT-PCR of *rras* transcripts in *Xenopus* epidermis performed at each corresponding stages indicated in the figure. (g) Transcript levels of *rras* decrease concomitantly with the induction of miR-449 expression. Transcript levels of *rras* and miR-449 were normalized and compared with their respective values obtained in stage 13. Transcript levels of *rras* were normalized against *Odc* transcript as an internal control and miR-449 expression was normalized with U2 as an internal control. Data represent the mean and s.d. of three independent experiments (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and * $P < 0.05$; Student's *t*-test).

context of multiciliogenesis. As the pattern of expression of both *arhgap1* and *arhgdib* in *Xenopus* epidermis was not consistent with an association to MCC precursors, *arhgap1* and *arhgdib* were not further analysed in *Xenopus*.

We designed target protection assays in which cholesterol-conjugated modified oligonucleotides were transfected in differentiating HAECs to compete with the binding of miR-34/449 on the site identified within the human 3'-UTR of

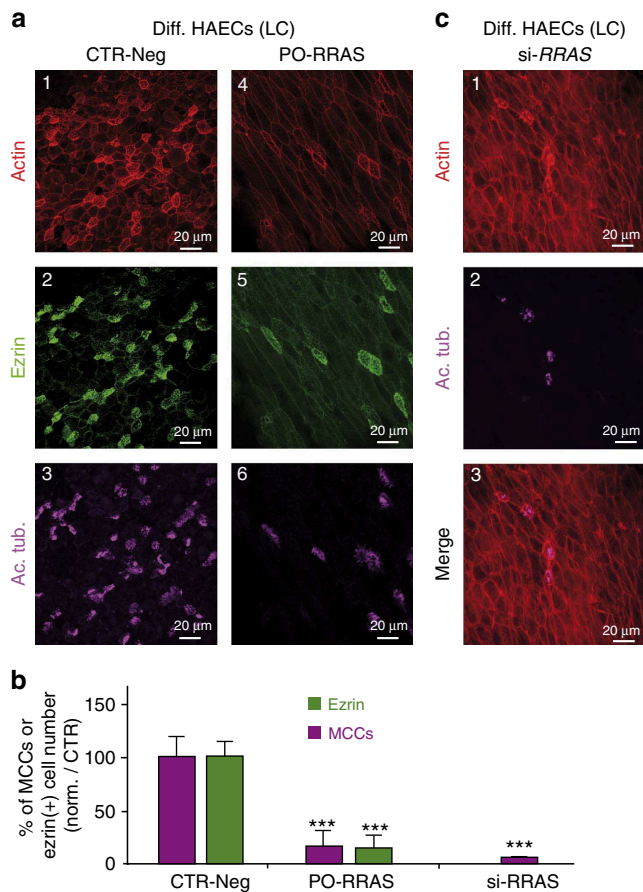


Figure 6 | The direct repression of *RRAS* by miR-449 affects multiciliogenesis and apical actin cytoskeleton reorganization in HAECs.

(a) Differentiating HAECs were chronically treated with negative oligonucleotide (CTR-Neg, a1–3) or with an oligonucleotide protecting the miR-449-binding site on *RRAS* (PO-*RRAS*, a4–6) and stained at LC stage for F-actin (a1,4), ezrin (a2,5) and acetylated tubulin (Ac. Tub., a3,6).

(b) Alternatively, differentiating HAECs were transfected at seeding time with si-*RRAS* and stained at LC stage for F-actin (in red, c1) and motile cilia (Ac. Tub. in magenta, c2). (c) The histogram indicates the number of apical ezrin-positive cells (in green) and MCCs (in magenta) normalized in percentage from control. Protecting the *RRAS* mRNA from interaction with miR-449 leads to defects in apical actin reorganization together with a decrease in MCC differentiation similar to that observed after inhibition of miR-449 activity. All data are means \pm s.d. from at least three independent experiments (*** $P < 0.001$; Student's *t*-test).

ARHGDI B mRNA (PO-*ARHGDI B*). No effect was observed either on apical actin web or multiciliogenesis after protection with PO-*ARHGDI B* or after *ARHGDI B* silencing with siRNAs in differentiating HAECs (Supplementary Fig. 3g,h). Incidentally, the existence of five miR-34/449-binding sites in the 3'-UTR of *ARHGAP1* made elusive the assessment of a target protection of *ARHGAP1* against a miR-34/449 action in primary HAEC cultures. Intriguingly, silencing *ARHGAP1* in human at an early step of HAEC differentiation strongly affected apical actin meshwork formation and blocked multiciliogenesis (Supplementary Fig. 3g,h), suggesting that *ARHGAP1* does play a role in multiciliogenesis, in which its level of expression has to be finely controlled during maturation of MCCs.

These data posit the absence of R-Ras in miR-34/449-expressing MCCs as a conserved feature across tetrapods. We therefore focused on the functional impact of miR-449-mediated repression of *RRAS* on apical actin reorganization in MCCs.

miR-34/449 control apical actin assembly by repressing R-Ras.

We used target protection assays (cholesterol-conjugated modified oligonucleotides in HAECs or morpholino oligonucleotides in frog epidermis) to compete with the binding of miR-34/449 on sites identified within the human and *Xenopus* 3'-UTRs of *RRAS* mRNA. In human cells, the *RRAS* protector oligonucleotide (PO-*RRAS*) strategy effectively blocked the action of ectopic miR-449, as evidenced on *RRAS* 3'-UTR in luciferase assays (Supplementary Fig. 4b). In addition, miR-34/449 knockdown or protection of *RRAS* mRNA from miR-34/449 in frog epidermis led to an increase in *rras* transcript levels (Supplementary Fig. 4c). We checked that in both species the expression of *RRAS2*, an *RRAS*-related gene, did not interfere with R-Ras signalling. *RRAS2* expression remained at a very low level during MCC differentiation and in response to miR-449 overexpression, and was not altered by miR-34/449 knockdown or PO-*RRAS* protection (HAECs, see GEO GSE22147; *Xenopus*, Supplementary Fig. 4c). In both models, the PO-*RRAS* strategy was also able to increase endogenous R-Ras protein level (Supplementary Fig. 4d,e). Collectively, these assays unambiguously establish that *RRAS* transcripts were specifically targeted by miR-34/449 in human and *Xenopus* MCCs.

In human (Fig. 6a,b) and in *Xenopus* (Fig. 7a,d), protection of the *RRAS* transcript from miR-34/449 binding led to a strong reduction in apical actin meshwork and motile cilia formation. Silencing *RRAS* in human at an early step of HAEC differentiation also strongly affected apical actin meshwork formation and blocked multiciliogenesis (Fig. 6b,c). These results strongly suggest that R-Ras plays a key role in maturation of MCCs, in which its level of expression has to be tightly fine-tuned, to allow apical actin cap formation and multiciliogenesis. In frog epidermis, both apical and sub-apical phalloidin staining were altered in PO-*rras*-injected embryos (Fig. 7a,b). In contrast, F-actin staining remained detectable at cellular junctions in both models. Importantly, actin cap formation and multiciliogenesis were rescued in *Xenopus* epidermis when a morpholino designed to block R-Ras translation (MO-ATG-*rras*) was co-injected with PO-*rras* (Fig. 7a,d). At the dose used for this assay, injection of MO-ATG-*rras* alone had no significant effect on either apical actin meshwork formation or multiciliogenesis (Fig. 7a–d), suggesting that *rras* expression may be already repressed by the presence of endogenous miR-34/449 in those MO-ATG-*rras* maturing MCCs.

Our data unambiguously indicate that the repression of *RRAS* at a late step of MCC differentiation by miR-34/449 is required for apical actin network assembly and multiciliogenesis in human (Fig. 6) as well as in frog (Fig. 7). Considering that R-Ras activity can be increased by Notch pathway activation, as previously observed in another cellular model³⁹, and considering the early repression of Notch signalling by miR-34/449 during vertebrate multiciliogenesis⁹, miR-34/449 is therefore able to control R-Ras function at two distinct levels: (1) directly, via the inhibition of *RRAS* expression, and (2) indirectly, via the inhibition of R-Ras activity through the repression of the Notch pathway.

As observed for miR-449 morphants with rhotekin staining in *Xenopus* epidermis (Fig. 3b), PO-*rras*-injected MCCs displayed reduced actin cap and motile cilia staining, but maintained RhoA activation at the apical surface (Fig. 7c,e). This suggests that *RRAS* may interact with downstream effectors of RhoA during actin cap formation. In particular, previous works described an interaction between R-Ras and Filamin A (FLNA), a non-muscle F-actin cross-linking protein involved in epithelial cell shape, actin cytoskeleton remodelling and primary cilia formation^{36,37,64–66}. FLNA can interact with the RhoA and Shroom3 signalling pathways^{67–69}, and has also been involved in ciliogenesis and basal body positioning through its interaction with Meckelin⁶⁴.

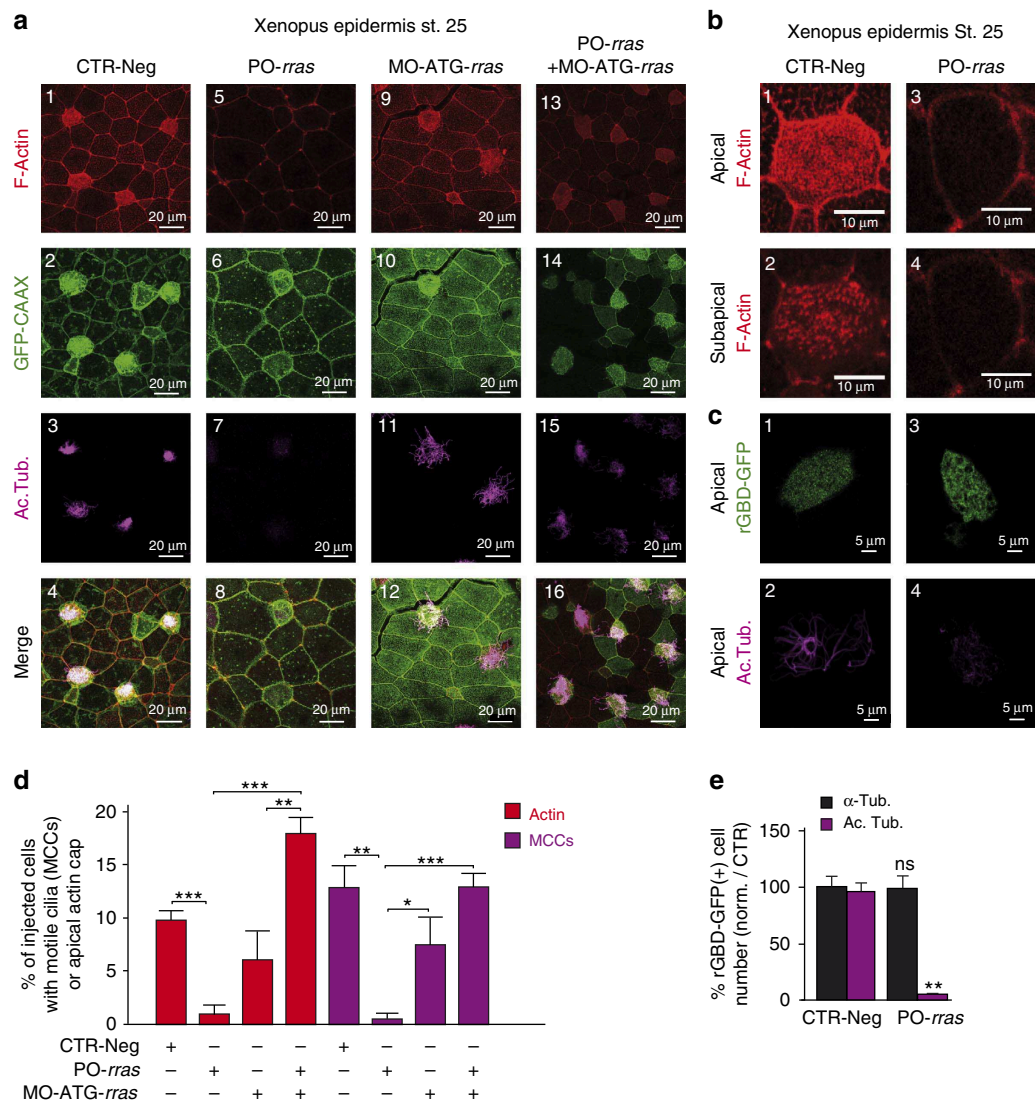


Figure 7 | The direct repression of *RRAS* by miR-449 affects multiciliogenesis and apical actin cap formation in *Xenopus*. (a,b) Eight-cell stage *Xenopus* embryos were injected in the epidermis precursor blastomeres with a mixture of synthetic mRNA coding for GFP-CAAX to label the injected cells (in green, a2,6,10,14) and negative control MO (CTR-Neg, a1-4, b1,2), or a morpholino protecting *rras* against binding by miR-449 (PO-*rras*, a5-8, b3,4) or a morpholino blocking the translation of *rras* (MO-ATG-*rras*, a9-12), or a combination of PO-*rras* and MO-ATG-*rras* (a13-16). MCCs are stained with an anti-acetylated tubulin antibody (in magenta, a3,7,11,15 and c2,4), F-actin with phalloidin (red, a1,5,9,13 and b1-4). (b) The impact of PO-*rras* in MCCs on apical (upper b5) and sub-apical actin (lower b6) was observed with F-actin staining. (c) In independent experiments, we used rGBD-GFP to examine RhoA activity in *Xenopus* MCCs (c1-4). Eight-cell stage *Xenopus* embryos were injected in the epidermis precursor blastomeres with a reporter of RhoA activity (rGBD-GFP in green, c1-4) and with negative control MO (CTR-Neg, c1-2) or with PO-*rras* (c3-4). MCCs are stained in magenta (c2,4). Protecting the *rras* mRNA from interaction with miR-449 results in defects in actin cap formation (F-Actin, a5 and b3,4) together with a loss of MCCs (Ac. Tub., a7,c4) without affecting apical RhoA activity (rGBD-GFP, c1,3). This phenotype is rescued when the translation of the protected *rras* mRNA is blocked by coinjection of MO-ATG-*rras* (a13-16). (d) The histogram indicates the percentage of injected cells (positive for mGFP) that develop proper apical actin cap (in red) and motile cilia (in magenta) in *Xenopus* epidermis at stage 25. CTR-Neg, $n = 10$ embryos per 413 injected cells; PO-*rras*, $n = 8$ embryos per 350 injected cells; MO-ATG-*rras*, $n = 8$ embryos per 290 injected cells; MO-PO-*rras* + MO-ATG-*rras*, $n = 9$ embryos per 395 injected cells ($***P = 0.009$ and $P < 0.0001$, and $**P = 0.0016$; Mann-Whitney test). Data are mean \pm s.e.m. (e) The histogram indicates the percentage of rGBD-GFP-positive cells stained for α -tubulin (α -tub. in black) or acetylated tubulin (Ac. Tub. in magenta) in PO-*rras* morphants (PO-*rras*, $n = 150$) in comparison with the negative control (CTR-Neg, $n = 110$). ($**P < 0.005$; ns, no significant; one-way-analysis of variance with Dunnett's test). Data are mean \pm s.e.m.

We detected in control fully differentiated HAECs (Fig. 8a) FLNA in MCCs near apically docked basal bodies. By contrast, it was more homogeneously distributed in non-ciliated cells. The same apical enrichment of FLNA was observed in *Xenopus* MCCs (Fig. 8c). We finally noticed a miR-449-dependent subcellular redistribution of FLNA, after quantifying R-Ras and FLNA protein levels in different cellular fractions of proliferating HAECs that overexpress or not miR-449. In the absence of

miR-449, R-Ras and FLNA were enriched in the membrane fraction (Fig. 8b). Following miR-449 overexpression, R-Ras disappeared from the membrane fraction, while FLNA was redistributed from the membrane to the cytoskeletal fraction (Fig. 8b). In a tentative model (Fig. 8d), we propose that the silencing of R-Ras by miR-34/449 in MCCs affects the interaction between R-Ras and FLNA, and favours a redistribution of FLNA in a cytoskeletal components involved into the anchoring of basal

bodies. This mechanism would contribute to apical actin reorganization and basal body docking in MCCs.

In conclusion, our data further document how the miR-34/449 family can participate to multiciliogenesis through the repression of several important targets. MiR-34/449 may initially down-regulate the expression of several cell cycle-regulated genes and members of the Notch pathway to promote entry into

differentiation. Interestingly, miR-449 appears to be negatively regulated by Notch activity, supporting the existence of a double-negative feedback loop. At later time points of differentiation, this regulatory loop drives the accumulation of miR-449 at sufficient levels to downregulate additional targets implicated in more downstream events, such as CP110, involved in basal body maturation⁴⁸, and R-Ras, shown here to be important for actin network assembly. From a wider point of view, this study illustrates well how a single miRNA family can contribute to complex cellular processes through its action on multiple targets belonging to different signalling pathways.

Methods

Subjects/tissue samples. Inferior turbinates or nasal polyps were from patients who underwent surgical intervention for nasal obstruction or septoplasty (kindly provided by Professor Castillo, Pasteur Hospital, Nice, France, or by Epithelix Sàrl, Geneva, Switzerland). The use of human tissues was authorized by the bioethical law 94-654 of the French Public Health Code after written consent from the patients.

Isolation and culture of HAECs. Primary HAECs were dissociated and seeded on porous polyester membranes (5 × 10⁴ cells per membrane), in cell culture inserts (Transwell-clear, 0.33 cm², 0.4 μm pores; Corning, Acton, MA) coated with human placenta collagen (0.2 mg ml⁻¹; Sigma-Aldrich). HAECs were cultured in liquid-liquid conditions in the proliferation medium until confluency (5 days). Then, the culture medium was removed from the upper compartment and the airway epithelium was allowed to differentiate by using the differentiation medium consisting of 1:1 DMEM (Invitrogen, Gibco) and bronchial epithelial basal medium (Lonza) with the Clonetics complements for human Epidermal Growth Factor (hEGF) (0.5 ng ml⁻¹), epinephrine (5 g ml⁻¹), bovine pituitary extract (BPE)

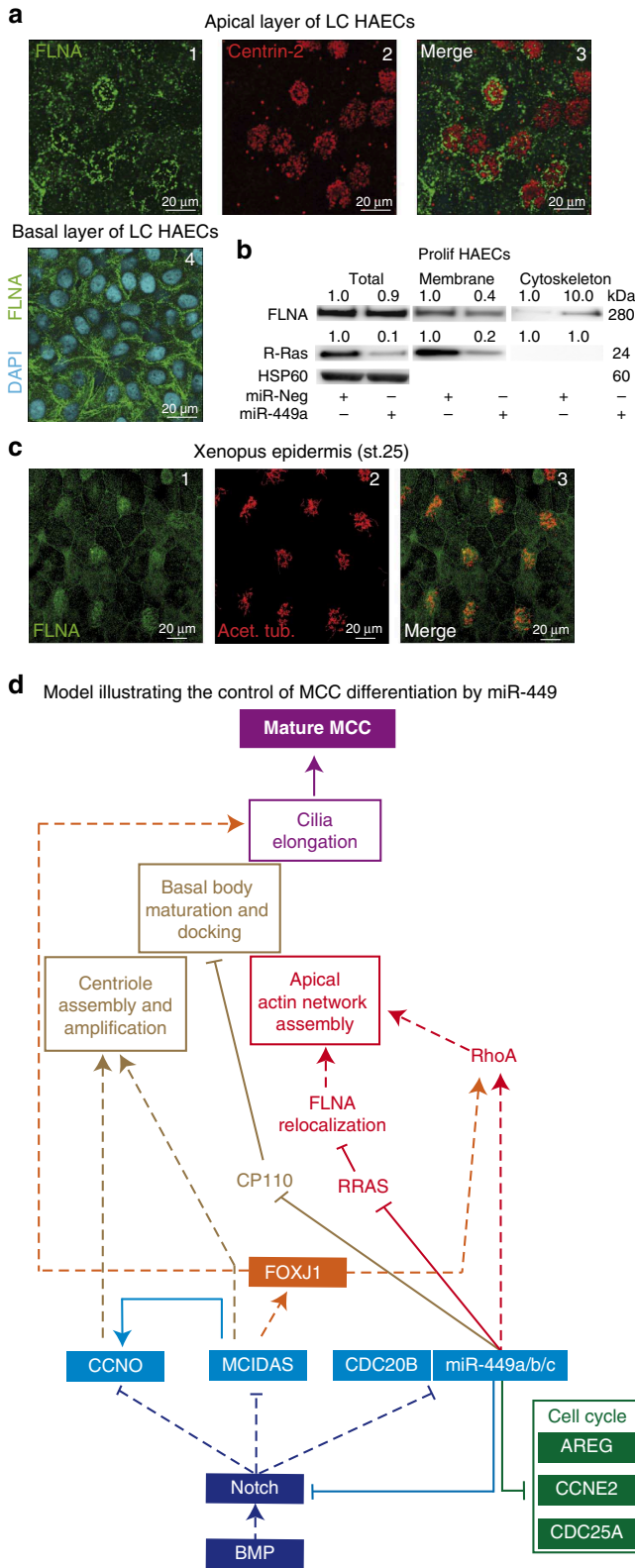


Figure 8 | MiR-34/449 promote FLNA relocalization during MCC differentiation. (a) Apical layer of differentiated HAECs (LC stage) were stained for the basal bodies marker centrin-2 (in red) and the actin-binding protein filamin-A (FLNA, in green). FLNA labelling was enriched in the apical layer near basal bodies (a1-3). Basal layer of differentiated HAECs (LC stage) were stained for FLNA (in green) and for nuclei with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; in blue) (a4). (b) Modulation of protein levels of FLNA and R-Ras in total fraction (Total), membrane fraction (Membrane) and cytoskeletal fraction (Cytoskeleton) isolated from proliferating HAECs transfected for 72 h with miR-Neg or miR-449a as indicated each below corresponding band. Protein levels were normalized against HSP60 as an internal control for the total fraction and normalized fold changes are indicated above the corresponding bands. Data were representative of three independent experiments. (c) In the epidermis of stage 25 *Xenopus* embryos, FLNA labelling (in green, c1) is apically enriched in acetylated tubulin-positive MCCs (in magenta, c2,3). (d) Model illustrating the roles of miR-449 and other interconnected actors in MCC differentiation. Early cues required to trigger MCC differentiation involve the inhibition of BMP and Notch pathway. The expression of Multicilin (MCIDAS), CCNO and miR-449 is controlled by the Notch pathway activity. Notch repression is associated with the increase in MCIDAS, CCNO and miR-449 expression. Then, miR-449 miRNAs repress the Notch pathway inducing a double-negative feedback loop increasing miR-449 expression. MiR-449 inhibit cell cycle-related genes to stop proliferation and promote entry in differentiation. In addition, MCIDAS drives expression of centriole multiplication-related genes including CCNO, which then participates to centriole assembly and amplification. MCIDAS also contributes to increase FOXJ1 expression, which in turn controls ciliogenesis-related genes and apical actin remodelling through a RhoA-dependent mechanism. In parallel, miR-449 also control apical actin network remodelling by repressing R-Ras, promoting FLNA redistribution and modulating RhoA activity. Finally, miR-449 favour basal body maturation and anchoring by downregulating CP110. All these events are key pre-requisites for axoneme elongation and motile cilia formation during MCC differentiation. Plain lines indicate direct interactions; dotted lines identify pathways that may or may not be direct.

(0.13 mg ml⁻¹), hydrocortisone (0.5 g ml⁻¹), insulin (5 g ml⁻¹), triio-dothyronine (6.5 g ml⁻¹) and transferrin (0.5 g ml⁻¹), supplemented with 200 UI ml⁻¹ penicillin, 200 g ml⁻¹ streptomycin and 0.1 nM retinoic acid (Sigma-Aldrich) in the basal compartment⁹. We analysed HAEC differentiation at four time points where Pr, Po, EC and LC represent the proliferating step at day 0, the polarization step at day 7, the early multiciliogenesis step at day 14 and the late multiciliogenesis step at day 21, respectively. Day number corresponds to the number of days after setting up the cells at an ALI.

Xenopus injections. Eggs obtained from NASCO females were fertilized *in vitro*, de jellyed in 2% cysteine hydrochloride (pH 8.0) and cultured in modified Barth's saline, and injected as described⁹. cRNAs were generated with the Ambion mMessage mMachine kit (Life Technologies). pCS105/mGFP-CAAX (a gift from C. Chang, University of Alabama at Birmingham, USA) was linearized with AseI and cRNA was synthesized with Sp6 polymerase⁹. mRNAs (rotekin, rGBD-GFP⁵⁶, NICD and mRFP) were generated with the Ambion mMessage mMachine kit (Life Technologies). All injections were done at least twice using 0.25 ng of each mRNA.

Immunocytochemistry. *Human.* Primary cultures of HAECs at EC and LC stages were used for detection of MCCs. Cells were fixed (4% paraformaldehyde, 15 min, 4 °C), rinsed (PBS-glycine 0.1 M, 10 min) and permeabilized (0.1% Triton X-100, 5 min). Only for γ -tubulin immunostaining to visualize centrioles and basal bodies, cells were fixed with methanol (10 min, -20 °C). Proliferating A549 airway epithelial cells grown on glass coverslip were used for detection of focal adhesion using anti-paxillin antibodies. Fixed cells were blocked for 1 h in 3% BSA and incubated for 1 h at room temperature or overnight at 4 °C with the appropriate primary antibodies (see Supplementary Table 1). Then, cells were incubated for 1 h with the appropriate secondary antibodies (Alexa Fluor, 1:500, Invitrogen), nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (300 nM, Invitrogen) and, when indicated, F-actin was stained with Alexa Fluor 594 Phalloidin (1 U per staining). Stained cells were mounted with ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen, Life Technologies)⁹.

Xenopus. For F-actin staining, embryos were fixed in 4% formaldehyde/PBT 1 h at 4 °C and stained with phalloidin-Alexa Fluor 555 (Invitrogen, 1:40) for 4 h at room temperature. For immunostaining, embryos were fixed in MEMFA (0.5 M MOPS, pH 7.4, 100 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, 3.7% formaldehyde). Whole-mount embryos or sections were blocked in 15% goat serum. The following primary antibodies were used: mouse anti-acetylated-tubulin (Sigma, 1:500); rabbit anti-RFP (Rockland, 1:500) and chicken anti-green fluorescent protein (GFP) (Aves, 1:500). After washing in PBT, sections or whole-mount embryos were incubated with the appropriate secondary antibody: anti-chicken Alexa Fluor 488 (1:500, Invitrogen), anti-mouse Alexa Fluor 555 (1:500, Invitrogen) or anti-mouse Alexa Fluor 647 (all from Invitrogen, 1:500). Epidermis fragments were peeled from embryos at stages 20 or 25 and mounted on a glass coverslip with fluoromount (Diagnostic BioSystem).

Western blot experiments. Primary HAECs cells were harvested by scraping in Ripa lysis Buffer (Thermo Scientific Pierce) and cleared by centrifugation. Protein concentration was determined using the BCA assay (Thermo Fisher Scientific) and equivalent amounts of protein were resolved on SDS-polyacrylamide gels using Novex NuPAGE SDS-PAGE Gel System following the manufacturer's instructions. Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes and analysed by immunoblotting with appropriate primary antibodies and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Dako) according to the manufacturer's instructions. Immunoreactive bands were detected using Immobilon ECL kit (Merck Millipore) on a LAS-3000 imager (Fujifilm). For subcellular protein fractionation, proliferating HAECs were trypsinized and centrifuged. Cell pellets were washed with ice-cold PBS and then treated with different buffers according to the manufacturer's instructions (Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells, Thermo Scientific).

MO-*rras*-injected, PO-*rras*-injected or control neurula stage (st.19) *Xenopus laevis* embryos were lysed in Halt Protease Inhibitor Single Use Cocktail (Thermo Scientific), the lysate was cleared by centrifugation, protein concentration was determined by NanoDrop reading and identical amounts of protein for each condition were resolved on 12% SDS-polyacrylamide gel using the Hoefer Gel Caster system. Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membrane and analysed by immunoblotting with anti-rabbit R-Ras (1:300, Antibody Verify) or anti-mouse- α -tubulin (1:2,000, Sigma-Aldrich) primary antibody and HRP-conjugated secondary antibodies (1:2,000, Jackson). Immunoreactive bands were detected using Pierce ECL2 kit (Thermo Scientific) on Amersham Hyperfilm (GE Healthcare).

Uncropped scans of the most important blots were shown in Supplementary Fig. 5.

Small GTPases activity assay. The activation of RhoA and Rac1, 2 and 3 were quantified using the glutathione S-transferase (GST) pulldown with recombinant proteins GST-Rhotekin-RBD and GST-PAK-PBD (Merck Millipore) that stoichiometrically interacts with GTP-bound Rho/Rac, as well as using the

ELISA/G-LISA kits according to the manufacturer's instructions (Cytoskeleton, Denver, USA). The Rho activator, calpeptin, was provided by Cytoskeleton and the Rock inhibitor (Y-27632) was provided by Abcam PLC (Biotech Life sciences, UK).

HAECs were seeded on type-I collagen-coated surface and were transfected with miRNA mimics and siRNA. After 72 h, cells were lysed in cell lysis buffer containing proteinase inhibitor cocktail (Cytoskeleton), lysate were cleared by centrifugation and immediately quantified using Precision Red Advanced Protein Assay Reagent (Cytoskeleton). Approximately 400 μ g of total proteins were incubated with the GST fusion protein at 4 °C for 30 min. Supernatants were then incubated with Pierce Glutathione Magnetic Beads for 30 min at 4 °C and washed three times with wash buffer (25 mM Tris pH 7.5, 30 mM MgCl₂, 40 mM NaCl) using a magnetic rack. Input and pull-down samples were resuspended in loading buffer and blotted using Novex NuPAGE SDS-PAGE Gel System following the manufacturer's instructions.

In *Xenopus* MCCs, RhoA activation was revealed through the injection of RNA encoding the RhoA sensor rotekin rGBD-GFP (see above).

Total RNA extraction. *Human.* Automated total RNA extraction was performed using QIAcube and miRNeasy kit from Qiagen, according to the manufacturer's instructions. Total RNAs were quantified using NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) and integrity of samples (RNA Integrity Number (RIN) > 8) was evaluated using RNA nano-chips on the Agilent 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies).

Xenopus. Total RNAs were isolated from animal caps dissected at stages 10–11 and cultured in modified Barth's saline (880 mM NaCl, 10 mM KCl, 8.2 mM MgSO₄, 24 mM NaHCO₃, 100 mM Hepes pH 7.4, 4.1 mM CaCl₂, 3.3 mM Ca(NO₃)₂). Twenty explants for each sample (stages 14 or 25) were collected for RNA extraction. Total RNAs were isolated using the RNeasy mini kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions, and quantified using a NanoDrop Spectrophotometer. Complementary DNAs were synthesized using iScript Reverse Transcription Supermix (BioRad).

Quantitative RT-PCR. *Human.* qRT-PCR was performed using TaqMan Gene Expression Assay and TaqMan MicroRNA Assay (Life Technologies) on a Lightcycler 480 (Roche) according to the manufacturer's instructions. Expression levels of mature miRNAs and mRNA were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, using respectively RNU44 and UBC as endogenous controls.

Xenopus. Primers were designed using Primer-BLAST Software. PCR reactions were carried out using SYBRGreen on a CFX Biorad qPCR cyclor. All experiments were repeated at least twice on separate injections and the qRT-PCR was performed in triplicate. The relative expression of *RRAS* was normalized to the expression of the housekeeping gene *ornithine decarboxylase*. The qRT-PCR *RRAS* primers are as follows: forward: 5'-*gtaccaaagaggaagcgtca*-3'; reverse: 5'-*ggatgacacaagggcaactttt*-3'.

MiR-449 silencing and target protection experiments. *Human.* 3'-Cholesterol linked 2'-O-methyl miR-449a/b or miR-34b/c antisense oligonucleotide (antagomiR, antago-449: 5'-*c,u,c,uuaaacacugccacau,u,u-Chol-3'*, antago-34: 5'-*g,c,a,aucagcuaaacuacacugc,c,u-Chol-3'*), Notch1 protector oligonucleotide 5'-*a,a,a,aagcaguguuucugug,u,a-Chol-3'* and *RRAS* protector oligonucleotide (PO-*RRAS*: 5'-*c,g,u,uggcagugacauuuuu,u,u-Chol-3'*) were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgique). Phosphorothioate bonds are indicated by subscript 's'. The miR-449 antagomiR targets *Homo sapiens* miR-449a (full match) and miR-449b with one mismatch. The *RRAS* protector is a complementary antisense oligonucleotide targeting the conserved miR-449 binding site of the human *RRAS* 3'-UTR. The antagomiR or protector negative control was the Clear-miR (5'-*c,a,u,cgucgucgucgucg,c,a-Chol-3'*) from Eurogentec. AntagomiR or antisense protector (100 μ M) were pre-incubated with FCS for 30 min at room temperature. Next, the antagomiR/FCS or protector/FCS mixture in differentiation medium (20 μ M) were added to the apical side of primary HAECs. After 2 h at 37 °C, the apical medium was removed to restore the air-liquid interface. Transfection was repeated every 5 days with freshly prepared antagomiR or antisense protector, until control cells reached full differentiation (typically after 21 days)⁹.

Xenopus. Morpholino antisense oligonucleotides were as follows: MOs against miR-449 (GeneTools, LLC): miR-449a MO, 5'-*accagctaacattactgctt-3'*; miR-449b MO, 5'-*gccagctaacattactgctt-3'*; miR-449c MO, 5'-*accagctagcagctgcaactgctt-3'*; control MO (MO-Neg), 5'-*tgccagctttcaatacagcgtt-3'*. Ten nanograms of mixture of each miR-449 MO (449-MOs) was injected in one animal-ventral blastomere at the eight-cell stage. Protector MO directed against miR-449-binding sites in *rras* 3'-UTR (PO-*rras*): 5'-*gtggcaatgtaggctcaattggtt-3'*. PO-*rras* (5.7 or 7.5 ng) was injected in one animal-ventral blastomere at the eight-cell stage. MO blocking the translation of *rras* (MO-*rras*) has the following sequence: 5'-*gctcttggactcatagctgc tgc-3'*. Fifteen or 25 ng of *rras* translation MO was injected in one animal-ventral blastomere at the eight-cell stage. The protector MOs directed against miR-449-binding sites in *Dll1* 3'-UTR have the following sequences: P1 MO: 5'-*cggcagtgca acagttatgtctgc-3'*; P2 MO: 5'-*aggcagtgctgctgtagtttagc-3'*.

Ectopic expression of miRNAs/siRNAs. Cells were grown to 30% confluency in proliferation medium on plastic, glass coverslip or on Transwell filters. Cells were then transfected with synthetic negative control miRNA (miR-Neg, Ambion) or synthetic miR-449a/b miRNAs (Ambion) (10 nM final concentration). Total RNAs or proteins were extracted, or immunostaining was performed, from 24 to 72 h later. For siRNA experiments in differentiating HAECs or A549 cell line, cells were transfected with a siRNA against the human *RRAS* (si-*RRAS*), *ARHGDI1B* (si-*ARHGDI1B*) or *ARHGAP1* (si-*ARHGAP1*) transcripts, or with a negative control siRNA (si-Neg) (Stealth RNAi, siRNAs, Life Technologies) (20 nM final concentration) using Lipofectamine RNAi Max Reagent (Invitrogen) in OPTIMEM (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. On the next day, an additional transfection was performed using the same procedure, before HAEC differentiation was induced in ALL, on the third day. Finally, HAECs were harvested for western blot analyses or processed for immunofluorescence experiments after 3 days for proliferating cells on glass coverslip or 7, 14 and 21 days for primary cultures in ALL.

Plasmid constructs and luciferase measurements. Sequence from the wild-type or mutants 3'-UTR of *RRAS*, *ARHGDI1B*, *ARHGAP1*, *NDRG1* and *DAAM1* were synthesized (gBlocks Gene Fragments, Integrated DNA Technologies) and cloned into psiCheck2 vector (Promega). For mutated 3'-UTRs, three bases of each seed region were changed by complementary bases. PsiCheck2 constructions were co-transfected with synthetic miRNA mimics (Ambion, Applied Biosystems) with or without antagonists or antisense protectors into HEK293T cells, and luciferase activity was measured using the dual reporter luciferase assay kit (Promega), according to the manufacturer's protocol.

ISH on *Xenopus* embryos. Whole-mount ISH analysis was done as follows: embryos were fixed in MEMFA (0.1 M MOPS pH 7.4, 2 mM MgSO₄, 1 mM EGTA, 3.7% v/v formaldehyde) overnight at 4 °C, dehydrated in 100% ethanol or methanol overnight at -20 °C, then rehydrated in PBT (PBS + 0.5% Tween20), bleached for 5–10 min in H₂O₂, and hybridized overnight with the chosen probe. After hybridization, the embryos were washed at increasing stringency in SSC/10% CHAPS, rinsed extensively in MABX (Maleic Acid Buffered solution + 0.5% Triton X), then incubated overnight at 4 °C under gentle agitation with the appropriate antibody in MABX, 2% Roche Blocking Reagent, 15% goat serum or FCS. On the final day, embryos were extensively washed in MABX, then stained with Roche BM-Purple⁷⁰. *RRAS* digoxigenin-labelled sense and antisense riboprobes (4202704 (IRHB 18A04), IRHB XGC, Source BioScience Life Sciences) and fluorescein-labelled antisense α -tubulin riboprobe¹⁷ were generated from linearized plasmids using RNA-labelling mix (Roche). A locked nucleic acid antisense probe against the mature form of miR-449a was described previously⁹. For fluorescent ISH (FISH) on sections, embryos were fixed in MEMFA for 2 h at room temperature or overnight at 4 °C, stored in methanol at least 24 h at -20 °C, rehydrated and washed in triethanolamine (0.1 M)/acetic anhydride. Embryos were then transferred in successive sucrose washes from 5% to 30% sucrose in PBS + Tween 20 (0.1% v/v). They were then embedded in O.C.T. Compound (VWR Chemicals ProLabo), flash frozen and 12- μ m-thick sections were prepared with a CM3050S Leica cryostat. Slides were kept at -80 °C overnight. FISH analysis was then carried out using Tyramide Signal Amplification—TSA TM Plus Cyanine 3/Fluorescein System (PerkinElmer). Before hybridization, and after Proteinase K digestion (3 min at 2 μ g ml⁻¹), endogenous peroxidase activity was blocked in a bath of H₂O₂ 3% in PBS for 20 min. Sections were hybridized with a mixture of digoxigenin- and fluorescein-labelled probes 40 ng each) overnight at 60 °C. Following washes (two times with 2% SSC/0.1% CHAPS at 60 °C; two times with 0.2% SSC/0.1% CHAPS at 37 °C), the digoxigenin-labelled probe was revealed first through incubation with a mouse anti-DIG antibody conjugated to HRP (POD) (Roche, 1:500), followed by incubation in Cy3 fluorophore amplification reagent (1/50 in the TSA diluent during 10 min). This reaction was then blocked in a bath of 2% H₂O₂ for 20 min. Next, the fluorescein-labelled probe (*rras*, *arhgdib* or *arhgp1*) was revealed with a mouse anti-fluorescein POD-conjugated antibody (Roche, 1:500), followed by incubation in Cy5 fluorophore amplification reagent (1/50 in the TSA diluent during 10 min). This second reaction was blocked in a bath of 2% H₂O₂ for 20 min. Following double FISH analysis, immunostaining with anti-GFP antibody was performed and slides were processed for confocal imaging. *Xenopus* embryos at stage 34 were fixed in paraformaldehyde 4% overnight and frozen in 100% methanol at -20 °C overnight before performing ISH with digoxigenin-labelled locked nucleic acid (Exiquon) probes against miR34b (5'-DIG-caatcagcaactactcactcctg-DIG-3')⁹.

Confocal microscopy. Human. Images were acquired using the Olympus Fv10i or the Leica SP5 confocal imaging systems.

Xenopus. Flat-mounted epidermal explants were examined with a Zeiss LSM 780 confocal microscope.

Three-colour confocal z-series images were acquired using sequential laser excitation, converted into single plane projection and analysed using ImageJ software.

In Supplementary Table 1 is provided a list of the antibodies used in our study.

References

- Fliegau, M., Benzing, T. & Omran, H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**, 880–893 (2007).
- Satir, P. & Christensen, S. T. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Ann. Rev. Physiol.* **69**, 377–400 (2007).
- Marshall, W. F. The cell biological basis of ciliary disease. *J. Cell Biol.* **180**, 17–21 (2008).
- Boon, M. *et al.* MCIDAS mutations result in a mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat. Commun.* **5**, 4418 (2014).
- Wallmeier, J. *et al.* Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat. Genet.* **46**, 646–651 (2014).
- LeSimple, P. *et al.* Trefoil factor family 3 peptide promotes human airway epithelial ciliated cell differentiation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **36**, 296–303 (2007).
- Hayes, J. M. *et al.* Identification of novel ciliogenesis factors using a new in vivo model for mucociliary epithelial development. *Dev. Biol.* **312**, 115–130 (2007).
- Dawe, H. R., Farr, H. & Gull, K. Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *J. Cell Sci.* **120**, 7–15 (2007).
- Marcet, B. *et al.* Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat. Cell Biol.* **13**, 693–699 (2011).
- Pearson, C. G., Culver, B. P. & Winey, M. Centrioles want to move out and make cilia. *Dev. Cell* **13**, 319–321 (2007).
- Vladar, E. K. & Stearns, T. Molecular characterization of centriole assembly in ciliated epithelial cells. *J. Cell Biol.* **178**, 31–42 (2007).
- Avasthi, P. & Marshall, W. F. Stages of ciliogenesis and regulation of ciliary length. *Differentiation* **83**, S30–S42 (2012).
- Sorokin, S. P. Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *J. Cell Sci.* **3**, 207–230 (1968).
- Pan, J., You, Y., Huang, T. & Brody, S. L. RhoA-mediated apical actin enrichment is required for ciliogenesis and promoted by Foxj1. *J. Cell Sci.* **120**, 1868–1876 (2007).
- Al Jord, A. *et al.* Centriole amplification by mother and daughter centrioles differs in multiciliated cells. *Nature* **516**, 104–107 (2014).
- Cibois, M. *et al.* BMP signalling controls the construction of vertebrate mucociliary epithelia. *Development* **142**, 2352–2363 (2015).
- Deblandre, G. A., Wettstein, D. A., Koyano-Nakagawa, N. & Kintner, C. A two-step mechanism generates the spacing pattern of the ciliated cells in the skin of *Xenopus* embryos. *Development* **126**, 4715–4728 (1999).
- Blatt, E. N., Yan, X. H., Wuerffel, M. K., Hamilos, D. L. & Brody, S. L. Forkhead transcription factor HFH-4 expression is temporally related to ciliogenesis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **21**, 168–176 (1999).
- Gomperts, B. N., Gong-Cooper, X. & Hackett, B. P. Foxj1 regulates basal body anchoring to the cytoskeleton of ciliated pulmonary epithelial cells. *J. Cell Sci.* **117**, 1329–1337 (2004).
- You, Y. *et al.* Role of f-box factor foxj1 in differentiation of ciliated airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **286**, L650–L657 (2004).
- Stubbs, J. L., Oishi, I., Izpisua Belmonte, J. C. & Kintner, C. The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Nat. Genet.* **40**, 1454–1460 (2008).
- Yu, X., Ng, C. P., Habacher, H. & Roy, S. Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. *Nat. Genet.* **40**, 1445–1453 (2008).
- Thomas, J. *et al.* Transcriptional control of genes involved in ciliogenesis: a first step in making cilia. *Biol. Cell* **102**, 499–513 (2010).
- Tan, F. E. *et al.* Myb promotes centriole amplification and later steps of the multiciliogenesis program. *Development* **140**, 4277–4286 (2013).
- Stubbs, J. L., Vladar, E. K., Axelrod, J. D. & Kintner, C. Multicilin promotes centriole assembly and ciliogenesis during multiciliate cell differentiation. *Nat. Cell Biol.* **14**, 140–147 (2012).
- Brody, S. L., Yan, X. H., Wuerffel, M. K., Song, S. K. & Shapiro, S. D. Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **23**, 45–51 (2000).
- Epting, D. *et al.* The Rac1 regulator ELMO controls basal body migration and docking in multiciliated cells through interaction with Ezrin. *Development* **142**, 174–184 (2015).
- Miyatake, K., Kusakabe, M., Takahashi, C. & Nishida, E. ERK7 regulates ciliogenesis by phosphorylating the actin regulator CapZIP in cooperation with Dishevelled. *Nat. Commun.* **6**, 6666 (2015).
- Bretscher, A., Edwards, K. & Fehon, R. G. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 586–599 (2002).
- Shaw, R. J., Henry, M., Solomon, F. & Jacks, T. RhoA-dependent phosphorylation and relocalization of ERM proteins into apical membrane/actin protrusions in fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* **9**, 403–419 (1998).
- Bossinger, O. & Bachmann, A. Ciliogenesis: polarity proteins on the move. *Curr. Biol.* **14**, R844–R846 (2004).
- Huang, T. *et al.* Foxj1 is required for apical localization of ezrin in airway epithelial cells. *J. Cell Sci.* **116**, 4935–4945 (2003).

33. Antoniadis, I., Stylianou, P. & Skourides, P. A. Making the connection: ciliary adhesion complexes anchor basal bodies to the actin cytoskeleton. *Dev. Cell* **28**, 70–80 (2014).
34. Jeong, H. W., Nam, J. O. & Kim, I. S. The COOH-terminal end of R-Ras alters the motility and morphology of breast epithelial cells through Rho/Rho-kinase. *Cancer Res.* **65**, 507–515 (2005).
35. Ada-Nguema, A. S. *et al.* The small GTPase R-Ras regulates organization of actin and drives membrane protrusions through the activity of PLCepsilon. *J. Cell Sci.* **119**, 1307–1319 (2006).
36. Gawecka, J. E., Griffiths, G. S., Ek-Rylander, B., Ramos, J. W. & Matter, M. L. R-Ras regulates migration through an interaction with filamin A in melanoma cells. *PLoS One* **5**, e11269 (2010).
37. Griffiths, G. S., Grundl, M., Allen, 3rd J. S. & Matter, M. L. R-Ras interacts with filamin A to maintain endothelial barrier function. *J. Cell Physiol.* **226**, 2287–2296 (2011).
38. Shang, X. *et al.* R-Ras and Rac GTPase cross-talk regulates hematopoietic progenitor cell migration, homing, and mobilization. *J. Biol. Chem.* **286**, 24068–24078 (2011).
39. Hodgkinson, P. S. *et al.* Mammalian NOTCH-1 activates beta1 integrins via the small GTPase R-Ras. *J. Biol. Chem.* **282**, 28991–29001 (2007).
40. Garcia-Mata, R., Boulter, E. & Burridge, K. The ‘invisible hand’: regulation of RHO GTPases by RHO GDis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 493–504 (2011).
41. Scita, G. *et al.* Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs. *EMBO J.* **19**, 2393–2398 (2000).
42. Liu, M., Bi, F., Zhou, X. & Zheng, Y. Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. *Trends Cell Biol.* **22**, 365–373 (2012).
43. Park, T. J., Mitchell, B. J., Abitua, P. B., Kintner, C. & Wallingford, J. B. Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nat. Genet.* **40**, 871–879 (2008).
44. Vladar, E. K. & Axelrod, J. D. Dishevelled links basal body docking and orientation in ciliated epithelial cells. *Trends Cell Biol.* **18**, 517–520 (2008).
45. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–297 (2004).
46. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* **9**, 102–114 (2008).
47. Giovannini-Chami, L. *et al.* Impact of microRNA in normal and pathological respiratory epithelia. *Methods Mol. Biol.* **741**, 171–191 (2011).
48. Song, R. *et al.* miR-34/449 miRNAs are required for motile ciliogenesis by repressing cp110. *Nature* **510**, 115–120 (2014).
49. Wu, J. *et al.* Two miRNA clusters, miR-34b/c and miR-449, are essential for normal brain development, motile ciliogenesis, and spermatogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, E2851–E2857 (2014).
50. Bravo-Cordero, J. J., Magalhaes, M. A., Eddy, R. J., Hodgson, L. & Condeelis, J. Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 405–415 (2013).
51. Sumi, T., Matsumoto, K., Takai, Y. & Nakamura, T. Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *J. Cell Biol.* **147**, 1519–1532 (1999).
52. Le Clainche, C. & Carlier, M. F. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol. Rev.* **88**, 489–513 (2008).
53. Tojkander, S., Gateva, G. & Lappalainen, P. Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles. *J. Cell Sci.* **125**, 1855–1864 (2012).
54. Niggli, V. & Rossy, J. Ezrin/radixin/moesin: versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 344–349 (2008).
55. Horani, A., Nath, A., Wasserman, M. G., Huang, T. & Brody, S. L. ROCK inhibition enhances airway epithelial basal cell proliferation and lentivirus transduction. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **49**, 341–347 (2013).
56. Ioannou, A., Santama, N. & Skourides, P. A. *Xenopus laevis* nucleotide binding protein 1 (xNubp1) is important for convergent extension movements and controls ciliogenesis via regulation of the actin cytoskeleton. *Dev. Biol.* **380**, 243–258 (2013).
57. Kim, D. *et al.* MicroRNA-34a modulates cytoskeletal dynamics through regulating RhoA/Rac1 crosstalk in chondroblasts. *J. Biol. Chem.* **287**, 12501–12509 (2012).
58. Le Brigand, K., Robbe-Sermesant, K., Mari, B. & Barbry, P. MiRonTop: mining microRNAs targets across large scale gene expression studies. *Bioinformatics* **26**, 3131–3132 (2010).
59. Clay, M. R. & Halloran, M. C. Rho activation is apically restricted by Arhgap1 in neural crest cells and drives epithelial-to-mesenchymal transition. *Development* **140**, 3198–3209 (2013).
60. Aspenstrom, P., Richnau, N. & Johansson, A. S. The diaphanous-related formin DAAM1 collaborates with the Rho GTPases RhoA and Cdc42, CIP4 and Src in regulating cell morphogenesis and actin dynamics. *Exp. Cell Res.* **312**, 2180–2194 (2006).
61. Sun, J. *et al.* Targeting the metastasis suppressor, NDRG1, using novel iron chelators: regulation of stress fiber-mediated tumor cell migration via modulation of the ROCK1/pMLC2 signaling pathway. *Mol. Pharmacol.* **83**, 454–469 (2013).
62. Hajj, R. *et al.* Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transit-amplifying cell properties. *Stem Cells* **25**, 139–148 (2007).
63. Hoh, R. A., Stowe, T. R., Turk, E. & Stearns, T. Transcriptional program of ciliated epithelial cells reveals new cilium and centrosome components and links to human disease. *PLoS One* **7**, e52166 (2012).
64. Adams, M. *et al.* A meckelin-filamin A interaction mediates ciliogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1272–1286 (2012).
65. Nakamura, F., Osborn, E., Janmey, P. A. & Stossel, T. P. Comparison of filamin A-induced cross-linking and Arp2/3 complex-mediated branching on the mechanics of actin filaments. *J. Biol. Chem.* **277**, 9148–9154 (2002).
66. Tu, Y., Wu, S., Shi, X., Chen, K. & Wu, C. Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell* **113**, 37–47 (2003).
67. Bellanger, J. M. *et al.* The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nat. Cell Biol.* **2**, 888–892 (2000).
68. Lee, C., Scherr, H. M. & Wallingford, J. B. Shroom family proteins regulate gamma-tubulin distribution and microtubule architecture during epithelial cell shape change. *Development* **134**, 1431–1441 (2007).
69. Plageman, Jr T. F. *et al.* A Trio-RhoA-Shroom3 pathway is required for apical constriction and epithelial invagination. *Development* **138**, 5177–5188 (2011).
70. Marchal, L., Luxardi, G., Thome, V. & Kodjabachian, L. BMP inhibition initiates neural induction via FGF signaling and Zic genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 17437–17442 (2009).

Acknowledgements

This work was supported by CNRS, the French Government (National Research Agency, ANR) through the ‘Investments for the Future’ LABEX SIGNALIFE (ANR-11-LABX-0028-01) and FRANCE GENOMIQUE (ANR-10-Infra-01), Région PACA (Canceropôle), CG06 and by grants from ANR (MERCi, ANR-09-GENO-039; COMMIT, ANR-11-BSV2-021; MITHRA, ANR-12-EMMA-0015-01), Vaincre la Mucoviscidose, FRM (DEQ20130326464). We thank V. Magnone, G. Rios, S. Fourré, M-J Arguel and K. LeBrigand from the IBISA Functional Genomics Platform, Sophia-Antipolis, for help with transcriptome analyses and bioinformatics, F. Brau and J. Cazareth for cellular imaging and F. Aguila for artwork. Authors in IBDM acknowledge France-BioImaging infrastructure (ANR-10-INSB-04-01, call ‘Investissements d’Avenir’) and thank the staff of the imaging platform and of the aquatic facility. This work is the object of a CNRS patent number 09/03723.

Author contributions

B.C. and O.M. performed and analysed human experiments. A.A. and D.R.R. performed and analysed *Xenopus* experiments. L.-E.Z. participated to human cell cultures and FLNA experiments. B.M., L.K. and P.B. designed and supervised the project. B.M. initiated the study, designed, planned and analysed human experiments. L.K. and A.P. designed, planned and analysed *Xenopus* experiments. B.M., L.K. and P.B. obtained fundings. B.M., P.B., L.K. and A.P. analysed and interpreted data, and wrote the paper. B.M. coordinated the project. All authors commented on the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

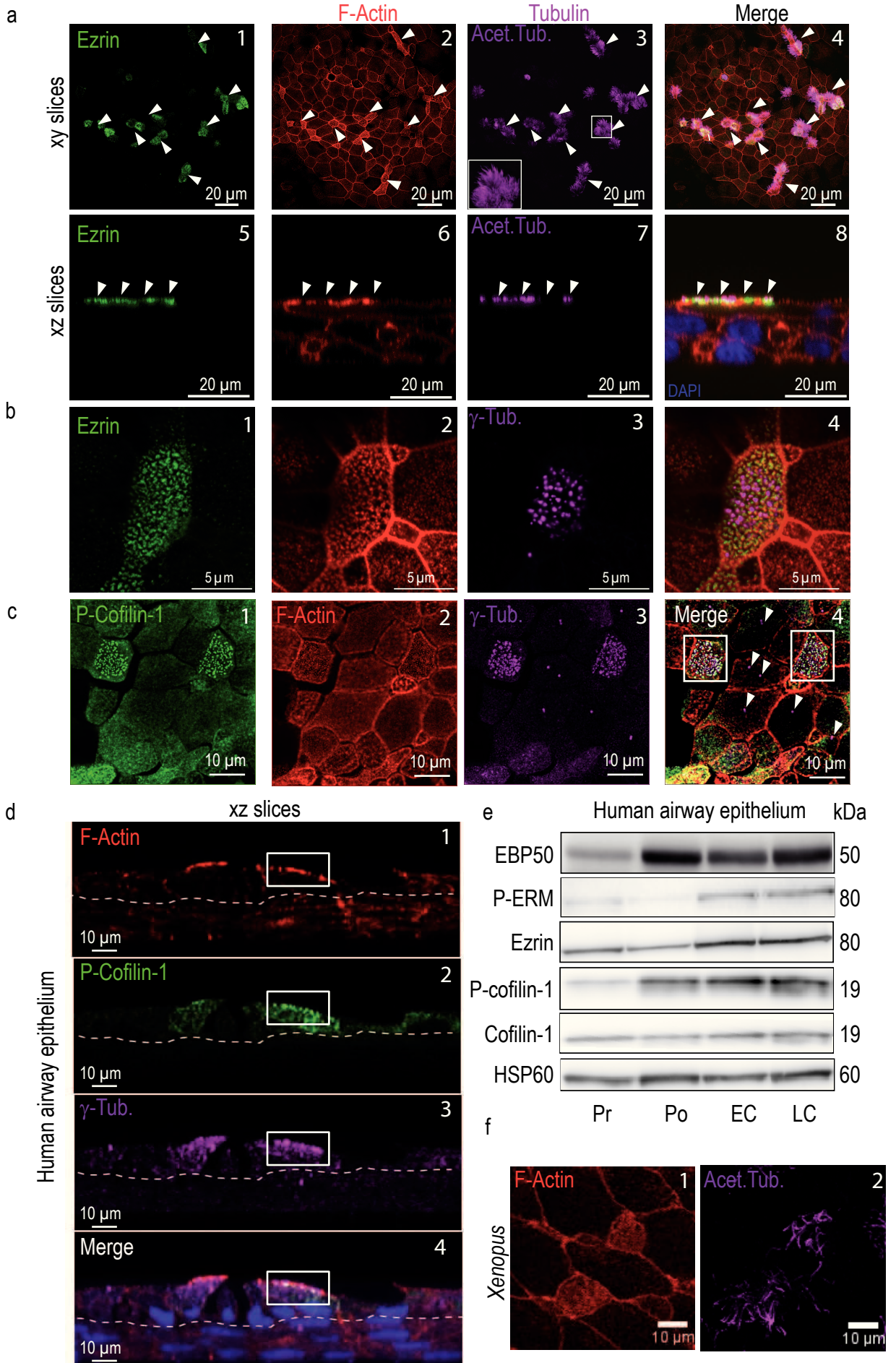
Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Chevalier, B. *et al.* miR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways. *Nat. Commun.* **6**:8386 doi: 10.1038/ncomms9386 (2015).



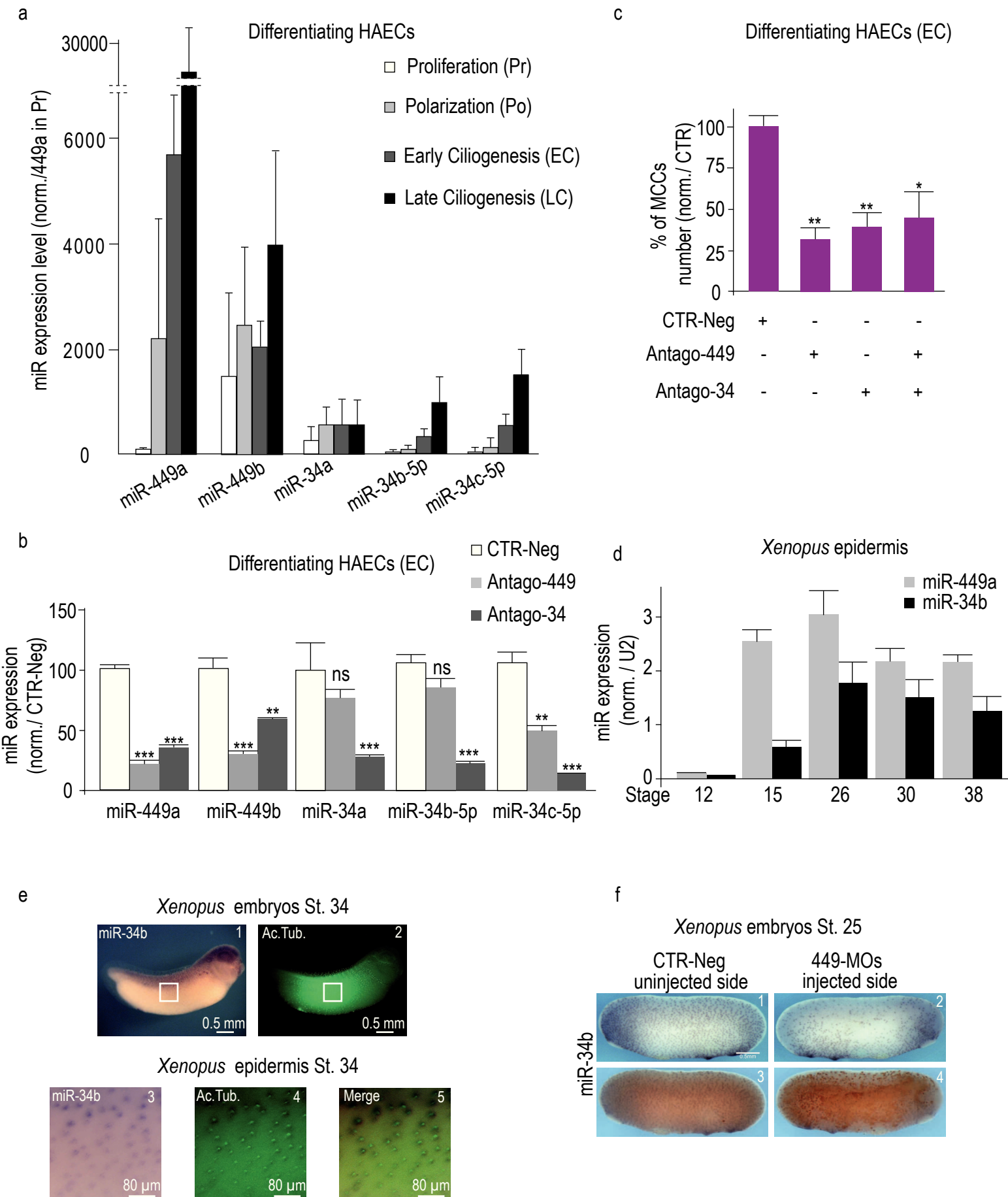
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Human airway epithelium (LC)



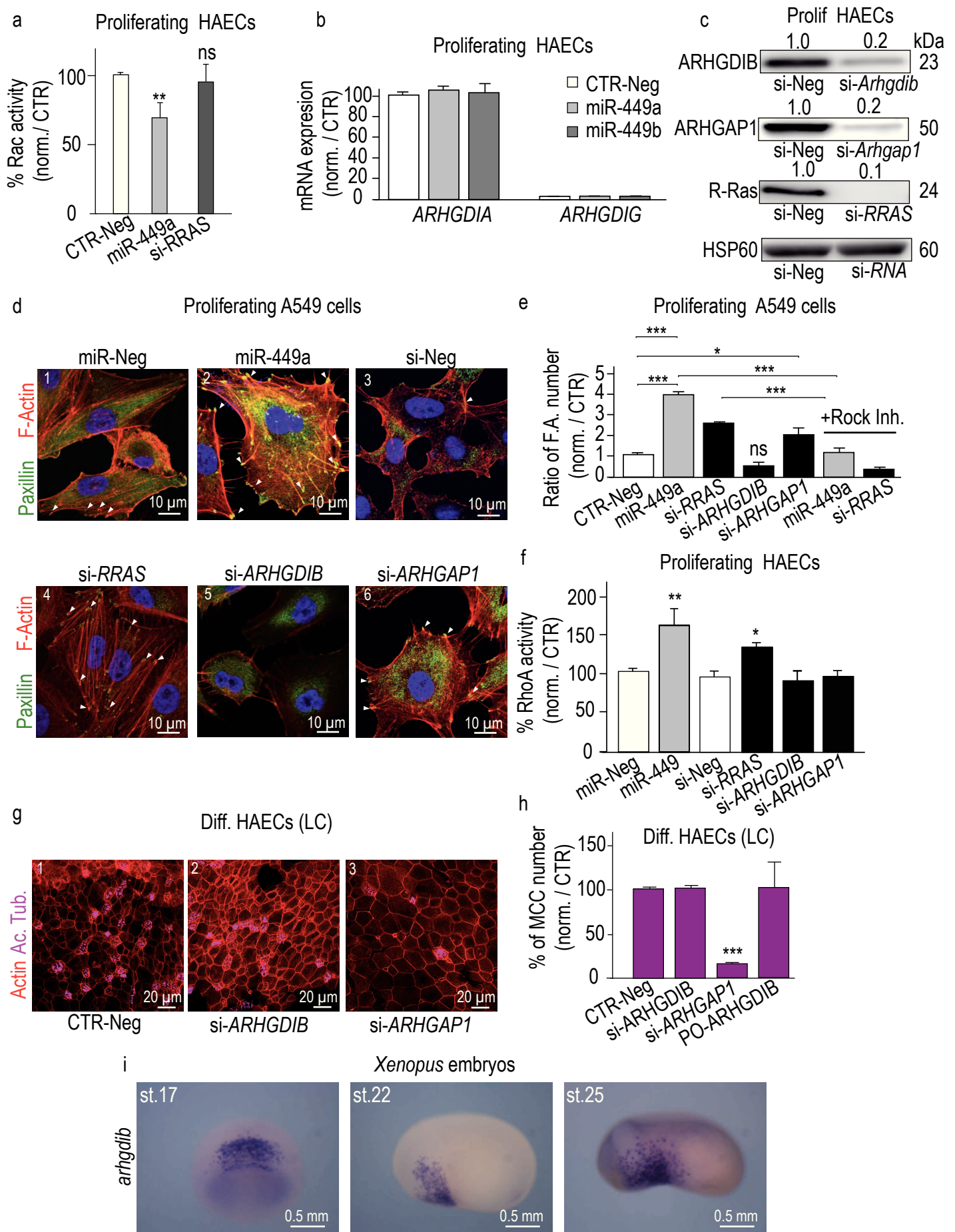
Supplementary Figure 1. Apical actin meshwork reorganization in vertebrate MCCs. (a)

Differentiated HAECs at LC stage were stained for ezrin (a1,5), F-actin (a2,6) and motile cilia (a3,7). Nuclei were stained with DAPI (a6). Panels a5-8 are orthogonal views (xz slices) of panels a1-4. In acetylated tubulin-positive MCCs denoted with white arrowheads and white framework (a3,7), F-actin is apically enriched (a2, a6) and colocalizes with ezrin staining (a1,5 and a4, 8). (b) γ -tubulin-positive basal bodies (in magenta, b3,4) colocalize with ezrin (b1) and apical F-actin (b2). (c) Differentiated HAECs at LC stage were stained for P-cofilin-1 (in green, c1,4), F-actin (in red, c2, 4) and γ -tubulin-positive basal bodies (in magenta, c3,4). P-cofilin1 co-localizes with the apical actin meshwork near basal bodies in MCCs (white framework in c4). No P-cofilin-1 signal is observed near centrioles in non-ciliated cells (white arrowheads, c4). Panels d1-4 are orthogonal views (xz slices) of differentiated HAECs at LC stage illustrating that P-cofilin-1 is enriched with the apical actin meshwork and near basal bodies in MCCs (white framework, d1-4). (e) Dynamics of the phosphorylation state of ezrin or ERM and cofilin1 and of EBP50 expression during HAEC differentiation are indicative of actin remodeling (Pr: proliferating HAECs; Po: polarization stage, ALI days 5-12; EC: early ciliogenesis, ALI days 14-21; LC: late ciliogenesis, from ALI days 28). HSP60 was used as a loading control. (f) In the epidermis of stage 25 *Xenopus* embryos, F-Actin (in red, f1) is apically enriched in acetylated tubulin-positive MCCs (in magenta, f2).



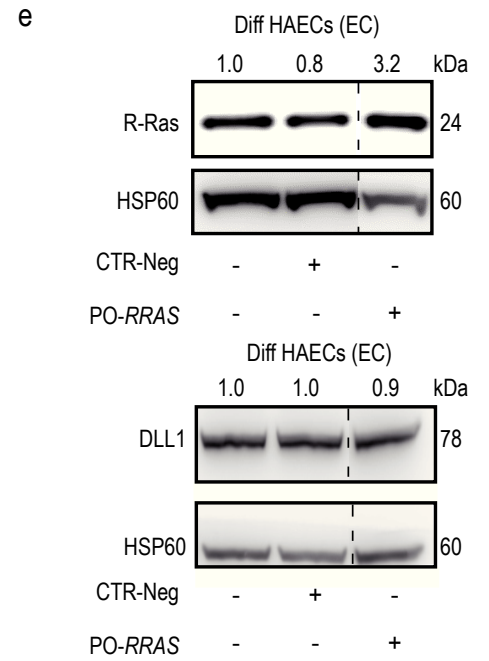
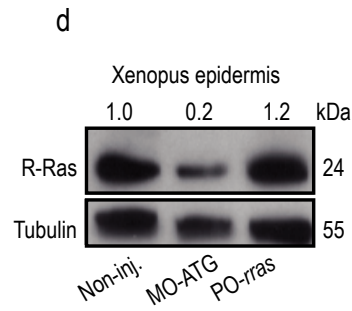
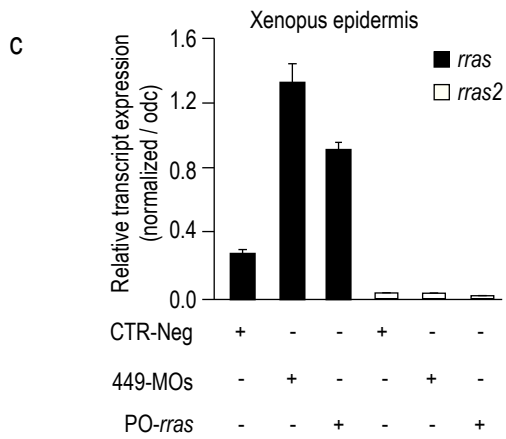
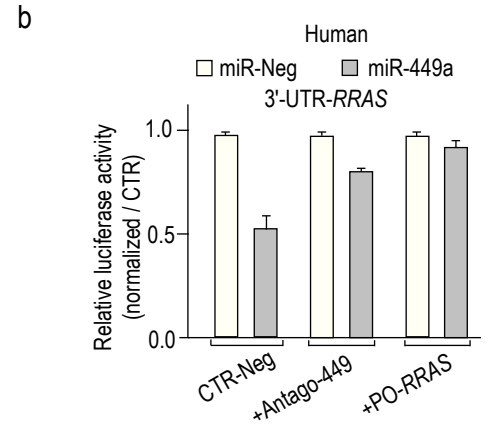
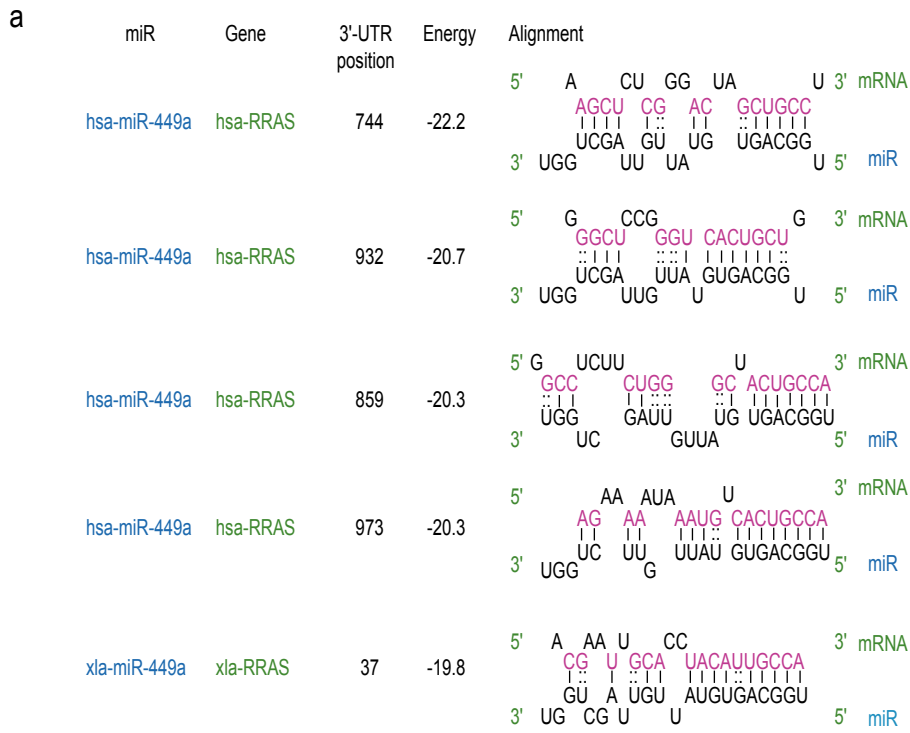
Supplementary Figure 2

Supplementary Figure 2. Role of miR-34 and miR-449 during multiciliogenesis in HAECs and Xenopus epidermis. (a) Expression level of miR-449a (1), miR-449b (2), miR-34a (3), miR-34b-5p (4) and miR-34c-5p (5) was measured by real-time PCR at the four stages of HAEC differentiation (Pr, Po, EC and LC). MiRNA levels are normalized with RNU44 and normalized to miR-449a level in Pr stage. Data represent the mean and s.d. of 3 independent experiments. (b,c) Effect of a treatment by negative control antagomiR (CTR-Neg), anti-miR-449a/b (Antago-449), anti-miR-34 (Antago-34) or an equal mixture of Antago34/449 on differentiating HAECs at EC stage. (b) The effects of Antago34 and Antago-449 versus CTR-Neg on miR-34/449 expression on differentiating HAECs at EC stage were evaluated by real-time PCR. MiRNA levels are normalized with RNU44 and normalized to miR-449a level at 100% in CTR-Neg condition. Data represent the mean and s.d. of 3 independent experiments (***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; ns : not significant; Student's t-test). (c) The histogram indicates the average percentage of MCC cell number (magenta) relative to control (means \pm s.d. from 3 donors, **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; Student's t-test). (d) Expression level of miR-449a and miR-34b (the two major members of the miR-34/449 family expressed in the Xenopus embryonic epidermis (GEO, GSE22147) at different developmental stages of Xenopus embryos. MiRNA levels are normalized with U2. Data represent the mean and s.d. of 3 independent experiments. (e) In situ hybridization of miR-34b (e1, 3) together with co-staining of MCCs with acetylated tubulin antibodies (e 2, 4) indicated that miR-34b is expressed in acetylated-positive MCCs in Xenopus embryonic epidermis and nephrostomes at stage 34. Panels e3 and e4 are enlarged views of area bounded by a white rectangle in panels e1 and e2, respectively. Panel e5 is a merged image of panels e3 and e4. (f) 449-MOs also suppress miR34b expression. 8 cell-stage Xenopus embryos were injected in the epidermis precursor blastomeres with 449-MOs and FLDx (in orange/brown, f3-4). In situ hybridization revealed that miR34b is suppressed in injected side of miR449 morphants embryos in 93% of cases whereas miR-34b is still expressed in negative control uninjected side.



Supplementary Figure 3

Supplementary Figure 3. Effects of miR-449, ARHGAP1, ARHGDIB or RRAS silencing on actin web or RhoA/Rac activity in proliferating lung epithelial cells. (a) Rac activity was measured in proliferating HAECs in response to miR-449a or si-RRAS. The histogram indicates Rac activation normalized to the control (CTR-Neg) set to 100%. (b) Transcript expression levels of ARHGDI A and ARHGDI G were analyzed using real-time RT-PCR following miR-449a/b overexpression (48h) in proliferating HAECs and normalized with UBC transcript as an internal control. (c) Proliferating HAECs were transfected with small interfering RNA (si-RNA) against transcripts of ARHGAP 1 (si-ARHGAP 1), ARHGDIB (si-ARHGDIB) or RRAS (si-RRAS) versus negative control (si-Neg). Protein levels were normalized with HSP60 as an internal control. Quantification of protein levels are indicated above each corresponding band and are representative of at least three independent experiments. (d-f) Proliferating HAECs or A549 cells were transfected for 72h with miR-Neg (d1), miR-449a (d2), si-Neg (d3), si-RRAS (d4), si-ARHGDIB (d5) or si-ARHGAP1 (d6) in absence (d) or presence (e) of a Rock inhibitor (Y27632, 10 μ M) to examine RhoA implication. Then, cells were stained for F-Actin (red), focal adhesions (anti-paxillin in green) and nuclei (DAPI in blue) (d). (e) The focal adhesion number per cell was quantified and normalized to control. (f) RhoA activity was then measured in each condition in proliferating HAECs. The histogram indicates RhoA activation normalized to the control set to 100%. (g) Differentiating HAECs were transfected at seeding time with si-Neg (g1), si-ARHGDIB (g2) or si-ARHGAP1 (g3) and F-actin (in red) and motile cilia (in magenta) were stained. (h) The histogram indicates the number of MCCs normalized in percentage from control (CTR-Neg) in HAECs at LC stage. All data are means \pm s.d. from at least three independent experiments (***, $p < 0.001$, Student's t-test). (i) In situ hybridization of *arhgdib* mRNAs on whole-mount *Xenopus* embryos at stages 17, 22 and 25, showing no expression of *arhgdib* in *Xenopus* epidermis. Staining was detectable only in blood cells.



Supplementary Figure 4

Supplementary Figure 4. (a) MiR-449 binding sites located in the 3'-UTR of Homo sapiens (hsa) or Xenopus laevis (xla) RRAS mRNA were identified in silico using “microcible” miRNA target prediction tool available on our laboratory website

(<http://www.genomique.info:8080/merge/index>). (b) Inhibition of miR-449 with Antago-449 or miR-449::RRAS protector oligonucleotides (PO-RRAS) specifically prevent miR-449 binding on RRAS 3'-UTR. miR-449a transfection in HEK293 cells strongly reduces relative luciferase activity of wild-type 3'-UTR chimeric constructs of RRAS. This effect is strongly blocked by antago-449a/b or miR-449::RRAS protector co-transfection, whereas it is not significantly affected by co-transfection with negative antagomiR or protector controls (CTR-Neg). Values were normalized to the internal Renilla Luciferase control. (c) Real-time RT-PCR expression of rras or rras2 in Xenopus embryos injected with control MO (CTR-Neg), PO-rras, or 449-MOs. Unlike rras, rras2 expression was very low and was not affected in either 449-MOs or PO-rras, indicating that only rras is a true miR-449 target in Xenopus. Transcripts levels were normalized against Odc transcript as an internal control. Error bars denotes standard deviation from three independent experiments. (d) Protecting rras mRNA against interaction with miR-449 resulted in increased levels of R-Ras protein in Xenopus. R-Ras levels in embryos injected with PO-rras were about 20% higher than in control non-injected embryos. By comparison, blocking rras translation by injection of MO-ATG-rras led to an 80% decrease in the amount of R-Ras. Embryos were injected at 1 cell stage and lysed at stage 19. Signal intensity was measured with ImageJ, using α -tubulin as an internal control. Data are representative of three independent experiments. (e) In differentiating HAECs at stage EC, protecting human RRAS mRNA against interaction with miR-449 (PO-RRAS) resulted in increased levels of R-Ras protein in comparison to treatment with negative control (CTR-Neg) but not of DLL1 protein, indicating the specificity of PO-RRAS and that RRAS is an effective miR-449 target in human. Protein levels were normalized with HSP60 as an internal control. Experiments were representative of three donors.

Figure 1e

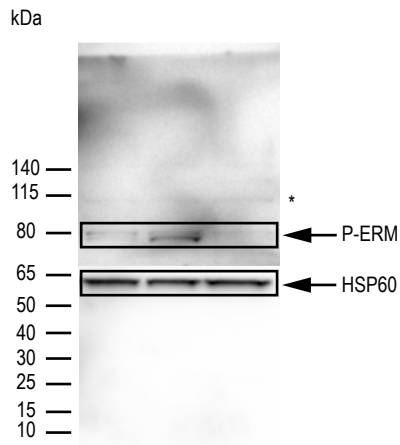


Figure 4d

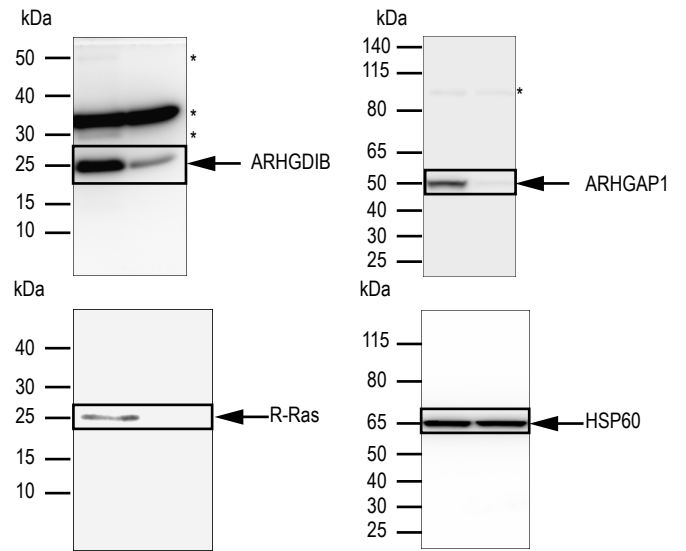
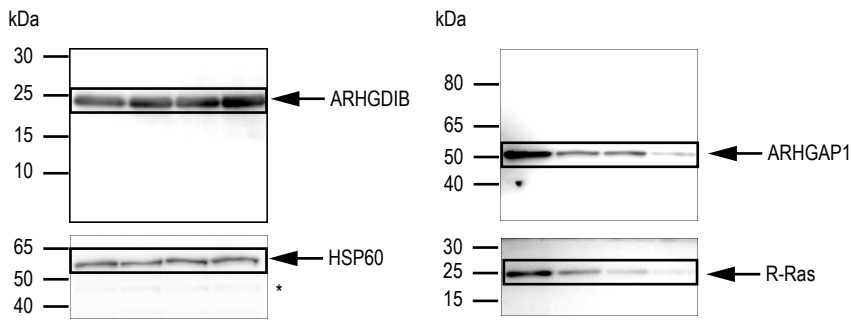


Figure 5d



Supplementary Figure 1e

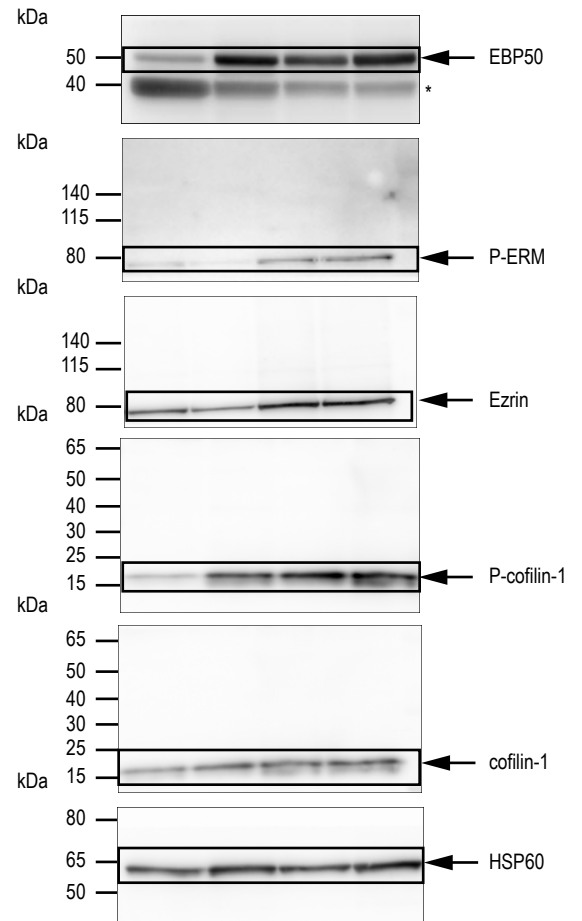
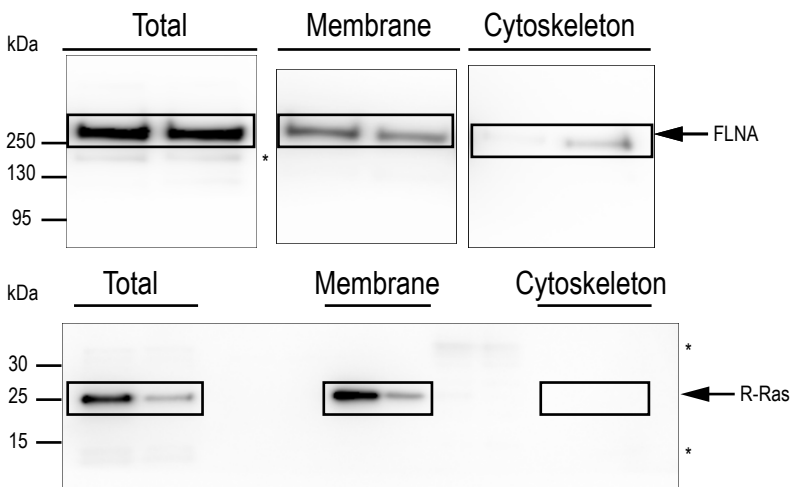
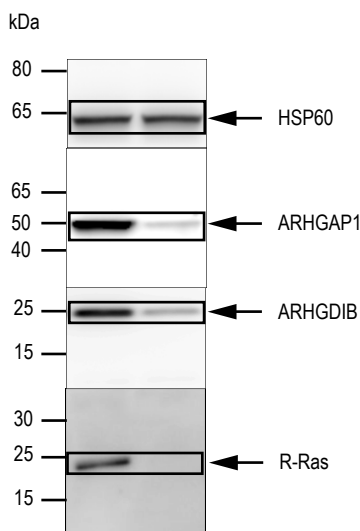


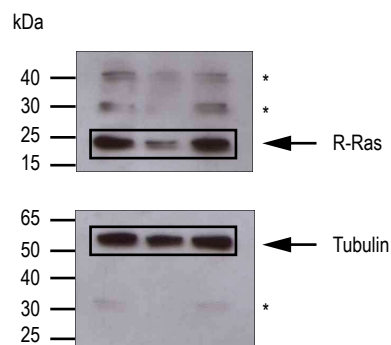
Figure 8b



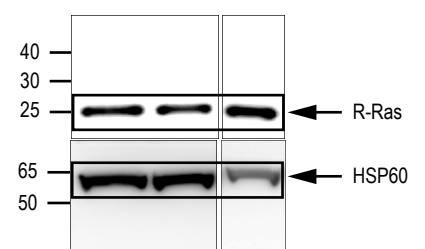
Supplementary Figure 3c



Supplementary Figure 4d



Supplementary Figure 4e



Supplementary table 1. List of Antibodies used :

Sp.	Target	Réf./clone	Manufacturer	Dilution
Ms	Acetylated-Tubulin	6-11B-1	Sigma-Aldrich	1/1000 (IF)
Ms	γ -Tubulin	GTU-88	Sigma-Aldrich	1/1000 (IF)
Ms	CD151	14A2.H1	BD biosciences	1/100 (IF)
Rb	R-Ras	C-19	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1/1000 (WB), 1/400 (IF)
Rb	Ezrin	07-130	Merck Millipore	1/1000 (WB), 1/100 (IF)
Rb	P-ERM	41A3	Cell Signaling Technology	1/1000 (WB), 1/100 (IF)
Gt	Actin	I-19	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1/5000 (WB)
Rb	ARHGAP-1	H-76	Santa Cruz Biotechnology, Inc	1/500 (IF)
Rb	ARHGDIB/RHO GDI2	Ab15198	ABCAM	1/500 (IF)
Ms	Paxillin	349/Paxillin	BD Biosciences	1/10000 (IF)
gt	HSP60		Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1/5000 (WB)
Rb	RhoA	67B9	Cell Signaling Technology	1/1000 (WB)
Rb	P-Cofilin 1	(hSer3)-R	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1/500 (WB)
Rb	Cofilin	3312	Cell Signaling Technology	1/1000 (WB)
Rb	Filamin A	HPA002925	Sigma-Aldrich	1/400 (IF), 1/1000 (WB)
Gt	DLL1	Ab85346	ABCAM	1/500 (WB)
HRP conjugate anti-Ms/Rb/Gt			Dako	Lot Dependent

COMMENTARY

 OPEN ACCESS

MicroRNAs as key regulators of GTPase-mediated apical actin reorganization in multiciliated epithelia

Olivier Mercey^{a,b}, Laurent Kodjabachian^c, Pascal Barbry^{a,b}, and Brice Marcet^{a,b}

^aCNRS-IPMC, UMR-7275, Sophia-Antipolis, France; ^bUniversity of Nice-Sophia-Antipolis (UNS), Sophia-Antipolis, France; ^cAix-Marseille Université, CNRS, IBDM UMR7288, Marseille, France

ABSTRACT

Multiciliated cells (MCCs), which are present in specialized vertebrate tissues such as mucociliary epithelia, project hundreds of motile cilia from their apical membrane. Coordinated ciliary beating in MCCs contributes to fluid propulsion in several biological processes. In a previous work, we demonstrated that microRNAs of the miR-34/449 family act as new conserved regulators of MCC differentiation by specifically repressing cell cycle genes and the Notch pathway. Recently, we have shown that miR-34/449 also modulate small GTPase pathways to promote, in a later stage of differentiation, the assembly of the apical actin network, a prerequisite for proper anchoring of centrioles-derived neo-synthesized basal bodies. We characterized several miR-34/449 targets related to small GTPase pathways including R-Ras, which represents a key and conserved regulator during MCC differentiation. Direct *RRAS* repression by miR-34/449 is necessary for apical actin meshwork assembly, notably by allowing the apical relocalization of the actin binding protein Filamin-A near basal bodies. Our studies establish miR-34/449 as central players that orchestrate several steps of MCC differentiation program by regulating distinct signaling pathways.

ARTICLE HISTORY

Received 22 December 2015
Revised 22 January 2016
Accepted 29 January 2016

KEYWORDS

actin network; airway epithelium; microRNAs; miR-34/449; miR-34; miR-449; Motile cilia; multiciliated cells; small GTPase; *Xenopus* larval skin

To date, the small GTPase superfamily encompasses 5 major subfamilies: Ras, Rho, Rab, Arf/Arl, and Ran, on the basis of sequence and function similarities.¹ Small GTPases are monomeric G proteins acting as GDP/GTP-regulated molecular switches. They represent versatile spatio-temporal regulators which activity is controlled by GTP binding and hydrolysis. Their activity is finely modulated by numerous molecular actors to mediate crosstalk between key signaling pathways implicated in several biological functions, such as cell proliferation, differentiation, cell shape, membrane- and cytoskeleton-related cellular processes.^{1,2} A growing body of work has highlighted the roles of various small GTPases in cilia formation and function, as well as in ciliopathies.^{3–9}

Cilia are microtubule-based membrane projections found in most eukaryotic cells, which play important roles in locomotion, fluid transport, and sensory perception.¹⁰ The primary cilium is a single non-motile cilium that functions as a cell antenna to perceive chemical or mechanical cues. In contrast, the motile cilium forms a micrometer-scale whip-like organelle found either as a single cilium per cell (nodal cilium or flagellum on sperm for instance) or up to hundreds at the surface of specialized cells, named multiciliated cells (MCCs). In all vertebrates,

MCCs line the luminal surface of some tissues such as the airways, the cerebral ventricles, the oviducts and the efferent ducts of testis.^{10–13} More species-specific instances of MCCs are represented by the embryonic epidermis of amphibians, the olfactory placodes of fish and the pronephros of both amphibians and fish.^{14–18} The coordinated beating of motile cilia allows the evacuation from airways of inhaled particles trapped in mucus, the circulation of the cerebrospinal fluid or the progression of the embryo along the genital tract.¹³ Any dysfunction or reduction of the number of motile cilia can cause or worsen the symptoms of many diseases such as ciliopathies (e.g. primary ciliary dyskinesia) or chronic respiratory diseases (e.g. cystic fibrosis, asthma or chronic obstructive pulmonary disease).^{19–21} The formation of multiple motile cilia (a process called multiciliogenesis) occurs during embryonic development or regeneration of some specialized epithelia. It involves multiple events including: (1) cell cycle exit, (2) acquisition of the MCC identity under the control of both the BMP (bone morphogenetic protein) and Notch signaling pathways, (3) reorganization of the apical actin network, (4) massive multiplication of centrioles, which then migrate and anchor in the apical actin meshwork to become basal bodies, and finally, (5) each basal body at

CONTACT Brice Marcet  marcet@ipmc.cnrs.fr  660 Route des Lucioles, F06560, Sophia-Antipolis, Valbonne, France.

Color versions of one or more of the figures in this article can be found online at www.tandfonline.com/ksqt.

Commentary to: Chevalier B, Adamiok A, Mercey O, Revinski DR, Zaragosi LE, Pasini A, Kodjabachian L, Barbry P, Marcet B. miR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways. *Nat Commun* 2015; 6:8386; PMID:26381333; <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms9386>

© 2016 Olivier Mercey, Laurent Kodjabachian, Pascal Barbry, and Brice Marcet. Published with license by Taylor & Francis.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The moral rights of the named author(s) have been asserted.

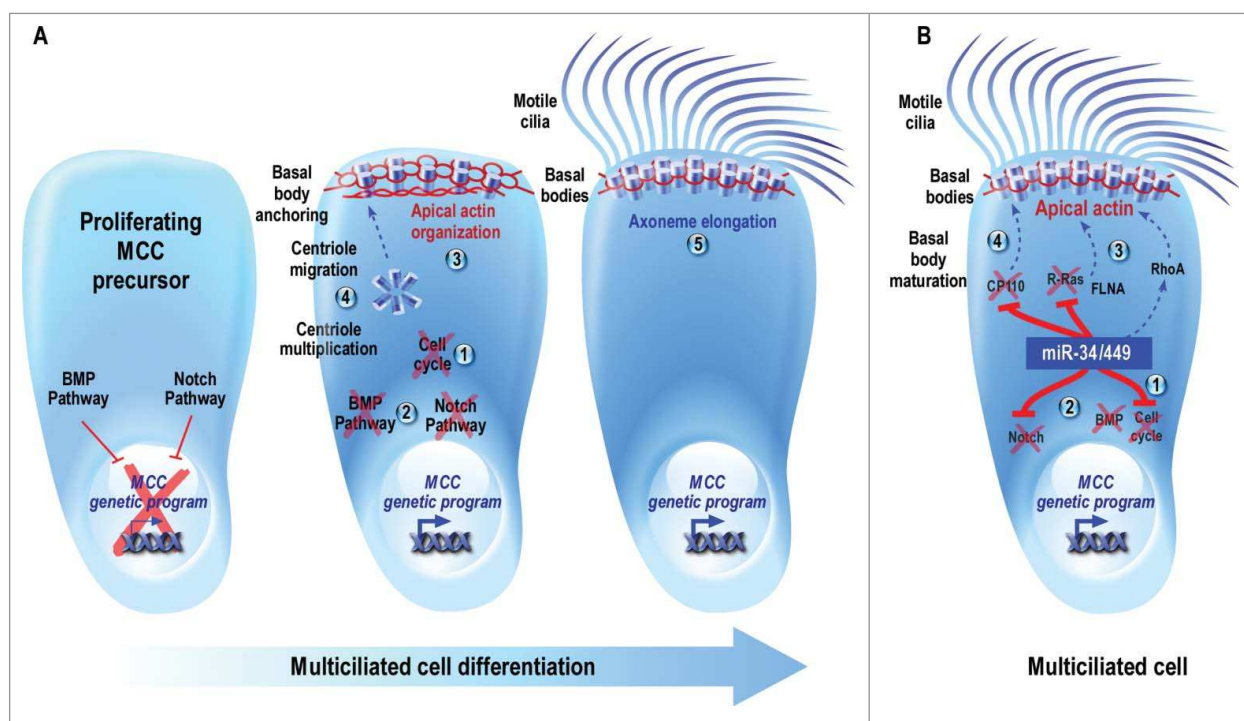


Figure 1. (A) Schematic description of multiciliogenesis. Proliferating MCC precursors must undergo (1) cell cycle exit followed by (2) the inhibition of BMP and Notch pathways, 2 early events required for the entry into MCC differentiation. (3) In maturing MCCs, the apical actin cytoskeleton is reorganized into a dense cortical meshwork. (4) In addition, a massive multiplication of centrioles occurs, followed by their migration toward the apical membrane, where they mature and anchor to the actin meshwork to form ciliary organizing centers known as basal bodies. (5) Finally, MCC maturation is achieved through the elongation of axonemes from basal bodies to form multiple motile cilia. These motile cilia subsequently orient and beat in a coordinated manner to generate robust directional fluid flow at the surface of the epithelium. (B) Model illustrating the conserved roles of miR-34/449 during vertebrate MCC differentiation. The specific expression of miR-34/449 in immature MCCs allows (1) the exit from the cell cycle and (2) the entry into differentiation through the direct repression of the Notch pathway. As a result, the MCC genetic program is triggered. As miR-34/449 expression is itself repressed by the activation of the Notch signaling, these miRNAs accumulate in maturing MCCs, thus maintaining a double negative feedback loop. Then, miR-34/449 can regulate subsequent steps such as (3) the reorganization of the apical actin network, by directly repressing R-Ras, modulating the RhoA activity, and allowing the apical relocalization of FLNA, and (4) basal body maturation by directly repressing CP110. Plain lines indicate direct interactions; dotted lines identify pathways that may or may not be direct.

the base of each cilium act as microtubule organizing center from which an axoneme elongates (Fig. 1A).^{8,10,22-24}

Several key regulators of multiciliogenesis have been identified so far, such as the transcription factors FoxJ1 (Forkhead box protein J1), MYB, some members of the RFX family (regulatory factor X),^{25,26} the geminin-related nuclear protein Multicilin,²⁷ Grainyhead-like 2 (Grhl2)²⁸ or cyclin O (CCNO).²⁹ It is also well known that an early inhibition of the Notch pathway drives vertebrate MCC differentiation.^{22,23,30} In a recent work, we showed that inhibition of BMP signaling is an additional early event required to trigger MCC differentiation in the *Xenopus* embryonic epidermis and in regenerating human airway primary cultures.²⁴ Using these 2 models, we also established a link between multiciliogenesis, the Notch pathway and the miR-34/449 superfamily of microRNAs (miRNAs or miR).^{8,22,30} MiRNAs belong to a class of small single-stranded and non-coding

regulatory RNAs that control many biological processes by limiting the stability or the translation of their target mRNAs.³¹ Based on their strong conservation in vertebrates, their high sequence homology and their common targets, miR-34 and miR-449 can be classified into a single miR-34/449 superfamily. Members of the miR-34 family have been detected in MCCs from invertebrates to vertebrates, while the miR-449 family appears restricted to vertebrate MCCs.^{8,14,22,32-35} Our previous data established miR-34/449 miRNAs as new key regulators of vertebrate multiciliogenesis that directly repress the cell cycle and the Notch pathway, 2 early events required for MCC differentiation.²² Our findings have been confirmed in 2 studies showing that miR-34/449-knockout mice display multiciliogenesis defects, causing altered mucociliary clearance, respiratory distress and post-natal lethality.^{32,33} Our own work also revealed a double negative feedback loop between Notch and miR-

449: miR-449 represses Notch activity, which in return enhances miR-449 expression.^{8,22} This feedback loop allows the accumulation of miR-34/449 molecules in maturing MCCs, providing an opportunity for them to repress additional targets at later stages of multiciliogenesis. Consistent with our hypothesis, Song and colleagues proposed that the centriolar protein CP110 represents a late target of miR-34/449 that should be suppressed to allow basal body maturation.³²

Another important prerequisite for basal body docking during multiciliogenesis is the apical actin meshwork reorganization, a process controlled by several factors including FoxJ1,^{9,36,37} Multicilin,²⁷ the ERK7 mitogen-activated protein kinase³⁸ and the small GTPase RhoA (Ras homolog family member A).⁹ Focal adhesion proteins are also required for the interaction between basal bodies and the apical actin network during multiciliogenesis.³⁹ GTPases of the RHO family such as RhoA interact with different effectors to control actin cytoskeleton formation in a wide range of cellular processes.⁴⁰ For instance, Rho GTPase signaling could interact with the planar cell polarity pathway to regulate the assembly of apical actin filaments, as well as the docking and planar polarization of the basal bodies in MCCs.⁴¹ The action of small GTPases on actin cytoskeletal dynamics is regulated by a complex network of interactions with additional GTPases, such as the Ras family member R-Ras,⁴² and other regulatory factors including guanine nucleotide exchange factors (GEFs), GTPase-activating proteins (GAPs) and GDP-dissociation inhibitors (GDIs)^{43,44} as well as miRNAs.⁴⁵ In that context, we have demonstrated that miR-34/449 control apical actin meshwork formation during multiciliogenesis by acting on small GTPase pathways.⁸ On the one hand, miR-34/449 silencing blocks the formation of both apical actin network and motile cilia in human airway epithelium and frog epidermis, although RhoA activity remains detectable. On the other hand, the expression of miR-34/449 in human respiratory cells increased the formation of actin stress fibers, focal adhesion and RhoA activity, in a Notch pathway independent manner (Fig. 1B). We therefore hypothesized that apical actin network reorganization during multiciliogenesis is controlled by additional miR-34/449 targets, independent of the Notch pathway and possibly acting downstream or in parallel to RhoA.⁸ Accordingly, we identified and validated several additional miR-34/449 transcript targets related to small GTPase pathways including *ARHGAP1*, *ARHGDIB*, and *RRAS* which encodes ARHGAP1, RhoGDI2 and R-Ras, respectively. In human airway epithelium, expression of *ARHGAP1*, *ARHGDIB*, and *RRAS* was restricted to basal cells and was specifically down-regulated at both transcript and protein levels during MCC

differentiation in response to miR-34/449 expression. Silencing of *ARHGAP1* or *RRAS* using siRNAs (small interfering RNA) at an early stage of differentiation affected both apical actin remodeling and multiciliogenesis. RhoA activity was increased by *RRAS* silencing but was unaffected by *ARHGAP1* or *ARHGDIB* silencing. Thus, the induction of RhoA activity by miR-34/449 may at least in part involve the silencing of *RRAS*, notwithstanding possible contributions by additional regulators. Incidentally, these observations suggested that *ARHGAP1* and R-Ras are probably necessary at early stages of multiciliogenesis. The absence of effect of *ARHGAP1* and *ARHGDIB* silencing on RhoA activity is probably in line with the existence of redundant or compensatory mechanisms controlling RhoA activity in the context of multiciliogenesis. During *Xenopus* MCC differentiation, *rras* was expressed in inner layer epidermal cells that were negative for MCC markers and in an anti-correlated manner with miR-34/449. Furthermore, the pattern of expression of both *arhgap1* and *arhgdib* was not consistent with a link to multiciliogenesis in *Xenopus*. Taken together, these observations indicated that R-Ras could be a *bona fide* target, conserved from amphibian to human and contributing to the formation of the apical actin network during multiciliogenesis. In both species, the specific blockade of miR-34/449 binding to the *RRAS* transcripts using protector oligonucleotides suppressed the apical actin network reorganization and multiciliogenesis, whereas RhoA activation at the apical surface was still detectable, thus mimicking the effects obtained by miR-34/449 inhibition. Importantly, *RRAS* silencing was able to restore apical actin network formation and multiciliogenesis in *Xenopus* embryos protected against the action of miR-34/449.

R-Ras has been reported to interact with Filamin A (FLNA), an actin-binding protein involved in actin cytoskeleton remodeling, with the Rho signaling pathway, and could regulate basal body positioning through its interaction with Meckelin.⁴⁶⁻⁵⁰ MiR-34/449 expression in maturing MCCs caused the apical relocalization of FLNA in the vicinity of basal bodies. This step may be important for stabilizing the apical actin network, which is an essential prerequisite for basal body anchoring. Collectively, our findings indicate that miR-34/449 control vertebrate MCC differentiation by successively *i*) inducing cell cycle arrest, *ii*) directly repressing the Notch pathway, *iii*) promoting the apical actin network reorganization through R-Ras silencing and RhoA pathway modulation (Fig. 1B).

Our works, together with others, illustrate the intricate role played by the miR-34/449 superfamily in coordinating a complex differentiation program and open up new perspectives for the study of ciliopathies etiology.

The elucidation of mechanisms governing multiciliogenesis may allow the emergence of more specific therapeutic strategies for treating diseases associated with ciliary disorders.

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Funding

Our works are supported by CNRS, the French Government (National Research Agency, ANR) through the “Investments for the Future” LABEX SIGNALIFE (ANR-11-LABX-0028-01) and FRANCE GENOMIQUE (ANR-10-INBS-09-03 and ANR-10-INBS-09-02), with supports from the Canceropôle PACA, and by grants from ANR (MITHRA, ANR-12-EMMA-0015-01), Vaincre la Mucoviscidose, and FRM (DEQ20130326464).

References

- [1] Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 2005; 118:843-6; PMID:15731001; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.016660>
- [2] Burrige K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell* 2004; 116:167-79; PMID:14744429; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00003-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00003-0)
- [3] Deretic D. Crosstalk of Arf and Rab GTPases en route to cilia. *Small GTPases* 2013; 4:70-7; PMID:23567335; <http://dx.doi.org/10.4161/sgtp.24396>
- [4] Zhang Q, Hu J, Ling K. Molecular views of Arf-like small GTPases in cilia and ciliopathies. *Exp Cell Res* 2013; 319:2316-22; PMID:23548655; <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.03.024>
- [5] Epting D, Slanchev K, Boehlke C, Hoff S, Loges NT, Yasunaga T, Indorf L, Nestel S, Lienkamp SS, Omran H, et al. The Rac1 regulator ELMO controls basal body migration and docking in multiciliated cells through interaction with Ezrin. *Development* 2015; 142:1553; PMID:25852201; <http://dx.doi.org/10.1242/dev.124214>
- [6] Li Y, Hu J. Small GTPases and cilia. *Protein Cell* 2011; 2:13-25; PMID:21337006; <http://dx.doi.org/10.1007/s13238-011-1004-7>
- [7] Li Y, Ling K, Hu J. The emerging role of Arf/Arl small GTPases in cilia and ciliopathies. *J Cell Biochem* 2012; 113:2201-7; PMID:22389062; <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.24116>
- [8] Chevalier B, Adamiok A, Mercey O, Revinski DR, Zaragosi LE, Pasini A, Kodjabachian L, Barbry P, Marcet B. miR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways. *Nat Commun* 2015; 6:8386; PMID:26381333; <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms9386>
- [9] Pan J, You Y, Huang T, Brody SL. RhoA-mediated apical actin enrichment is required for ciliogenesis and promoted by Foxj1. *J Cell Sci* 2007; 120:1868-76; PMID:17488776; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.005306>
- [10] Brooks ER, Wallingford JB. Multiciliated cells. *Curr Biol* 2014; 24:R973-82; PMID:25291643; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.047>
- [11] Takeda S, Narita K. Structure and function of vertebrate cilia, towards a new taxonomy. *Differentiation* 2012; 83:S4-11; PMID:22118931; <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2011.11.002>
- [12] Kirchoff C, Osterhoff C, Samalecos A. HE6/GPR64 adhesion receptor co-localizes with apical and subapical F-actin scaffold in male excurrent duct epithelia. *Reproduction* 2008; 136:235-45; PMID:18469038; <http://dx.doi.org/10.1530/REP-08-0078>
- [13] Fliegauf M, Benzing T, Omran H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:880-93; PMID:17955020; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2278>
- [14] Wang L, Fu C, Fan H, Du T, Dong M, Chen Y, Jin Y, Zhou Y, Deng M, Gu A, et al. miR-34b regulates multiciliogenesis during organ formation in zebrafish. *Development* 2013; 140:2755-64; PMID:23698347; <http://dx.doi.org/10.1242/dev.092825>
- [15] Hansen A, Zeiske E. The peripheral olfactory organ of the zebrafish, *Danio rerio*: an ultrastructural study. *Chem Senses* 1998; 23:39-48; PMID:9530968; <http://dx.doi.org/10.1093/chemse/23.1.39>
- [16] Dubaissi E, Papalopulu N. Embryonic frog epidermis: a model for the study of cell-cell interactions in the development of mucociliary disease. *Dis Model Mech* 2011; 4:179-92; PMID:21183475; <http://dx.doi.org/10.1242/dmm.006494>
- [17] Malicki J, Avanesov A, Li J, Yuan S, Sun Z. Analysis of cilia structure and function in zebrafish. *Methods Cell Biol* 2011; 101:39-74; PMID:21550439; <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387036-0.00003-7>
- [18] Wessely O, Tran U. *Xenopus* pronephros development—past, present, and future. *Pediatr Nephrol* 2011; 26:1545-51; PMID:21499947; <http://dx.doi.org/10.1007/s00467-011-1881-2>
- [19] Livraghi A, Randell SH. Cystic fibrosis and other respiratory diseases of impaired mucus clearance. *Toxicol Pathol* 2007; 35:116-29; PMID:17325980; <http://dx.doi.org/10.1080/01926230601060025>
- [20] Boon M, Wallmeier J, Ma L, Loges NT, Jaspers M, Olbrich H, Dougherty GW, Raidt J, Werner C, Amirav I, et al. MCIDAS mutations result in a mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat Commun* 2014; 5:4418; PMID:25048963; <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5418>
- [21] Wallmeier J, Al-Mutairi DA, Chen CT, Loges NT, Pennekamp P, Menchen T, Ma L, Shamseldin HE, Olbrich H, Dougherty GW, et al. Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat Genet* 2014; 46:646-51; PMID:24747639; <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2961>
- [22] Marcet B, Chevalier B, Luxardi G, Coraux C, Zaragosi LE, Cibois M, Robbe-Sermesant K, Jolly T, Cardinaud B, Moreilhon C, et al. Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat Cell Biol* 2011; 13:693-9; PMID:21602795; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2358>
- [23] Deblandre GA, Wettstein DA, Koyano-Nakagawa N, Kintner C. A two-step mechanism generates the spacing pattern of the ciliated cells in the skin of *Xenopus* embryos. *Development* 1999; 126:4715-28; PMID:10518489.

- [24] Cibois M, Luxardi G, Chevalier B, Thome V, Mercey O, Zaragosi LE, Barbry P, Pasini A, Marcet B, Kodjabachian L. BMP signalling controls the construction of vertebrate mucociliary epithelia. *Development* 2015; 142:2352-63; PMID:26092849; <http://dx.doi.org/10.1242/dev.118679>
- [25] Jerber J, Thomas J, Durand B. [Transcriptional control of ciliogenesis in animal development]. *Biol Aujourdhui* 2012; 206:205-18; PMID:23171843; <http://dx.doi.org/10.1051/jbio/2012023>
- [26] Tan FE, Vladar EK, Ma L, Fuentealba LC, Hoh R, Espinoza FH, Axelrod JD, Alvarez-Buylla A, Stearns T, Kintner C, et al. Myb promotes centriole amplification and later steps of the multiciliogenesis program. *Development* 2013; 140:4277-86; PMID:24048590; <http://dx.doi.org/10.1242/dev.094102>
- [27] Stubbs JL, Vladar EK, Axelrod JD, Kintner C. Multicilin promotes centriole assembly and ciliogenesis during multiciliate cell differentiation. *Nat Cell Biol* 2012; 14:140-7; PMID:22231168; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2406>
- [28] Gao X, Bali AS, Randell SH, Hogan BL. GRHL2 coordinates regeneration of a polarized mucociliary epithelium from basal stem cells. *J Cell Biol* 2015; 211(3):669-82.
- [29] Funk MC, Bera AN, Menchen T, Kualess G, Thriene K, Lienkamp SS, Dengjel J, Omran H, Frank M, Arnold SJ. Cyclin O (Ccno) functions during deuterosome-mediated centriole amplification of multiciliated cells. *EMBO J* 2015; 34:1078-89; PMID:25712475; <http://dx.doi.org/10.15252/embj.201490805>
- [30] Marcet B, Chevalier B, Coraux C, Kodjabachian L, Barbry P. MicroRNA-based silencing of Delta/Notch signaling promotes multiple cilia formation. *Cell Cycle* 2011; 10:2858-64; PMID:21857154; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.10.17.17011>
- [31] Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 2008; 132:9-14; PMID:18191211; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.024>
- [32] Song R, Walentek P, Sponer N, Klimke A, Lee JS, Dixon G, Harland R, Wan Y, Lishko P, Lize M, et al. miR-34/449 miRNAs are required for motile ciliogenesis by repressing cp110. *Nature* 2014; 510:115-20; PMID:24899310; <http://dx.doi.org/10.1038/nature13413>
- [33] Wu J, Bao J, Kim M, Yuan S, Tang C, Zheng H, Mastick GS, Xu C, Yan W. Two miRNA clusters, miR-34b/c and miR-449, are essential for normal brain development, motile ciliogenesis, and spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111:E2851-7; PMID:24982181; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1407777111>
- [34] Comazzetto S, Di Giacomo M, Rasmussen KD, Much C, Azzi C, Perlas E, Morgan M, O'Carroll D. Oligoasthenozoospermia and infertility in mice deficient for miR-34b/c and miR-449 loci. *PLoS Genet* 2014; 10:e1004597; PMID:25329700; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004597>
- [35] Christodoulou F, Raible F, Tomer R, Simakov O, Trachana K, Klaus S, Snyman H, Hannon GJ, Bork P, Arendt D. Ancient animal microRNAs and the evolution of tissue identity. *Nature* 2010; 463:1084-8; PMID:20118916; <http://dx.doi.org/10.1038/nature08744>
- [36] Gomperts BN, Gong-Cooper X, Hackett BP. Foxj1 regulates basal body anchoring to the cytoskeleton of ciliated pulmonary epithelial cells. *J Cell Sci* 2004; 117:1329-37; PMID:14996907; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00978>
- [37] Huang T, You Y, Spoor MS, Richer EJ, Kudva VV, Paige RC, Seiler MP, Liebler JM, Zabner J, Plopper CG, et al. Foxj1 is required for apical localization of ezrin in airway epithelial cells. *J Cell Sci* 2003; 116:4935-45; PMID:14625387; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00830>
- [38] Miyatake K, Kusakabe M, Takahashi C, Nishida E. ERK7 regulates ciliogenesis by phosphorylating the actin regulator CapZIP in cooperation with Dishevelled. *Nat Commun* 2015; 6:6666; PMID:25823377; <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms7666>
- [39] Antoniadis I, Stylianou P, Skourides PA. Making the connection: ciliary adhesion complexes anchor basal bodies to the actin cytoskeleton. *Dev Cell* 2014; 28:70-80; PMID:24434137; <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2013.12.003>
- [40] Guilluy C, Garcia-Mata R, Burrridge K. Rho protein crosstalk: another social network? *Trends Cell Biol* 2011; 21:718-26; PMID:21924908; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2011.08.002>
- [41] Park TJ, Mitchell BJ, Abitua PB, Kintner C, Wallingford JB. Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nat Genet* 2008; 40:871-9; PMID:18552847; <http://dx.doi.org/10.1038/ng.104>
- [42] Jeong HW, Nam JO, Kim IS. The COOH-terminal end of R-Ras alters the motility and morphology of breast epithelial cells through Rho/Rho-kinase. *Cancer Res* 2005; 65:507-15; PMID:15695393.
- [43] Boulter E, Garcia-Mata R. RhoGDI: A rheostat for the Rho switch. *Small Gtpases* 2010; 1:65-8; PMID:21686121; <http://dx.doi.org/10.4161/srgtp.1.1.12990>
- [44] Garcia-Mata R, Boulter E, Burrridge K. The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12:493-504; PMID:21779026; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3153>
- [45] Liu M, Bi F, Zhou X, Zheng Y. Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. *Trends Cell Biol* 2012; 22:365-73; PMID:22572609; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2012.04.004>
- [46] Adams M, Simms RJ, Abdelhamed Z, Dawe HR, Szymanska K, Logan CV, Whewey G, Pitt E, Gull K, Knowles MA, et al. A meckelin-filamin A interaction mediates ciliogenesis. *Hum Mol Genet* 2012; 21:1272-86; PMID:22121117; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddr557>
- [47] Gawecka JE, Griffiths GS, Ek-Rylander B, Ramos JW, Matter ML. R-Ras regulates migration through an interaction with filamin A in melanoma cells. *PLoS One* 2010; 5:e11269; PMID:20585650; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011269>
- [48] Griffiths GS, Grundl M, Allen JS, 3rd, Matter ML. R-Ras interacts with filamin a to maintain endothelial barrier function. *J Cell Physiol* 2011; 226:2287-96; PMID:21660952; <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.22565>
- [49] Bellanger JM, Astier C, Sardet C, Ohta Y, Stossel TP, Debant A. The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nat Cell Biol* 2000; 2:888-92; PMID:11146652; <http://dx.doi.org/10.1038/35046533>
- [50] Shaker X, Cancelas JA, Li L, Guo F, Liu W, Johnson JF, Ficker A, Daria D, Geiger H, Ratner N, et al. R-Ras and Rac GTPase cross-talk regulates hematopoietic progenitor cell migration, homing, and mobilization. *J Biol Chem* 2011; 286:24068-78; PMID:21572048; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.226951>

Des microARN au cœur de la fabrication de cils motiles

Olivier Mercey^{1,2}, Benoît Chevalier^{1,2}, Laurent Kodjabachian³, Pascal Barbry^{1,2}, Brice Marcet^{1,2}

¹ CNRS, institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire, UMR7275, Sophia-Antipolis, F06560, France ;

² Université de Nice-Sophia-Antipolis, 660, route des Lucioles, F-06560 Sophia-Antipolis, France

³ Aix-Marseille Université, CNRS, UMR7288, institut de biologie du développement de Marseille, F13288 Marseille, France.

barbry@ipmc.cnrs.fr

marcet@ipmc.cnrs.fr

Le cil, organite cellulaire conservé chez de nombreux eucaryotes, est un prolongement membranaire constitué de microtubules et doté de fonctions sensorielles et/ou locomotrices particulières [1]. On distingue le cil primaire, non-motile et présent dans la plupart des types cellulaires, du cil motile qui est présent en un unique exemplaire dans des cellules « monociliées », et jusqu'à plusieurs centaines dans des cellules dites « multiciliées » (→). Chez les vertébrés, ces cellules multiciliées bordent la surface de certains tissus comme les voies respiratoires, les ventricules cérébraux, le tractus génital féminin, les placodes¹ olfactives du poisson zèbre ou encore l'épiderme d'embryon de grenouille [2, 3]. Grâce au battement coordonné des cils motiles, les cellules multiciliées jouent un rôle important dans divers processus physiologiques comme l'évacuation, par l'épithélium respiratoire, des particules inhalées piégées dans le mucus, la circulation du liquide céphalo-rachidien ou la progression de l'embryon dans le tractus génital [2]. Un dysfonctionnement ou une diminution du nombre de ces cils motiles peut être la cause ou aggraver les symptômes de nombreuses pathologies telles que des ciliopathies (comme les dyskinesies ciliaires touchant le système respiratoire) ou des maladies respiratoires chroniques (comme la mucoviscidose,

(→) Voir le numéro thématique « Cils primaires et ciliopathies », m/s n° 11, novembre 2014

l'asthme ou les broncho-pneumopathies chroniques obstructives) [2]. La fabrication de multiples cils motiles par les cellules multiciliées (processus appelé multiciliogénèse) intervient au cours du développement embryonnaire, ainsi que lors de la régénération de certains épithéliums spécialisés. Elle nécessite plusieurs étapes clés successives : (1) la sortie du cycle cellulaire, (2) l'acquisition de l'identité « cellule multiciliée » sous le contrôle des voies de signalisation Notch et BMP (*bone morphogenetic protein*), (3) la réorganisation du réseau apical d'actine, (4) la multiplication massive de centrioles, qui vont migrer et s'ancrer dans le réseau apical d'actine pour devenir des corps basaux, et enfin (5) l'élongation des axonèmes² des cils motiles à partir de ces mêmes corps basaux qui jouent le rôle de centre organisateur des microtubules à la base de chaque cil (Figure 1) [4]. L'élucidation des mécanismes qui gouvernent la multiciliogénèse est un prélude indispensable à la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces pour lutter contre les pathologies associées à des désordres ciliaires. Plusieurs facteurs de transcription, comme FoxJ1 (*Forkhead box protein J1*) ou certains membres de la famille RFX (*regulatory factor X*) [5], de même que les voies de signalisation Notch et BMP [3, 6], étaient déjà connus pour agir à plusieurs étapes clés de la multiciliogénèse. Notre équipe s'est concentrée sur l'étude du rôle potentiel des microARN dans ce mécanisme.

En 2011, nous avons établi un lien fonctionnel, conservé des amphibiens jusqu'à l'homme, entre la famille de microARN (miARN ou miR) miR-34/449 et la multiciliogénèse [3]. Les miARN sont des petits ARN non-codants endogènes qui contrôlent de nombreux processus biologiques en réprimant l'expression génique par des mécanismes post-transcriptionnels [7]. Nous avons montré, à partir d'épithélium respiratoire humain et d'épiderme d'embryon de xénope, que les miR-34/449, dont l'expression était fortement et spécifiquement induite dans les cellules multiciliées, déclenchaient la multiciliogénèse en bloquant à la fois le cycle cellulaire et la voie Notch, deux étapes précoces de la différenciation « multiciliée » [3]. Nos résultats ont depuis été confirmés par deux études montrant que des souris invalidées pour miR-34/449 présentent des défauts de multiciliogénèse [8, 9]. Plus récemment, nous avons mis en évidence une boucle de régulation négative réciproque entre miR-34/449 et la voie Notch [10]. Cette boucle permet l'accumulation de molécules miR-34/449 dans les cellules multiciliées engagées dans leur voie de différenciation, offrant la possibilité à ces microARN de contrôler d'autres cibles à des étapes plus tardives de la multiciliogénèse. En accord avec cette hypothèse, les travaux de Song et ses collègues suggèrent que la protéine centriolaire Cp110, dont l'expression doit être réprimée pour permettre la maturation des corps basaux, représenterait une cible supplémentaire importante des miR-34/449 [8].

¹ Ébauches de l'épithélium olfactif au cours du développement embryonnaire.

² Partie axiale motrice du cil.

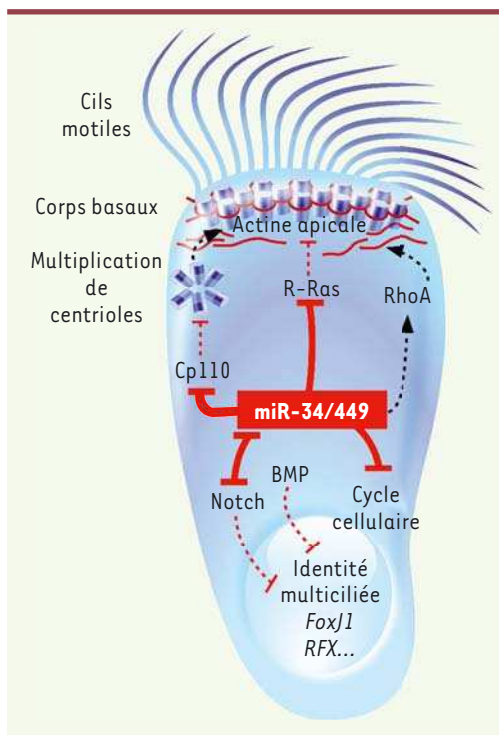


Figure 1. Illustration du rôle des miR-34/449 au cours de la multiciliogenèse. L'inhibition des voies BMP (*bone morphogenetic protein*) et Notch est un événement précoce requis pour l'entrée en différenciation « multiciliée ». L'expression spécifique des miR-34/449 dans les progéniteurs des cellules multiciliées permet la sortie du cycle cellulaire et l'initiation de l'acquisition de l'identité « multiciliée » en inhibant la voie Notch. L'inhibition de la voie Notch renforce l'expression de miR-449. Les miR-34/449 favorisent ensuite (1) la réorganisation du réseau apical d'actine, en réprimant R-Ras et en modulant l'activité de RhoA, et (2) la multiplication massive et la maturation des corps basaux, en réprimant Cp110. Après leur migration au pôle apical, ces corps basaux s'ancrent au réseau apical d'actine. En parallèle, les facteurs de transcription FoxJ1 (*Forkhead box protein J1*) et RFX (*regulatory factor X*) activent l'expression des constituants nécessaires à l'assemblage et au mouvement des cils motiles.

voie RhoA et indépendantes de la voie Notch, dans le contrôle de la réorganisation apicale du réseau d'actine qui s'opère lors de la multiciliogenèse.

Nous avons ainsi identifié, parmi les cibles des miR-34/449, la petite protéine G R-Ras (*Ras-related protein*) comme une des cibles, conservées de l'amphi-

bien à l'homme, contribuant à la formation du réseau apical d'actine au cours de la multiciliogenèse. Dans ces deux espèces, les miR-34/449 répriment spécifiquement l'expression du gène *RRAS*, à la fois au niveau du transcrite et de la protéine (Figure 1) [10].

Il est à noter que, chez l'homme, une invalidation trop précoce du gène *RRAS* à l'aide d'une stratégie d'interférence utilisant un siARN (*small interfering RNA*) affecte le remodelage apical d'actine et la multiciliogenèse, tout en augmentant l'activité RhoA, suggérant que R-Ras est probablement nécessaire aux premiers stades de la multiciliogenèse. De plus, dans nos deux modèles, le blocage spécifique de la liaison des miR-34/449 aux transcrits du gène *RRAS* réprime à la fois la réorganisation du réseau apical d'actine et la multiciliogenèse, mimant ainsi les effets obtenus par l'invalidation des miR-34/449. Dans les embryons de xénope, ces défauts sont corrigés lorsque l'on empêche les transcrits du gène *RRAS*, protégés contre l'action des miR-34/449, d'être traduits. Enfin, l'action de miR-34/449 aboutit à une relocalisation de la filamine-A,

MicroRNAs pull the strings of motile cilia

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article. Ce travail a fait l'objet d'un brevet CNRS n° 09/03723.

RÉFÉRENCES

1. Satir P, Guerra C, Bell AJ. Evolution and persistence of the cilium. *Cell Motil Cytoskeleton* 2007 ; 64 : 906-13.
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. 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 : 693-9.

Nous montrons aujourd'hui, dans une nouvelle étude, que ces mêmes miR-34/449 contrôlent également la formation du réseau apical d'actine, une autre étape clé de la multiciliogenèse, en agissant sur la voie des petites protéines G [10]. L'invalidation spécifique des miR-34/449 (à l'aide d'oligonucléotides antisens), aussi bien dans l'épiderme d'embryon de xénope que dans l'épithélium respiratoire humain, perturbe fortement la formation du réseau apical d'actine et des cils motiles. Dans les cellules respiratoires humaines, l'expression des miR-34/449 favorise la formation des fibres de stress d'actine et des points focaux d'adhésion. Elle induit également une augmentation de l'activité de la petite protéine G RhoA (*Ras homolog family member A*), régulateur clé du cytosquelette d'actine, et ce d'une manière indépendante de la voie Notch (Figure 1). Chez le xénope, l'inhibition des miR-34/449 bloque la réorganisation apicale du réseau d'actine et la multiciliogenèse, tandis que l'activité RhoA est toujours détectable. Ces résultats suggèrent l'implication d'autres cibles des miR-34/449, en aval de la

RÉFÉRENCES

4. Vladar EK, Stearns T. Molecular characterization of centriole assembly in ciliated epithelial cells. *J Cell Biol* 2007 ; 178 : 31-42.
5. Thomas J, Morlé L, Soulavie F, et al. Transcriptional control of genes involved in ciliogenesis: a first step in making cilia. *Biol Cell* 2010 ; 102 : 499-513.
6. Cibois M, Luxardi G, Chevalier B, et al. BMP signalling controls the construction of vertebrate mucociliary epithelia. *Development* 2015 ; 142 : 2352-63.
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. Song R, Walentek P, Sponer N, et al. miR-34/449 miRNAs are required for motile ciliogenesis by repressing cp110. *Nature* 2014 ; 510 : 115-20.
9. Wu J, Bao J, Kim M, et al. Two miRNA clusters, miR-34b/c and miR-449, are essential for normal brain development, motile ciliogenesis, and spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 ; 111 : E2851-7.
10. Chevalier B, Adamiok A, Mercey O, et al. miR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways. *Nat Commun* 2015 ; 6 : 8386.

NOUVELLE

Les macrophages

Nouveaux modulateurs de la répartition de la masse grasse au cours de l'obésité

Élise Dalmas¹, Nicolas Venteclef²

¹ Département d'endocrinologie, diabète et métabolisme, centre hospitalier de l'université de Bâle, département de biomédecine, université de Bâle, CH-4031 Bâle, Suisse.

² Inserm, UMR S 113, Sorbonne Universités, UPMC Paris 6, université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, centre de recherche des Cordeliers, 15, rue de l'École de Médecine, F-75006 Paris, France.

nicolas.venteclef@upmc.fr

> L'obésité et ses complications, telles que le diabète de type 2 ou l'athérosclérose, sont aujourd'hui reconnues comme des états inflammatoires chroniques de bas bruit, c'est-à-dire évoluant de manière relativement silencieuse (sans symptômes). Le tissu adipeux, principal lieu de stockage de l'excès d'apports caloriques, est au cœur de cette activité inflammatoire due à une production accrue de facteurs délétères de type cytokines et chimiokines [1]. En 2003, deux équipes américaines ont décrit pour la première fois l'infiltration de cellules immunitaires, les macrophages, dans le tissu adipeux de souris obèses et chez l'homme. Cette infiltration de macrophages semble être proportionnelle à l'indice de masse corporelle chez les sujets en surpoids et obèses [2, 3]. Ces macrophages, s'accumulant typiquement autour d'adipocytes hypertrophiques, sont considérés comme la source majeure de production de facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α (*tumor necrosis factor-alpha*) ou l'interleukine(IL)-1 β . La production d'IL-1 β favoriserait le maintien d'un dialogue pro-inflammatoire et prodiabéto-gène avec des lymphocytes T *helper* de type 17 (Th17) au sein du tissu adipeux

viscéral de patients obèses [4]. Ainsi, en plus de leur accumulation, les macrophages orchestreraient un dialogue entre les différentes cellules immunitaires du tissu adipeux, déterminant dans le développement de l'obésité et du diabète de type 2.

Les macrophages du tissu adipeux sont au cœur d'une inflammation prodiabéto-gène

Dans les modèles murins, l'abondance des macrophages dans le tissu adipeux peut être contrôlée par des manipulations génétiques ou des interventions pharmacologiques. Ces approches permettent de démontrer l'importance de ces cellules dans le développement des complications liées à l'obésité [1]. Chez l'homme, la présence de macrophages et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires semblent également associées à l'obésité et au diabète de type 2 [1, 4]. Ces études restent cependant corrélatives. Sur le plan clinique, l'inflammation et la présence de macrophages sont particulièrement observées dans le tissu adipeux viscéral (intra-abdominal) et, de manière moins importante, dans la graisse sous-cutanée dite superficielle. L'élargissement

du tissu adipeux viscéral (phénomène qualifié d'obésité androïde) est fortement associé à un risque élevé de développer un syndrome métabolique et des complications cardiovasculaires [5]. Au contraire, l'obésité gynoïde (accumulation préférentielle de la graisse dans les régions superficielles) est associée à un meilleur profil métabolique. Au cours de nos travaux, nous avons examiné le rôle possible des macrophages dans le développement soit de l'obésité gynoïde (protectrice), soit de l'obésité androïde (délétère).

Il existe de nombreux niveaux d'activation des macrophages dans les pathologies. Une nomenclature restrictive permet cependant de distinguer deux grandes classes de macrophages inflammatoires dites polarisations¹ M1 et M2 : (1) les macrophages dits M1, activés en particulier par le lipopolysaccharide² (LPS) via les récepteurs TLR (*toll like receptors*), suivent une voie classique aboutissant à la production

¹ La polarisation de cellules immunitaires, comme les macrophages, définit leur état d'activation qui dépend des cytokines qui les stimulent, des cytokines et autres facteurs qu'elles sécrètent, et des facteurs de transcription qu'elles expriment.

² Le lipopolysaccharide est une molécule présente dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif.

II. Caractérisation des isomiR de la famille 34/449 : quand la famille s'agrandit !

A. Contexte de l'étude

De nombreux miARN regroupés en « clusters » au niveau du génome sont souvent co-transcrits, partagent la même région « seed » de fixation sur les 3'-UTR de leur gènes cibles et appartiennent ainsi à une même famille de miARN (Partie III.F). Un exemple typique est donné par la superfamille miR-34/449 qui présente une redondance génomique avec six miARN homologues (miR-34a, miR-34b/c et miR-449a/b/c) situés sur trois *loci* génomiques distincts. Les miR-34b/c et les miR-449a/b/c regroupés sous le terme miR-34/449 agissent comme régulateurs pléiotropiques de la multiciliogénèse conservés chez les vertébrés.

Récemment, les approches technologiques par séquençage à haut débit ont mis en évidence l'existence de plusieurs isoformes, appelées 5'- ou 3'-isomiR, pour de nombreuses séquences de miARN qui diffèrent par une ou plusieurs bases à leur extrémité 5' et/ou 3' par rapport aux miARN canoniques référencés dans miRBase.

Les séquences de ces isomiR peuvent différer en fonction des tissus et des stades du développement, et peuvent être conservées à travers les espèces (Wyman et al. 2011; Burroughs et al. 2010; Tan et al. 2014; Llorens et al. 2013). Bien que la présence d'isomiR ait été rapportée dans de nombreuses études, leur biogénèse, leur pertinence biologique et leur contribution fonctionnelle restent controversées. Les 5'-isomiR, qui présentent donc un décalage dans leur site de fixation, sont susceptibles de cibler différents transcrits par rapport à leurs homologues canoniques. Alternativement, des isomiR qui ciblent les mêmes ARNm que leurs miARN canoniques pourraient renforcer la spécificité d'action sur une cible donnée. Le manque de caractérisation fonctionnelle de ces isomiR provient des outils limités disponibles pour moduler leurs niveaux d'expression et mesurer leurs effets, ainsi que leur spécificité d'action sur un gène donné, étant donné la forte homologie avec leur miARN canoniques.

Ayant observé que les séquences de hsa-miR-34b-5p et hsa-miR-449c-5p rapportées dans miRBase diffèrent de celle des autres membres de la famille (hsa-miR-34a, -34c -5p, et -449a -449b) par l'addition d'une uridine ("U") à l'extrémité 5' de la séquence, nous avons cherché à déterminer si ces variations de séquences correspondaient à des isomiR. Puis, nous nous sommes demandé si ces isomiR avaient des propriétés biologiques et fonctionnelles.

B. Résultats

Article 4 : Mercey O, Popa A, Paquet A, Cavard A, Chevalier B, Pons N, Magnone V, Zaragosi L-E, Ponzio G, Lebrigand K, Barbry P, Marcet B. Characterizing isomiR variants in the microRNA-34/449 family. (Soumis).

1. Identification de variants pour miR-34b-5p et miR-449c-5p chez l'Homme

La superfamille miR-34/449 regroupe 6 microARN différents partageant une forte homologie de séquence, notamment dans leur région « seed ». Néanmoins, les séquences humaines correspondant aux miR-34b-5p (miR-34b) et miR-449c-5p (miR-449c) référencées dans miRBase possèdent une base supplémentaire en 5' (uridine) par rapport aux autres membres de la superfamille, entraînant un décalage de leur région de reconnaissance des 3'-UTR de transcrits cibles. Nous avons donc entrepris une analyse précise des séquences obtenues à partir de données de séquençage haut débit de miARN dans notre modèle de culture d'épithélium des voies respiratoires. Nos analyses ont permis de révéler l'existence de deux différents variants pour les miARN miR-34b et miR-449c chez l'Homme : une forme minoritaire (respectivement de 3 et 28% pour miR-34b et miR-449c) correspondant à la séquence référence de miRBase, et une forme majoritaire (respectivement de 97 et 72% pour miR-34b et miR-449c) qui s'aligne parfaitement sur la région « seed » avec le reste de la famille. En outre, nous avons observé sur un large éventail de miARN exprimés dans 10 différents tissus que plus de 7% de tous les miARN présentent une forme majoritaire (>50%) décalée en 5' de la séquence référence de miRBase. Ces résultats soulignent une récurrence de mauvaises annotations des séquences de références sur miRBase.

Etant donnée l'expression très importante des miARN de la famille miR-34/449 dans les MCC, nous avons supposé que même les formes minoritaires 5'-isomiR-34b et 5'-isomiR-449c pouvaient contribuer à la régulation de cibles. C'est pourquoi nous avons par la suite cherché à caractériser les formes décalées minoritaires de miR-34b et miR-449c afin d'en proposer une nouvelle dénomination comme 5'-isomiR : 5'-isomiR-34b et 5'-isomiR-449c

Une comparaison du niveau de conservation de ces séquences à travers les espèces montre que l'uridine surnuméraire est également retrouvée pour miR-34b chez le xénope, le poisson zèbre et le poulet, alors que pour miR-449c, cette base supplémentaire est uniquement retrouvée chez l'Homme.

2. L'abondance relative des formes canoniques et isomiR de miR-34b et miR-449c n'est pas due à des artéfacts de séquençage

Afin de déterminer si ces séquences de variants sont dues à des biais technologiques de séquençage, nous avons effectué une comparaison des séquençages de miARN de cellules A549 issus de deux plateformes de séquençage différentes : SOLID et ILLUMINA. Pour chaque miARN, les séquences obtenues avec les deux plateformes sont globalement les mêmes. En se focalisant sur les miARN présentant plusieurs variants, le même résultat a été retrouvé. En effet, les différentes formes pour un même miARN sont séquencées dans les mêmes proportions entre SOLID et ILLUMINA. Ces résultats suggèrent que les deux formes observées ne sont pas dues à des biais de séquençage.

Etant donné que la préparation des bibliothèques pour le séquençage est similaire sur les deux plateformes, nous avons soupçonné des possibles biais au niveau du clonage des molécules. Pour répondre à cette question, nous avons fait synthétiser les formes matures de miR-34b, 5'-isomiR-34b, miR-449c et 5'-isomiR-449c, phosphorylées sur leur extrémité 5', afin de permettre leur clonage. Chacune de ces formes matures a ensuite été mélangée à une solution complexe d'ARN ne possédant pas de miARN de la famille miR-34/449, puis séquencée. Dans chacune des conditions testées, la seule forme présente dans le mélange a été retrouvée après séquençage. Afin de s'assurer qu'aucun clonage préférentiel n'existe entre la forme canonique et la forme isomiR, ces deux formes, pour chaque microARN, ont été mélangées en proportion 1 :1 et séquencées. Les deux variants ont été séquencés dans les mêmes proportions, indiquant que les deux isoformes de miR-34b et miR-449c ne proviennent pas d'un biais de clonage et ont donc une réalité biologique.

3. Effets fonctionnels des isomiR

Après avoir démontré l'existence des séquences 5'-isomiR-34b et 5'-isomiR-449c, nous avons cherché à savoir si ces variants avaient une pertinence biologique et s'ils pouvaient cibler des transcrits. Par ailleurs, l'importance de la région « seed » étant primordiale dans la reconnaissance des miARN sur leurs transcrits cibles, nous avons cherché à évaluer l'impact transcriptomique de ce décalage en 5' de la région « seed » qui distingue les deux variants de nos deux isomiR d'intérêt. Des cellules primaires épithéliales humaines ont été transfectées par les différents membres de la famille miR-34/449 en incluant également les isomiR, puis les ARN ont été séquencés. L'analyse globale de l'expression génique révèle que les 5'-isomiR-34b et 5'-isomiR-449c entraînent des effets très différents du reste de la famille. De manière surprenante, les formes canoniques de miR-34b et miR-449c répriment plus de cibles prédites *in silico* que leurs isomiR respectifs. Les formes canoniques et isomiR semblent réprimer chacune des gènes spécifiques, mais partagent également des cibles

communes. Tous ces résultats montrent d'une part l'importance du « seed » dans la reconnaissance des ARN cibles. D'autre part, ils suggèrent que deux variants d'un miARN de la même superfamille miR-34/449 pourraient soit agir sur des cibles différentes, et donc avoir un impact fonctionnel distinct, soit agir sur des mêmes cibles et donc avoir un effet de redondance ou de synergie.

Dans cette perspective, nous avons ensuite examiné l'effet des isomiR sur des cibles déjà validées de la famille miR-34/449 : Arhgap1, ARHGDIB (ou Rho-GDI2), R-Ras et Notch1. A ce titre, nous avons analysé, en plus des données de transcriptome, l'expression de ces cibles en qRT-PCR, mais également au niveau protéique. De plus, des tests par rapporteurs luciférase ont été effectués pour valider le ciblage des miARN. Ces différentes expériences ont montré que les 5'-isomiR-34b et 5'-isomiR-449c ont des effets répressifs bien moindre que leurs homologues canoniques sur les cibles telles que Arhgap1, ARHGDIB et R-Ras que nous avons précédemment décrites comme ayant un rôle essentiel dans la réorganisation du réseau apical d'actine. Ces résultats ont été corroborés par l'absence d'effets fonctionnels de ces deux isomiR par rapport aux miR-34/449 canoniques sur la formation de points focaux d'adhésion. En revanche, les 5'-isomiR-34b et 5'-isomiR-449c ont des effets comparables aux miR-34/449 canoniques sur l'inhibition de l'expression de Notch1 ainsi que sur le blocage du cycle cellulaire en phase G1. Ces résultats suggèrent que les 5'-isomiR-34/449 pourraient représenter un mécanisme additionnel visant à renforcer l'effet inhibiteur des miARN canoniques sur des cibles importantes telles que Notch1 dont la répression est indispensable au déclenchement de la multiciliogénèse.

C. Conclusion

A travers cette étude, nous avons prouvé l'existence d'isomiR physiologiquement actifs de la famille miR-34/449. Ces molécules ne partagent que certains effets biologiques communs avec leurs homologues canoniques. Nos résultats proposent que des isomiR représentent un mécanisme additionnel par lequel la machinerie des miARN exerce une régulation fine de processus biologique complexe. Une des questions qu'il nous reste à éclaircir serait de savoir si ces 5'-isomiR-34/449 répriment de manière spécifique certaines cibles et s'ils sont dotés de fonctions biologiques au cours de la multiciliogénèse, et ce indépendamment de leurs homologues canoniques.

Luciférase

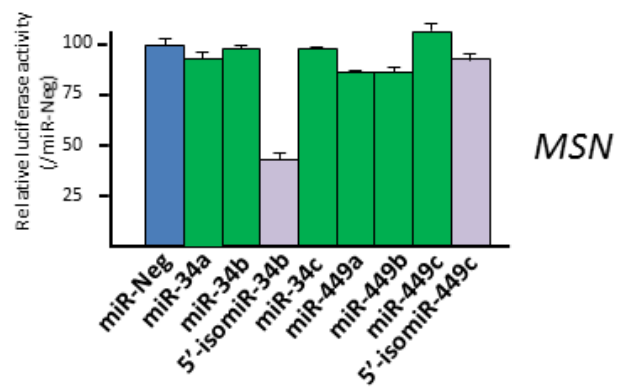


Figure additionnelle 1: *MSN* semble être une cible directe du 5'-isomiR-34b

L'activité de la luciférase sous le contrôle du 3'UTR de *MSN* est réduite de 60% en réponse à la transfection du 5'-isomiR-34b (n=2) mais n'est pas réduite par les autres membres de la famille miR-34/449

D. Résultats additionnels

1. Moésine, cible spécifique du 5'isomiR-34b ?

Les résultats obtenus lors de cette étude nous ont poussés à rechercher des cibles spécifiques des isomiR et reliées à la dynamique de l'actine afin d'expliquer l'impact fonctionnel différents des isomiR comparé aux miR canoniques. L'analyse rigoureuse des données transcriptomiques nous a orientés vers la Moésine, qui est décrite comme régulant la formation des points focaux d'adhésion (Haynes et al. 2011; Doi et al. 1999). Nous avons montré que l'expression de la Moésine (*MSN*) est diminuée spécifiquement par la transfection du 5'-isomiR-34b. Nous avons par la suite confirmé ce ciblage spécifique en clonant le 3'-UTR de cette cible en aval de la phase codante pour la luciférase et en observant l'effet de la transfection de chacun des membres de la famille miR-34/449 (Figure additionnelle 1).

Ces résultats nécessitent désormais des confirmations au niveau protéique mais également au niveau fonctionnel à l'aide d'une approche de protection de cible et d'invalidation par siARN.

Characterizing isomiR variants in the microRNA-34/449 family

Olivier Mercey^{1,2}, Alexandra Popa^{1,2}, Agnès Paquet^{1,2}, Amélie Cavard^{1,2}, Benoît Chevalier^{1,2}, Nicolas Pons^{1,2}, Virginie Magnone^{1,2}, Laure-Emmanuelle Zaragosi^{1,2}, Gilles Ponzio^{1,2}, Kevin Lebrigand^{1,2}, Pascal Barbry^{1,2,†}, Brice Marcet^{1,2,†}

¹ CNRS-IPMC, UMR-7275, Sophia-Antipolis, France.

² University of Nice-Sophia-Antipolis (UNS), Sophia-Antipolis, France.

† Correspondence should be addressed to : marcet@ipmc.cnrs.fr ; barbry@ipmc.cnrs.fr

IPMC-CNRS/UNS, UMR-7275, 660 Route des Lucioles, 06560 Sophia-Antipolis, Valbonne, France.

Phone : 00-33-(0)4-93-95-77-90/93

Fax : 00-33-(0)4-93-95-77-94

Abstract (100 words)

MiR-34/449 microRNAs (miRNAs) are new conserved regulators of multiciliated cell differentiation. Here, we characterized variant sequences (named isomiRs) of miR-34b-5p and miR-449c-5p differing from their canonical counterparts by one supplemental base at their 5'-end. Using small RNA sequencing, we found that these isomiRs, corresponding to miR-34b-5p and miR-449c-5p reported in miRBase, actually represent a minor fraction of total sequences whereas the most abundant sequences for miR-34b-5p and miR-449c-5p share an identical 5'-end with other canonical miR-34/449 members. We thus propose to re-qualify minor sequence variants exhibiting an additional uridine as isomiRs "5'-isomiR-34b-5p" and "5'-isomiR-449c-5p" and major sequences as genuine canonical miR-34b and miR-449c. Indeed, contrarily to isomiRs, overexpression of canonical genuine miR-34b-5p and miR-449c-5p systematically reproduced similar biological effects than other canonical miR-34/449. We show that canonical miR-34/449 and 5'-isomiR-34/449 can exhibit distinct biological functions but also share some functional activities, as they were both able to block cell cycle and to repress important targets such as Notch pathway components.

Keywords: miR-449 ; miR-34 ; miR-34/449; IsomiR ; microRNA ; motile cilia; actin network ; multiciliated cell

Introduction

MicroRNAs (miRNAs or miR) represent a widespread class of small endogenous non-coding RNA species (Ambros 2004; Bartel 2004; Kim, Han et al. 2009; Yates, Norbury et al. 2013). Since their discovery in 1993, miRNAs have emerged as major post-transcriptional regulators of gene expression in animals and plants (Lee, Feinbaum et al. 1993) and are involved in a large variety of normal and pathophysiological events (Mattes, Yang et al. 2007; Inui, Martello et al. 2010; Giovannini-Chami, Grandvaux et al. 2011; Pottier, Cauffiez et al. 2014; Ebrahimi and Sadroddiny 2015). MiRNAs bind to specific target messenger RNAs (mRNAs) to regulate their expression. Every miRNA bears a short stretch of 6 to 8 nucleotides at its 5'-end, from position 2 to 7 (or 8), termed the “seed region” (Doench and Sharp 2004; Brennecke, Stark et al. 2005; Lewis, Burge et al. 2005; Agarwal, Bell et al. 2015), that plays a major role in the interaction with the 3'-untranslated region (3'-UTR) of target mRNAs, thereby allowing a control of mRNA stability or translational efficiency (Yates, Norbury et al. 2013). One miRNA can theoretically bind hundreds of different mRNAs. Conversely, the 3'-UTR of a particular mRNA can be simultaneously targeted by multiple miRNAs. The interaction between a given miRNA and its targets is driven by complex rules that make the identification of potential targets difficult using *in silico* approaches. It remains that miRNAs and their target mRNAs form a powerful regulation network to fine-tune gene expression of several disjoint biological processes. Many instances of this kind of regulation have been provided by studies of development or differentiation in multicellular organisms (Bartel 2004; Baek, Villen et al. 2008; Bartel 2009; Inui, Martello et al. 2010; Loh, Yi et al. 2011; Marcet, Chevalier et al. 2011; Chevalier, Adamiok et al. 2015). The growing interest for these molecules has led to the creation of a specialized database, miRBase (Kozomara and Griffiths-Jones 2014), which current release (version 21) gathers information on 35,828 mature miRNA products across 223 species. This database is instrumental to disseminate any useful information about miRNAs such as their mature sequence.

MiRNA genomic clusters are often co-transcribed into related miRNAs (Peters and Robson 2008; Janga and Vallabhaneni 2011; Loh, Yi et al. 2011), which share the same seed region and/or which belong to functionally related miRNA families (Wong, Yu et al. 2011; Schmitt, Margue et al. 2013). A

typical example is given by the miR-34/449 family which exhibits extensive genomic redundancy by encompassing six homologous miRNAs (miR-34a, miR-34b/c and miR-449a/b/c) located on three distinct genomic loci (Lize, Herr et al. 2010; Lize, Pilarski et al. 2010; Marcet, Chevalier et al. 2011; Bao, Li et al. 2012; Concepcion, Han et al. 2012; Song, Walentek et al. 2014; Wu, Bao et al. 2014; Chevalier, Adamiok et al. 2015). The miR-34 family is detected from ancient bilaterian invertebrates to vertebrates (Christodoulou, Raible et al. 2010), whereas the miR-449 family appears restricted to vertebrates (Lize, Herr et al. 2010; Lize, Pilarski et al. 2010; Marcet, Chevalier et al. 2011; Wang, Fu et al. 2013; Song, Walentek et al. 2014; Wu, Bao et al. 2014). MiR-34/449 act as pleiotropic regulators of vertebrate multiciliogenesis, through their action at several cellular levels: arrest of the cell cycle and inhibition of the Notch signaling pathway (Marcet, Chevalier et al. 2011), maturation and docking of basal bodies (Song, Walentek et al. 2014) as well as induction of the apical actin meshwork formation (Chevalier, Adamiok et al. 2015). Invalidation of miR-34/449 in mice causes defects in multiciliogenesis, leading to airway infections, hydrocephalus and infertility (Song, Walentek et al. 2014; Walentek, Song et al. 2014; Wu, Bao et al. 2014). Mice deficient either for miR-34a, miR-34b/c, and miR-449a/b/c or for miR-34b/c and miR-449a/b/c exhibit motile cilia impairment together with respiratory and fertility defects while mice invalidated for only one of these miRNAs causes no discernible phenotype (Choi, Lin et al. 2011; Bao, Li et al. 2012; Concepcion, Han et al. 2012; Song, Walentek et al. 2014; Wu, Bao et al. 2014). Several conserved miR-34/449 targets correspond to key regulators that need to be repressed to promote multiciliogenesis: cell cycle actors (CCNB1, CCNE2, CDC25A, AREG), Notch pathway components (DLL1, Notch1) (Marcet, Chevalier et al. 2011), or GTPase-regulators such as R-Ras, ARHGAP1 or ARHGDI1B (Chevalier, Adamiok et al. 2015) and the centriolar protein CP110 (Song, Walentek et al. 2014; Walentek, Quigley et al. 2016). Altogether, these findings have strongly suggested that sequence homologies among miR-34/449 miRNAs, particularly in the seed region, predicted functional redundancies.

High throughput sequencing technologies have revealed a complex pattern of expression for many miRNAs, with the detection of related isomers that vary by one or more bases at the 3'- and/or 5'-end compared to the canonical miRNAs referenced in miRBase. These sequences have been stamped as 5'- or 3'-isomiRs (Lee, Zhang et al. 2010; Pantano, Estivill et al. 2010; Cloonan, Wani et al. 2011;

Guo, Li et al. 2012; Neilsen, Goodall et al. 2012; Llorens, Hummel et al. 2013; Guo, Zhang et al. 2014; Guo, Zhao et al. 2014; Tan, Chan et al. 2014). The trimming or additions of bases in the 5'- and/or 3'-end of miRNAs can differ according to tissues and developmental stages, and they represent conserved events across species (Morin, O'Connor et al. 2008; Cloonan, Wani et al. 2011; Neilsen, Goodall et al. 2012; Tan, Chan et al. 2014). Variations in isomiRs can be generated by distinct processing by Drosha, Dicer or any other processing enzymes (Neilsen, Goodall et al. 2012). Although isomiRs have been reported in many datasets, their biological relevance and their putative contribution to the functional repertoire of a specific miRNA gene remain controversial (Neilsen, Goodall et al. 2012). Some authors have pointed to sequencing or alignment artifacts (Kim, Cho et al. 2008; de Hoon, Taft et al. 2010; Reese, Xia et al. 2010), poor quality or degraded RNA (Sdassi, Silveri et al. 2009), sloppy Drosha/Dicer excision (Ruby, Jan et al. 2006; Ruby, Stark et al. 2007), or as the existence of "trivial variants" (Cummins, He et al. 2006). It remains that noisy measurement can hardly account for the high frequency of some isomiRs which are not randomly distributed (Ebhardt, Tsang et al. 2009; Pantano, Estivill et al. 2010). This suggests that isomiR biogenesis could be regulated and that isomiRs could have a functional relevance. All currently available target prediction tools probably underestimate the impact of such miRNA isoforms upon target gene regulation. IsomiRs may confer additional mRNA targeting properties (Chiang, Schoenfeld et al. 2010; Fukunaga, Han et al. 2012; Humphreys, Hynes et al. 2012; Manzano, Forte et al. 2015). 5'-isomiRs may target very different sets of transcripts when compared to their canonical homologues (Bartels and Tsongalis 2009). Alternatively, isomiRs that target the same mRNAs than their canonical miRNAs may reduce off-target effects (Cloonan, Wani et al. 2011). The lack of exact determination of the roles played by isomiRs comes from the limited tools available for modulating the levels of specific isomiRs and measuring their effects (Neilsen, Goodall et al. 2012), together with the overlapping and redundant nature of most miRNA genes (Miska, Alvarez-Saavedra et al. 2007). Overall, deep sequencing studies clearly indicate that the sequences of many miRNAs vary from the standard sequences reported by miRBase. Seldom, it also indicates that the canonical sequence reported in miRBase just represents a very small fraction of a given miRNA. Although isomiRs have been reported in many studies, their biological function remains to be further characterized.

The present study started from our observation that the seed region reported in miRBase either for hsa-miR-34b-5p or hsa-miR-449c-5p differs from the one of other members of the family (hsa-miR-34a, -34c-5p, -449a and -449b), with the addition of one uridine (“U”) at the 5’- end of the sequence. Using small RNA sequencing of human airway epithelial cells (HAECs) primary cultures, we showed that miRNA sequences referenced in miRBase for hsa-miR-34b-5p or hsa-miR-449c-5p actually represent minor variants that we propose here to consider as isomiRs (iso-miR-34b-5p and iso-miR-449c-5p). On the contrary, the most abundantly expressed sequences corresponding to hsa-miR-34b-5p and hsa-miR-449c-5p contained exactly the same seed region as other canonical members of the miR-34/449 family. Our findings provide evidence that canonical miRNAs and isomiRs exhibit dramatic changes in the mRNA target recognition and also display strong functional differences.

Results & Discussion

Identification of isomiRs of hsa-miR-34b-5p and hsa-miR-449c-5p

Since miR-34 and miR-449 miRNAs share a strong sequence homology that is not limited to the seed region, they can be gathered into a unique superfamily (Figure 1a). This miR-34/449 family is more particularly expressed in multiciliated cells (Marcet, Chevalier et al. 2011; Chevalier, Adamiok et al. 2015). Intriguingly, miRBase defines mature hsa-miR-34b-5p and hsa-miR-449c-5p as sequences that contain an additional uridine in the 5’-end compared to the rest of the family, resulting in a one base-shift in their seed region. We hypothesized that such a shift in the seed region could affect the recognition of targets and the functional impact of these two miRNAs. Therefore, we have carefully analyzed the exact 5’ nucleotide sequence of every miRNA sequenced in our biological model, by more precisely focusing our investigations on mature members of hsa-miR-34 and hsa-miR-449. The analyses of small RNA deep sequencing data performed on RNAs collected from well-differentiated HAECs revealed that hsa-miR-34b-5p (miR-34b) and hsa-miR-449c-5p (miR-449c) were represented as two distinct variants (Figure 1b). The most abundant sequence for both hsa-miR-34b-5p and hsa-miR-449c-5p corresponded to the isoform containing the same seed region than the rest of miR-34/449 family (Figure 1a-b). MiRBase reference sequences were also detected, but they only represented 3%

and 28% of the reads for miR-34b and miR-449c, respectively (Figure 1a-b). We therefore propose to re-assign the less abundant form as isomiR variants that we named 5'-isomiR-34b and 5'-isomiR-449c, and the best aligned miRNAs as bona fide miRNA sequences. An exploration of orthologous sequences in other species revealed that the 5'-supplemental base was unique to human for miR-449c, whereas it was also found in *Xenopus*, *Danio Rerio*, *Gallus Gallus* for miR-34b. To assess the extent of such a mis-annotation, we analyzed small RNA sequencing experiments from ten other human tissues (Study SRP006043). After selecting sequences detected with more than 20 reads per million reads, we observed that more than 7% of all expressed miRNAs in this large panel differed by an alternative 5' shift form in at least 50% of their reads (Table 1).

Because the detection of such variants could also be due to technological biases, we compared small RNA deep sequencing datasets obtained from A549 cells that were carried out on two distinct platforms: SOLID (GSE77252) and Illumina (GSE51508) (Tam, de Borja et al. 2014). 86.4% of miRNA sequences exhibiting less than 5% of alignment differences (Figure 1c) were detected in the same proportion in both SOLID and ILLUMINA platforms. Similar observations were obtained by focusing on microRNAs exhibiting different variants (isomiRs). For a given miRNA, each variant was sequenced in the same proportion with both platforms. This suggested that the detection of isomiR variants was not technology dependant.

Since the library preparation was similar for both platforms, we also explored a possible bias during molecular cloning. We therefore designed and synthesized four 5'-phosphate miRNAs, corresponding to miR-34b and 5'-isomiR-34b, miR-449c and 5'-isomiR-449c. Each of these four miRNAs was added alone in a complex mixture of RNA, and then sequenced. In every tested condition, the right sequence present in the mix was correctly identified (Figure 1d). When the two different variant sequences of the same miRNA were mixed with a 1:1 ratio, they were roughly sequenced with the same proportion, thus highlighting no preferential cloning. Altogether, these observations ruled out a possible cloning bias.

One possible explanation of the lower abundance of isomiRs compared to canonical miRNA sequences may come from a weaker stability intrinsic of variants sequences. However, 5'-isomiR-34b and 5'-isomiR-449c sequences start with one uridine, an event described to induce more stable sequences (Guo, Liu et al. 2015). Furthermore, recent studies indicated that Dicer activity can be modulated by several proteins interacting either with Dicer or with miRNA precursors (Ha and Kim 2014). Another hypothesis would be that a difference in Dicer activity modulation according to cell types and physiological conditions may alter the relative abundance of 5'-isomiRs. This hypothesis remains an open question that deserves further investigations that are beyond the scope of this study.

IsomiR and canonical sequences of miR-34b and miR-449c exhibit distinct gene expression profiling

Hereafter, we examined whether the one base shift that affects hsa-miR-34b-5p and hsa-miR-449c-5p could lead to distinct effects on gene expression profiling. Since miR-34/449 miRNAs were hugely expressed in airway multiciliated cells (Marcet, Chevalier et al. 2011; Song, Walentek et al. 2014; Chevalier, Adamiok et al. 2015), we hypothesized that their isomiR variants, even in low abundance (3% and 28% for 5'-isomiR-34b and 5'-isomiR-449c, respectively), may also contribute to gene expression regulation. We therefore transfected primary cultures of HAECs with each miRNA member of the miR-34/449 family, including 5'-iso-miR-34b and 5'-iso-miR-449c, and performed targetome analyses using RNA deep sequencing and *in silico* approaches. Figure 3a shows that 5'-iso-miR-34b and 5'-iso-miR-449c induced distinct effects on global transcriptome in comparison to their canonical counterparts and to the rest of the canonical members of the family (miR-34a-5p, miR-34c-5p, miR-449a-5p, miR-449b-5p). From global transcriptome analysis (Figure 2a), *bona fide* canonical miR-34b and miR-449c were clustered together with the rest of the canonical members of the family (miR-34a, miR-34c, miR-449a, miR-449b). Canonical miR-34b and miR-449c shared and repressed a significantly higher number of predicted targets than their isomiR counterparts (Figure 2). As shown in Figure 2b, 85% of common predicted targets and down-regulated by miR-449c were also inhibited

by miR-34c. 63% of common predicted targets and down-regulated by miR-34b were also repressed by miR-449c. On the other hand, whereas 68% and 76% of common predicted targets and down-regulated by isomiR-34b and isomiR-449c, respectively, were also repressed by their canonical counterparts, only 28% and 32% of common predicted targets and down-regulated by canonical miR-34b and miR-449c, respectively, were also inhibited by their isomiR counterparts (Figure 2b). These observations indicated that the number of common predicted targets repressed in response to isomiR overexpression was reduced by ~2.5 time in comparison to their canonical counterparts. These results also point out that only a one-base shift in the seed region may alter miRNA targeting, suggesting that isomiR variants and canonical miRNAs may regulate common but also distinct targets. Our observations also suggested that the seed region of isomiR variants “AGGCAG” may drive them to bind the 3'-UTR of some transcripts also targeted by the canonical miR-34/449 with the seed region “GGCAGU” if the next nucleotide downstream the seed region (nucleotide 2-8) on the mRNA is an uridine.

Mature miRNAs and IsomiRs target distinct transcripts

Next, we explored the inhibitory effects of canonical and isomiR variants of miR-34/449 family on several miR-34/449 targets, including ARHGAP1, ARHGDIB, R-Ras and Notch1, that we previously described to play a key role in MCC differentiation (Marcet, Chevalier et al. 2011; Chevalier, Adamiok et al. 2015; Mercey, Kodjabachian et al. 2016). After examining their expression level in our datasets generated using RNA sequencing (Figure 2), these targets were then validated and quantified using quantitative RT-PCR, western blot and luciferase reporter assay, in primary cultures of HAECs, in A549 cells or in HEK293 cells (Figures 3-4). Figure 3 shows that both canonical miR-34b and miR-449c induced similar regulatory effects on these miR-34/449 targets than other canonical miR-34/449 members. On the contrary, the isomiR variants 5'-isomiR-34b and 5'-isomiR-449c, which represent the sequences referenced in miRBase, exhibited much weaker effects (Figure 3-4). While 5'-isomiR-34b and 5'-isomiR-449c have lowest or not significant effects on targets related to small GTPase

pathway (ARHGAP1, ARHGDIB and R-Ras) than their canonical counterparts, they exhibited similar inhibitory effects on the Notch pathway receptor Notch1 (Figure 3-4). Whereas isomiR variants had no significant effect on ARHGDIB, their residual inhibitory effects on ARHGAP1 and RRAS targets may be due to a weak action of isomiR on the canonical miR-34/449 binding site, and may explain the less efficiency of isomiR on these targets. These results indicated that 5'-isomiR-34/449 were less efficient than miR-34/449 to silence several gene expression. Nevertheless, we found that among targets commonly repressed by of isomiR and canonical miR-34/449 in our RNA sequencing datasets, Notch1, an important target that must be repressed by miR-34/449 to trigger multiciliogenesis (Marcet, Chevalier et al. 2011), was similarly repressed by both canonical miR-34/449 and their isomiR variants. A dose-response relationship of both canonical miR-34b and 5'-isomiR-34b indicated no significant difference in their efficacy to repress Notch1 using luciferase reporter assay. Several studies indicated an association between isomiRs and AGO (Azuma-Mukai, Oguri et al. 2008; Siomi and Siomi 2008; Cloonan, Wani et al. 2011; Llorens, Banez-Coronel et al. 2013). Since overexpression of 5'-isomiR-34/449 induced significant effects on many targets including Notch1, suggested that isomiRs were loaded in argonautes (AGO) protein complexes. However, whether canonical and isomiR sequences were loaded in AGO complexes with a similar efficacy remains undetermined. The comparison in dose-response relationship between miR and isomiR sequences effects on Notch1 repression exhibited similar results, suggesting a similar efficacy of loading in the RNA-induced silencing complex (RISC). Alternatively, either isomiR may be more efficiently loaded in RISC but displayed less efficient silencing effects, or inversely they may be less efficiently loaded in RISC but exhibited better silencing effects. In line with the hypothesis of a similar efficacy in loading in RISC between miR and isomiR, it has been shown that miRNA sequences starting with an uridine or an adenine, like canonical and isomiRs of miR-34/449 family, were loaded 30 times more than other sequences (Frank, Sonenberg et al. 2010). A differential expression level of the different AGO according to the tissue could explain the different effects observed of isomiRs (Turchinovich and Burwinkel 2012). Also, whether isomiRs and canonical miRNAs were differentially loaded according to the subtype of argonaute proteins expressed in a given tissue or cell type remains to be elucidated.

Canonical miRNAs and isomiR variants of miR-34/449 family have distinct biological function

We have previously shown that miR-34/449 control multiciliogenesis by repressing cell cycle and Notch pathway (Marcet, Chevalier et al. 2011). In addition, miR-34/449 also control actin network reorganization and focal adhesion formation in airway epithelial cells by repressing small GTPase components such as R-Ras, ARHGAP1 or ARHGDIB (Mercey, Kodjabachian et al. 2016). We can wonder whether the weaker abundance in 5'-isomiRs in comparison to their canonical counterparts may hamper their biological relevance. The expression of miR-34/449 miRNAs was increased by 1000 times during multiciliogenesis, representing about 15% of the total of expressed miRNAs (Marcet, Chevalier et al. 2011). This huge level of expression suggests that a small proportion of isomiR-34/449 may be sufficient to have biological functions. Hence, we next examined whether isomiR variants shared similar biological functions with the rest of canonical miR-34/449. To address this issue, isomiRs and their canonical homologues were overexpressed in proliferating human airway A549 epithelial cells and their effects on cell cycle (Figure 4a) and on focal adhesion formation were measured (Figures 4b/c). We showed that both canonical and isomiR sequences of miR-34/449 strongly reduced the number of cycling cells (Figure 5a), indicating that they share similar functions on cell cycle arrest. Nevertheless, the strong sequence homology between canonical and isomiR of miR-34/449 miRNAs impeded to experimentally test whether 5'-isomiR-34/449 may also control multiciliogenesis by repressing Notch pathway, as previously demonstrated for their canonical counterparts (Marcet, Chevalier et al. 2011). As previously shown (Chevalier, Adamiok et al. 2015), all canonical sequences of miR-34/449 strongly affected actin network assembly, as revealed by the increased formation of focal adhesion (Figure 5). On the contrary, these effects were not observed in cells overexpressing 5'-iso-miR-34b or 5'-iso-miR-449c. These results are consistent with the precedent observations indicating that the small GTPase components RRAS, ARHGDIB and ARHGAP1, which were not predicted to have binding site for 5'-isomiR-34b and 5'-isomiR-449c and previously described to control actin network reorganization, were not or weakly repressed by isomiRs. Thus, the absence or diminution of effect of isomiRs on small GTPase targets may explain

the absence of functional effects of isomiRs on actin network. Altogether, our data indicated that isomiRs and canonical sequences of miR-34/449 may share some biological effects but may also have distinct functions.

The overlapping targeting and high correlation of isomiRs with their canonical miRNAs may answer one of the most intriguing paradoxes of miRNA function: the ability to drive specific biological phenotypes given the flexible nature of interactions between miRNA and targeted transcripts. Among the small number of mRNAs predicted to be targeted and repressed by isomiRs, our data revealed key and evolutionary conserved genes such as Notch1 that must be repressed to trigger multiciliated cell differentiation (Marcet, Chevalier et al. 2011; Marcet, Chevalier et al. 2011). In this context, isomiR-34/449 could act as additional mechanisms to strengthen miRNA-induced silencing effect on important target genes.

In conclusion, our work first stresses that many miRNA sequences, including hsa-miR-449c-5p and hsa-miR-34b-5p, were inappropriately annotated as mature canonical miRNAs in miRBase, and actually correspond to isomiR variants with distinct functional effects. Since most of commercially miR mimics currently used for functional studies are based on information provided in miRBase, our study incidentally highlights the importance of a careful examination of the genuine mature canonical miRNA sequences, which can differ from those referenced in miRBase, that might profoundly affect the interpretation of results. Through the example of miR-34/449 family, our study also suggests that isomiRs variants could share biological function but also have distinct roles from their canonical homologues. Finally, our findings highlight how isomiRs may bring additional mechanisms by which miRNA machinery may exert a fine-tune regulation of a complex biological function, illustrated here with the role of miR-34/449 in multiciliogenesis.

Materials & Methods

Tissue samples and primary culture of human airway epithelial cells

Inferior nasal turbinates were collected from patients who underwent surgical intervention for nasal obstruction or septoplasty (kindly provided by Pr Castillo, Pasteur Hospital, Nice, France). The use of human tissues was authorized by the bioethical law 94-654 of the French Public Health Code after written consent from the patients. Primary HAEC cultures were performed as previously described (Marcet, Chevalier et al. 2011; Chevalier, Adamiok et al. 2015).

Design of custom mimics for hsa-miR-34b-5p and hsa-miR-449c-5p

Hsa-miR-34b-5p (5'-AGGCAGUGUCAUUAGCUGAUUGU-3') and hsa-miR-449c-5p (5'-AGGCAGUGUAUUGCAGCGGCUGU-3') custom mimics were designed from the predominant form in small RNA sequencing data (Ambion, Life Technologies).

Ectopic expression of miRNAs and isomiRs

Cells were grown to 30 % confluency on plastic plates or glass coverslip. They were then transfected with synthetic negative control miRNA (miR-Neg, Ambion, Life Technologies) or synthetic miRNAs (miRBase references for hsa-miR-34a, -34c-5p, -449a, and -449b, and newly synthesized sequences for hsa-miR-34b-5p and hsa-miR-449c-5p, Ambion, Life Technologies) and synthetic isomiRs (iso-miR-34b-5p and iso-miR-449c-5p, referenced as miR-34b-5p and miR-449c-5p in miRBase, Ambion, Life Technologies) at 10 nM (final concentration) using Lipofectamine RNAi Max Reagent (Invitrogen) in OPTIMEM (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Total RNAs and proteins were extracted after 48h and 72h after transfection, respectively.

Total RNA extraction

Automated total RNA extraction was performed using QIAcube and miRNeasy kit from QIAGEN according to the manufacturer's instructions. Total RNAs were quantified using NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) and integrity of samples (RIN > 8) was evaluated using RNA nano-chips on the Agilent 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies).

Small RNA Sequencing

Synthetic mature miRNAs or isomiRs (10 pg) were first mixed with 1.5 µg of a complex RNA mixture of 3T3 cells. Small RNA libraries were generated with the NEB next small library prep set for SOLiD (New England Biolabs) and sequenced on the Applied Biosystems SOLiD 5500 wildfire system following the manufacturer's instructions. All data generated from RNA sequencing were stored on microarray information system Mediante (Le Brigand and Barbry 2007).

RNA Sequencing

2 µg of total RNAs were isolated from primary HAEC cultures transfected with miRNAs or isomiRs. PolyA RNAs were purified using dynabeads mRNA purification kit (Invitrogen) and tagged for 9 min at 95°C. RNA libraries were then generated with the NEB next small library prep set for SOLiD (New England Biolabs) and sequenced on the Applied Biosystems SOLiD 5500 wildfire system following the manufacturer's instructions. All data generated from RNA sequencing were stored on microarray information system Mediante (Le Brigand and Barbry 2007).

Data Analysis

SOLiD data were analyzed with lifescape v2.5.1, using the smallRNA pipeline for miRNA libraries and whole transcriptome pipeline for RNA-seq libraries with default parameters. Illumina data from SRR1013967 and SRR1013968 were aligned versus hg19 rbuild using bowtie2 mapper with local mode option. Annotations files used for production of raw count tables correspond to miRBase v18 for smallRNAs and Refseq Gene model v20130707.

The abundance of isomiRs was quantified using custom java program. For each miRNA from miRBase v18, we extracted the number of reads starting at the exact miRBase position versus the number of reads starting at position -2, -1,+1 and +2 from the miRBase start position, then we computed for each miRNA the percentage of reads mapping to each isomiR.

All data generated from RNA sequencing analysed with Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). Gene differential analyses between samples transfected with each of the 8 canonical miRNAs or isomiRs of the miR-34/449 family versus the control (miR-Neg) were performed using the DESeq package in R (Anders and Huber 2010). Down-regulated genes in at least one of the 8 comparisons were selected based on the following criteria: a minimum of 50 reads in at least one of samples, a log fold change ≤ -0.7 and adjusted p-value ≤ 0.05 . An unsupervised median-centered hierarchical clustering on the above log₂-transformed 1180 down-regulated genes and the 9 samples was performed using GenePattern (Reich, Liefeld et al. 2006). Pearson's correlation distance was used both for genes and samples, and pairwise average-linkage was used as clustering method.

Data availability

Data generated using deep sequencing were submitted to GEO repository under super series GSE77252 gathering 3 sub-series accession GSE77248 for A549 miRNome, GSE77249 for miRome of synthetic microRNA transfection and GSE77251 for transcriptome analysis in cells overexpressing canonical miR-34abc/449abc, isomiR-34b-5p or isomiR-449c-5p.

Quantitative RT-PCR

Quantitative RT-PCR was performed using TaqMan® Gene Expression Assay (Life Technologies) on a Lightcycler 480 (Roche) according to manufacturer's instructions. Expression levels of messenger RNAs were calculated using the 2-deltaCT method, using UBC as endogenous controls.

Immunocytochemistry

A549 airway epithelial cells were grown on glass coverslips for detection of focal adhesion using anti-paxillin antibody. Cells were then fixed (4% paraformaldehyde, 15 min, 4°C), rinsed (PBS-glycine 0.1M, 10 min) and permeabilized (0.1% Triton X-100, 5 min). Fixed cells were blocked for 1h in 3% BSA and incubated for 1h at room temperature with anti-paxillin primary antibody (1:10000, 349/Paxillin, BD Biosciences). Then, cells were incubated for 1h with the appropriate secondary antibody (Alexa Fluor®, 1:500, Invitrogen), nuclei were stained with DAPI (300 nM, Invitrogen) and, F-Actin was stained with Alexa Fluor® 594 Phalloidin (1U/staining). Stained cells were mounted with ProLong® Gold antifade reagent (Invitrogen, Life technologies). Images were acquired using the Olympus Fv10i confocal imaging systems.

Western Blot experiments

Primary HAECs cells were harvested by scraping in RIPA lysis Buffer (Thermo Scientific Pierce) and cleared by centrifugation. Protein concentration was determined using the BCA assay (Thermo Fisher Scientific) and equivalent amounts of protein were resolved on SDS polyacrylamide gels using Novex® NuPAGE® SDS-PAGE Gel System following manufacturer's instructions. Proteins were transferred to PVDF membranes and analyzed by immunoblotting with appropriate primary antibodies and HRP-conjugated secondary antibodies (1:500, Dako) according manufacturer's instructions. Primary antibodies and dilution used were as follow: ARHGAP1 (1:500, Santa Cruz, sc-68918), ARHGDIB (1:500, Abcam, Ab15198), R-Ras (1:500, Santa Cruz, sc-523) and Notch1 (1:500, Abcam, Ab27526). Immunoreactive bands were detected using immobilon ECL kit (Merck Millipore) on a LAS-3000 imager (Fujifilm).

Plasmid constructs and Luciferase measurements

Sequence from the wild-type 3'-UTR of ARHGAP1, ARHGDIB, RRAS and NOTCH1 were synthesized (gBlocks® Gene Fragments, Integrated DNA Technologies) and cloned into psiCheck2 vector (Promega). HEK293T cells were seed on 96 wells plate at $2 \cdot 10^4$ cell per well. The next day,

psiCheck2 constructions (200 ng) were co-transfected with synthetic microRNA mimics (final concentration 33 nM) (Ambion, Applied Biosystems) into HEK293T cells, and luciferase activity was measured at 48h post-transfection using the dual reporter luciferase assay kit (Promega), according to the manufacturer's protocol.

Cell cycle analysis

To determine whether canonical miR-34/449 or 5'-isomiR-34/449 altered the duration of specific cell cycle phases, we used FUCCI (Fluorescence Ubiquitin Cell Cycle Indicator)-expressing A549 cell lines (gift from...). FUCCI cells exploit the regulation of cell cycle-dependent ubiquitination to label individual nuclei in G1 phase red, and those in S/G2/M phases green (Zielke and Edgar 2015). Twenty four hours after seeding, Fucci A549 cells were transfected with either synthetic negative control miRNA (miR-Neg, Ambion, Life Technologies), synthetic canonical miR-34/449 (newly synthesized sequences for hsa-miR-34b-5p and hsa-miR-449c-5p, Ambion, Life Technologies) or synthetic isomiRs (iso-miR-34b-5p and iso-miR-449c-5p, referenced as miR-34b-5p and miR-449c-5p in miRBase, Ambion, Life Technologies) at 10 nM (final concentration) using Lipofectamine RNAi Max Reagent (Invitrogen) in OPTIMEM (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. The day after, cells were serum starved for 32h. Cells were then cultured again in presence of serum for 24h before assessing fluorescence of the cells by microscopy (LSM 780, Zeiss). Using ImageJ software, fluorescent cells were counted positive for one color (corresponding to cell cycle phases) if the fluorescence reaches a defined threshold.

Acknowledgements

This work was supported by CNRS, the National Research Agency (ANR) through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE (ANR-11-LABX-0028-01) and FRANCE GENOMIQUE (ANR-10-INBS-09-03 and ANR-10-INBS-09-02), Canceropôle PACA, and by grants from ANR (MITHRA,

ANR-12-EMMA-0015-01), Vaincre la Mucoviscidose, FRM (DEQ20130326464) and Ligue contre le cancer. Data from this work is the object of a CNRS patent PCT/FR2010/000539.

Authors' contributions

O.M. performed and analysed experiments. A.Po., A.Pa., N.N. and K.L. performed bioinformatics analyses. V.M., N.P. and L.-E.Z carried out RNA sequencing experiments. A.C. and B.C. contributed to qPCR, western blotting and luciferase assay experiments. G.P. participated to cell cycle experiments. B.M. designed, planned and analysed experiments. B.M. and P.B. coordinated and supervised the project, and obtained funding. O.M., P.B. and B.M. analysed and interpreted data and wrote the paper. All authors commented on the manuscript.

Abbreviations List

MicroRNAs (miRNAs or miR); miR-449a, miR-449b and miR-449c (miR-449); human airway epithelial cells (HAECs); air-liquid interface (ALI); filamentous actin (F-actin); RNA-induced silencing complex (RISC); Argonaute protein (AGO); FUCCI (Fluorescence Ubiquitin Cell Cycle Indicator).

Legends

Figure 1. Identification of isomiRs of hsa-miR-34b-5p and hsa-miR-449c-5p. (a) The sequences for every mature variants of the miR-34/449 family are illustrated. The miRBase reference sequences are in blue whereas the one-base shift sequences are in red. Green frames correspond to seed region (nucleotide 2-8). (b) Histogram represents the percent of reads obtained by small RNA deep sequencing for every mature sequence variants of miR-34/449 family members. (c) For each sequencing protocol (Illumina, SOLiD), the percentage of reads mapping to miRNAs (miRBase reference) and their respective isomiR variants (1 or 2 nucleotides two-ways shift from the miRBase reference sequence) were computed. The graph represents the differences in mapping percentage between SOLiD and Illumina by bins of 5%. (d) 5'-phosphate miRNAs, corresponding to hsa-miR-34b-5p and hsa-miR-449c-5p miRBase referenced sequences and their shifted major variants were sequenced alone in a complex mixture of RNA. The histogram represents the percentage of reads observed for each unique microRNA sequence or for an approximate mix 1:1 of canonical:isomiR.

Figure 2. Overexpression of canonical mature miRNAs or isomiRs induces distinct gene expression patterns. (a) The graph illustrates a median-centered hierarchical clustering on the 1180 genes down-regulated between proliferating HAECs overexpressing each of the 8 canonical or isomiRs of the miR-34/449 family compared to a control miRNA (miR-Neg). Pearson's correlation distance was used both for the genes and the samples, and pairwise average-linkage was used as clustering method. Down-regulated genes exhibiting a minimum of 50 reads in at least one of samples (\log_2 fold change ≤ -0.7 and an adjusted p value ≤ 0.05) were selected and compared to each condition. (b) Venn diagrams illustrate predicted miR-34/449 targets down-regulated following 48h overexpression of canonical miR-34/449 versus 5'-isomiR-34/449 as indicated upon each circle. Circles indicate the number of predicted targets downregulated in response to canonical miR-34b (blue) or miR-449c (magenta). Red circles indicate the number of predicted targets downregulated in

response to 5'-isomiR-34b or 5'-isomiR-449c. The intersection of two circles indicates the number of predicted targets commonly downregulated by the two conditions as indicated.

Figure 3. Specific targeting for canonical mature miRNAs and isomiRs. (a-b) Proliferating HAECs were transfected for 48h with either canonical miR-34/449, 5'-isomiR-34/449 or negative control miR-Neg, as indicated on figure. The effect of canonical miR-34/449 or 5'-isomiR-34/449 expression on transcript levels using real-time RT-PCR (a) or protein level using western blot (b) of ARHGAP1, ARHGDIB, Notch1 and R-Ras, were compared to miR-Neg. Transcript levels were normalized using ubiquitin C gene (UBC). Data are means \pm s.d. from three to six donors; ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$, ns, not significant, Student's t-test).

Figure 4. Specific interaction between canonical miRNAs or isomiRs of the miR-34/449 family and the 3'-UTRs of validated targets. (a) Specific interaction between miR-34/449 or 5'-isomiR-34/449 and the 3'-UTRs of ARHGAP1, ARHGDIB, RRAS and NOTCH1 was confirmed using luciferase reporter assay on constructs carrying the wild-type 3'-UTR-binding sites of canonical miR-34/449 and isomiR-34/449. Values were normalized to the miR-Neg conditions. Data are means \pm s.d. from 5 independent experiments. (b) Dose-response relationship of canonical miR-34b or 5'-isomiR-34b was performed using luciferase reporter assay on the wild-type 3'-UTR of NOTCH1. Data are means \pm s.d. from 3 independent experiments; ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$, ns, not significant, Student's t-test.

Figure 5. Functional differences between canonical miR-34/449 and 5'-isomiR-34/449. (a) The histogram illustrates the effects of expression of canonical miR-34b or miR-449c and 5'-isomiR-34b or 5'-isomiR-449c on the different phases of the cell cycle assessed using the FUCCI sensor cells. Red bars correspond to G1 phase and green bars correspond to S/G2/M phases. Data were compared to

miR-Neg conditions and are representative of 3 independent experiments. **(b)** The histogram represents the quantification of focal adhesion foci per cell in response to overexpression of miR-Neg in grey as negative control, canonical miR-34b or miR-449c in red and 5'-isomiR-34b or 5'-isomiR-449c in blue. Data are means \pm s.d. from 3 to 6 independent experiments; ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$, ns, not significant, Student's t-test. **(c)** Immunostaining of focal adhesion protein Paxillin (in green), F-actin (in red) and nuclei (in blue) in A549 epithelial cells transfected for 72h with control miRNA (miR-Neg), canonical miR-34b, canonical miR-449c, 5'-isomiR-34b or 5'-isomiR-449c.

Table 1

MiRNA expression and sequence distribution in ten tissues. Each miRNA variant read was counted according to its 5'-start compared to miRBase (position -2, -1, 0, 1, 2). Final sheet gathers all miRNAs with >50% reads differing from miRBase 5'-start.

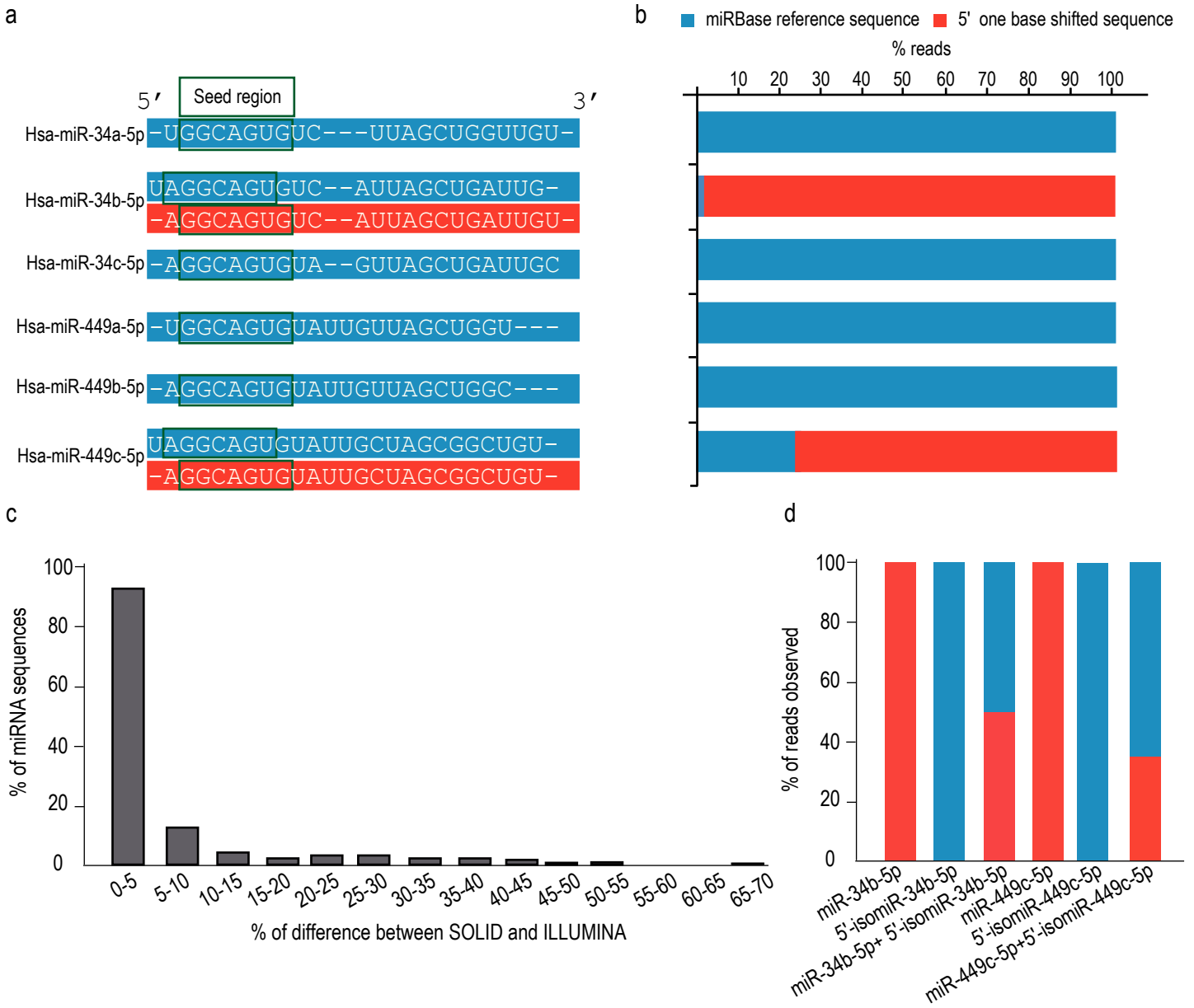


Figure 1

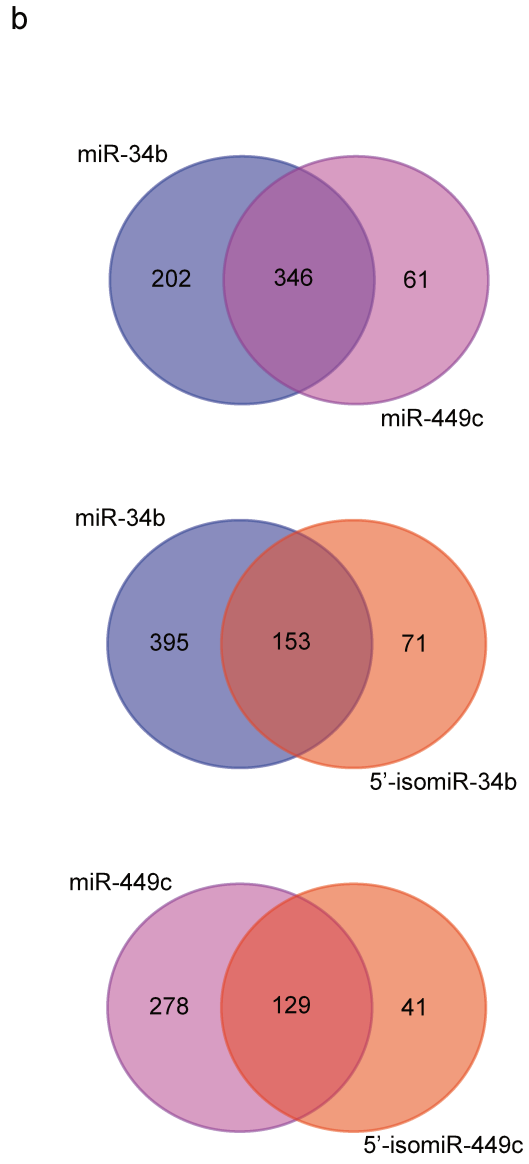
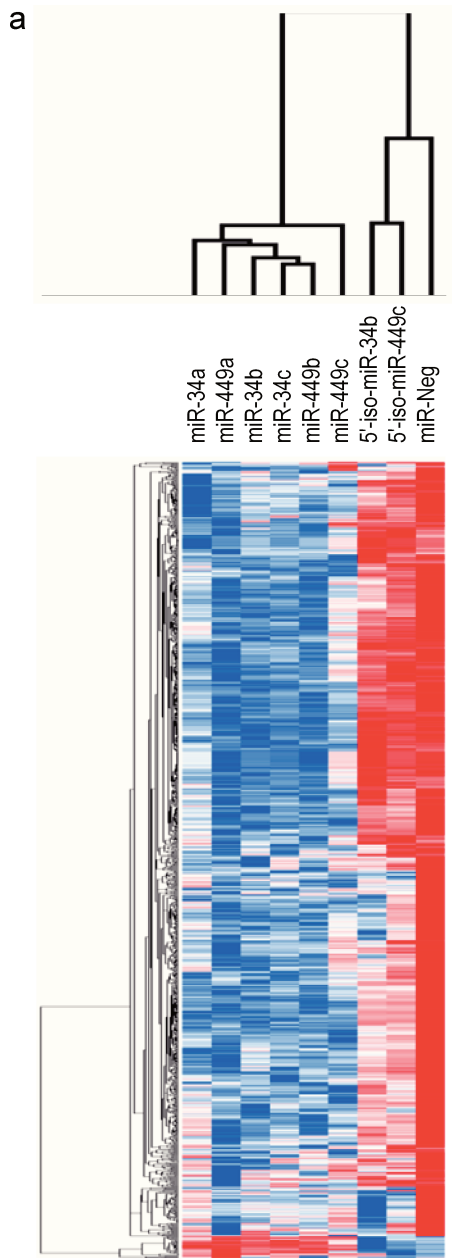


Figure 2

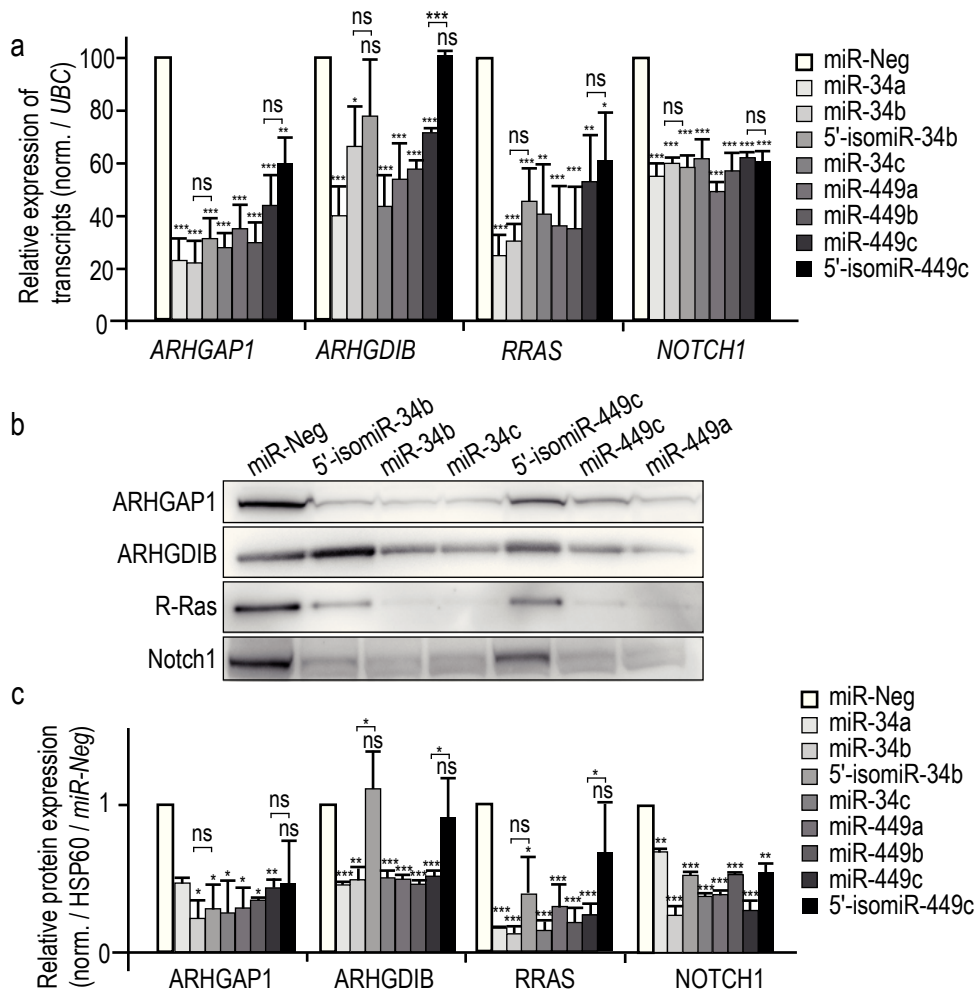


Figure 3

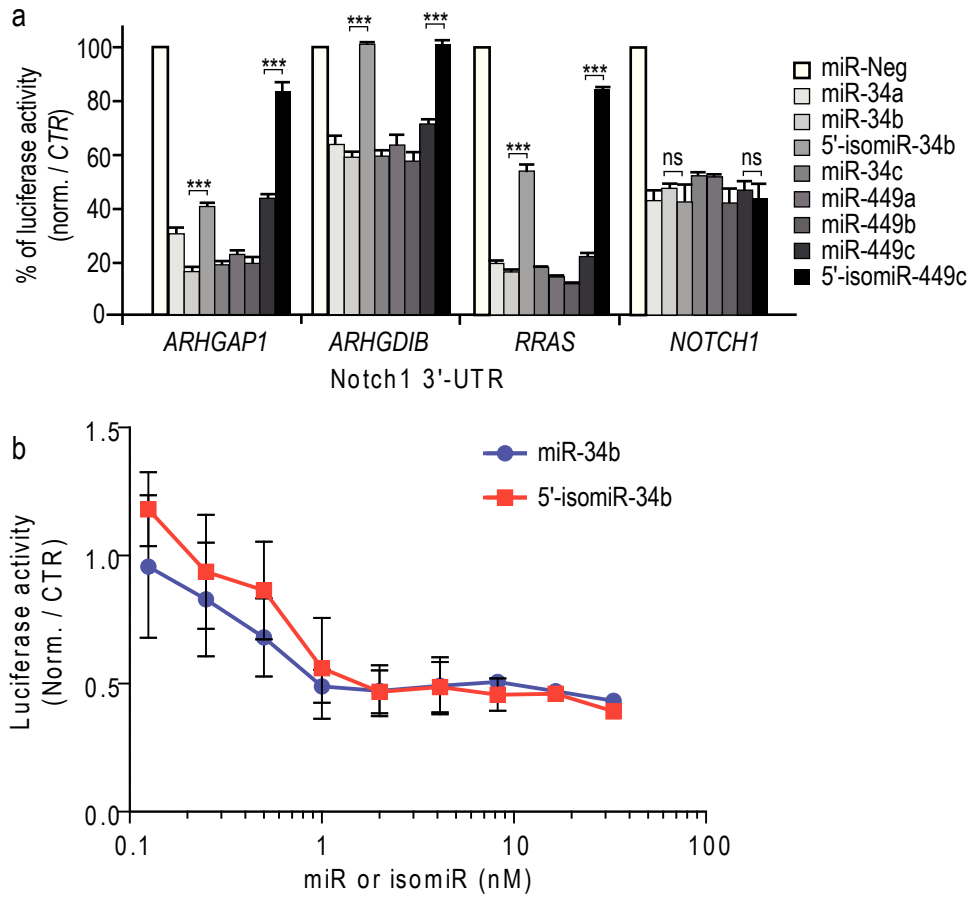


Figure 4

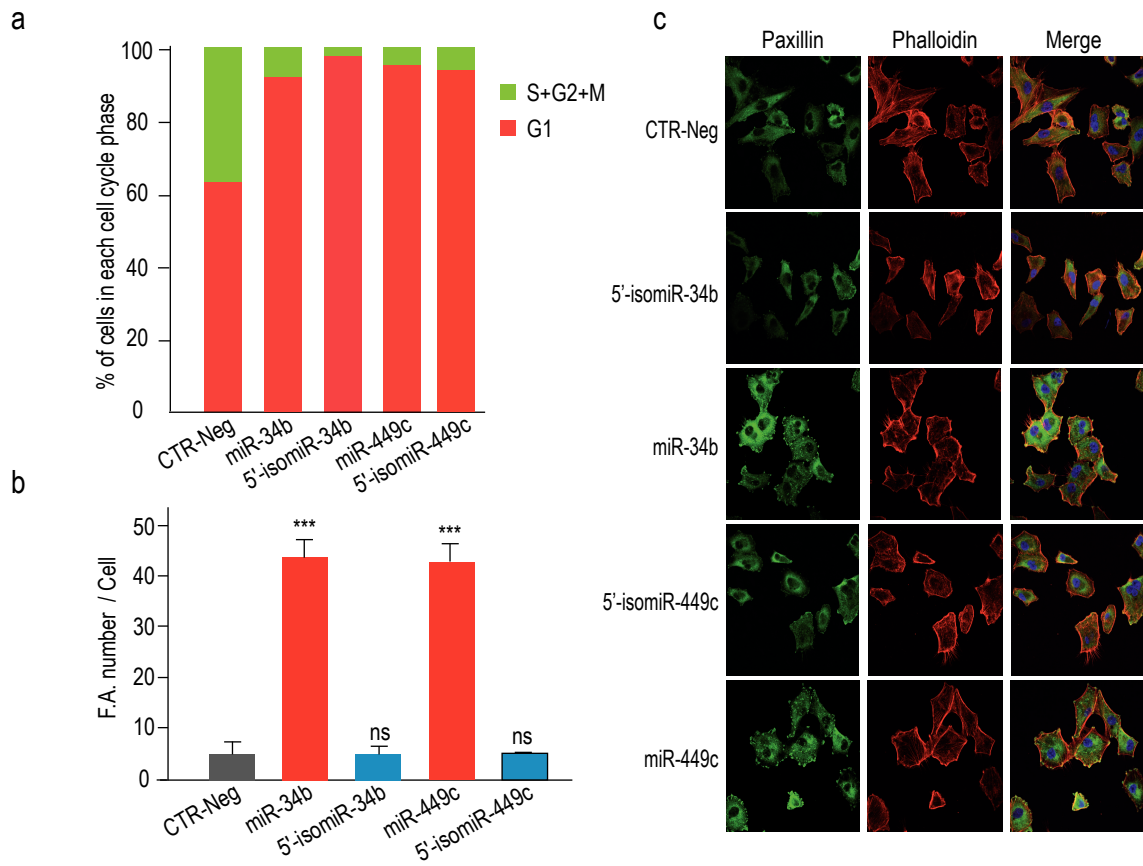


Figure 5

References

- Agarwal, V., G. W. Bell, et al. (2015). "Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs." Elife **4**.
- Ambros, V. (2004). "The functions of animal microRNAs." Nature **431**(7006): 350-5.
- Anders, S. and W. Huber (2010). "Differential expression analysis for sequence count data." Genome Biol **11**(10): R106.
- Azuma-Mukai, A., H. Oguri, et al. (2008). "Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(23): 7964-9.
- Baek, D., J. Villen, et al. (2008). "The impact of microRNAs on protein output." Nature **455**(7209): 64-71.
- Bao, J., D. Li, et al. (2012). "MicroRNA-449 and microRNA-34b/c function redundantly in murine testes by targeting E2F transcription factor-retinoblastoma protein (E2F-pRb) pathway." J Biol Chem **287**(26): 21686-98.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-97.
- Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." Cell **136**(2): 215-33.
- Bartels, C. L. and G. J. Tsongalis (2009). "MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer." Clin Chem **55**(4): 623-31.
- Brennecke, J., A. Stark, et al. (2005). "Principles of microRNA-target recognition." PLoS Biol **3**(3): e85.
- Chevalier, B., A. Adamiok, et al. (2015). "miR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways." Nat Commun **6**: 8386.
- Chiang, H. R., L. W. Schoenfeld, et al. (2010). "Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes." Genes Dev **24**(10): 992-1009.
- Choi, Y. J., C. P. Lin, et al. (2011). "miR-34 miRNAs provide a barrier for somatic cell reprogramming." Nat Cell Biol **13**(11): 1353-60.

Christodoulou, F., F. Raible, et al. (2010). "Ancient animal microRNAs and the evolution of tissue identity." Nature **463**(7284): 1084-8.

Cloonan, N., S. Wani, et al. (2011). "MicroRNAs and their isomiRs function cooperatively to target common biological pathways." Genome Biol **12**(12): R126.

BACKGROUND: Variants of microRNAs (miRNAs), called isomiRs, are commonly reported in

Concepcion, C. P., Y. C. Han, et al. (2012). "Intact p53-dependent responses in miR-34-deficient mice." PLoS Genet **8**(7): e1002797.

Cummins, J. M., Y. He, et al. (2006). "The colorectal microRNAome." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(10): 3687-92.

de Hoon, M. J., R. J. Taft, et al. (2010). "Cross-mapping and the identification of editing sites in mature microRNAs in high-throughput sequencing libraries." Genome Res **20**(2): 257-64.

Doench, J. G. and P. A. Sharp (2004). "Specificity of microRNA target selection in translational repression." Genes Dev **18**(5): 504-11.

Ebhardt, H. A., H. H. Tsang, et al. (2009). "Meta-analysis of small RNA-sequencing errors reveals ubiquitous post-transcriptional RNA modifications." Nucleic Acids Res **37**(8): 2461-70.

Ebrahimi, A. and E. Sadroddiny (2015). "MicroRNAs in lung diseases: Recent findings and their pathophysiological implications." Pulm Pharmacol Ther.

Frank, F., N. Sonenberg, et al. (2010). "Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2." Nature **465**(7299): 818-22.

Fukunaga, R., B. W. Han, et al. (2012). "Dicer partner proteins tune the length of mature miRNAs in flies and mammals." Cell **151**(3): 533-46.

Giovannini-Chami, L., N. Grandvaux, et al. (2011). "Impact of microRNA in normal and pathological respiratory epithelia." Methods Mol Biol **741**: 171-91.

Guo, L., H. Li, et al. (2012). "Consistent isomiR expression patterns and 3' addition events in miRNA gene clusters and families implicate functional and evolutionary relationships." Mol Biol Rep **39**(6): 6699-706.

Guo, L., H. Zhang, et al. (2014). "Selected isomiR expression profiles via arm switching?" Gene **533**(1): 149-55.

Guo, L., Y. Zhao, et al. (2014). "A genome-wide screen for non-template nucleotides and isomiR repertoires in miRNAs indicates dynamic and versatile microRNAome." Mol Biol Rep.

Guo, Y., J. Liu, et al. (2015). "Characterization of the mammalian miRNA turnover landscape." Nucleic Acids Res **43**(4): 2326-41.

Steady state cellular microRNA (miRNA) levels represent the balance between miRNA

Ha, M. and V. N. Kim (2014). "Regulation of microRNA biogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(8): 509-24.

Humphreys, D. T., C. J. Hynes, et al. (2012). "Complexity of murine cardiomyocyte miRNA biogenesis, sequence variant expression and function." PLoS One **7**(2): e30933.

Inui, M., G. Martello, et al. (2010). "MicroRNA control of signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(4): 252-63.

Janga, S. C. and S. Vallabhaneni (2011). "MicroRNAs as post-transcriptional machines and their interplay with cellular networks." Adv Exp Med Biol **722**: 59-74.

Kim, J., I. S. Cho, et al. (2008). "Identification and characterization of new microRNAs from pig." Mamm Genome **19**(7-8): 570-80.

Kim, V. N., J. Han, et al. (2009). "Biogenesis of small RNAs in animals." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(2): 126-39.

Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones (2014). "miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data." Nucleic Acids Res **42**(Database issue): D68-73.

Le Brigand, K. and P. Barbry (2007). "Mediante: a web-based microarray data manager." Bioinformatics **23**(10): 1304-6.

Lee, L. W., S. Zhang, et al. (2010). "Complexity of the microRNA repertoire revealed by next-generation sequencing." RNA **16**(11): 2170-80.

Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et al. (1993). "The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14." Cell **75**(5): 843-54.

Lewis, B. P., C. B. Burge, et al. (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell **120**(1): 15-20.

Lize, M., C. Herr, et al. (2010). "MicroRNA-449a levels increase by several orders of magnitude during mucociliary differentiation of airway epithelia." Cell Cycle **9**(22): 4579-83.

Lize, M., S. Pilarski, et al. (2010). "E2F1-inducible microRNA 449a/b suppresses cell proliferation and promotes apoptosis." Cell Death Differ **17**(3): 452-8.

Llorens, F., M. Banez-Coronel, et al. (2013). "A highly expressed miR-101 isomiR is a functional silencing small RNA." BMC Genomics **14**: 104.

Llorens, F., M. Hummel, et al. (2013). "Microarray and deep sequencing cross-platform analysis of the mirRNome and isomiR variation in response to epidermal growth factor." BMC Genomics **14**: 371.

Loh, Y. H., S. V. Yi, et al. (2011). "Evolution of microRNAs and the diversification of species." Genome Biol Evol **3**: 55-65.

Manzano, M., E. Forte, et al. (2015). "Divergent target recognition by coexpressed 5'-isomiRs of miR-142-3p and selective viral mimicry." RNA **21**(9): 1606-20.

Marcet, B., B. Chevalier, et al. (2011). "MicroRNA-based silencing of Delta/Notch signaling promotes multiple cilia formation." Cell Cycle **10**(17): 2858-64.

Marcet, B., B. Chevalier, et al. (2011). "Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway." Nat Cell Biol **13**(6): 693-9.

Mattes, J., M. Yang, et al. (2007). "Regulation of microRNA by antagomirs: a new class of pharmacological antagonists for the specific regulation of gene function?" Am J Respir Cell Mol Biol **36**(1): 8-12.

Mercey, O., L. Kodjabachian, et al. (2016). "MicroRNAs as key regulators of GTPase-mediated apical actin reorganization in multiciliated epithelia." Small GTPases **7**(2): 54-8.

Miska, E. A., E. Alvarez-Saavedra, et al. (2007). "Most Caenorhabditis elegans microRNAs are individually not essential for development or viability." PLoS Genet **3**(12): e215.

Morin, R. D., M. D. O'Connor, et al. (2008). "Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells." Genome Res **18**(4): 610-21.

Neilsen, C. T., G. J. Goodall, et al. (2012). "IsomiRs--the overlooked repertoire in the dynamic microRNome." Trends Genet **28**(11): 544-9.

Pantano, L., X. Estivill, et al. (2010). "SeqBuster, a bioinformatic tool for the processing and analysis of small RNAs datasets, reveals ubiquitous miRNA modifications in human embryonic cells." Nucleic Acids Res **38**(5): e34.

Peters, J. and J. E. Robson (2008). "Imprinted noncoding RNAs." Mamm Genome **19**(7-8): 493-502.

Pottier, N., C. Cauffiez, et al. (2014). "FibromiRs: translating molecular discoveries into new anti-fibrotic drugs." Trends Pharmacol Sci **35**(3): 119-26.

Reese, T. A., J. Xia, et al. (2010). "Identification of novel microRNA-like molecules generated from herpesvirus and host tRNA transcripts." J Virol **84**(19): 10344-53.

Reich, M., T. Liefeld, et al. (2006). "GenePattern 2.0." Nat Genet **38**(5): 500-1.

Ruby, J. G., C. Jan, et al. (2006). "Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*." Cell **127**(6): 1193-207.

Ruby, J. G., A. Stark, et al. (2007). "Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs." Genome Res **17**(12): 1850-64.

Schmitt, M. J., C. Margue, et al. (2013). "MiRNA-29: a microRNA family with tumor-suppressing and immune-modulating properties." Curr Mol Med **13**(4): 572-85.

Sdassi, N., L. Silveri, et al. (2009). "Identification and characterization of new miRNAs cloned from normal mouse mammary gland." BMC Genomics **10**: 149.

Siomi, M. C. and H. Siomi (2008). "Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing." Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)(52): 59-60.

Song, R., P. Walentek, et al. (2014). "miR-34/449 miRNAs are required for motile ciliogenesis by repressing cp110." Nature **510**(7503): 115-20.

Tam, S., R. de Borja, et al. (2014). "Robust global microRNA expression profiling using next-generation sequencing technologies." Lab Invest **94**(3): 350-8.

Tan, G. C., E. Chan, et al. (2014). "5' isomiR variation is of functional and evolutionary importance." Nucleic Acids Res.

Tan, G. C., E. Chan, et al. (2014). "5' isomiR variation is of functional and evolutionary importance." Nucleic Acids Res **42**(14): 9424-35.

Turchinovich, A. and B. Burwinkel (2012). "Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma." RNA Biol **9**(8): 1066-75.

Walentek, P., I. K. Quigley, et al. (2016). "Ciliary transcription factors and miRNAs precisely regulate Cp110 levels required for ciliary adhesions and ciliogenesis." Elife **5**.

Walentek, P., R. Song, et al. (2014). "microRNAs and cilia. An ancient connection." Cell Cycle **13**(15): 2315-6.

Wang, L., C. Fu, et al. (2013). "miR-34b regulates multiciliogenesis during organ formation in zebrafish." Development **140**(13): 2755-64.

Wong, K. Y., L. Yu, et al. (2011). "DNA methylation of tumor suppressor miRNA genes: a lesson from the miR-34 family." Epigenomics **3**(1): 83-92.

miRNA is a small ncRNA of 22-25 nucleotides, which leads to mRNA degradation or

Wu, J., J. Bao, et al. (2014). "Two miRNA clusters, miR-34b/c and miR-449, are essential for normal brain development, motile ciliogenesis, and spermatogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(28): E2851-7.

Yates, L. A., C. J. Norbury, et al. (2013). "The long and short of microRNA." Cell **153**(3): 516-9.

Zielke, N. and B. A. Edgar (2015). "FUCCI sensors: powerful new tools for analysis of cell proliferation." Wiley Interdiscip Rev Dev Biol **4**(5): 469-87.

III. L'implication de la voie de signalisation BMP dans la différenciation multiciliée chez les vertébrés

A. Contexte de l'étude

La voie de signalisation Notch a été clairement établie comme une voie majeure dans la différenciation des MCC chez les vertébrés. Son inhibition est en particulier décrite comme étant l'étape la plus précoce afin de permettre la spécification des cellules indifférenciées. Néanmoins, les mécanismes mis en jeu dans cette répression demeurent encore largement incompris.

Cette voie a également été décrite pour être dans certains contextes intimement interconnectée avec la voie BMP. Tandis que la voie BMP a été largement étudiée au cours du développement, son implication dans la différenciation des MCC n'avait jamais été étudiée. Dans cette perspective, nous avons exploré le rôle de la voie BMP au cours de la multiciliogénèse à partir de nos deux modèles d'étude, l'épiderme d'embryon de xénope (Cf Partie IV.A.1.b), et les cultures primaires de cellules épithéliales respiratoires humaines (Cf Partie IV.A.2).

B. Résultats

Article 5 : Cibois M*, Luxardi G*, Chevalier B*, Thomé V, **Mercey O**, Zaragosi LE, Barbry P, Pasini A, Marcet B#, Kodjabachian L#. BMP signalling controls the construction of vertebrate mucociliary epithelia. *Development*. (2015). 142: 2352-2363 (*, contribution équivalente, #, Co-senior)

1. La voie de signalisation BMP est active au cours de la différenciation mucociliée chez l'Homme et le xénope

La phosphorylation des SMAD1/5/8 est un événement indicateur de l'activité de la voie BMP. Nous avons montré par des expériences d'immuno-marquages au cours des étapes de maturation de l'épiderme d'embryon de xénope, que la voie BMP est active à la fois dans la couche interne et externe de l'épiderme, et ce à tous les stades du développement analysés. En utilisant des marqueurs spécifiques de différents types cellulaires, nous avons observé que la voie BMP est active à la fois dans les ionocytes (cellules positives pour la Pendrine) et dans les MCC (positives pour la tubuline- α), et ceci avant ou après intercalation.

Dans les expériences sur cellules humaines en début de différenciation auxquelles j'ai contribuées, l'immuno-marquage des phospho-SMAD révèle un fort enrichissement dans les cellules en cours de différenciation contrairement aux cellules basales dans lesquelles aucun marquage n'est détecté. Un traitement avec du BMP2 (agoniste de la voie BMP) entraîne néanmoins une détection du signal phospho-SMAD dans ces cellules basales, indiquant que celles-ci sont capables de répondre à une telle stimulation de la voie BMP. La quantification par Western Blot de la phosphorylation des SMAD révèle que l'activité de BMP atteint un pic en début de différenciation (lors de la polarisation des cellules cylindriques), puis diminue dans les étapes plus tardives de différenciation. Ainsi, l'activation de la voie BMP dans des étapes précoces de différenciation de l'épithélium est un phénomène conservé de la grenouille à l'Homme.

2. La modulation de la voie BMP perturbe la formation de l'épithélium mucocilié

Nous avons par la suite examiné l'effet de la modulation de cette voie sur la différenciation de l'épithélium mucocilié. Une suractivation de la voie BMP, par injection soit d'un agoniste de la voie BMP (BMP4) soit d'une forme constitutivement active du récepteur BMP Alk3 (pour « Activin receptor-like kinase 3 ») à une étape précoce de la formation de l'épithélium chez l'embryon de xénope provoque une très forte diminution du nombre de MCC, d'ionocytes et de petites cellules sécrétrices mais n'induit aucune perte de cellules à mucus.

Dans le modèle humain, un traitement chronique par du BMP2 supprime complètement la différenciation des MCC comme observé chez le xénope, mais bloque aussi fortement la formation des cellules sécrétrices de mucus, contrairement à ce qui est observé chez le xénope. De plus, en réponse à ce traitement, les cellules présentent un aspect aplati et expriment des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse, suggérant une métaplasie squameuse de l'épithélium. Comme dans les deux modèles, une suractivation précoce de la voie BMP altère la mise en place de l'épithélium mucocilié, nous avons ensuite étudié l'effet d'une inhibition précoce de la voie BMP sur la différenciation de l'épithélium mucocilié. Chez le xénope, la répression de BMP entraîne une augmentation du nombre de MCC, d'ionocytes et des petites cellules sécrétrices accompagnée d'une diminution du nombre de cellules sécrétrices de mucus. En revanche, de manière surprenante, les MCC restent piégées dans la couche interne de l'épiderme et ne s'intercalent pas.

Dans le modèle humain, une inhibition précoce de la voie BMP induite par un traitement avec Noggin (inhibiteur protéique endogène de la voie BMP2/4) ou bien de la dorsomorphine (inhibiteur chimique de la voie BMP) entraîne une augmentation spectaculaire du nombre de MCC et de cellules sécrétrices de mucus. Ma contribution à ce niveau a consisté à déterminer la fenêtre d'action de la voie BMP au cours de la différenciation de l'épithélium mucocilié des voies

respiratoires. Nous avons observé le même effet à partir de cellules de patients atteints de mucoviscidose. Cet effet remarquable suggère qu'il est possible de stimuler la formation de MCC dans un modèle pathologique, et donc potentiellement d'améliorer la fonction de clairance mucociliaire, perturbée dans ce genre de pathologie.

3. Interconnexion entre voie BMP et voie Notch

Etant donné que la voie Notch a largement été décrite comme participant à la différenciation mucociliée, nous avons cherché à savoir si les effets observés par la modulation de la voie BMP pouvaient être imputables à une régulation de la voie Notch. En injectant du BMP4 à un stade précoce dans l'épiderme d'embryon de xénope, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression du ligand de la voie Notch Dll1. L'effet miroir est également observé lorsque l'expression de BMP4 est inhibée au même stade à l'aide de morpholinos. De plus, la capacité du BMP4 exogène à réguler l'expression de Dll1 est limitée dans une courte fenêtre temporelle qui coïncide avec son aptitude à bloquer la formation des MCC, ionocytes et petites cellules sécrétrices. D'ailleurs, suite à la surexpression de BMP4, nous avons observé que Dll1 colocalise successivement avec les marqueurs des MCC, ionocytes et petites cellules sécrétrices. Dès lors, il semble que l'activation de la voie Notch *via* la voie BMP entraîne un blocage de la différenciation dans ces types cellulaires.

C. Conclusion

Nous avons été les premiers à mettre en évidence un rôle conservé de la voie de signalisation BMP dans la mise en place de l'épithélium mucocilié chez les vertébrés. Nous avons néanmoins souligné une différence concernant l'effet sur les cellules sécrétrices de mucus entre les deux espèces. Cette observation peut trouver une probable explication dans la différence d'origine de ce type cellulaire dans les deux modèles. Chez l'Homme, les cellules à mucus, comme les MCC, proviennent de mêmes progéniteurs. Il est donc envisageable qu'une modulation précoce agisse indifféremment sur les deux types cellulaires. En revanche, les cellules à mucus de xénope naissent dans la couche externe de l'épiderme contrairement aux autres cellules différenciées qui prennent naissance dans la couche interne. Dès lors, il n'est pas étonnant que ces types cellulaires puissent répondre différemment à certains signaux. En prenant part à différentes expériences sur le modèle IAL humain, j'ai pu apporter une contribution substantielle dans les résultats obtenus.

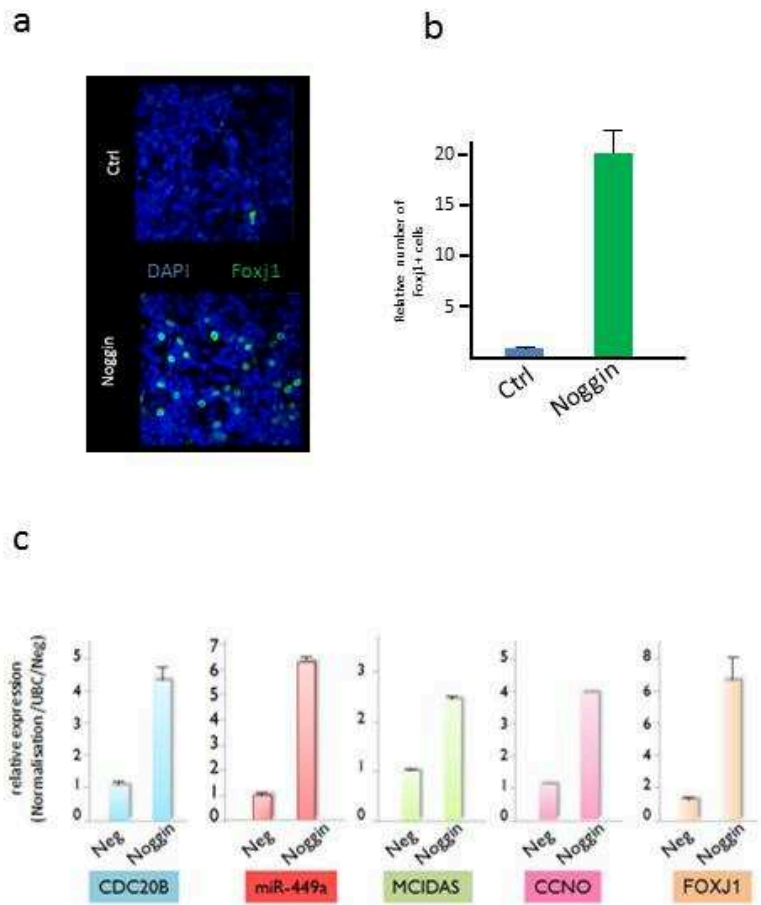


Figure additionnelle 1: L'inhibition de BMP induit l'expression de marqueurs précoces de la multiciliogénèse

a. Immuno-marquage fluorescent de cellules épithéliales respiratoires humaines traitées ou non par Noggin. Le marqueur des noyaux (DAPI) est en bleu et Foxj1 en vert. b. Quantification des cellules obtenues en immuno-marquage (n=3 donneurs). c. RT-qPCR de gènes reliés à la différenciation multiciliée à partir de cultures de cellules épithéliales stimulées ou non par Noggin

D. Résultats additionnels

1. L'inhibition précoce de la voie BMP augmente le nombre de précurseurs des cellules multiciliées

Nous avons préalablement démontré que l'inhibition précoce (au moment de la polarisation de l'épithélium) de la voie BMP augmente significativement le nombre de MCC en fin de différenciation. J'ai récemment obtenu des résultats montrant que la répression de cette voie induit l'expression de marqueurs précoces de différenciation de MCC. L'immuno-marquage de Foxj1 m'a permis de révéler que l'inhibition précoce de BMP par Noggin augmente significativement le nombre de précurseurs de MCC, suggérant que la répression de BMP module des événements précoces de différenciation (Figure additionnelle 1a,b). Ce résultat est confirmé par la quantification en qRT-PCR d'autres marqueurs précoces de différenciation des MCC tels que *MCIDAS*, *CCNO* ou encore *MYB* (Figure additionnelle, Figure 1c).

2. La répression de la voie BMP inhibe fortement l'expression de la famille d'inhibiteurs de différenciation ID

Afin de déterminer les événements précoces successifs à la modulation de la voie BMP, j'ai analysé l'expression génique par puces transcriptomiques et par séquençage à haut débit après 6h, 24h et 72h de stimulation par BMP2 ou Noggin dans notre modèle humain de multiciliogénèse. Ceci m'a permis d'observer un effet en miroir entre l'agoniste BMP2 et l'antagoniste Noggin sur l'expression d'une famille de répresseurs de différenciation appelée ID (Inhibitor of Differentiation). L'expression des 4 membres de cette famille (ID1/ID2/ID3/ID4) est fortement induite par BMP2 tandis qu'elle est fortement réprimée en réponse à Noggin (Figure additionnelle, Figure 2a). J'ai par la suite confirmé ces résultats par qRT-PCR (Figure additionnelle, Figure 2b).

L'analyse de l'expression des transcrits de la famille ID au cours de la différenciation dans notre modèle indique que les 4 membres sont exprimés, bien qu'ID3 et ID4 le sont dans une moindre mesure. L'expression d'ID2 augmente significativement en tout début de différenciation, puis est significativement diminuée dans les étapes tardives de multiciliogénèse (Figure additionnelle, Figure 2c).

3. L'inhibition des ID par Noggin pourrait moduler l'activité transcriptionnelle du facteur précoce de différenciation E2F4

Les ID sont des molécules de la famille bHLH (basic Helix Loop Helix) qui regroupe de nombreux facteurs de transcription. Les facteurs de transcription de type bHLH s'associent sous forme de dimères (homo ou hétérodimères) afin de réguler l'expression génique en se fixant sur des

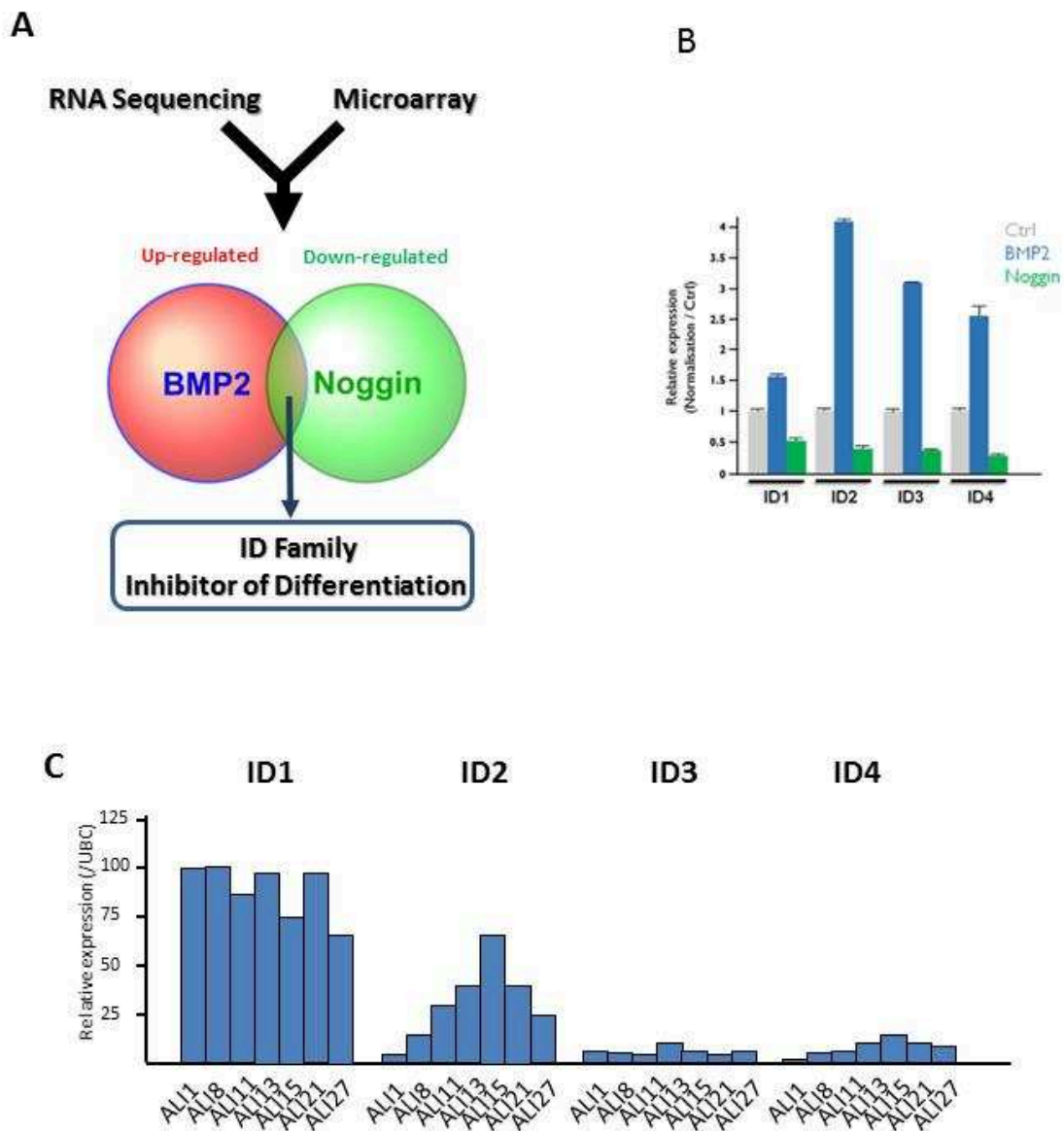


Figure additionnelle 2 : Les gènes de la famille ID sont sensibles à la modulation de la voie BMP

A. Stratégie réalisée afin de mettre en évidence des gènes modulés en miroir par BMP2 (agoniste de la voie BMP) et Noggin (antagoniste).

B. Expression des gènes ID par qRT-PCR en réponse au traitements BMP2 ou Noggin dans des cellules épithéliales respiratoires humaines.

C. Expression des gènes ID par qRT-PCR au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire *in vitro*. ALI représente le jour de différenciation après mise en interface Air/Liquide

régions cibles de l'ADN. La particularité des ID est que contrairement aux autres membres des bHLH, elles ne possèdent pas de résidus basiques au sein de leur séquence protéique, leur permettant de se fixer à l'ADN. Dès lors, elles ont une fonction inhibitrice en empêchant leur partenaire du dimère de se fixer sur l'ADN.

Nous avons donc voulu déterminer si la répression de cette famille d'inhibiteurs pouvait permettre à un facteur de transcription de recouvrer son potentiel transcriptionnel. Une étude a montré l'interaction d'ID2 avec le facteur de transcription E2F4 (Rodríguez et al. 2006), qui a été lui-même identifié comme un acteur important de la différenciation multiciliée (Ma et al. 2014; Danielian et al. 2007; Danielian et al. 2016; Arbi et al. 2016). A l'aide d'expériences de co-immunoprécipitation et de marquages fluorescents de proximité (DuoLink), j'ai montré qu'ID2 et E2F4 interagissent dans notre modèle (Figure additionnelle, Figures 3a,b). De manière intéressante, l'expression protéique d'E2F4 révèle un maximum d'expression en début de différenciation, dans la fenêtre temporelle où l'inhibition de BMP entraîne une forte augmentation du nombre de MCC (Figure additionnelle, Figure 3c).

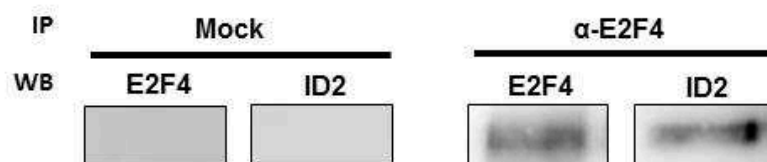
4. Les effets de la modulation de la voie BMP sur la multiciliogénèse sont indépendants de la voie Notch

Nous avons montré qu'il existe une interaction possible entre la voie BMP et la voie Notch pour contrôler la multiciliogénèse chez le xénope. Nous avons donc cherché à déterminer si cette régulation est également effective chez l'Homme dans notre modèle de culture IAL de cellules épithéliales respiratoires. A l'aide de nos expériences de puces et de séquençage haut débit ainsi que par qRT-PCR, j'ai pu révéler que l'expression des cibles transcriptionnelles de la voie Notch (les gènes HES pour Hairy and Enhancer of Split et HEY pour Hes-related with YRPW motif) ne sont pas régulées par la modulation de l'activité de BMP (Figure additionnelle, Figure 4a). Ce résultat a été par la suite confirmé par Western Blot en révélant que les protéines Notch1 et DLL1 n'étaient pas non plus modulées en réponse à l'inhibition de la voie BMP (Figure additionnelle, Figure 4b).

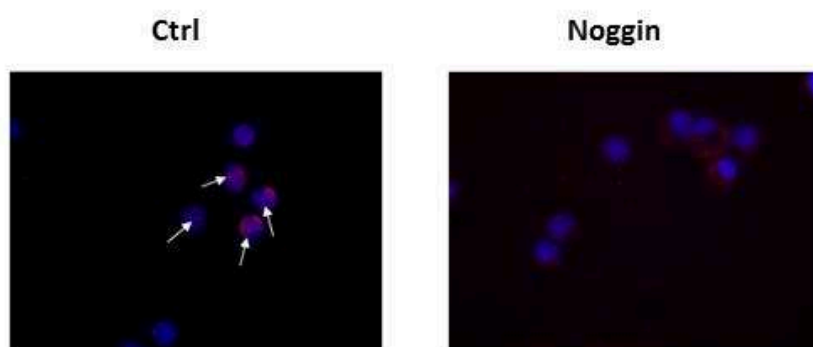
5. L'inhibition de BMP augmente la régénération des cellules multiciliées *in vivo*

Nous avons enfin étudié l'effet de l'inhibition de la voie BMP *in vivo* chez la souris. Pour cela, des souris ont été traitées de manière chronique avec un allergène afin d'induire une inflammation des voies respiratoires (Figure additionnelle, Figure 5a). J'ai tout d'abord montré que cette inflammation entraînait une perte globale des MCC au niveau de la trachée (observée par immunofluorescence) (Figure additionnelle, Figure 5b,c). Durant la phase de régénération de l'épithélium de surface, des injections chroniques de Noggin ont été réalisées par voie intranasale. Par ces expériences, j'ai pu révéler que l'inhibition de la voie BMP par la molécule endogène

A



B



C

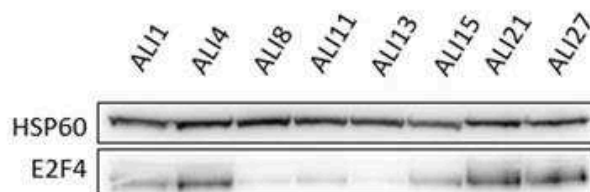


Figure additionnelle 3: ID2 et E2F4 interagissent dans les cellules épithéliales respiratoires humaines

A. Co-immunoprécipitation d'ID2 avec E2F4. Mock : anticorps contrôle ; IP : immunoprécipitation; WB : Western Blot.

B. Immunomarquage de proximité Duolink entre ID2 et E2F4 sur cellules épithéliales isolées par cytopspin. Les flèches blanches représentent du signal reflétant l'interaction des deux protéines.

C. Expression d'E2F4 en protéine au cours de la différenciation. ALI représente le jour de différenciation après mise en interface Air/Liquide

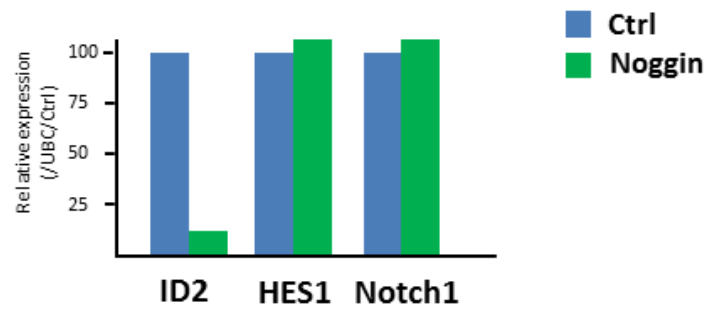
Noggin permet d'induire la régénération d'un plus grand nombre de MCC par rapport aux souris contrôles (Figure additionnelle, Figure 5d).

E. Conclusion

A travers cette étude préliminaire, j'ai tenté d'élucider par quels mécanismes moléculaires l'inhibition du signal BMP est capable d'induire la multiciliogénèse. Les premiers résultats semblent suggérer que l'inhibition des protéines ID par Noggin pourrait entraîner une dé-répression du facteur clé E2F4. Nous essayons désormais de prouver que l'interaction mise en évidence entre ID2 et E2F4 permet en effet d'expliquer un mécanisme répresseur des ID sur la différenciation *via* E2F4. Nous tâcherons notamment de savoir si l'inhibition des ID permet à E2F4, libre, d'être transcriptionnellement actif et de stimuler l'expression de gènes clés de la différenciation comme l'a démontré l'équipe de Kintner (Ma et al. 2014).

Enfin, nous avons montré que l'inhibition du signal BMP permet d'augmenter fortement le nombre de MCC dans notre modèle *in vitro* de différenciation aussi bien à partir de cellules issues de patients « normaux » que de patients atteints de mucoviscidose. J'ai également démontré la capacité de l'inhibition du signal BMP à induire une régénération des MCC dans un modèle d'asthme *in vivo* chez la souris. L'ensemble de nos résultats laisse supposer d'un potentiel intérêt thérapeutique de l'inhibition de la voie BMP dans la régénération d'un épithélium fonctionnel dans le cas de pathologies respiratoires chroniques associées à des désordres ciliaires.

A



B

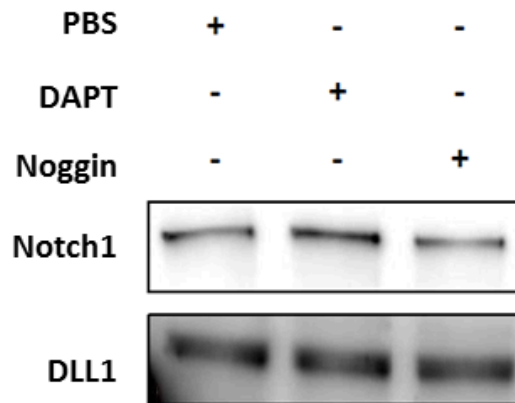


Figure additionnelle 4: Les effets de l'inhibition de Notch sur la multiciliogénèse sont indépendants de la voie Notch dans des cellules épithéliales respiratoires humaines

A. Expression de gènes de la voie Notch et de ID2 par qRT-PCR en réponse à une stimulation Noggin.

B. Expression protéique de Notch1 et DLL1 en réponse à un traitement par DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester) ou Noggin

F. Procédures expérimentales

Co-immunoprécipitation

Les expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées en suivant les instructions du fournisseur (Pierce co-immunoprecipitation kit, ThermoFisher Scientific). Dans un premier temps, les anticorps contrôles (anti-IgG de souris) ou anti-E2F4 sont immobilisés sur résine dans des colonnes. En parallèle, le lysat protéique est passé sur colonne composée d'une résine contrôle où s'adsorbent toutes les protéines réalisant des interactions non spécifiques avec la résine. Par la suite, le lysat obtenu après élution de la colonne avec la résine contrôle est déposé sur les colonnes précédemment immobilisées avec les anticorps et incubé sur la nuit à 4°C sous rotation. Le lendemain l'élution est réalisée et les fractions récupérées sont analysées par Western Blot.

Coimmunomarquage de proximité (Duolink®)

La technique de co-immuno-marquage de proximité (Duolink®, Sigma Aldrich) permet de mettre en évidence la proximité d'ID2 et d'E2F4 dans des cellules préalablement isolées par cytopspin. Concrètement, une première incubation est réalisée avec des anticorps primaires spécifiques des deux protéines d'intérêt. Par la suite, des anticorps secondaires, chacun couplé à une séquence oligonucléotidique, sont ajoutés. Lorsque les deux oligonucléotides sont proches l'un de l'autre, une réaction de ligation et d'amplification est possible. Durant l'étape d'amplification, des sondes fluorescentes viennent s'hybrider sur les séquences nucléiques néosynthétisées et entraîne la formation d'un signal spécifique à l'endroit où la ligation s'est produite, reflétant donc la proximité des deux protéines analysées.

Expériences in vivo sur souris asthmatiques

Les souris utilisées sont soumises à un protocole induisant une réponse inflammatoire allergique de type asthme. Pour cela, les souris reçoivent, après anesthésie, une administration intranasale d'ambrosie (25µg dans 30µL de NaCl 0.9%) tous les 4 jours pendant 16 jours. Le traitement par Noggin consiste à deux injections intranasales (1µg dans 30µL de NaCl 0.9%) à 5 jours d'intervalle et à partir de 3 jours après la dernière stimulation à l'ambrosie. Les trachées sont ensuite récupérées 15 jours après la dernière stimulation par Noggin. Elles sont ensuite lavées, coupées longitudinalement, puis fixées sur la nuit à 4°C dans du paraformaldéhyde à 4%, et enfin marquées afin d'observer les cils par microscopie à fluorescence (Confocal FV-10, Olympus).

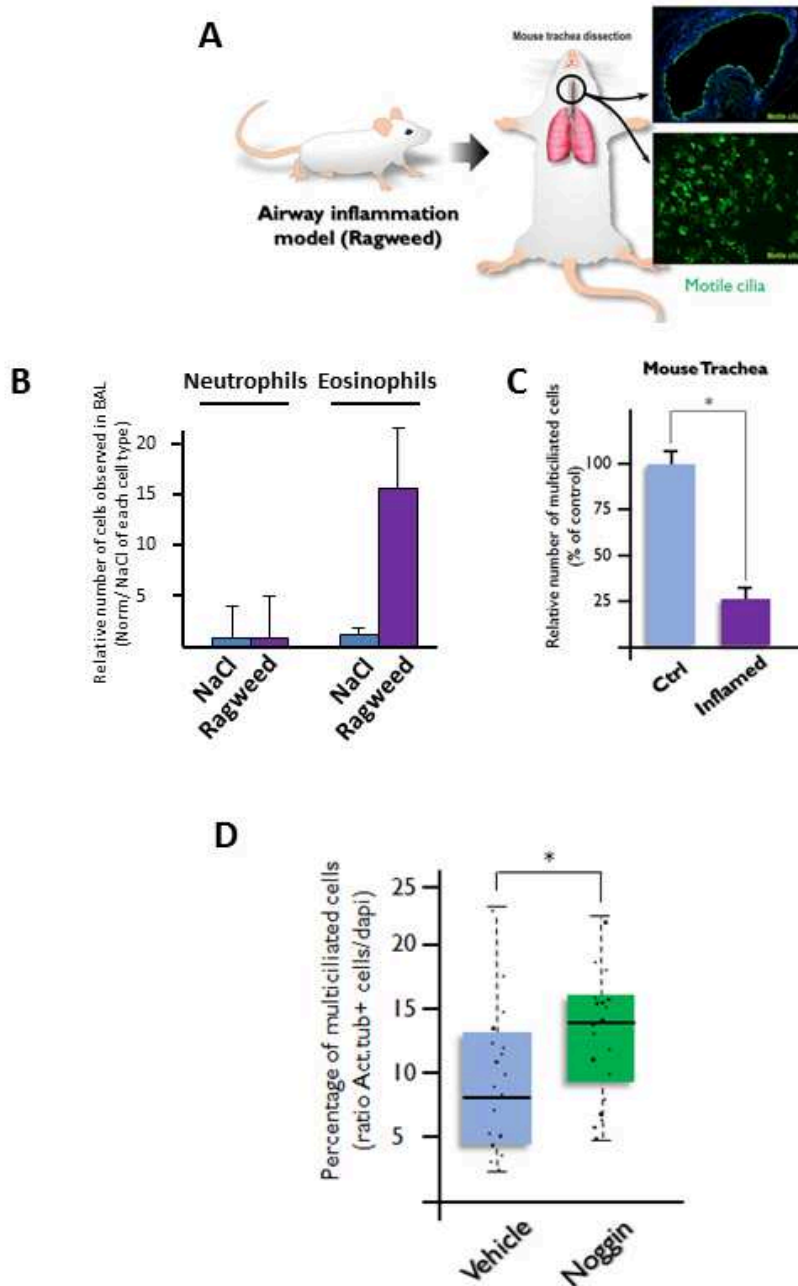


Figure additionnelle 5: L'inhibition *in vivo* de BMP par Noggin stimule la régénération des cellules multiciliées dans un modèle inflammatoire pulmonaire de souris.

A. Modèle expérimental utilisé.

B. L'administration d'ambrosie (Ragweed) stimule une réponse inflammatoire asthmatique mise en évidence par l'augmentation significative d'éosinophiles dans les lavages broncho-alvéolaires (BAL)

C. L'inflammation induite par l'ambrosie réduit considérablement le nombre de cellules multiciliées

D. L'administration chronique de Noggin stimule significativement la régénération des cellules multiciliées de l'énithélium trachéal

RESEARCH ARTICLE

BMP signalling controls the construction of vertebrate mucociliary epithelia

Marie Cibois^{1,‡}, Guillaume Luxardi^{1,*,*}, Benoit Chevalier^{2,‡}, Virginie Thomé¹, Olivier Mercey^{2,3}, Laure-Emmanuelle Zaragosi^{2,3}, Pascal Barbry², Andrea Pasini^{1,§}, Brice Marcet^{2,3,§} and Laurent Kodjabachian^{1,§,¶}

ABSTRACT

Despite the importance of mucociliary epithelia in animal physiology, the mechanisms controlling their establishment are poorly understood. Using the developing *Xenopus* epidermis and regenerating human upper airways, we reveal the importance of BMP signalling for the construction of vertebrate mucociliary epithelia. In *Xenopus*, attenuation of BMP activity is necessary for the specification of multiciliated cells (MCCs), ionocytes and small secretory cells (SSCs). Conversely, BMP activity is required for the proper differentiation of goblet cells. Our data suggest that the BMP and Notch pathways interact to control fate choices in the developing epidermis. Unexpectedly, BMP activity is also necessary for the insertion of MCCs, ionocytes and SSCs into the surface epithelium. In human, BMP inhibition also strongly stimulates the formation of MCCs in normal and pathological (cystic fibrosis) airway samples, whereas BMP overactivation has the opposite effect. This work identifies the BMP pathway as a key regulator of vertebrate mucociliary epithelium differentiation and morphogenesis.

KEY WORDS: *Xenopus*, Human, Mucociliary epithelium, Multiciliogenesis, BMP, Notch, Epidermis, Airway

INTRODUCTION

Mucociliary epithelia (MCE) are encountered in many bilaterians, where they perform a variety of functions, including animal movement, food particle capture and ingestion, gamete transportation, and protection against pollutants and infectious agents (Castillo-Briceno and Kodjabachian, 2014; Lyons et al., 2006; Rompolas et al., 2013; Silverman et al., 1999; Werner and Mitchell, 2012). One of the most widely studied MCE is the lining of the human upper airways, which ensures the clearance of inhaled noxious particles by means of the mucociliary escalator. Several chronic respiratory diseases, including asthma, chronic obstructive pulmonary diseases and cystic fibrosis, are associated with defects in MCE regeneration and impaired airway cleansing (Fahy and Dickey, 2010; Livraghi and Randell, 2007). More recently, familial cases of deficient mucociliary clearance have been linked to mutations in genes required for multiciliogenesis (Boon et al., 2014; Wallmeier et al., 2014). MCE are characterised by the presence of at least two cell types: mucus-secreting (goblet) cells and multiciliated cells (MCCs) with motile cilia that distribute and mobilise

the mucus along the epithelial surface. The mammalian airway MCE also contains basally located cells that have stem cell-like features and are responsible for renewal and maintenance of the tissue (Hajj et al., 2007; Hogan et al., 2014; Rock et al., 2009). The cellular and molecular events controlling human airway MCE formation and renewal are incompletely understood, largely owing to the poor accessibility and experimental amenability of this tissue. Air-liquid interface (ALI) primary cultures of human airway epithelial cells (HAECs) from healthy or diseased donors provide a valuable tool to investigate these processes (Karp et al., 2002; Marcet et al., 2011), but are technically demanding and might not fully recapitulate the relevant interactions occurring within the organism.

Recent studies have suggested that the embryonic epidermis of the amphibian *Xenopus* might provide a powerful and valuable model to address vertebrate MCE biology (Cibois et al., 2014; Dubaissi and Papalopulu, 2011; Werner and Mitchell, 2012). In particular, several reports revealed a striking degree of conservation in the molecular mechanisms that control MCC differentiation in mammalian upper airways and in the *Xenopus* embryonic epidermis (Marcet et al., 2011; Song et al., 2014; Stubbs et al., 2012; Tan et al., 2013; Werner and Mitchell, 2012).

In its mature form, the *Xenopus* embryonic epidermis consists of an epithelial outer layer of goblet cells that is interspersed with MCCs, osmoregulatory ionocytes and serotonin-secreting small secretory cells (SSCs), and an inner layer of non-cohesive P63-positive cells (Deblandre et al., 1999; Dubaissi et al., 2014; Lu et al., 2001; Quigley et al., 2011; Walentek et al., 2014). This tissue emerges from the early non-neural ectoderm in a multistep process. During gastrulation, MCCs, ionocytes, SSCs and P63-positive cells are born within the inner layer. It has been reported that the Delta/Notch pathway controls the number of cells of each type, presumably via lateral inhibition. In this process, a so-called signal-sending cell displays ligand molecules, such as Delta, at its surface and transactivates Notch receptor molecules on the surface of adjacent signal-receiving cells, which allows the two cells to adopt distinct fates (Guruharsha et al., 2012). In the *Xenopus* epidermis, constitutive activation of Notch resulted in a decrease in the number of both MCCs and ionocytes, whereas blocking the Notch pathway led to an increase in their numbers (Deblandre et al., 1999; Hayes et al., 2007; Marcet et al., 2011; Quigley et al., 2011; Stubbs et al., 2006, 2012). However, there is evidence that *Xenopus* epidermal cells are sensitive to cis-inhibition of Notch by its ligands (Guruharsha et al., 2012), as Delta-like 1 (Dl1) overexpression induces supernumerary MCCs, similar to overexpression of the secreted dominant-negative Dl1^{Stu} mutant (Deblandre et al., 1999). Finally, Notch activation was shown to induce supernumerary P63-positive cells, whereas Notch inhibition had the opposite effect, suggesting that P63-positive cells are counterparts to MCCs and ionocytes selected through lateral inhibition (Sirour et al., 2011). Following their commitment,

¹Aix-Marseille Université, CNRS, IBDM, Marseille 13288, France. ²CNRS, IPMC, Sophia-Antipolis 06560, France. ³University of Nice Sophia Antipolis (UNS), IPMC, Sophia-Antipolis 06560, France.

*Present address: Institute for Regenerative Cures, Department of Dermatology, University of California, 2921 Stockton Blvd, Sacramento, CA 95817, USA.

[‡]These authors contributed equally to this work

[§]These authors contributed equally to this work

[¶]Author for correspondence (laurent.kodjabachian@univ-amu.fr)

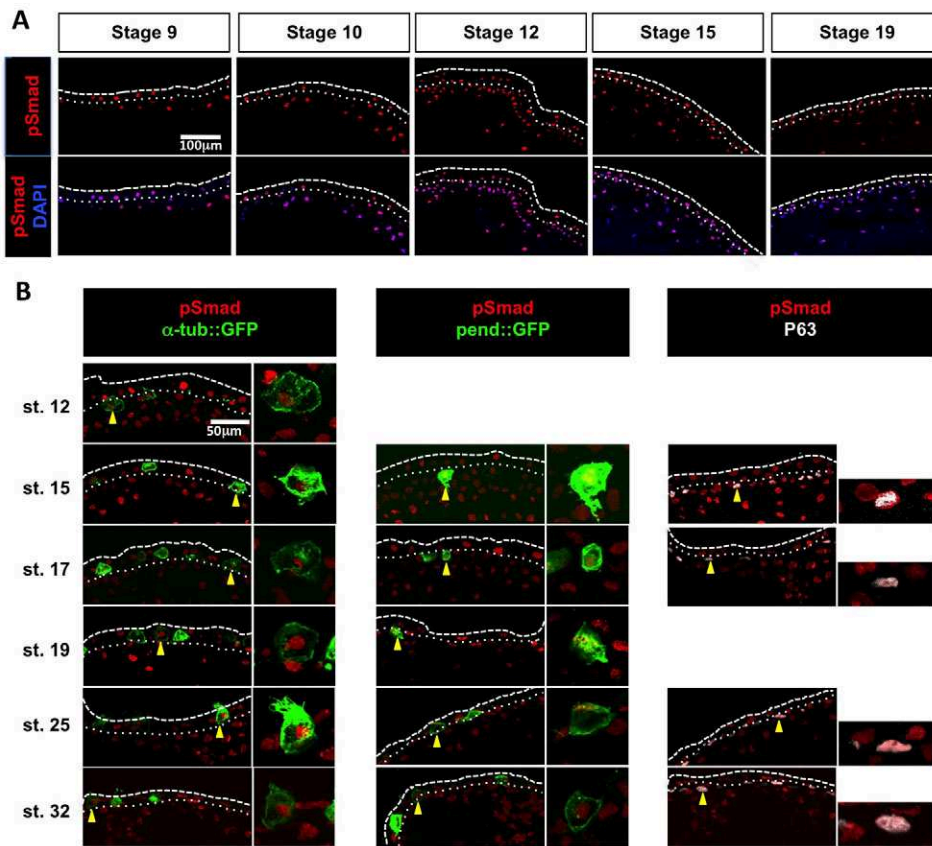


Fig. 1. BMP pathway activity in the developing *Xenopus* epidermis.

(A) Immunostaining of cryosectioned *Xenopus* embryos revealed that the pSmad1/5/8 signal (red) colocalises with nuclear DAPI staining (blue) in both inner and outer layer cells. (B) (Left) In embryos injected with linearised plasmid DNA for the MCC reporter α -tub::GFP (50 pg/embryo), the pSmad1/5/8 signal (red) colocalised with GFP immunostaining (green). (Middle) In embryos injected with linearised plasmid DNA for the ionocyte reporter pendrin::GFP (25 pg/embryo), the pSmad1/5/8 signal (red) colocalised with GFP immunostaining (green). (Right) The pSmad1/5/8 signal (red) colocalised with P63 protein expression (white). For each marker and stage, a representative cell (yellow arrowhead) is displayed at higher magnification to show the double staining. The white dashed and dotted lines respectively mark the apical surface of the ectodermal outer layer and the boundary between the outer and the inner ectodermal layers.

MCCs, ionocytes and SSCs sequentially migrate to the outer layer, where they intercalate among goblet cells and resume differentiation (Chung et al., 2014; Cibois et al., 2014; Quigley et al., 2011; Stubbs et al., 2006), whereas the P63-positive cells remain in the inner layer. The role of P63-positive cells remains uncharacterised, although the mature inner layer of the amphibian embryonic epidermis has been proposed to constitute the source of the late larval and post-metamorphic skin (Yoshizato, 2007). Thus, *Xenopus* epidermal P63-positive cells may not be compared to the P63-positive bona fide basal stem cells of mammalian airway epithelia (Hogan et al., 2014).

In *Xenopus*, BMP signalling is chiefly responsible for non-neural ectoderm induction at blastula/gastrula stages (Cibois et al., 2014; De Robertis and Kuroda, 2004). Although BMP expression and activity remain high at subsequent stages (Schohl and Fagotto, 2002), the role of this pathway in the developing epidermis has never been addressed. In mammals, activation of the BMP pathway has been described in lung morphogenesis and homeostasis as well as in airway epithelium regeneration (Huang et al., 2014; Masterson et al., 2011; McCormack et al., 2013; Sountoulidis et al., 2012).

We show here that correct organogenesis of the *Xenopus* embryonic epidermis requires the fine-tuning of BMP signalling activity. BMP inhibition is necessary and sufficient to induce MCC, ionocyte and SSC specification, whereas correct goblet cell differentiation depends on high BMP activity. BMP activity is also required for the insertion of MCCs, ionocytes and SSCs into the outer layer. Furthermore, in HAECs from healthy donors and from cystic fibrosis patients, BMP pathway inhibition stimulates MCE differentiation, with a dramatic increase in MCC numbers, whereas treatment with recombinant BMPs globally blocks cell differentiation.

Altogether, our data highlight the importance of the BMP pathway in the construction of vertebrate MCE.

RESULTS

The BMP pathway is active during MCE development and regeneration

Phosphorylation of Smad1/5/8 (pSmad1/5/8), which indicates BMP activity, was detected in the nuclei of most non-neural ectoderm cells in *Xenopus*, in both the outer and inner ectodermal layers and at all stages analysed, ranging from blastula to tailbud (Fig. 1A). To map the cell populations that receive BMP signals in the inner layer, we performed pSmad1/5/8 immunodetection in embryos injected with the reporter constructs α -tub::GFP or pendrin::GFP, which drive GFP expression in committed MCCs and ionocytes, respectively (Quigley et al., 2011; Stubbs et al., 2006). As shown in Fig. 1B, pSmad1/5/8 immunoreactivity was detected in both MCCs and ionocytes before and after their intercalation into the outer layer. In addition, co-immunostaining for P63 (Tp63 – Xenbase) showed that some pSmad1/5/8-positive inner layer cells were P63 positive (Fig. 1B), revealing that the BMP pathway was active in at least three out of the four currently described cell types born within the inner layer.

In regenerating HAECs, pSMAD1/5 levels increased between the proliferation and polarisation stages, then decreased at the onset of ciliogenesis (Fig. 2A). Although at the polarisation stage the pSMAD1/5 signal was stronger in the apical cell layer of the pluristratified epithelium (Fig. 2B), it increased in the basal layer following treatment with recombinant BMP2 (Fig. 2C,D), showing that basal layer cells were also responsive to the BMP signal.

Thus, BMP pathway activation during the early steps of MCE formation is a conserved feature in our two models. We next addressed the consequences of BMP pathway dysregulation for MCE formation.

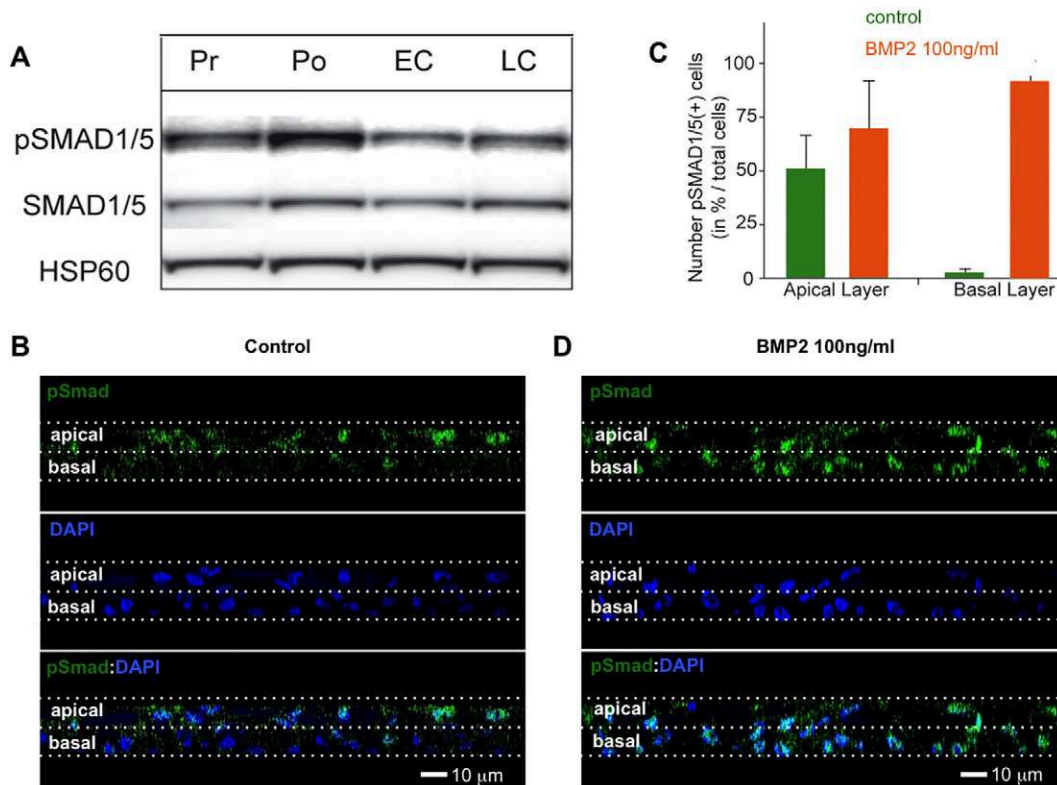


Fig. 2. BMP pathway activity in HAEC cultures. (A) Western blot with an anti-pSMAD1/5 antibody revealed that in HAEC cultures SMAD1/5 phosphorylation increases during the early regeneration stages, then decreases at the onset of ciliogenesis. Pr, proliferation stage (ALI days 0-7); Po, polarising stage (ALI days 7-15); EC, early ciliogenesis (ALI days 15-30); LC, late ciliogenesis (from ALI day 30). HSP60 (HSPD1) was used as a loading control. (B) In HAECs at Po stage, pSMAD1/5 labelling was mostly restricted to apical layer cells. (C,D) The number of pSMAD1/5-positive cells was slightly increased in the apical layer and dramatically increased in the basal layer following a 2 h treatment with BMP2 (100 ng/ml) at Po stage. Data in C are representative of three independent experiments; error bars indicate s.d. (B,D) Orthogonal views (z-slices) of HAECs.

BMP pathway overactivation perturbs the construction of *Xenopus* epidermal and human airway MCE

Injection of stage 9 *Xenopus* embryos with recombinant BMP4 led to increased Smad1/5/8 phosphorylation and nuclear localisation (supplementary material Fig. S1A,B). Scanning electron microscopy (SEM) of the mature epidermis of BMP4-injected embryos revealed a striking decrease in the number of MCCs, ionocytes and SSCs, whereas goblet cells were still apparent (Fig. 3A,A'). *In situ* hybridisation or immunostaining with markers specific for MCCs (α -tubulin and acetylated tubulin; Fig. 3B-C'), ionocytes (*foxi1e* and *v1a*; Fig. 3C-D') and SSCs (*tph1* and serotonin; Fig. 3E-F') confirmed the reduction in the numbers of these cell types. Overactivation of the BMP pathway by injection of a constitutively active (CA) form of the BMP receptor Alk3 (Bmpr1a – Xenbase) in ventral ectoderm also led to a decrease in the numbers of MCCs and ionocytes (supplementary material Fig. S2A-C',D). Surprisingly, a loss of P63 immunoreactivity was observed in BMP-treated embryos (Fig. 3G,G'), suggesting that non-intercalating inner cells were also affected. By contrast, BMP4 treatment did not significantly alter the expression of *otogelin* and *trim29* (Fig. 3H-J'), and rather upregulated *intelectin-1* expression (Fig. 3G,G'), suggesting that goblet cell identity was maintained.

Although the epidermis occasionally appeared thicker in sections of BMP-injected embryos, immunostaining against phospho-histone H3 did not reveal any consistent variation in the number of mitotic nuclei (supplementary material Fig. S2F-H). We next tested whether the observed lack of differentiation of intercalating cells resulted from an earlier defect in specification. For this, we

analysed how BMP treatment affected the expression, prior to intercalation, of *foxj1*, *foxi1e* and *foxa1*, which label committed MCCs, ionocytes and SSCs, respectively. As shown in Fig. 3K-M', BMP4 injection at stage 9 resulted in a drastic decrease in the early expression levels of these three markers, revealing a defect in the specification of inner intercalating cell types.

In HAECs, chronic treatment with recombinant BMP2 strongly reduced the number of MUC5AC-positive goblet cells, both at polarisation and late ciliogenesis stages (Fig. 4A-B). Likewise, BMP2 treatment suppressed MCCs, as revealed by the absence of acetylated tubulin-positive cells at the late ciliogenesis stage (Fig. 4A-B). Following BMP2 treatment, the cells presented a flattened aspect, reminiscent of the morphology observed in squamous metaplasia, a common alteration of the human upper airway lining (data not shown). Consistent with this interpretation, BMP2-treated HAECs exhibited increased levels of transglutaminase 1 (TGM1) and involucrin (IVL), two markers of squamous metaplasia (Gray et al., 2007; Tanabe et al., 2012) (Fig. 4C).

We conclude that BMP pathway overactivation is incompatible with the construction of a normal MCE in both models. We next addressed the consequences of BMP inhibition in this process.

BMP pathway inhibition perturbs the construction of *Xenopus* epidermal and human airway MCE

Inhibition of the endogenous BMP pathway in the *Xenopus* non-neural ectoderm was achieved by knocking down BMP2, BMP4 and BMP7 with specific morpholino oligonucleotides (BMP MOs), as previously reported (Reversade et al., 2005). In all subsequent

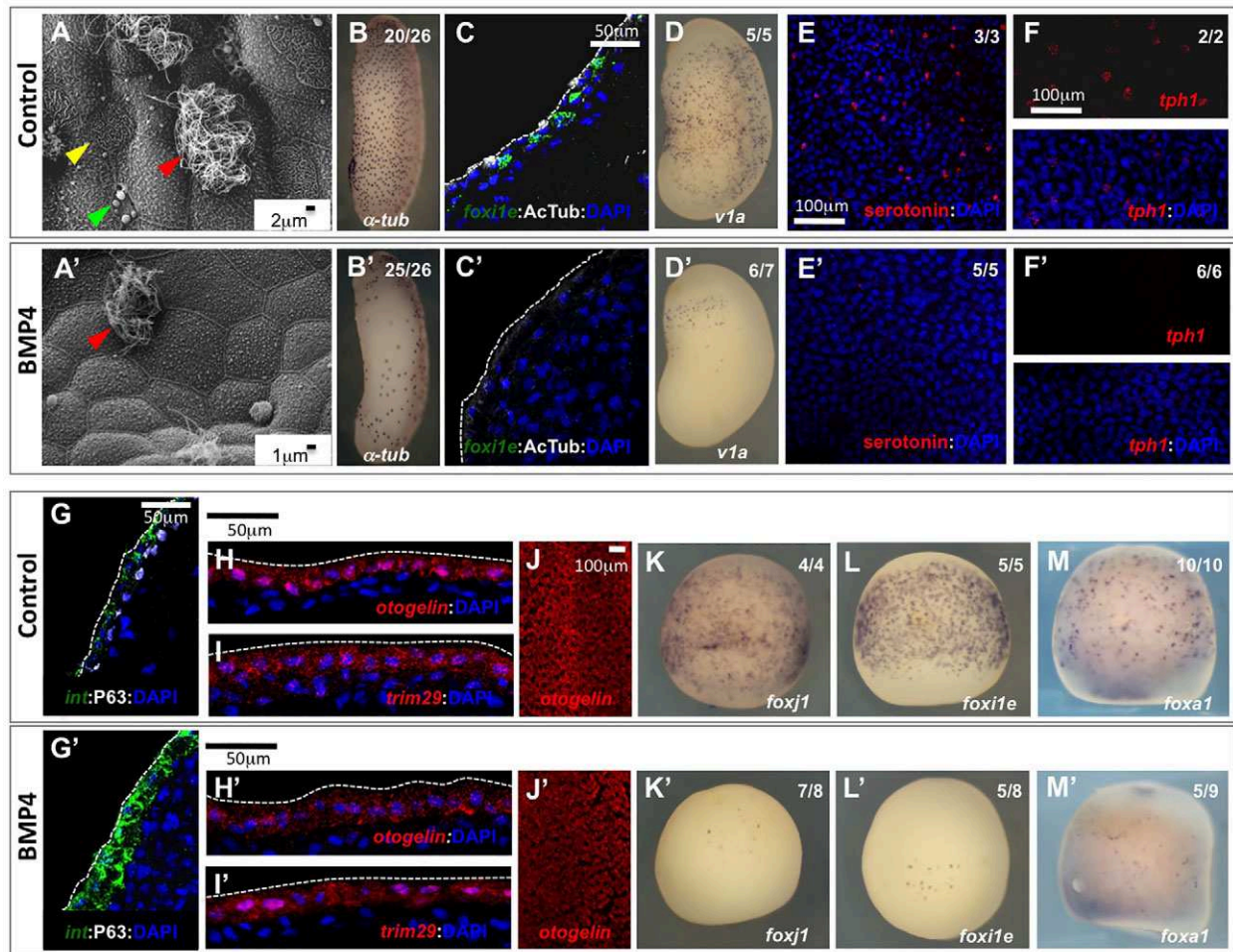


Fig. 3. BMP pathway overactivation affects cell specification in the developing *Xenopus* epidermis. Stage 9 *Xenopus* embryos were injected in the blastocoel with either BSA (A-M) or 2-7 ng recombinant BMP4 (A'-M'). (A,A') SEM of the epidermis at stage 37 revealed the severe decrease in the numbers of MCCs (red arrowhead), ionocytes (yellow arrowhead) and SSCs (green arrowhead). (B,B') At tailbud (stage 30), BMP4-injected embryos showed normal morphology but substantially fewer α -tubulin-positive MCCs, as revealed by whole-mount *in situ* hybridisation (WISH). (C,C') Both the differentiated MCC marker acetylated tubulin (white) and the ionocyte marker *foxi1e* (green) were lost in sectioned tailbud (stage 25) BMP4-injected embryos. (D,D') WISH revealed that the differentiated ionocyte marker *v1a* was strongly decreased in stage 25 BMP4-injected embryos. (E-E') The differentiated SSCs markers serotonin (red in E,E') and *tryptophan hydroxylase-1* (*tph1*, red in F,F') were lost or strongly decreased in stage 25 BMP4-injected embryos. (G,G') In sections of stage 25 BMP4-injected embryos, P63 (white), a marker of the non-intercalating inner layer cells, was lost, whereas the goblet cell marker *intelectin-1* (green) was upregulated. *otogelin* (red in H,H',J,J') and *trim29* (red in I,I'), two other markers of goblet cells, were unaffected. (K-M) Stage 14 embryos were analysed by WISH in order to stain MCCs for *foxj1* (K,K'), ionocytes for *foxi1e* (L,L') and SSCs for *foxa1* (M,M'). (B,B',D-F',J-M') Whole-mount embryos; (C,C',G-I') cryosectioned embryos. (B-M') All markers were revealed by chromogenic or fluorescent *in situ* hybridisation, except for acetylated tubulin, serotonin and P63, which were revealed by immunofluorescence. (C,C',E-I') Nuclei were stained with DAPI. (B,B',D-F',K-M') The number of embryos showing the phenotype among the total number of embryos examined is indicated.

experiments, BMP MOs were injected into 8-cell stage animal ventral blastomeres that are fated to become epidermis, together with membrane GFP (mGFP) RNA to visualise and count injected cells. We first verified that BMP MOs suppressed Smad1/5/8 phosphorylation in injected cells (supplementary material Fig. S1C).

BMP MO injection resulted in an increase in the numbers of inner layer cells expressing early markers of MCCs (*foxj1* and *multicilin/MCI*; Fig. 5A-B') and ionocytes (*foxi1e*; Fig. 5C,C'). A corresponding increase in the number of committed MCCs and ionocytes was visible at tailbud stage (Fig. 5G-I',P,Q). Injection in the presumptive epidermis of synthetic mRNAs encoding dominant-negative (dn) forms of the BMP receptor *Alk3* or the Smad5 transcriptional effector also resulted in an expansion of the MCC and ionocyte populations (supplementary material Fig. S2A'-E). BMP knockdown also caused a significant expansion of SSCs marked early by *foxa1* (Fig. 5D,D') and in stage 35 tadpoles by *tph1* (Fig. 5R and Fig. 6I-J').

Unexpectedly, transverse sections through BMP morphant tailbud embryos revealed that α -tubulin-positive cells remained trapped between the two layers of the epidermis and failed to produce cilia (Fig. 6A-C',F-H',K-M'). The failure of MCCs to intercalate was not simply due to a developmental delay, as most remained trapped below the surface layer in late tadpoles (Fig. 6F-H',K-M'). MCCs also displayed incomplete intercalation in dnSmad5-injected embryos, although this defect was not as pronounced as in BMP morphants (supplementary material Fig. S1E). An analogous failure to intercalate was observed for ionocytes and SSCs in stage 25 and stage 35 BMP morphants, respectively (Fig. 6D-E',I-J').

Finally, BMP MO injection also resulted in lower levels of expression of the goblet cell markers *otogelin* and *trim29* at stage 14 (Fig. 5E-F'), as well as of the 5G7 antigen and *intelectin-1* at stage 25 (Fig. 5J-L'). No statistically significant variation in the number of P63-positive non-intercalating inner cells was observed (Fig. 5S), but these cells displayed lower levels of P63 and α -dystroglycan (Fig. 5M-O').

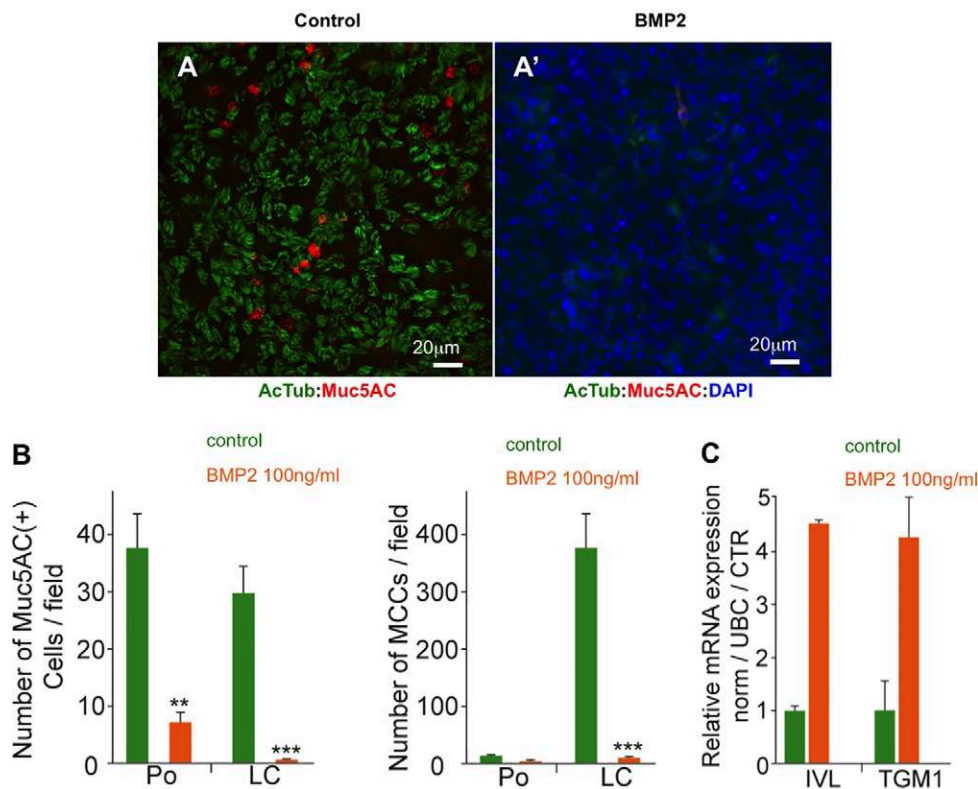


Fig. 4. BMP pathway overactivation affects the formation of MCCs and mucus-producing cells in HAEC cultures. (A,A') Chronic treatment of HAEC cultures with 100 ng/ml BMP2 drastically decreased the numbers of both MUC5AC-positive goblet cells and acetylated tubulin-positive MCCs relative to untreated controls. DAPI was added to confirm the presence of cells (A'). (B) Quantification of the experiments illustrated in A,A' performed in triplicate; data show mean \pm s.d. from three donors; *** P <0.001, ** P <0.01, Student's t -test. (C) HAECs chronically exposed to 100 ng/ml BMP2 upregulated the squamous metaplasia markers involucrin (IVL) and transglutaminase 1 (TGM1). CTR, control; UBC, ubiquitin C.

In HAECs, BMP inhibition was achieved through chronic treatment with recombinant Noggin protein, a potent secreted BMP antagonist, or with the pharmacological BMP pathway inhibitor dorsomorphin (Yu et al., 2008). We first verified that Noggin could suppress BMP-induced SMAD1/5 phosphorylation and nuclear translocation (supplementary material Fig. S3A,B). Noggin treatment led to a dramatic dose-dependent increase in the number of MCCs (Fig. 7A,B,D-F; supplementary material Fig. S3C). A similar induction was seen upon dorsomorphin treatment (Fig. 7C,F). Fluorescence-activated cell sorting (FACS) confirmed that the number of acetylated tubulin-positive MCCs and MUC5AC-positive goblet cells was increased by \sim 4-fold by Noggin (Fig. 7G). The effect of Noggin was strongest when treatment started around the polarisation stage, when BMP pathway activation was maximal (Fig. 2A), and a single 3-day-long pulse of Noggin was sufficient to massively stimulate MCC differentiation (Fig. 7H).

In cystic fibrosis (CF), chronic injuries of the airways lead to epithelium remodelling that is characterised by mucous secretory hyper/metaplasia and a progressive loss of MCCs, dramatically impairing mucociliary clearance and airway defence (Livraghi and Randell, 2007). Thus, we examined whether BMP pathway inhibition by Noggin treatment was also capable of inducing an increase in the number of MCCs in primary cultures derived from CF patients. Fig. 7I-K shows that the effect of Noggin was maintained in CF primary cultures, suggesting that BMP pathway inhibition might stimulate MCC formation and improve mucociliary clearance in chronic airway disease patients.

The BMP and Delta/Notch pathways are linked in the *Xenopus* epidermis

Since the Delta/Notch pathway controls the numbers of MCCs and ionocytes in the *Xenopus* epidermis (Deblandre et al., 1999; Hayes et al., 2007; Quigley et al., 2011; Stubbs et al., 2006), we speculated

that the BMP signal might act through this pathway. Injection of recombinant BMP4 into blastula stage 9 embryos resulted in a strong and persistent upregulation of the Notch ligand *dll1* throughout the ectodermal inner layer (Fig. 8A-D',H-I"). Conversely, when presumptive epidermal blastomeres were injected with GFP mRNA together with either dnSmad5 mRNA or BMP MOs, a consistent cell-autonomous repression of *dll1* expression was observed compared with embryos injected with GFP mRNA alone (Fig. 8E-G'; data not shown). This was accompanied by an increase in *dll1* expression in some adjacent uninjected cells, most likely owing to reduced activation of the Notch pathway in these cells by the injected cells that contained less Dll1 ligand (Fig. 8E-G'). Strikingly, the ability of exogenous BMP to upregulate *dll1* transcription was temporally limited and coincided with its capacity to suppress MCC, ionocyte and SSC fates. Indeed, as shown in Fig. 8H-J", blastocoel injection of BMP4 at stage 9 resulted in both *dll1* upregulation at stage 12 and loss of α -tubulin at stage 25, whereas both markers were unaffected when the injection was performed at gastrula stage 11. Interestingly, BMP4 injection at stage 11 did not prevent the normally specified inner cells from reaching the superficial layer (data not shown).

To confirm that the control of *dll1* expression by the BMP pathway was compatible with the observed effect of BMP overexpression on MCCs, ionocytes and SSCs, we examined *dll1* expression relative to early markers of these three cell types. We found that, during gastrulation, *dll1* was first co-expressed with the MCC marker *foxj1*, and soon after with the ionocyte marker *foxi1e* (Fig. 8K-R). This is consistent with the comparable effects produced by Notch pathway activation and repression on the number of both MCCs and ionocytes (Deblandre et al., 1999; Hayes et al., 2007; Quigley et al., 2011; Stubbs et al., 2006). Co-expression of *dll1* and the early SSC marker *foxa1* was also observed at early neurula stage 14 (Fig. 8S-V), consistent with the repression of *foxa1*

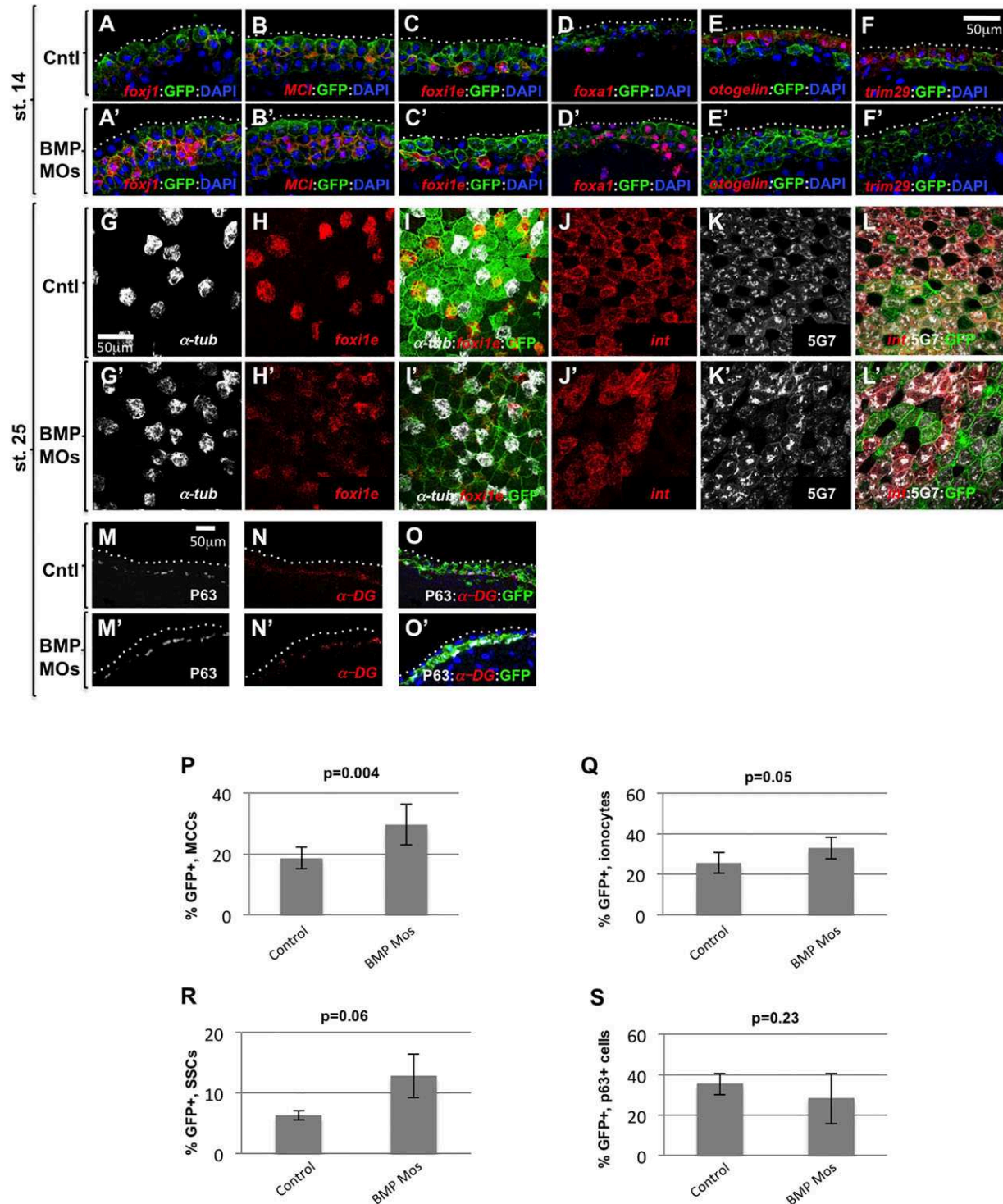


Fig. 5. BMP inhibition promotes MCC, ionocyte and SSC fates in the developing *Xenopus* epidermis. (A-O') Eight-cell stage *Xenopus* embryos were injected in one animal ventral blastomere (fated to become only epidermis) with either 500 pg GFP mRNA alone (Cntl) or with 500 pg GFP mRNA and BMP2, BMP4 and BMP7 morpholinos (BMP MOs, 10 ng each) and were analysed at stage 14 (A-F') or 25 (G-O'). GFP immunostaining was used to identify the injected cells. Injection of BMP MOs resulted in an increase in the numbers of stage 14 inner layer cells expressing markers for committed MCCs (*foxj1* and *MCI*, red in A,A' and B,B', respectively), for committed ionocytes (*foxi1e*, red in C,C') and for committed SSCs (*foxa1*, red in D,D'). Conversely, injection of BMP MOs led to a severe decrease in the expression levels of the goblet cell markers *otogelin* and *trim29* (red in E,E' and F,F', respectively). When analysed at stage 25, embryos injected with BMP MOs showed an increase in the numbers of both α -tubulin-positive MCCs (white in G,G',I,I') and *foxi1e*-positive ionocytes (red in H,H',I,I'), together with a decrease in the expression levels of the outer layer goblet cell markers *intelectin-1* (red in J,J',L,L') and 5G7 (white in K-L') and of the inner layer non-intercalating cell markers P63 (white in M,M',O,O') and α -dystroglycan (red in N,N',O,O'). (A-F',M-O') Cryosectioned embryos; (G-L') Whole-mount embryos. (P-S) Quantification of the different inner layer cellular populations in injected epidermal clones at stage 25. Shown are the percentages of MCCs (P), ionocytes (Q), SSCs (R) and P63-positive inner non-intercalating cells (S) among injected, GFP-positive cells. The increase in the number of MCCs, ionocytes and SSCs in BMP morphants was significant (Student's *t*-test). No significant variation was observed for P63-positive cells. Error bars indicate s.d.

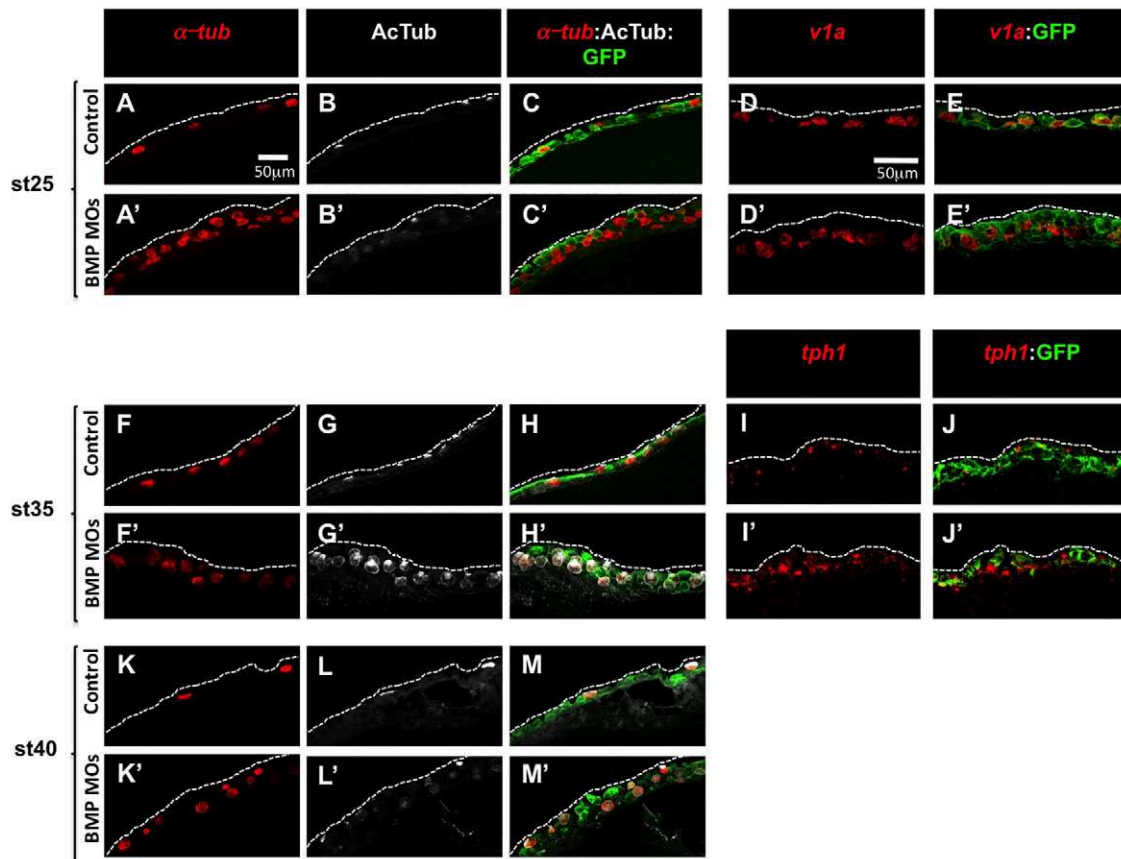


Fig. 6. BMP inhibition prevents the intercalation of MCCs, ionocytes and SSCs in the outer layer of the developing *Xenopus* epidermis. (A-E') Sectioning through the epidermis at stage 25 revealed that in the BMP MO-injected embryos the supernumerary α -tubulin-positive MCCs (red in A-C') and *v1a*-positive ionocytes (red in D-E') fail to intercalate into the epidermis outer layer. (I-J') Likewise, the supernumerary *tph1*-positive SSCs failed to intercalate in stage 35 BMP morphants (red in I-J'). (F-H', K-M') Even at later developmental stages, most of the supernumerary MCCs, which expressed the differentiation marker acetylated tubulin (white), were unable to intercalate properly into the outer layer.

expression in Notch intracellular domain (NICD)-injected embryos (Hayes et al., 2007).

In summary, tightly regulated BMP activity appears to be required for *dll1* expression and the specification of MCCs, ionocytes, SSCs and non-intercalating inner cells, presumably through the Notch pathway. Consistent with this view, injection of a dominant-negative form of the Notch effector Su(H) was able to limit the decrease in MCC specification caused by a constitutively active form of the BMP receptor, while a constitutively active form of Su(H) was able to counteract the increase in MCC specification produced by a dominant-negative form of the BMP receptor (supplementary material Fig. S4).

DISCUSSION

Our study reveals that the construction of MCE in two distant vertebrate models commonly involves the BMP signalling pathway. Below, we highlight similarities and differences between the responses to BMP modulation in our two models.

In *Xenopus* epidermis, we found that exogenous BMP4 prevents the specification of MCCs, ionocytes, SSCs and P63-positive non-intercalating inner cells. In other words, all inner cell fates are suppressed when BMP is over-active. By contrast, outer layer goblet cells are specified normally. Conversely, BMP pathway inhibition leads to an increase in the numbers of MCCs, ionocytes and SSCs, but not P63-positive cells, and antagonises goblet cell differentiation. In HAECs, both goblet and MCC fates are suppressed by exposure to

exogenous BMP2 protein, and both fates are induced by BMP inhibition. Thus, goblet cells exhibit opposite responses to BMP in our two systems. This is likely to reflect the difference in the goblet cell lineage in the two models. In HAECs, goblet cells and MCCs are likely to derive from common P63-positive progenitors (Hogan et al., 2014), and it seems logical that they exhibit similar responses to BMP modulation. In the *Xenopus* epidermis, goblet cells are born in the outer layer whereas MCCs are born in the inner layer. The two layers of the epidermis are produced through oriented cell divisions during cleavage stages and inherit different maternal determinants that control inner and outer cell fates (Chalmers et al., 2003; Ossipova et al., 2007). Thus, goblet cells and MCCs are born from lineages that have been separated before the activation of the zygotic genome, which might explain why they respond in an opposite manner to the zygotic inducer BMP. The *Xenopus* embryonic epidermis also contains ionocytes, which are involved in osmoregulation (Dubaissi and Papalopulu, 2011; Quigley et al., 2011), and SSCs, which control the ciliary beating frequency of MCCs and secrete anti-infective substances that protect the embryo (Dubaissi et al., 2014; Walentek et al., 2014). Ionocytes and SSCs have no clear counterparts in human airways, so no pertinent comparison can be made.

The most striking parallel between our two models is the identical response of MCCs to BMP pathway modulation. This observation is consistent with multiple reports of common molecular mechanisms at the basis of MCC differentiation in vertebrates (Boon et al., 2014; Marcet et al., 2011; Song et al., 2014; Stubbs et al., 2012; Tan et al.,

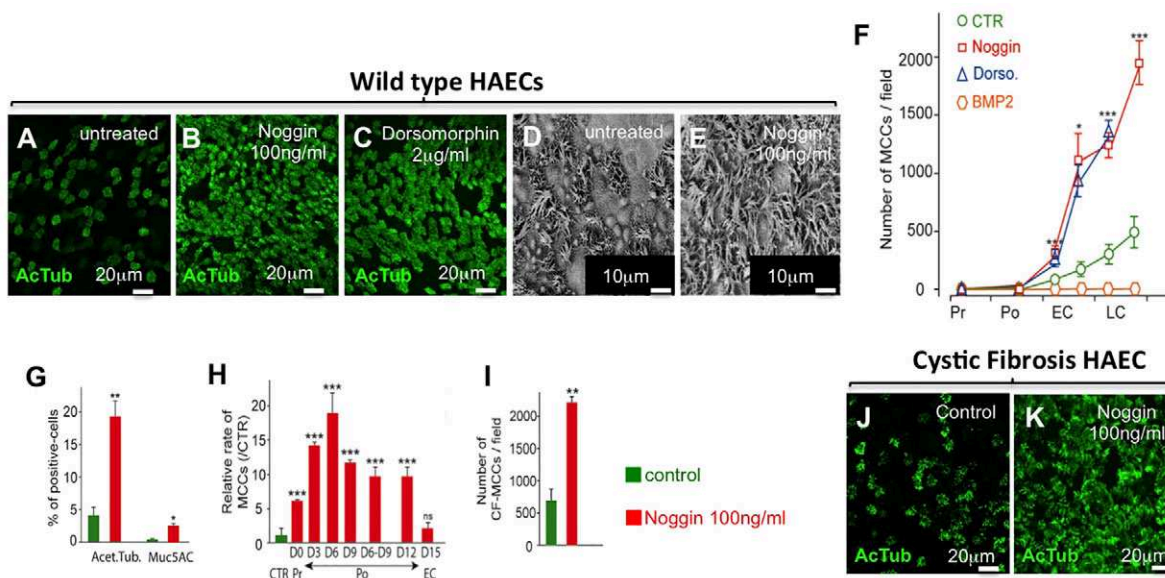


Fig. 7. BMP inhibition promotes the MCC fate in regenerating HAECs. (A-C, J, K) Acetylated tubulin-positive, morphologically normal MCCs increased following BMP pathway inhibition by treatment with Noggin (100 ng/ml) in HAEC cultures from healthy donors (A-C) or cystic fibrosis patients (J, K). (D, E) SEM images of control or Noggin-treated HAEC cultures at stage LC. (F) The number of MCCs per field of observation in HAEC cultures from three donors at various time points of culture. Noggin and dorsomorphin (Dorso.) induced precocious and increased rates of ciliogenesis. CTR, control (G) FACS confirmed the increase in MCCs and goblet cells in Noggin-treated normal HAEC cultures. (H) The maximal increase in the number of MCCs relative to untreated cultures was observed when Noggin treatment of HAECs started at Po stage (ALI days 6-9). (I) Noggin treatment increases the number of MCCs in HAEC cultures from cystic fibrosis (CF) donors. (G-I) Data are mean \pm s.d. from three independent experiments; * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001; ns, not significant; Student's t -test.

2013; Wallmeier et al., 2014). We conclude that, at the present time, the comparison between HAEC cultures and the developing *Xenopus* embryonic epidermis is mostly relevant to an understanding of MCC biology.

Recent studies have developed protocols to generate *in vitro* airway epithelial cells from human pluripotent stem cells that include an early inhibition of the BMP pathway followed by its activation in order to push the definitive endoderm to differentiate into ventral anterior foregut, before the induction of lung progenitor specification (Firth et al., 2014; Huang et al., 2015, 2014). However, these reports did not explore the role of BMP signalling at later steps, when airway progenitors give rise to fully differentiated airway MCE. Our work reveals that BMP inhibition may facilitate the commitment of multipotent airway progenitors towards MCC and goblet cell fates, making it an important signalling pathway to be considered for human airway regeneration in physiological as well as pathological situations.

The activity of the BMP pathway, which is initially required for the partitioning of the non-neural ectoderm in *Xenopus* (De Robertis, 2006) and for lung morphogenesis in mammals (Huang et al., 2014; Mou et al., 2012; Sountoulidis et al., 2012), has subsequently to be tightly controlled to ensure MCE formation. In the developing epidermis, all cell types appear to experience BMP pathway activity, although cell type-specific differences in the timing or strength of the signal cannot be ruled out. The temporal window of susceptibility of the developing *Xenopus* ectoderm to exogenous BMP4 ends by mid-gastrula stage 11. Interestingly, this stage is known to mark the end of the temporal window of competence of embryonic cells to respond to exogenous inducers (Snape et al., 1987; Wylie et al., 1987). This observation indicates that the BMP signal exerts its action on an early pool of multipotent inner layer cells, which will give rise to MCCs, ionocytes, SSCs and P63-positive cells. Thus, the BMP signal might not instruct cell fates, but rather promotes in the non-neural ectoderm a permissive

state compatible with fate choices by downstream regulators. In HAEC cultures, the BMP treatment almost completely obliterates the formation of both MCCs and goblet cells and results in the expression of markers of squamous epithelia. This is reminiscent of the squamous metaplasia that occurs when the airway epithelium is submitted to chronic damage or irritation and might reflect the excessively prolonged maintenance of the cells in an uncommitted state (Hogan et al., 2014). Altogether, our data suggest that, in developing or regenerating vertebrate MCE, fate commitment cannot be initiated when BMP activity is too high. We propose that attenuation of BMP activity, by as yet unknown mechanisms, is required for cells to engage in fate choices.

We found that BMP signalling is required to activate *dll1* expression in the *Xenopus* developing epidermis, although the absence of clear Smad consensus binding sites upstream of the *dll1* open reading frame (data not shown) suggests an indirect mode of control. The decreased *dll1* expression in the absence of BMP is expected to reduce Notch activation and allow a greater number of cells to engage in intercalating cell fate choices. In agreement with this interpretation, *Dll1* knockdown induces supernumerary MCCs (Marcet et al., 2011). By contrast, the strong and persistent induction of *dll1* expression in BMP4-injected embryos was correlated with the lack of specification of all inner cell types. This finding is at odds with the published observation that injection of a synthetic *dll1* mRNA leads to an increase in the number of MCCs, presumably through cis-inhibition of Notch (Deblandre et al., 1999). Thus, Notch cis-inhibition by increased levels of *dll1* transcripts might not occur in the presence of excess BMP activity. Conversely, increased *dll1* expression in BMP4-injected embryos might not translate into Notch activation either, as it should otherwise induce P63 expression (Sirour et al., 2011). We conclude that BMP overactivation produces inhibitory effects that make it impossible for inner layer cells to initiate their specification programme. Such inhibitory effects might include the artificial

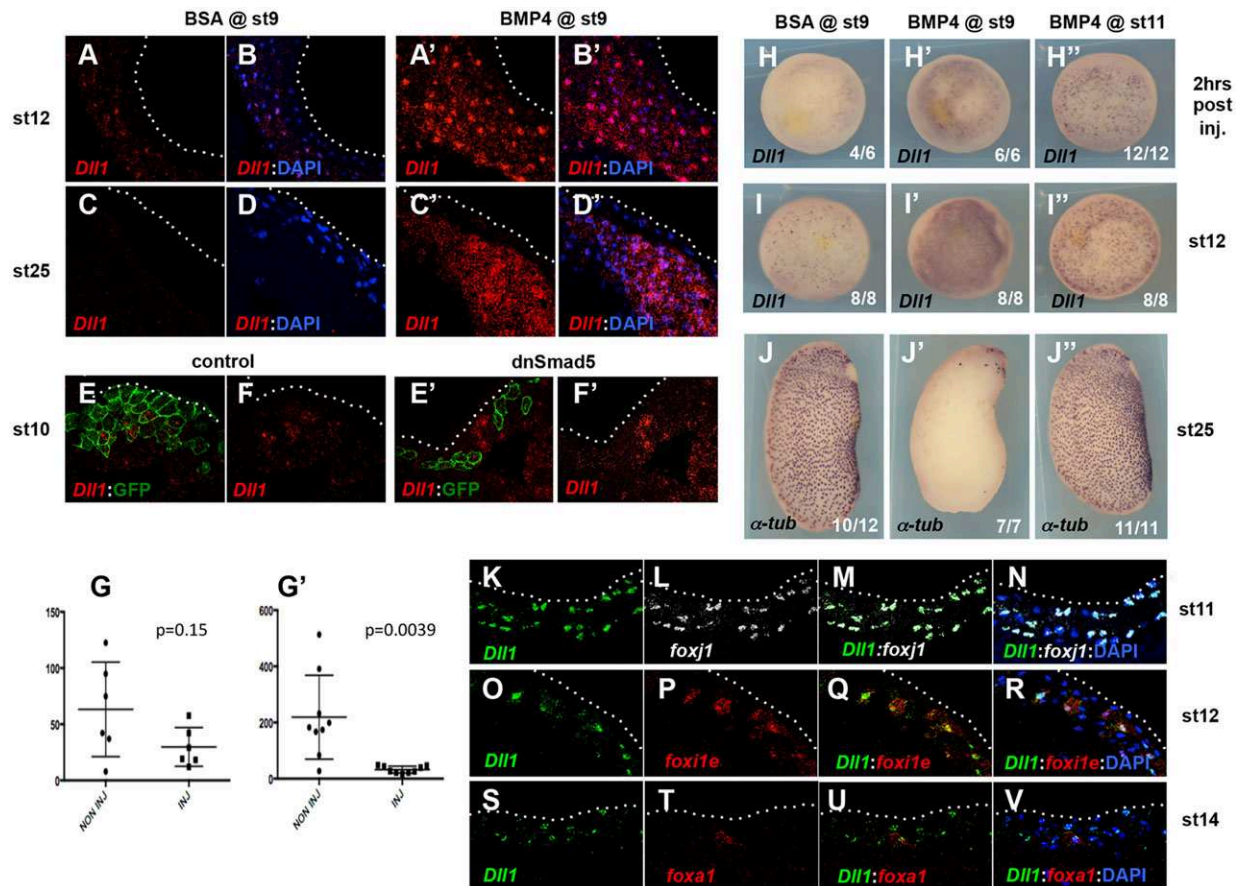


Fig. 8. The BMP pathway controls *dll1* expression in the developing *Xenopus* epidermis. (A-D') Embryos injected in the blastocoel at stage 9 with either BSA or BMP4 were probed for *dll1* expression at stage 12 or 25. BMP4-injected embryos showed a strong and persistent upregulation of *dll1* within the epidermal inner layer. (E-F') Eight-cell stage embryos were injected in a ventral ectoderm precursor blastomere with GFP mRNA alone (control) or with GFP mRNA and an mRNA encoding dominant-negative Smad5 (dnSmad5). Stage 10 embryos were sectioned and hybridised with a probe against *dll1* and an antibody against GFP. The amount of *dll1* signal (red) that colocalised with GFP fluorescence (green) was lower when GFP was co-injected with dnSmad5, indicating that dnSmad5 cell-autonomously decreases *dll1* expression. (G,G') The *dll1* signal (red channel fluorescence) was measured in areas of equal size within (inj) or outside (non inj) of the injected clones in control (G) and dnSmad5-injected (G') embryos. Signals were compared pairwise within each section, confirming the significant decrease in *dll1* signal in dnSmad5-injected cells (Wilcoxon test). The middle bar indicates the median, and the outlier bars delimit the lower and upper quartiles. (H-J'') Embryos were injected at stage 9 with BSA (H,I,J), or with BMP4 at stage 9 (H',I',J') or 11 (H'',I'',J''), then probed for *dll1* 2 h after injection (H-H'') or at stage 12 (I-I'') and for α -tubulin at stage 25 (J-J''). BMP4 caused ectopic *dll1* activation and the loss of MCCs when injected at stage 9 but not at stage 11. (K-V) Cryosectioned embryos were hybridised with probes against *dll1* and the MCC early marker *foxj1* (K-N), the ionocyte early marker *foxi1e* (O-R) or the SSC early marker *foxa1* (S-V) at stages 11, 12 and 14, respectively. *dll1* colocalised with *foxj1* at stage 11, with *foxi1e* at stage 12 and with *foxa1* at stage 14.

maintenance of pluripotency regulators by excess BMP activity (Morrison and Brickman, 2006; Scerbo et al., 2012; Ying et al., 2003). However, the inhibition caused by BMP may be overcome, to a certain extent, by the Notch pathway, as suggested by the antagonism observed when the BMP and Notch pathways were concomitantly manipulated in opposite ways (supplementary material Fig. S4).

Following their specification in the inner epidermal layer, the MCCs, ionocytes and SSCs migrate to the outer layer, where they intercalate among goblet cells, a morphogenetic step crucial for the development of the functional *Xenopus* epidermis, but which has no clear counterpart in the regenerating HAEC cultures. Our data show that blocking the BMP signal by injection of BMP MOs completely and durably prevents intercalation of MCCs, ionocytes and SSCs. The failure in intercalation might depend non-exclusively on a cell-autonomous disruption of cytoskeleton dynamics in intercalating cells, or on defects in the differentiation of the inner and/or outer layer cells that render the epidermal environment non-permissive for intercalation. Although this

issue deserves further investigation, it is remarkable that the transmembrane protein α -Dystroglycan, which is expressed by inner non-intercalating cells and is downregulated following BMP knockdown, has been shown to be required for MCC intercalation (Sirour et al., 2011).

Thus, in the *Xenopus* epidermal MCE, BMP activity coordinates cell fate specification with cell movement. It is important to stress that this dual role was not reported for the Notch pathway, as supernumerary MCCs induced by Notch inhibition in the epidermis do manage to intercalate (Deblandre et al., 1999; Stubbs et al., 2006).

In conclusion, our study reveals that vertebrate MCE construction involves the BMP pathway at multiple steps of the organogenetic process. Beyond the global overview provided by this study, more focused analyses will be required to understand how BMP activity is spatially and temporally controlled, to identify at the molecular level the responses induced by BMP modulation, and to decipher the complex interplay with other signalling pathways.

MATERIALS AND METHODS

Human tissue samples

Inferior turbinates or nasal polyps were from patients who underwent surgical intervention for nasal obstruction or septoplasty (kindly provided by Prof. Castillo, Pasteur Hospital, Nice, France). Samples from CF patients were purchased from Epithelix Sarl (Geneva, Switzerland). The use of human tissues was authorised by bioethics law 94-654 of the French Public Health Code after written consent from the patients.

Ethics statement

All experiments were performed following the European Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. All animal experiments were approved by the 'Direction départementale de la Protection des Populations, Pôle Alimentation, Santé Animale, Environnement, des Bouches du Rhône' (agreement number E 13-055-21).

Isolation and culture of human airway epithelial cells

Primary HAEC cultures were performed according to Marcet et al. (2011). HAEC differentiation was analysed at four time points following exposure of HAECs at an air-liquid interface (ALI). Pr, Po, EC and LC represent the proliferating step at ALI day 0, the polarisation step at ALI day 7, the early multiciliogenesis step at ALI day 14 and the late multiciliogenesis step at ALI day 21, respectively.

General *Xenopus* procedures

Eggs obtained from NASCO females were fertilised *in vitro*, dejellied, cultured and injected as described previously (Marchal et al., 2009). Synthetic capped mRNAs were produced with the Ambion mMACHINE mMACHINE Kit. BMP2, BMP4 and BMP7 morpholinos were described by Reversade et al. (2005). Recombinant zebrafish Bmp4 protein was resuspended as recommended by the manufacturer (R&D Systems, catalogue number 1128-BM), and injected through the animal pole into the blastocoelic cavity of embryos at blastula or at gastrula stages. Plasmids for the MCC α -tub::GFP and ionocyte pendrin::GFP reporter constructs were linearised by *SalI* and injected into one animal cell at the 8-cell stage.

Stainings

Xenopus

Whole-mount chromogenic *in situ* hybridisation was performed as described previously (Marchal et al., 2009). Whole-mount fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) was performed as described previously (Castillo-Briceno and Kodjabachian, 2014). For single staining, all RNA probes were labelled with digoxigenin. For double staining, *dll1* was labelled with fluorescein, *foxal* and *foxile* with digoxigenin, and *foxj1* with DNP. Sections for FISH or immunohistochemistry (IHC) were prepared as follows. Embryos were fixed in either 4% formaldehyde or paraformaldehyde (PFA), stored in methanol for at least 4 h at -20°C , then rehydrated in PBT (PBS+Tween 0.1% v/v), treated with triethanolamine and acetic anhydride, incubated in increasing sucrose concentrations and finally embedded with OCT (VWR Chemicals). 12- μm -thick cryosections were created. FISH on sections was an adaptation of the whole-mount FISH method. Immunohistochemical staining was performed on whole embryos as described previously (Castillo-Briceno and Kodjabachian, 2014) and adapted for sections.

Human

Fresh cultures of ALI-D28 (LC) HAECs were used for immunodetection as previously described (Marcet et al., 2011). Cells were fixed (4% PFA, 15 min, 4°C), rinsed (0.1 M glycine in PBS, 10 min) and permeabilised (0.1% Triton X-100, 5 min). Fixed cells were blocked for 1 h in 3% BSA, and incubated for 1 h at room temperature or overnight at 4°C with the appropriate primary antibodies (supplementary material Table S1). Then, cells were incubated for 1 h with the appropriate secondary antibodies (supplementary material Table S1). Stained cells were mounted with ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen, Life Technologies). After FISH and IHC, and just before mounting, samples were placed in DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) for 3 min for whole *Xenopus* embryos and HAECs and 2 min for sections.

Imaging

Images of HAEC cultures were acquired using an Olympus Fv10i or Leica SP5 confocal imaging system with 60 \times oil-immersion objective. Epidermal tissue from *Xenopus* embryos was explanted and mounted with Fluoromount G (Fluoroprobes) and allowed to dry before imaging on a Zeiss LSM780 confocal microscope. Images were acquired as 8 bit/channel and with 1024 \times 1024 pixel resolution, and processed in ImageJ for maximum intensity z-projection and/or merge of channels. Expression levels on FISH were analysed using ImageJ. For *Xenopus*, stacks of confocal images from four to five explants per experiment and per condition were made. Z-projection of the green channel images was used to count GFP-positive injected cells. MCCs, ionocytes and SSCs were counted using a merge of their corresponding channels with the green channel on order to consider only injected cells. Statistical analysis was made using GraphPad Prism 6.

SEM processing and imaging

Xenopus

Samples were prepared and imaged as previously described (Castillo-Briceno and Kodjabachian, 2014).

Human

SEM was performed at the CCMA EM Core Facility of the University of Nice Sophia-Antipolis. Briefly, cells were fixed in 1.6% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, rinsed and post-fixed 30 min in osmium tetroxide (1% in 0.1 M phosphate buffer). After rinsing, cells were dehydrated in a graded ethanol series and dried using hexamethyldisilazane (HMDS). Cells were mounted on aluminium stubs with adhesive tabs, sputter-coated with Pt (Crossington, 308R) and examined on a 6700F field emission scanning electron microscope (JEOL).

Western blot

Primary HAECs were harvested by scraping in RIPA lysis buffer (Thermo Scientific Pierce) and cleared by centrifugation. Protein concentration was determined using the BCA assay (Thermo Fisher Scientific) and equivalent amounts of protein were resolved by electrophoresis using the Novex NuPAGE SDS-PAGE Gel System following the manufacturer's instructions. Proteins were transferred to PVDF membranes (Bio-Rad) and analysed by immunoblotting with appropriate primary antibodies (supplementary material Table S1) and HRP-conjugated secondary antibodies (1/5000, Dako). Immunoreactive bands were detected using the Immobilon ECL Kit (Merck Millipore) on an LAS-3000 imager (Fujifilm).

Acknowledgements

We thank the staff of the imaging platform and of the aquatic facility at IBDM; Jean-Pierre Laugier (Centre Commun de Microscopie Appliquée, University of Nice Sophia-Antipolis) for the SEM experiments on human samples; Chris Kintner, Nancy Papalopulu, Martin Blum, John Wallingford, Eric Bellefroid and Saburo Nagata for sharing reagents; and Pierluigi Scerbo, who made the initial observation of misexpression of epidermal cell type marker genes in response to BMP pathway dysregulation in *Xenopus*.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

M.C., G.L. and V.T. performed experiments in *Xenopus* and analysed data. B.C., O.M., L.-E.Z. and B.M. performed experiments on HAECs and analysed data. A.P. and B.M. drafted the article and L.K. edited it. L.K. and B.M. conceived and supervised the project. L.K. and P.B. obtained funding and supervised the research teams. L.K. coordinated the project.

Funding

This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Aix-Marseille Université, Université de Nice Sophia-Antipolis, and by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR: MERCI, COMMIT, MITHRA), Vaincre la Mucoviscidose, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) [DEQ20130326464], and Fondation ARC to P.B. and L.K. IBDM authors acknowledge France-Biomedicine infrastructure funding 'Investissements d'Avenir' [ANR-10-INSB-04-01].

Supplementary material

Supplementary material available online at
<http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.118679/-/DC1>

References

- Boon, M., Wallmeier, J., Ma, L., Loges, N. T., Jaspers, M., Olbrich, H., Dougherty, G. W., Raidt, J., Werner, C., Amirav, I. et al. (2014). MCIDAS mutations result in a mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat. Commun.* **5**, 4418.
- Castillo-Briceno, P. and Kodjabachian, L. (2014). *Xenopus* embryonic epidermis as a mucociliary cellular ecosystem to assess the effect of sex hormones in a non-reproductive context. *Front. Zool.* **11**, 9.
- Chalmers, A. D., Strauss, B. and Papalopulu, N. (2003). Oriented cell divisions asymmetrically segregate aPKC and generate cell fate diversity in the early *Xenopus* embryo. *Development* **130**, 2657-2668.
- Chung, M.-I., Kwon, T., Tu, F., Brooks, E. R., Gupta, R., Meyer, M., Baker, J. C., Marcotte, E. M. and Wallingford, J. B. (2014). Coordinated genomic control of ciliogenesis and cell movement by RFX2. *Elife* **3**, e01439.
- Cibois, M., Scerbo, P., Thome, V., Pasini, A. and Kodjabachian, L. (2014). Induction and differentiation of the *Xenopus* ciliated embryonic epidermis. In *Xenopus Development* (ed. M. Kloc and J. Z. Kubiak), pp. 112-129. Oxford: John Wiley & Sons.
- De Robertis, E. M. (2006). Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 296-302.
- De Robertis, E. M. and Kuroda, H. (2004). Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 285-308.
- Deblandre, G. A., Wettstein, D. A., Koyano-Nakagawa, N. and Kintner, C. (1999). A two-step mechanism generates the spacing pattern of the ciliated cells in the skin of *Xenopus* embryos. *Development* **126**, 4715-4728.
- Dubaissi, E. and Papalopulu, N. (2011). Embryonic frog epidermis: a model for the study of cell-cell interactions in the development of mucociliary disease. *Dis. Model. Mech.* **4**, 179-192.
- Dubaissi, E., Rousseau, K., Lea, R., Soto, X., Nardeosingh, S., Schweickert, A., Amaya, E., Thornton, D. J. and Papalopulu, N. (2014). A secretory cell type develops alongside multiciliated cells, ionocytes and goblet cells, and provides a protective, anti-infective function in the frog embryonic mucociliary epidermis. *Development* **141**, 1514-1525.
- Fahy, J. V. and Dickey, B. F. (2010). Airway mucus function and dysfunction. *N. Engl. J. Med.* **363**, 2233-2247.
- Firth, A. L., Dargitz, C. T., Qualls, S. J., Menon, T., Wright, R., Singer, O., Gage, F. H., Khanna, A. and Verma, I. M. (2014). Generation of multiciliated cells in functional airway epithelia from human induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, E1723-E1730.
- Gray, A. C., McLeod, J. D. and Clothier, R. H. (2007). A review of in vitro modelling approaches to the identification and modulation of squamous metaplasia in the human tracheobronchial epithelium. *Altern. Lab. Anim.* **35**, 493-504.
- Guruharsha, K. G., Kankel, M. W. and Artavanis-Tsakonas, S. (2012). The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 654-666.
- Haji, R., Baranek, T., Le Naour, R., Lesimple, P., Puchelle, E. and Coraux, C. (2007). Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transit-amplifying cell properties. *Stem Cells* **25**, 139-148.
- Hayes, J. M., Kim, S. K., Abitua, P. B., Park, T. J., Herrington, E. R., Kitayama, A., Grow, M. W., Ueno, N. and Wallingford, J. B. (2007). Identification of novel ciliogenesis factors using a new in vivo model for mucociliary epithelial development. *Dev. Biol.* **312**, 115-130.
- Hogan, B. L. M., Barkauskas, C. E., Chapman, H. A., Epstein, J. A., Jain, R., Hsia, C. C. W., Niklason, L., Calle, E., Le, A., Randell, S. H. et al. (2014). Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function. *Cell Stem Cell* **15**, 123-138.
- Huang, S. X. L., Islam, M. N., O'Neill, J., Hu, Z., Yang, Y.-G., Chen, Y.-W., Mumau, M., Green, M. D., Vunjak-Novakovic, G., Bhattacharya, J. et al. (2014). Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **32**, 84-91.
- Huang, S. X. L., Green, M. D., de Carvalho, A. T., Mumau, M., Chen, Y.-W., D'Souza, S. L. and Snoeck, H.-W. (2015). The in vitro generation of lung and airway progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* **10**, 413-425.
- Karp, P. H., Moninger, T. O., Weber, S. P., Nesselhauf, T. S., Launspach, J. L., Zabner, J. and Welsh, M. J. (2002). An in vitro model of differentiated human airway epithelia. Methods for establishing primary cultures. *Methods Mol. Biol.* **188**, 115-137.
- Livraghi, A. and Randell, S. H. (2007). Cystic fibrosis and other respiratory diseases of impaired mucus clearance. *Toxicol. Pathol.* **35**, 116-129.
- Lu, P., Barad, M. and Vize, P. D. (2001). *Xenopus* p63 expression in early ectoderm and neuroectoderm. *Mech. Dev.* **102**, 275-278.
- Lyons, R. A., Saridogan, E. and Djanabakhch, O. (2006). The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Hum. Reprod. Update* **12**, 363-372.
- Marcet, B., Chevalier, B., Luxardi, G., Coraux, C., Zaragosi, L.-E., Cibois, M., Robbe-Sermesant, K., Jolly, T., Cardinaud, B., Moreilhon, C. et al. (2011). Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1280.
- Marchal, L., Luxardi, G., Thome, V. and Kodjabachian, L. (2009). BMP inhibition initiates neural induction via FGF signaling and Zic genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 17437-17442.
- Masterson, J. C., Molloy, E. L., Gilbert, J. L., McCormack, N., Adams, A. and O'Dea, S. (2011). Bone morphogenetic protein signalling in airway epithelial cells during regeneration. *Cell. Signal.* **23**, 398-406.
- McCormack, N., Molloy, E. L. and O'Dea, S. (2013). Bone morphogenetic proteins enhance an epithelial-mesenchymal transition in normal airway epithelial cells during restitution of a disrupted epithelium. *Respir. Res.* **14**, 36.
- Morrison, G. M. and Brickman, J. M. (2006). Conserved roles for Oct4 homologues in maintaining multipotency during early vertebrate development. *Development* **133**, 2011-2022.
- Mou, H., Zhao, R., Sherwood, R., Ahfeldt, T., Lapey, A., Wain, J., Sicilian, L., Izvolsky, K., Lau, F. H., Musunuru, K. et al. (2012). Generation of multipotent lung and airway progenitors from mouse ESCs and patient-specific cystic fibrosis iPSCs. *Cell Stem Cell* **10**, 385-397.
- Ossipova, O., Tabler, J., Green, J. B. A. and Sokol, S. Y. (2007). PAR1 specifies ciliated cells in vertebrate ectoderm downstream of aPKC. *Development* **134**, 4297-4306.
- Quigley, I. K., Stubbs, J. L. and Kintner, C. (2011). Specification of ion transport cells in the *Xenopus* larval skin. *Development* **138**, 705-714.
- Reversade, B., Kuroda, H., Lee, H., Mays, A. and De Robertis, E. M. (2005). Depletion of Bmp2, Bmp4, Bmp7 and Spemann organizer signals induces massive brain formation in *Xenopus* embryos. *Development* **132**, 3381-3392.
- Rock, J. R., Onaitis, M. W., Rawlins, E. L., Lu, Y., Clark, C. P., Xue, Y., Randell, S. H. and Hogan, B. L. M. (2009). Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 12771-12775.
- Rompolas, P., Azimzadeh, J., Marshall, W. F. and King, S. M. (2013). Analysis of ciliary assembly and function in planaria. *Methods Enzymol.* **525**, 245-264.
- Scerbo, P., Girardot, F., Vivien, C., Markov, G. V., Luxardi, G., Demeneix, B., Kodjabachian, L. and Coen, L. (2012). Vent factors function as Nanog-like guardians of developmental potential in *Xenopus*. *PLoS ONE* **7**, e36855.
- Schohl, A. and Fagotto, F. (2002). Beta-catenin, MAPK and Smad signaling during early *Xenopus* development. *Development* **129**, 37-52.
- Silverman, H., Lynn, J. W., Beninger, P. G. and Dietz, T. H. (1999). The role of latero-frontal cirri in particle capture by the gills of *Mytilus edulis*. *Biol. Bull.* **197**, 368-376.
- Sirour, C., Hidalgo, M., Bello, V., Buisson, N., Darribere, T. and Moreau, N. (2011). Dystroglycan is involved in skin morphogenesis downstream of the Notch signaling pathway. *Mol. Biol. Cell* **22**, 2957-2969.
- Snape, A., Wylie, C. C., Smith, J. C. and Heasman, J. (1987). Changes in states of commitment of single animal pole blastomeres of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **119**, 503-510.
- Song, R., Walentek, P., Spöner, N., Klimke, A., Lee, J. S., Dixon, G., Harland, R., Wan, Y., Lishko, P., Lize, M. et al. (2014). miR-34/449 miRNAs are required for motile ciliogenesis by repressing cp110. *Nature* **510**, 115-120.
- Sountoulidis, A., Stavropoulos, A., Giaglis, S., Apostolou, E., Monteiro, R., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Chen, H., Stripp, B. R., Mummery, C., Andreakos, E. et al. (2012). Activation of the canonical bone morphogenetic protein (BMP) pathway during lung morphogenesis and adult lung tissue repair. *PLoS ONE* **7**, e41460.
- Stubbs, J. L., Davidson, L., Keller, R. and Kintner, C. (2006). Radial intercalation of ciliated cells during *Xenopus* skin development. *Development* **133**, 2507-2515.
- Stubbs, J. L., Vladar, E. K., Axelrod, J. D. and Kintner, C. (2012). Multicilin promotes centriole assembly and ciliogenesis during multiciliate cell differentiation. *Nat. Cell Biol.* **14**, 140-147.
- Tan, F. E., Vladar, E. K., Ma, L., Fuentealba, L. C., Hoh, R., Espinoza, F. H., Axelrod, J. D., Alvarez-Buylla, A., Stearns, T., Kintner, C. et al. (2013). Myb promotes centriole amplification and later steps of the multiciliogenesis program. *Development* **140**, 4277-4286.
- Tanabe, T., Kanoh, S., Moskowitz, W. B. and Rubin, B. K. (2012). Cardiac asthma: transforming growth factor-beta from the failing heart leads to squamous metaplasia in human airway cells and in the murine lung. *Chest* **142**, 1274-1283.
- Walentek, P., Bogusch, S., Thumberger, T., Vick, P., Dubaissi, E., Beyer, T., Blum, M. and Schweickert, A. (2014). A novel serotonin-secreting cell type regulates ciliary motility in the mucociliary epidermis of *Xenopus* tadpoles. *Development* **141**, 1526-1533.
- Wallmeier, J., Al-Mutairi, D. A., Chen, C.-T., Loges, N. T., Pennekamp, P., Menchen, T., Ma, L., Shamseldin, H. E., Olbrich, H., Dougherty, G. W. et al. (2014). Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat. Genet.* **46**, 646-651.
- Werner, M. E. and Mitchell, B. J. (2012). Understanding ciliated epithelia: the power of *Xenopus*. *Genesis* **50**, 176-185.
- Wylie, C. C., Snape, A., Heasman, J. and Smith, J. C. (1987). Vegetal pole cells and commitment to form endoderm in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **119**, 496-502.

- Ying, Q.-L., Nichols, J., Chambers, I. and Smith, A.** (2003). BMP induction of *Id* proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115**, 281-292.
- Yoshizato, K.** (2007). Molecular mechanism and evolutionary significance of epithelial-mesenchymal interactions in the body- and tail-dependent metamorphic transformation of anuran larval skin. *Int. Rev. Cytol.* **260**, 213-260.
- Yu, P. B., Hong, C. C., Sachidanandan, C., Babitt, J. L., Deng, D. Y., Hoyng, S. A., Lin, H. Y., Bloch, K. D. and Peterson, R. T.** (2008). Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 33-41.

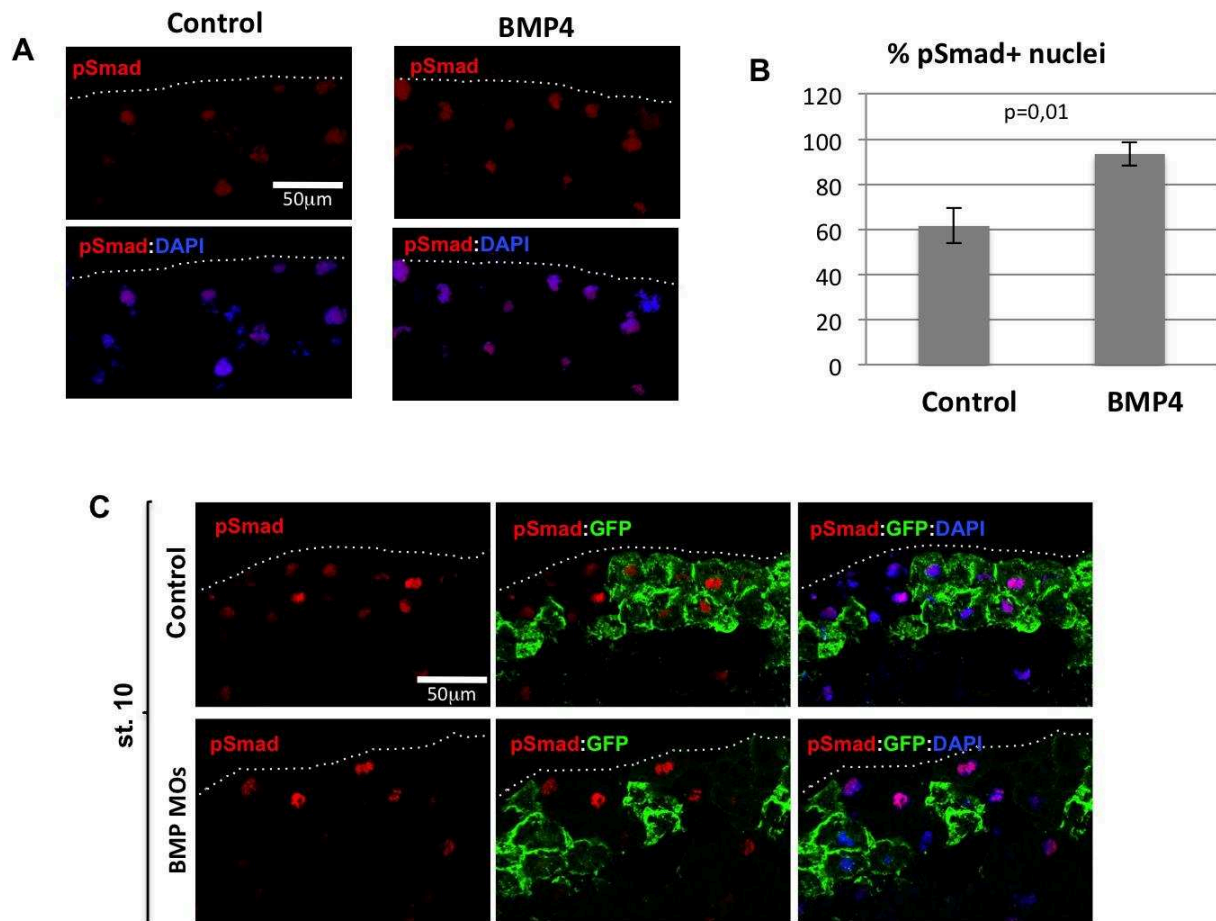


Figure S1: Validation of pSmad1/5/8 staining in response to BMP manipulation.

(A): Injection of stage 9 *Xenopus* embryos with recombinant BMP4 led to increased Smad1/5/8 phosphorylation and nuclear localization. **(B):** The percentage of nuclei positive for the pSmad signal is significantly higher in BMP-treated than in control embryos (Student's t-test). **(C):** Knocking down BMP2, BMP4 and BMP7 with specific morpholino oligonucleotides inhibited Smad1/5/8 phosphorylation. Embryos were injected with either GFP mRNA alone (upper row) or GFP mRNA and the BMP2/4/7 MOs (lower row). The pSmad1/5/8 signal was lost in cells that received the BMP2/4/7 MOs, but not in those that received only the GFP mRNA.

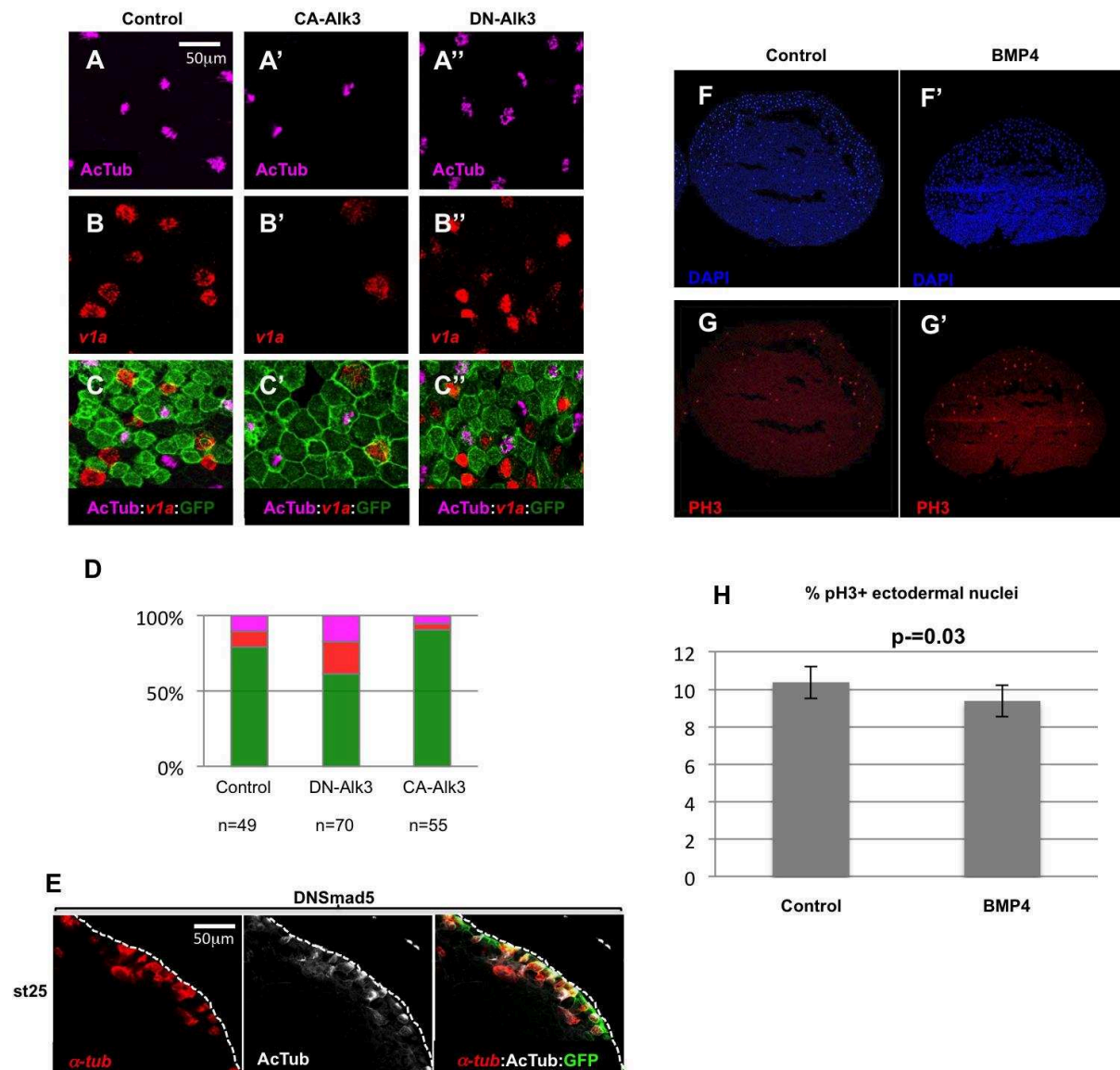


Figure S2: Interfering with the BMP pathway alters the numbers of MCCs and ionocytes in the developing *Xenopus* epidermis.

(A-D): 8-cell stage embryos were injected into the animal ventral blastomeres with synthetic mRNAs coding for GFP, alone (control; A, B, C) or together with mRNAs coding for a constitutively active (CA-Alk3; A', B', C') or a dominant negative (DN-Alk3; A'', B'', C'') version of the BMP receptor ALK3, then hybridized at stage 25 with a probe against the ionocyte marker *v1a* and antibodies against acetylated tubulin and against GFP. Activation of the BMP pathway by CA-Alk3 injection resulted in a decrease in the numbers of MCCs and

ionocytes. Inhibition of the BMP pathway by DN-Alk3 injection results in an increase in the numbers of MCCs and ionocytes. **(D)**: quantification of the different cellular populations in injected epidermal clones. The bars represent the total number of GFP positive cells scored. Magenta: acetylated tubulin positive MCCs; red: *vla* positive ionocytes; green: GFP positive cells negative for both acetylated tubulin and *vla*. **(E)**: Embryos injected with a synthetic mRNA coding for a dominant negative form of the zebrafish BMP pathway nuclear effector Smad5 (dnSmad5), showed supernumerary α -tubulin positive MCC precursors, which only partially managed to intercalate. **(F-H)**: Embryos were injected in the blastocoele with BSA (control) or recombinant BMP4 protein (BMP4), fixed at stage 10, cryosectioned and immunostained with an antibody against phosphorylated histone H3 (red), a hallmark of cells in mitosis. DAPI (blue) was used to stain the nuclei. The graph in **(H)** shows the ratio of phospho-H3 positive nuclei to the total number of ectodermal DAPI stained nuclei. BMP4 injection did not significantly modify the number of mitotic nuclei compared to controls (Student's t-test). In F-G', the animal pole (ectoderm) is up.

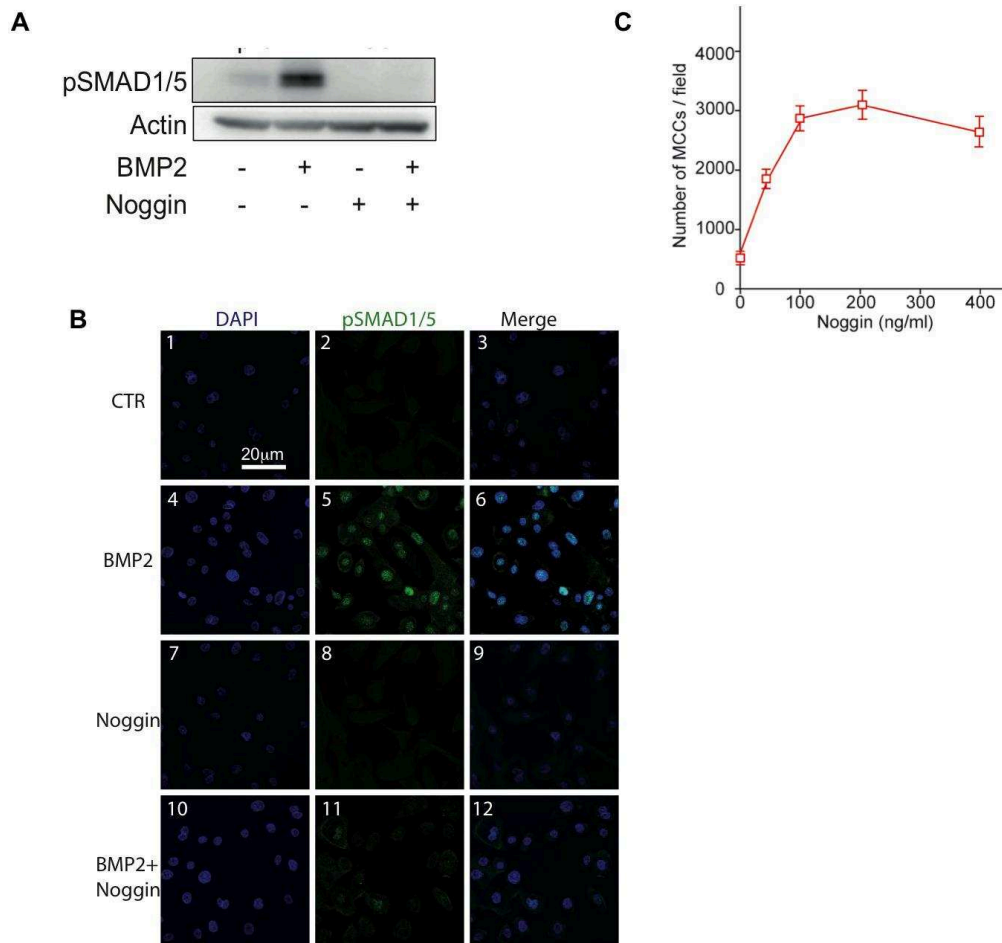


Figure S3: Validation of BMP pathway manipulation in HAECs.

(A): Expression levels of pSMAD1/5 in response to BMP2 (100ng/ml, 2h), Noggin (100ng/ml, 2h), or BMP2+Noggin (100ng/ml each, 2h) in proliferating HAECs. Actin was used as a loading control. **(B)** Proliferating HAECs were stained to identify the specific sub-cellular localization of pSMAD1/5 (in green) in untreated control cells (panels 1-3), BMP2-treated cells (100ng/ml, 2h) (panels 4-6), Noggin-treated cells (100ng/ml, 2h) (panels 7-9) and cells treated with both BMP2 and Noggin (100ng/ml each, 2h) (panels 10-12). Nuclei were stained with DAPI (in blue; panels 1,4,7,10). Data are representative of 3 independent experiments. **(C):** Dose-response curve of Noggin treatment. Regenerating HAECs were chronically treated with different doses of recombinant Noggin. Acetylated-tubulin positive MCCs were counted at LC. 100ng/ml Noggin was the minimal dose to give the maximal effect and used in the rest of the study.

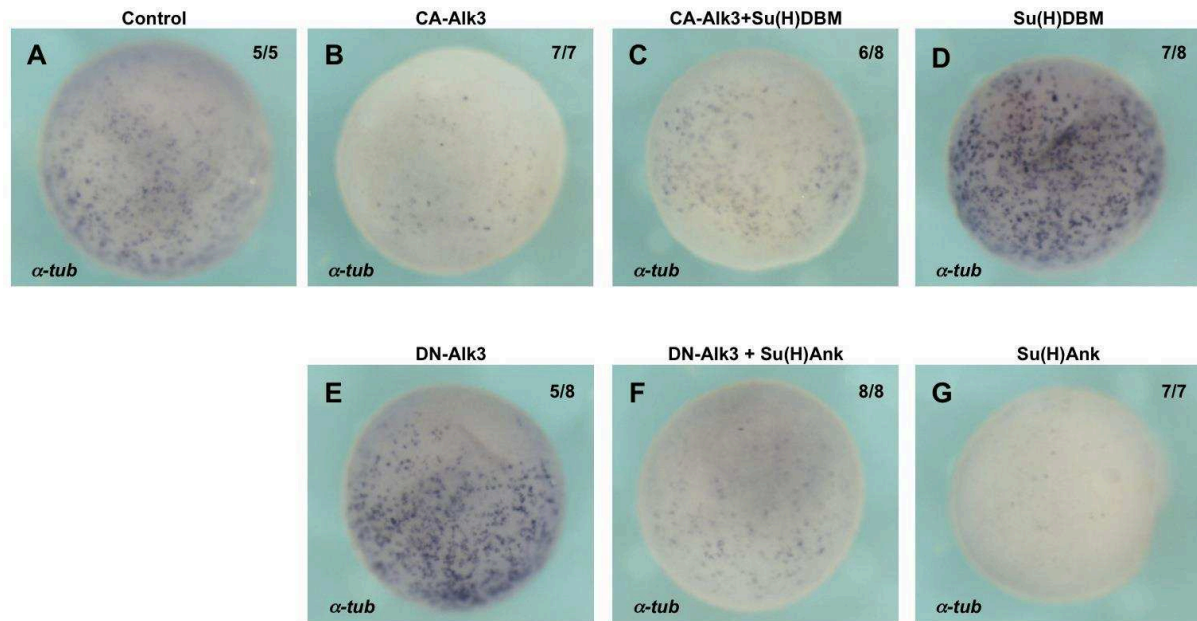


Figure S4: The BMP and Notch pathways interact.

Co-injection of mRNAs coding for a constitutively active form of the BMP receptor Alk3 (CA-Alk3) and a dominant negative form of the transcriptional Notch effector Suppressor-of-hairless (Su(H)DBM) (C) mitigated both the loss of α -tubulin positive cells resulting from expression of CA-Alk3 alone (B) and their increase following injection of Su(H)DBM alone (D). Co-injection of mRNAs coding for a dominant negative form of the BMP receptor Alk3 (DN-Alk3) and a constitutively active form of the transcriptional Notch effector Suppressor-of-hairless (Su(H)Ank) (F) mitigated both the increase in α -tubulin positive cells resulting from expression of DN-Alk3 alone (E) and their loss following injection of Su(H)Ank alone (G). The number of embryos showing the phenotype displayed over the total number of embryos examined is indicated.

Table S1: Plasmids, morpholinos, antibodies, drugs and recombinant proteins used.

Plasmid name	Vector	linearized with	transcribed with
dnSmad5	pCS2+	NotI	SP6
CA-Alk3	pCS2+	NotI	SP6
DN-Alk3	pCS2+	NotI	SP6
GFP-CAAX	pCS105	AseI	SP6

Morpholino Name	Sequence
MO-BMP2	5'-GATCCCAGCGACCATTGTCAACCTG-3'
MO-BMP4	5'-CAGCATTCGGTTACCAGGAATCATG-3'
MO-BMP7	5'-TTACTGTCAAAGCATTTCATTTTGTC-3'

Antibodies used on <i>Xenopus</i>	Source	Reference	Dilution
Monoclonal mouse anti-acetylated tubulin	Sigma	Clone 6-11B-1	1:200
Monoclonal mouse 5G7	Gift from Saburo Nagata (Japan Women's University)		1:500
Monoclonal mouse anti-P63	Abcam	Ab111449	1:100
Polyclonal rabbit anti-pSmad1/5/8	Cell signalling	9511	1:100
Polyclonal chicken anti-GFP	2BScientific	GFP-1020	1:1000
Polyclonal rabbit anti-Serotonin	Millipore	Ab938	1/250
Polyclonal rabbit anti-phosphoH3	Millipore	06-570	1 :250
anti-mouse-Cy5 anti-mouse 647 anti-mouse-561 anti-chick-488 anti-rabbit-561	Molecular Probes		1:500

Antibodies used on HAECs	N° clone	Source	Reference	Dilution	
				IF	Blot
Anti-acetylated tubulin	6-11B-1	Sigma-Aldrich	T7451	1 :1000	
Anti-HSP60	K-19	Santa Cruz Biotechnology	sc-1722		1 :5000
Anti-Muc5AC	45M1	Abcam	ab3649	1 :500	
Secondary antibodies		Molecular Probe		1:500	
Anti-pSmad1/5/8	41D10	Cell signaling	9516	1 :100	1 :1000
Anti-Smad1	D59D7	Cell signaling	6944		1 :1000
Anti-Actin	I-19	Santa Cruz Biotechnology	sc-1616		1 :5000

Drug and Recombinant proteins	Source	Reference	Concentration
Dorsomorphin	Sigma-Aldrich	P5499	2mg/ml
BMP2	R&D	355-BM	200ng/ml
Noggin	R&D	6057-NG	200ng/ml or see figures
BMP4	R&D	1128-BM-010	2 to 7ng/embryo

Probe	Vector	linearized	transcribed	Reference
Dll1	pBS	XhoI	T7	Deblandre et al. 1999
FoxA1	pBS	EcoRI	T3	Sinner et al. 2004
FoxJ1	pCS2+	BamHI	T7	Stubbs et al. 2008
Foxi1e	pCMV Sport 6	Sall	T7	Dubaissi et al. 2011
Intelectin-1	pBS	EcoRI	T7	Hayes et al. 2007
Multicilin	pBS	HindIII	T3	Stubbs et al. 2012
Otogelin	pCMV Sport 6	Sall	T7	Hayes et al. 2007
Tph1	pCMV Sport 6	EcoRV	T7	Walentek et al. 2014
α -Tubulin	pBS	NotI	T7	Deblandre et al. 1999
Trim29	pCS2+	EcoRI	T7	Hayes et al. 2007
V1a	pCS107	ClaI	T7	Dubaissi et al. 2011
α -Dystroglycan	pCRII	XhoI	Sp6	Bello et al. 2008

References:

Bello, V. Sirour, C. Moreau, N., Denker, E. and Darribère, T. (2008). A function for dystroglycan in the pronephros development in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **317**,106-120.

Dubaissi, E. and Papalopulu, N. (2011). Embryonic frog epidermis: a model for the study of cell-cell interactions in the development of mucociliary disease. *Dis. Mod. Mech.* **4**, 179-192.

Sinner, D., Rankin, S., Lee, M. and Zorn, A.M. (2004). Sox17 and beta-catenin cooperate to regulate the transcription of endodermal genes. *Development* **131**, 3069-3080.

Stubbs, J.L., Oishi, I., Izpisua Belmonte, J.C., Kintner, C. (2008). The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Nat. Genet.* **40**, 1454-1460.

DISCUSSION/PERSPECTIVES

En 2011, une étude pionnière réalisée au laboratoire a démontré le rôle des miR-34/449 comme régulateurs conservés de la multiciliogénèse, établissant ainsi pour la première fois un lien fonctionnel entre des miARN et la biogénèse des cils vibratiles. Le premier mécanisme d'action de ces miARN à avoir été mis en évidence est leur capacité à réprimer successivement le cycle cellulaire et la voie Notch, deux événements précoces nécessaires à la différenciation des MCC (Marcet, Chevalier, Coraux, et al. 2011; Marcet, Chevalier, Luxardi, et al. 2011). Ces résultats ont été depuis largement confirmés par d'autres études montrant qu'une invalidation des miR-34/449 chez la souris provoquait des défauts de multiciliogénèse (R Song et al. 2014; Jingwen Wu et al. 2014a). Cette découverte nous a permis d'approfondir les connaissances sur les mécanismes d'action des miARN mis en jeu dans une fonction biologique précise. Dans cette perspective, mon travail de thèse a consisté à mettre en lumière la complexité d'action des miR-34/449 pour contrôler la différenciation des MCC. D'une part, ils sont capables de coordonner successivement de multiples voies de signalisation afin d'orchestrer le programme de différenciation multicilié. D'autre part, nous avons identifié et caractérisé deux variants isomiR de la famille miR-34/449 qui ajoutent un niveau de complexité supplémentaire dans le mécanisme d'action et de régulation de ces miARN.

I. MiR-34/449 : chefs d'orchestre de la multiciliogénèse

Nous avons d'abord révélé une boucle de rétroaction négative entre Notch et les miR-449, conservée du xénope à l'Homme. Tandis que les miR-449 induisent une répression de Notch, cette inhibition de Notch va en retour renforcer l'expression des miR-449 puis des miR-34. Nos résultats ont permis d'émettre l'hypothèse que cette accumulation de molécules miR-34/449 leur confère la capacité de réguler d'autres cibles impliquées dans des étapes plus tardives de la différenciation. En accord avec ce postulat, Song et ses collègues ont montré que les miR-34/449 régulaient aussi l'expression de CP110, une protéine centriolaire dont l'inhibition est nécessaire à la maturation des corps basaux (Rui Song et al. 2014; Walentek et al. 2016).

A. miR-34/449 contrôlent la réorganisation du réseau apical d'actine

Lors de la différenciation des MCC, le remaniement du cytosquelette d'actine est un événement indispensable à la migration et à l'ancrage des corps basaux au pôle apical. Ce processus nécessite i) l'activation de la petite GTPase RhoA par un mécanisme dépendant du facteur de transcription Foxj1 ainsi que ii) la phosphorylation de l'Ezrine, protéine de liaison à l'actine, par des

kinases effectrices de RhoA comme ROCK1 (Rho-associated protein kinase 1) (Huang et al. 2003a; Pan et al. 2007).

Mon travail de thèse a consisté à mettre en évidence des mécanismes, dont certains sont conservés du xénope à l'Homme, par lesquels les miR-34/449 contrôlent la réorganisation apicale du réseau d'actine en modulant l'expression et l'activité de différents acteurs de la voie des petites GTPases.

Aussi bien chez le xénope que chez l'Homme, nous avons démontré que la répression de la petite GTPase R-Ras par miR-34/449 est indispensable à la mise en place du réseau apical d'actine et à la multiciliogénèse. Les miR-34/449 provoquent également une élévation de l'activité de RhoA. Cet effet ne résulte qu'en partie de l'inhibition de R-Ras, suggérant que les miR-34/449 modulent par ailleurs d'autres cibles de cette voie. A cet égard, nous avons identifié et caractérisé *ARHGDIB* et *ARHGAP1*, deux régulateurs négatifs de l'activité de RhoA (Cf Partie IV.B.3). (Cherfils & Zeghouf 2013; Mori et al. 2009), qui représentent en outre deux cibles directement réprimées par miR-34/449. Aucune modification de l'activité RhoA n'a été étonnamment détectée suite à l'invalidation d'*ARHGDIB* et d'*ARHGAP1*, suggérant un mécanisme de compensation par d'autres régulateurs. En effet, nous avons détecté dans notre modèle une expression significative de 23 autres *ARHGAP* et 22 *ARHGEF*, non prédites pour être ciblées directement par miR-34/449. Une étude systématique des 3'-UTR des transcrits de ces différents acteurs pourrait permettre de déterminer leur éventuel ciblage par les miR-34/449 ou leurs isomiR. Par ailleurs, en plus d'activer RhoA, les miR-34/449 induisent une inhibition de l'activité des GTPase de la famille Rac par un mécanisme indépendant de R-Ras. Les miR-34/449 pourraient donc réprimer d'autres cibles telles que des *ARHGEF* qui sont aussi des activateurs de Rac.

L'invalidation par siARN d'*ARHGAP1* ou de *RRAS* sur des cellules en prolifération induit une augmentation des points focaux d'adhésion, mimant les effets de l'expression de miR-34/449. De manière surprenante, cette même invalidation à un stade précoce de la différenciation bloque la formation des MCC. En revanche, aucun effet n'a été observé suite à l'invalidation d'*ARHGDIB*. Ceci indique qu'une expression précoce de R-Ras et d'*ARHGAP1* est requise pour la différenciation des MCC. Une approche de protection de cible sur R-Ras, a montré que la répression de R-Ras par miR-34/449 à une étape plus tardive est indispensable pour la réorganisation apicale du cytosquelette d'actine et le déclenchement de la multiciliogénèse. Chez le xénope, la protection de *rras* contre l'action des miR-34/449 perturbe la formation d'actine apicale et des cils mobiles mais ne semble pas affecter l'activité de RhoA, suggérant que R-Ras pourrait interagir avec des effecteurs en aval de RhoA. En revanche, la protection d'*ARHGDIB* n'induit aucun

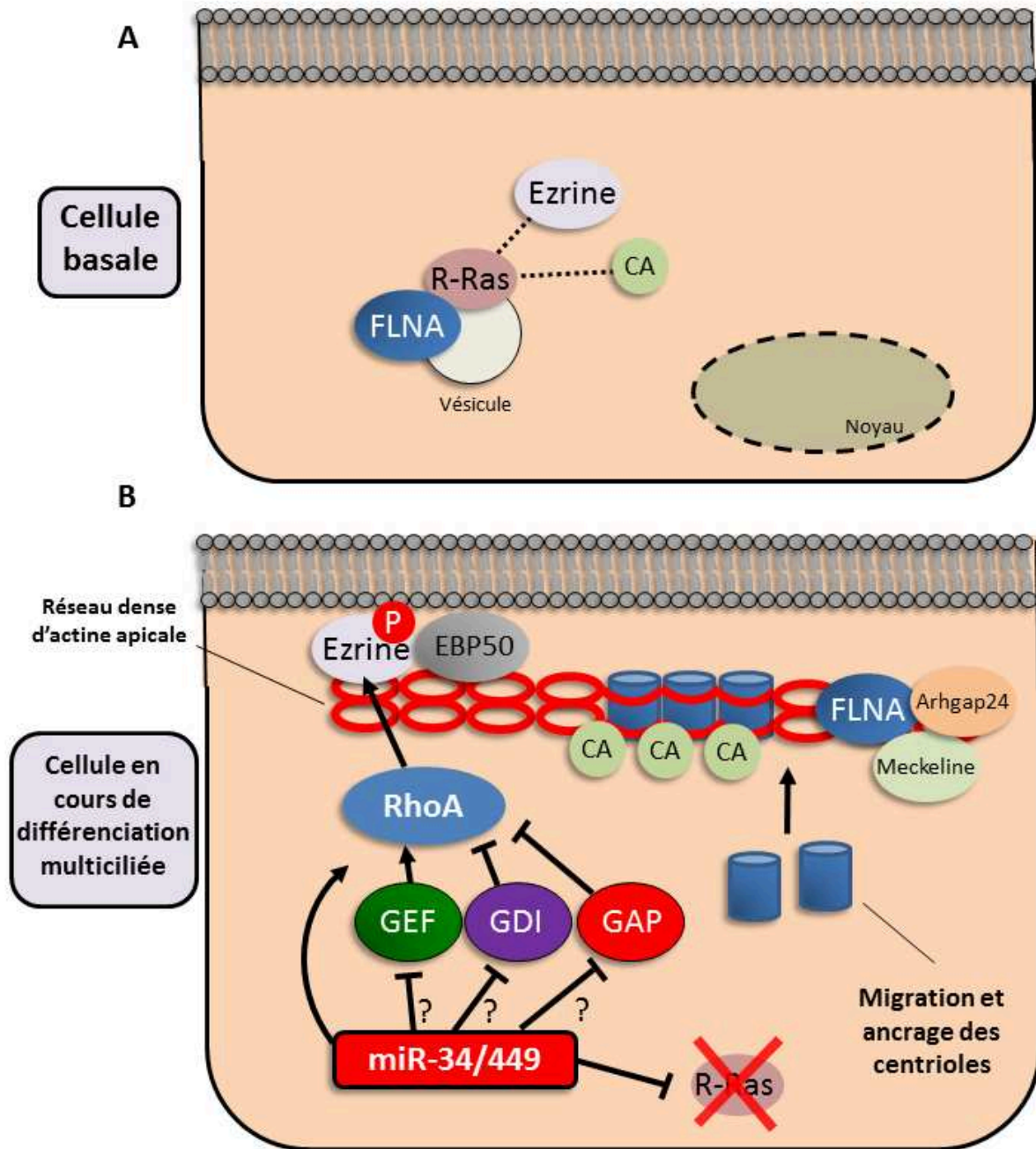


Figure 35 : Modèle proposé de la réorganisation du cytosquelette d'actine en réponse à l'inhibition de R-Ras par miR-34/449

A. Dans les cellules basales, R-Ras séquestre différentes protéines hors du pôle apical de la cellule, soit en interagissant directement avec (Filamine-A : FLNA) ou en modifiant leur état de phosphorylation (Ezrine et composants des complexes d'adhésion : CA)

B. Dans les cellules en cours de différenciation multiciliée, l'expression de miR-34/449 permet de réprimer R-Ras et libérer la Filamine-A, l'Ezrine et les complexes d'adhésion, qui vont pouvoir relocaliser au pôle apical et interagir avec d'autres partenaires afin de réorganiser le cytosquelette d'actine et permettre la migration et l'ancrage des corps basaux. miR-34/449 active également RhoA (possiblement via des modulateurs petites GTPases tels que les GEF, GAP ou GDI) qui va, entre autre, permettre la phosphorylation de l'Ezrine, indispensable à sa localisation apicale.

effet détectable ni sur la formation du réseau d'actine ni sur la multiciliogénèse. Cette même expérience n'a pu être techniquement conduite pour *ARHGAP1* car son 3'-UTR contient six sites cibles de miR-34/449. Une étude approfondie, qui serait lourde et coûteuse, de chacun des sites pourrait néanmoins permettre de déterminer le rôle d'Arhgap1 dans ce processus. Une hypothèse à tester serait qu'Arhgap1 et R-Ras modulent l'activité d'une autre protéine encore non identifiée, mais possédant un rôle précoce dans la multiciliogénèse.

Après avoir montré que le remodelage de l'actine apicale au cours de la multiciliogénèse implique conjointement l'activation de la voie RhoA et l'inhibition de R-Ras par miR-34/449, nous avons cherché à en élucider les mécanismes sous-jacents.

L'expression des miR-34/449 induit la phosphorylation de l'Ezrine, protéine de liaison à l'actine nécessaire à la réorganisation apicale du cytosquelette d'actine, par des kinases effectrices de RhoA telles que ROCK1. Néanmoins, il n'est pas impossible que l'inhibition de R-Ras participe à ce processus. Dans cette hypothèse, R-Ras contraindrait l'Ezrine sous une forme déphosphorylée, empêchant sa localisation apicale ainsi que le recrutement d'EBP50 nécessaire à la formation du réseau apical d'actine (Figure 35). Une analyse de la phosphorylation de l'Ezrine suite à une invalidation de R-Ras en présence ou non d'un inhibiteur de l'effecteur de RhoA ROCK1, tel que le Y27632, pourrait répondre à cette question.

Une autre protéine qui pourrait agir en aval de RhoA correspond à la Cofiline-1, une protéine de liaison à l'actine impliquée dans les cycles de polymérisation/dépolymérisation de l'actine. Sa phosphorylation sert de marqueur de stabilité du réseau d'actine. Tout comme l'Ezrine, la phosphorylation de la Cofiline-1 est augmentée au cours de la différenciation. Cette protéine est retrouvée fortement enrichie au pôle apical et co-localise avec les corps basaux. A nouveau, l'effet de l'inhibition de R-Ras sur la phosphorylation et la localisation de la Cofiline-1 pourrait être examiné. De manière intéressante, la Cofiline-1 fait partie intégrante d'un module protéique appelé complexe d'adhésion focal, dont la mise en place permet la formation des points focaux d'adhésion. De plus, ces structures sont impliquées dans la formation de complexes d'adhésion ciliaires, capables de connecter les corps basaux au cytosquelette d'actine et ainsi assurer leur bon positionnement (Antoniades et al. 2014). Une étude a mis en évidence la capacité de R-Ras à stimuler la phosphorylation d'autres protéines du complexe d'adhésion focal, la Paxilline et la Focal Adhesion Kinase (FAK) (Jeong et al. 2005). Leur phosphorylation a pour conséquence la relocalisation de ses structures. Par conséquent, on peut émettre une hypothèse selon laquelle R-Ras séquestre ces protéines en modulant leur état de phosphorylation dans les cellules non différenciées. La répression de R-Ras par les miR-34/449 dans les précurseurs des MCC permettrait alors la relocalisation apicale

de l'ensemble de ces protéines et la formation de complexes d'adhésion ciliaires, indispensables à l'ancrage optimal des corps basaux au sein du maillage d'actine (Figure 35). Cette hypothèse pourrait être démontrée par l'observation de la localisation cellulaire des complexes d'adhésion focaux/ciliaires au cours de la différenciation et l'évaluation de l'impact de la répression de R-Ras sur la phosphorylation des différents composants de ces complexes.

Par ailleurs, R-Ras est capable d'interagir avec la Filamine-A, une protéine cytoplasmique impliquée dans le positionnement des filaments d'actine (Ohta et al. 2006; Griffiths et al. 2011; Gawecka et al. 2010). Dans notre modèle, la Filamine-A est exprimée de manière homogène dans le cytoplasme des cellules basales tandis que son expression dans les MCC est restreinte au pôle apical à proximité des corps basaux. L'expression des miR-34/449 entraîne une relocalisation de la Filamine-A de la fraction membranaire vers la fraction du cytosquelette. Ces observations nous ont permis de supposer que l'expression de R-Ras dans les cellules indifférenciées permet son interaction avec la Filamine-A et la séquestre dans une fraction membranaire de la cellule. R-Ras a d'ailleurs été décrite comme localisant au niveau de vésicules de transport (Wurtzel et al. 2012; Conklin et al. 2010). La répression massive de R-Ras par miR-34/449 dans les cellules en cours de différenciation multiciliée permettrait à la Filamine-A d'interagir avec d'autres partenaires et ainsi d'être relocalisée au pôle apical (Figure 35). En accord avec notre hypothèse, une étude récente a montré que la Filamine-A interagit avec la Meckeline et que l'altération de cette interaction par l'inactivation de la Filamine-A ou de la Meckeline induit des défauts de ciliogénèse du cil primaire et de positionnement du corps basal (Adams et al. 2012). De plus, lors de la différenciation de l'épithélium respiratoire humain nous observons une forte induction de la Meckeline et la base de données « Human Protein Atlas » suggère une expression apicale de cette protéine dans les cellules cylindriques de l'épithélium respiratoire nasal. Une autre protéine connue pour interagir avec la Filamine-A est ARHGAP24 (Ohta et al. 2006), dont l'expression est également fortement induite au cours de la différenciation dans notre modèle et possédant le même profil d'expression cellulaire que la Meckeline sur « Human Protein Atlas ». Les auteurs ont montré que la phosphorylation d'ARHGAP24 par la kinase effectrice de RhoA ROCK1 inhibe l'activité de Rac, un résultat également observé après surexpression de miR-34/449

Enfin, nous avons montré que l'ensemble de ces événements sur l'actine est indépendant de la voie Notch, bien qu'il ait été montré que la voie Notch contrôle l'activité de R-Ras (Hodkinson et al., 2007). En effet, l'expression des miR-34/449 abolit complètement celle de R-Ras, rendant inutile le contrôle de son activité par la voie Notch alors que cette même protéine n'est plus exprimée par la cellule.

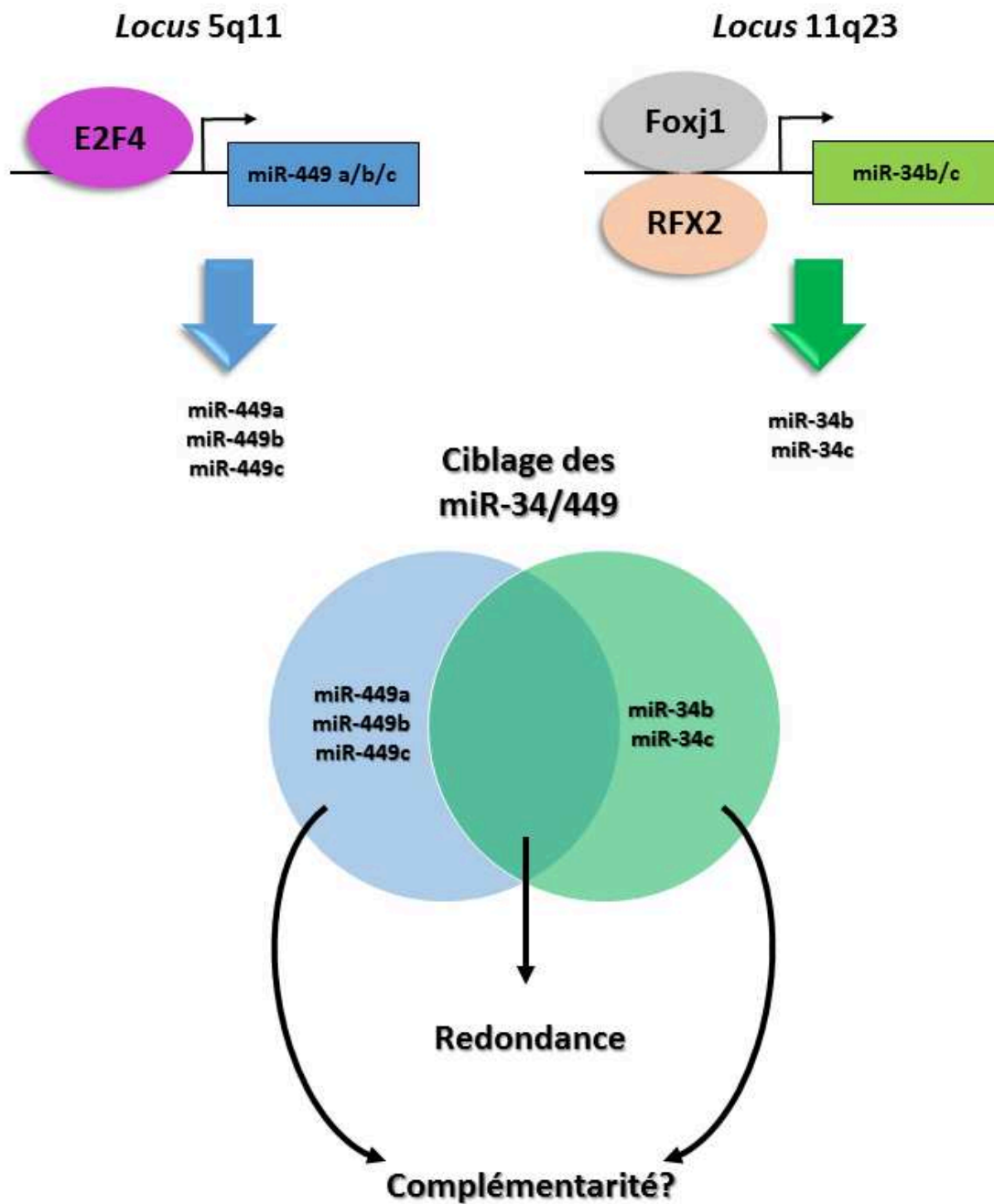


Figure 36: miR-34 et miR-449, redondance ou complémentarité?

La localisation chromosomique différente des miR-34b/c et miR-449 laisse supposer un contrôle transcriptionnel distinct. Nos résultats de cinétique d'expression de ces miARN ainsi que les résultats de CHIP-Seq de l'équipe de Kintner semblent confirmer que ces deux *loci* sont modulés de manière partiellement distincte (Walentek et al., 2016). Par ailleurs, l'analyse des données de transcriptomique après transfection des différents membres de la famille dans des cellules épithéliales respiratoires humaines souligne l'existence de cibles spécifiques à chaque sous famille (miR-34 et miR-449) en plus d'un large éventail de cibles réprimées par les deux sous familles. La validation de ces cibles spécifiques permettrait de mettre en évidence des mécanismes complémentaires des deux sous-familles, en plus d'une redondance évidente.

B. miR-34/449 : implication dans d'autres processus de la multiciliogénèse ?

Nos résultats, associés à ceux de la littérature, ont permis de mettre à jour les multiples mécanismes d'action conservés des miR-34/449 mis en jeu dans le contrôle de la multiciliogénèse. Un tel pléiotropisme d'action de miARN dans le contrôle d'une fonction biologique ne trouve à ce jour d'équivalent dans la littérature qu'avec les miR-130/301, des acteurs majeurs de l'hypertension pulmonaire au centre de la régulation de multiples voies de signalisation à la fois dans les cellules endothéliales et dans les cellules musculaires lisses (Bertero, K. Cottrill, et al. 2015; Bertero, K. A. Cottrill, Lu, et al. 2015; Bertero, K. A. Cottrill, Annis, et al. 2015).

Le nombre important de cibles prédites des miR-34/449 et retrouvées modulées dans nos modèles laisse présager que ces miARN contrôlent d'autres étapes de la multiciliogénèse. Par exemple, nous avons montré (données non publiées) que les miR-34/449 inhibent directement l'expression de la Gémimine (*GMNN*), qui est un répresseur précoce de la différenciation multiciliée agissant sur l'activité de *GEMC1* (Kyrrousi et al. 2015; Terré et al. 2016; Arbi et al. 2016). Ces observations élargissent encore plus le spectre d'action de cette famille de miARN.

C. miR-34, miR-449 et isomiR-34/449 : Redondance ou complémentarité ?

Savoir si chacun des miARN d'une même famille possède une contribution précise dans une fonction donnée est une question essentielle afin d'éclaircir les mécanismes évolutifs ayant abouti à l'existence de ces différents membres. Chez l'Homme, malgré la très forte homologie des 6 miARN de la famille miR-34/449, on peut souligner quelques légères différences (en dehors de la séquence « seed » parfaitement conservée), suggérant la divergence d'une séquence ancestrale qui se serait dupliquée. La comparaison des séquences de miR-449 et des miR-34 révèle la présence de deux uridines en milieu de séquence pour les miR-449, inexistantes chez les miR-34 (Figure 23). Cette différence de deux nucléotides est conservée chez tous les vertébrés. Ce décalage pourrait avoir des conséquences sur la reconnaissance des cibles, puisque l'importance des régions centrales et 3' des miARN ont été démontrées (Shin et al. 2010; Moore et al. 2015). Ainsi, une hypothèse serait que la divergence entre miR-34 et 449 ait pu être conservée car elle aurait apporté un avantage sélectif *via* un ciblage de transcrits partiellement différents. Nos données suggèrent qu'au-delà d'un grand nombre de cibles partagées, les miR-34 et les miR-449 possèderaient des cibles spécifiques à chacune des sous familles (Figure 36). Ces résultats pourraient être confirmés par des expériences de séquençage à haut débit après immunoprécipitation des protéines AGO liées covalamment aux ARN cibles des miARN (ou HITS-CLIP pour « High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking

immunoprecipitation ») après transfection de l'une ou l'autre famille 34 ou 449. Cette technique a l'avantage de ne sélectionner que les cibles directes et spécifiques des miARN, restreignant ainsi les signaux faussement positifs. La mise en évidence de cibles spécifiques à chacune des familles et qui pourraient avoir un rôle dans la multiciliogénèse permettrait de révéler une complémentarité fonctionnelle entre miR-34 et 449, en plus d'une redondance évidente.

Le fait qu'autant de miARN homologues agissent sur un même processus physiologique pose également la question d'une compensation de fonction. En effet, l'éventuelle duplication des miARN permettrait-elle de renforcer un mécanisme de régulation, et de permettre un balancement en cas de dysfonction d'un membre ? Cette question trouve une réponse partielle tout d'abord dans l'étude de Bao et collègues qui ont analysé l'expression des miR-34/449 dans les testicules de souris (Bao et al. 2012). L'expression de miR-34b/c et non celle de miR-34a est augmentée dans les souris KO pour miR-449a/b/c. La même équipe a observé deux ans plus tard précisément ces compensations dans les quatre tissus où les miARN sont exprimés chez la souris (testicules, cerveau, poumon et ovaires) (Jingwen Wu et al. 2014b). Ce phénomène de compensation est également mis en évidence fonctionnellement dans l'étude de Song et collaborateurs (R Song et al. 2014). Dans cette étude, les auteurs montrent que les souris double KO pour miR-34a et miR-449a/b/c ou pour miR-34a et miR-34b/c ne présentent pas de défaut de formation de MCC comparées aux souris triple KO (miR-34a, miR-449a/b/c et miR-34b/c). Il est en revanche à déplorer que les auteurs ne présentent aucun résultat sur des souris double KO (miR-34b/c et miR-449a/b/c). Ces données auraient en effet confirmé le rôle marginal et non compensatoire de miR-34a dans la multiciliogénèse observé par Wu et collègues (Jingwen Wu et al. 2014a).

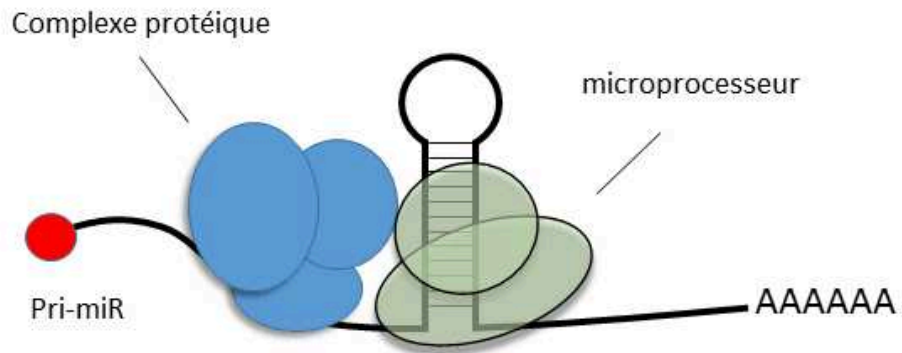
Ces résultats mettent également en évidence un contrôle différent de l'expression des miR-34 et des miR-449. Il est important de prendre en considération le fait que les miR-34/449 sont localisés sur 3 régions chromosomiques différentes. Hormis miR-34a qui ne semble pas avoir un rôle prépondérant dans la multiciliogénèse (Shuiqiao Yuan et al. 2015; Comazzetto et al. 2014; Jingwen Wu et al. 2014a), miR-34b/c et miR-449a/b/c sont sans doute contrôlés de manière différente au cours du processus de différenciation, de par leur localisation génomique (Figure 36). Bien que cette hypothèse n'ait à ce jour aucune confirmation claire, nous y avons partiellement répondu en étudiant les cinétiques d'expression des différents membres au cours de la différenciation (Chevalier et al. 2015). Nous avons en effet montré que l'induction de l'expression des miR-449 est plus précoce que celle des miR-34 et ceci chez l'Homme et le xénope. Ceci laisse supposer que l'expression tardive des miR-34 pourrait permettre de réprimer d'autres cibles, pour l'instant inconnues. Ce résultat nous a laissé supposer que dans un premier temps, les miR-449, seuls, répriment de manière précoce la

voie de signalisation Notch. Par la suite, l'inhibition de cette voie activerait à la fois l'expression des miR-34 et des miR-449, expliquant le délai d'expression entre ces deux familles.

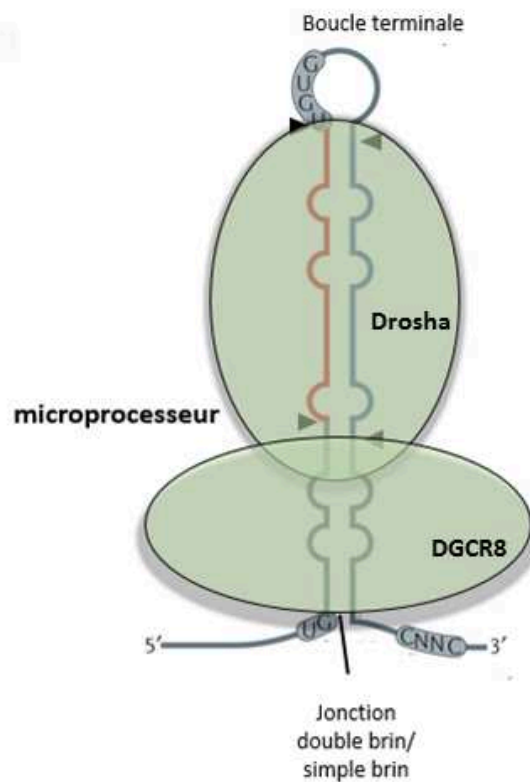
L'étude récente de l'équipe de Christopher Kintner révèle de nouveaux éléments concernant le contrôle de ces différents miARN chez le xénope (Walentek et al. 2016). Par des expériences d'immunoprécipitation de chromatine, ils ont montré que Foxj1 et RFX2 sont capables de se fixer au niveau de la région promotrice de miR-34b/c alors qu'E2F4 peut, quant à lui, se lier au promoteur des miR-449 (Figure 36). Ces résultats nécessitent des confirmations expérimentales afin de savoir si la liaison de ces différents facteurs s'accompagne d'une induction transcriptionnelle directe. Des tests de gènes rapporteurs réalisés au laboratoire ont d'ailleurs permis de souligner la capacité d'E2F4 à stimuler le promoteur de *CDC20B*. Ces données corroborent donc nos observations puisqu'E2F4 est un facteur de transcription très précoce de la multiciliogénèse alors que Foxj1 et RFX2 sont plus tardifs.

Le contrôle transcriptionnel observé permet de proposer une deuxième hypothèse dans laquelle la régulation d'expression des miR-34/449 serait également contrôlée par des événements épigénétiques. A cet égard, Toyota et collaborateurs ont identifié, en 2008, l'hyperméthylation du promoteur de miR-34b/c dans des cas de cancer colorectal (Toyota et al. 2008). Le niveau de méthylation des promoteurs de miR-34/449 pourrait changer au cours de la différenciation multiciliée afin de permettre un contrôle fin de l'expression des miARN. Néanmoins des études préliminaires alliant des expériences à haut débit à des PCR ne nous ont pas permis de mettre à jour de tels mécanismes dans notre modèle.

Les isomiR représentent une classe émergente de variants de miARN matures dont les fonctions font toujours l'objet de débats dans la littérature. Dans notre étude, nous avons mis en évidence l'existence d'isomiR en 5' de la famille miR-34/449, et nos résultats laissent suggérer que ces isomiR possèdent des cibles spécifiques, présageant de fonctions distinctes comparées aux membres canoniques de la famille. Néanmoins, le rôle fonctionnel de ces variants reste à déterminer. La difficulté de cette étude réside notamment dans le manque d'outils disponibles. En effet, aucune sonde n'est actuellement disponible commercialement pour la quantification d'isomiR en qPCR ou en puce. Il serait d'ailleurs intéressant d'estimer la capacité des sondes « canoniques » à inclure les séquences isomiR, dès lors faux-positifs. Le séquençage haut débit reste à ce jour la technologie la plus adaptée pour identifier ces variants. Par ailleurs, il est difficile de concevoir que les techniques permettant d'inhiber l'expression des miARN, tels que les antagomiR ou les morpholinos, permettent de discerner deux molécules différant d'une base. Une des techniques



Hypothèse 1: Encombrement stérique de la région de fixation de microprocesseur par une ou plusieurs protéines



Hypothèse 2: Influence de la séquence nucléotidique du pri-miR sur la fixation et le clivage du microprocesseur

Figure 37: Hypothèses sur le clivage imprécis du microprocesseur donnant naissance aux isomiR en 5'

permettant de discriminer l'effet fonctionnel d'un miARN canonique vis-à-vis de son isomiR serait l'utilisation d'oligonucléotides protecteurs. En effet, si le miR canonique et l'isomiR possèdent un site cible différent dans le 3'-UTR d'un transcrit, alors la protection de l'un ou l'autre des sites permettra de bloquer spécifiquement la répression du miR ou de son variant. Cet outil pourrait donc être utilisé pour valider fonctionnellement l'effet du ciblage d'un transcrit spécifique des isomiR-34/449.

L'existence des isomiR en 5', possédant une séquence « seed » différente de leur pendant canonique, s'explique exclusivement par un défaut de clivage par les endonucléases Drosha et Dicer (Partie III.F.1). En effet, à l'heure actuelle, aucune enzyme capable d'ajouter ou de supprimer un nucléotide en 5' d'un miARN n'a été découverte. De plus, l'extrémité 5' d'un miARN étant enfouie dans une poche basique au sein d'AGO, elle est protégée de toute modification (Ma et al. 2005). Les isomiR de la famille 34/449 étant des variants de miR-5p, dépendent donc uniquement du clivage par Drosha. Il serait donc essentiel d'identifier les déterminants expliquant une imprécision de clivage de cette enzyme. Une des hypothèses serait que les séquences avoisinant le site de coupure sur la séquence du pri-miR puissent influencer la coupure de Drosha (Figure 37). En effet, un encombrement stérique, possiblement dû par la fixation d'autres protéines, pourrait empêcher un bon positionnement du microprocesseur et entraîner des imprécisions au niveau de la coupure. Une autre hypothèse serait que la séquence même du pri-miR influe sur le positionnement du microprocesseur et donc sur la qualité de sa coupure (Figure 37). Il serait donc judicieux d'observer si la conservation des isomiR est corrélée à la conservation de la séquence du pri-miR ou du moins d'une fraction de cette séquence. Néanmoins, cette hypothèse semble non pertinente dans le cas de miR-34b où l'isomiR est également présent dans des espèces lointaines comme le xénope mais absent chez la souris. En effet, l'alignement des séquences du pri-miR humain avec celui de la souris est quasiment parfait (5 mésappariements) alors que celui du pri-miR humain avec celui du xénope présente de nombreux mésappariements (63% d'identité seulement).

Un tel phénomène aléatoire tend à infirmer le rôle physiologique des 5'-isomiR et suggère que le ciblage spécifique de transcrits par ces variants soit stochastique. Cela expliquerait nos résultats de séquençage obtenus après transfection des miR-34/449 ou de leurs 5'-isomiR. En effet, en plus de posséder un « targetome » (ie l'ensemble des cibles réprimées) très différent de celui des miR canoniques, les isomiR possèdent un nombre plus restreint de cibles modulées, suggérant donc qu'une partie des répressions observées représente un phénomène aléatoire. Néanmoins, il est concevable qu'un nombre restreint de cibles aient pu évoluer récemment pour être ciblées par les 5'-isomiR, et ainsi fournir une complémentarité d'action aux miR canoniques. Dans notre exemple, nous avons suggéré le ciblage spécifique de la Moésine par le 5'-isomiR-34b. Afin de déterminer si ce ciblage a un impact fonctionnel, nous pourrions réaliser une stratégie de protection de la Moésine,

empêchant la fixation du 5'isomiR-34b, et observer la formation de points focaux d'adhésion qui est décrite pour être influencée par le niveau d'expression de la Moésine (Haynes et al. 2011; Doi et al. 1999).

Un autre aspect à prendre en considération sur les isomiR est le biais potentiel de leur quantification. En effet, le séquençage haut débit des miARN permet de compter le nombre de molécules à l'équilibre à un instant donné. Néanmoins, cette quantification n'est pas forcément le reflet du niveau de transcription des miARN. En effet, si l'addition d'une base sur un isomiR entraîne une modification de sa stabilité, le nombre de lectures observées en séquençage ne sera pas le reflet de son niveau d'expression transcriptionnel. Pour répondre à ce problème, des expériences de blocage de transcription par l'actinomycine D pourraient être mises en place afin d'observer les stabilités des miR/isomiR en effectuant un séquençage à différents temps après stimulation. Ce résultat permettrait d'estimer correctement les proportions des 5'-isomiR de la famille 34/449 transcrits.

La réponse à l'ensemble de ces questions permettrait de mieux comprendre la biogénèse de ces variants à l'heure actuelle trop peu décrits.

D. Contribution des gènes des *loci* miR-34 et miR-449 : existence de deux loci « multiciliaires » ?

En plus du rôle des miR-449, le laboratoire avait aussi révélé que leur gène hôte, *CDC20B*, était lui aussi fortement et spécifiquement exprimé dans les MCC (Marcet, Chevalier, Luxardi, et al. 2011). *CDC20B* code pour une protéine retrouvée au niveau des corps basaux (Marcet, Chevalier, Luxardi, et al. 2011), mais également au niveau des deutérosomes et des cils mobiles dans les MCC chez l'Homme mais aussi chez le xénope (Zaragosi et al en préparation). De plus, des expériences de gain et perte de fonctions dans les deux espèces indiquent que Cdc20b contribue également à l'élaboration des multiples cils vibratiles, bien que sa fonction précise fasse encore l'objet d'étude dans l'équipe (Zaragosi et al., en préparation). Ces résultats révèlent que les miR-449 et leur gène hôte *CDC20B* possèdent une complémentarité fonctionnelle dans la différenciation des MCC. Ce phénomène a déjà été rapporté dans la littérature comme dans l'exemple de miR-33 et son gène hôte SREBP, coopérant pour contrôler l'homéostasie du cholestérol (Najafi-Shoushtari et al. 2010; Lutter et al. 2010). Au-delà de cette coopération au sein du gène *CDC20B*, deux autres gènes adjacents à *CDC20B* localisés dans une même région du *locus* 5q11 ont récemment été décrits comme acteurs clés de la multiciliogénèse (Figure 22). C'est le cas de la multiciline, codée par le gène *MCIDAS* chez l'Homme, qui est un facteur de transcription clé impliqué dans ce processus de différenciation (Cf Partie IV.C.4.a) (Stubbs et al. 2012; Ma et al. 2014; Kyrousi et al. 2015). C'est

également le cas du gène *CCNO* codant pour une protéine impliquée dans la formation des deutérosomes (Funk et al. 2015b). Le regroupement de ces gènes au sein du même *locus* est très conservé chez les vertébrés. Des mutations de *MCIDAS* ou *CCNO* ont été récemment caractérisées chez des patients souffrant de défauts de clairance mucociliaire associés à une réduction du nombre de cils mobiles à la surface des MCC (Julia Wallmeier et al. 2014; Boon et al. 2014), démontrant la complémentarité fonctionnelle et l'importance physiopathologique des membres de ce locus 5q11 dans l'établissement du phénotype multicilié.

Le rôle complémentaire des membres du locus 5q11 et des miR-449 ainsi que le rôle des miR-34b/c dans la multiciliogénèse, nous a conduits à émettre l'hypothèse que les gènes du locus 11q23 des miR-34b/c (*LAYN* et *C11ORF88*) pourraient, comme ceux du locus 5q11, participer à ce processus. Les membres du locus 11q23 chez l'Homme sont aussi conservés chez tous les vertébrés. La Layilin (codée par *LAYN*) est un récepteur membranaire à l'acide hyaluronique capable d'interagir avec le cytosquelette d'actine dans les cellules épithéliales des voies respiratoires (Wegener et al. 2008). La petite GTPase RhoA a été identifiée comme effecteur de la signalisation *via* la Layilin (Forteza et al. 2012). Néanmoins, cette protéine n'est pas spécifique des MCC. A l'inverse, l'expression de *C11ORF88* semble spécifique de ces cellules. Des résultats préliminaires nous indiquent que l'expression de la protéine C11orf88, de fonction encore inconnue, est très fortement induite au cours de la différenciation multiciliée. L'équipe cherche donc à identifier la fonction de ces deux gènes et comprendre leur contribution au cours de la multiciliogénèse. Malgré son expression ubiquitaire, la Layilin pourrait avoir une fonction dans des étapes précoces de différenciation comme la polarisation où la mise en place du réseau d'actine apical. En effet, son lien étroit avec le cytosquelette pourrait lui conférer des rôles lors de l'évolution structurale des cellules au cours de la différenciation. De plus, des premiers résultats nous montrent que l'expression de cette protéine semble s'atténuer en fin de différenciation, renforçant son rôle précoce. Il serait judicieux d'identifier les protéines interagissant avec la Layilin dans notre modèle en début de différenciation. Pour cela, des expériences de co-immunoprécipitation couplées à des analyses globales des partenaires par spectrométrie de masse pourraient être réalisées. Pour ce qui est de C11orf88, il serait dans un premier temps intéressant d'analyser précisément sa cinétique d'expression au cours de la différenciation. En effet, une expression corrélée à celle des miR-34 (un peu plus tardive que les miR-449) suggérerait un contrôle transcriptionnel commun de ce gène avec les miARN du même locus. Par ailleurs, des premières expériences d'immunomarquage semblent indiquer une présence centriolaire de la protéine C11orf88. Des expériences de perte et gain de fonction pourraient permettre de déterminer son implication dans la multiciliogénèse. Sous cet aspect, des analyses par spectrométrie de masse suite à une co-immunoprécipitation permettraient une mise en évidence des

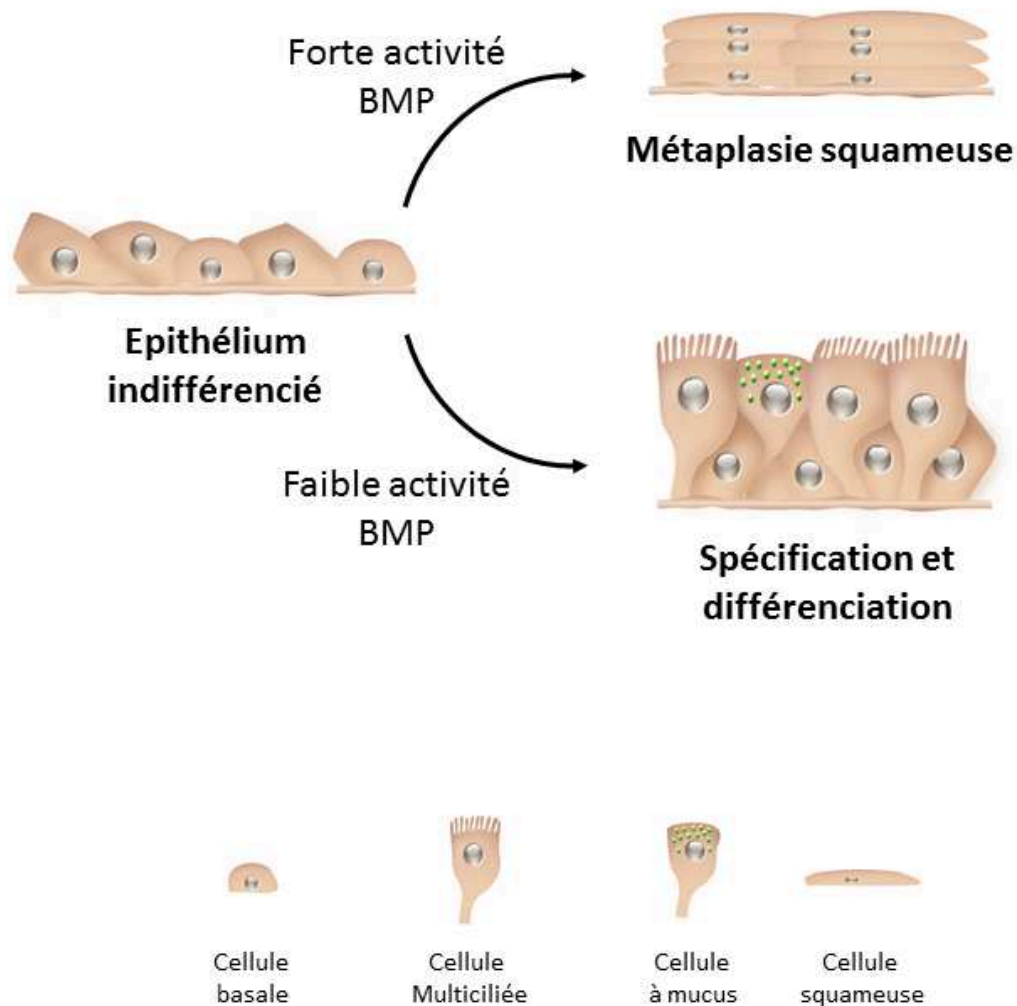


Figure 38: Devenir de l'épithélium respiratoire en culture en fonction du niveau d'activité de la voie BMP

Un faible niveau d'activité de BMP est requis pour l'entrée en différenciation des cellules multiciliées et des cellules à mucus. A l'inverse, une forte stimulation de la voie BMP entraîne une transition épithélio-mésenchymateuse de l'épithélium amenant à une métaplasie squameuse.

interactions avec certaines protéines dont la fonction pourrait conduire à la caractérisation fonctionnelle de C11orf88.

La découverte d'un rôle conservé d'un des gènes du *locus* 11q23 soulignerait l'existence originale d'une coopération de deux *loci* agissant de manière concertée pour contrôler une même fonction physiologique.

II. Rôle de la voie BMP dans la multiciliogénèse

Nous avons démontré pour la première fois le rôle de la voie de signalisation BMP dans la différenciation de l'épithélium mucocilié chez les vertébrés. Chez le xénope comme chez l'Homme, une inhibition précoce de la voie BMP stimule fortement la différenciation des MCC et des cellules à mucus. Par ailleurs, nous avons constaté que le signal BMP est actif dans les cellules cylindriques apicales de l'épithélium respiratoire au début de la différenciation. Cette observation, *a priori* troublante, a été également rapportée dans deux études récentes qui ont noté un marquage des SMAD 1/5/8 phosphorylées (reflétant de l'activité de BMP) dans les cellules positives pour des marqueurs de cellules différenciées (Mou et al. 2016; Tadokoro et al. 2016). Pourtant, leurs travaux ainsi que les nôtres montrent que l'activation de la voie BMP bloque totalement la différenciation. Ainsi, le signal BMP doit être finement contrôlé pour orienter le destin cellulaire vers une différenciation des MCC et des cellules à mucus. Un niveau d'activité faible de BMP permettrait à la cellule de se spécifier, contrairement à une activité forte qui bloquerait cette étape (Figure 38). Dès lors, une inhibition précoce de la voie augmenterait le nombre de MCC et de cellules à mucus, ce qui corroborerait les résultats que nous obtenons par traitement avec Noggin pour inhiber le signal BMP. Une cellule déjà spécifiée ne serait alors plus sensible à BMP dans le contrôle de son destin, et cette voie pourrait alors jouer d'autres rôles qui restent à déterminer. Les cellules ne répondraient donc pas de la même façon au signal BMP selon leur niveau d'engagement dans le processus de différenciation. Une telle différence de réponse à BMP entre cellules non spécifiées ou spécifiées pourrait s'expliquer par l'expression à leur surface de différents récepteurs de la voie BMP ou des niveaux d'expression différents entre les deux types cellulaires.

Actuellement, nous cherchons à élucider les mécanismes moléculaires expliquant comment l'inhibition de cette voie peut stimuler la différenciation des MCC. Nous avons identifié les gènes de la famille ID (pour « inhibitor of differentiation ») comme étant très fortement réprimés par l'inhibition de la voie BMP induite par Noggin. Nous avons ensuite testé l'hypothèse selon laquelle ces molécules, en interagissant avec le facteur de transcription clé de la multiciliogénèse E2F4,

pourrait bloquer son activité transcriptionnelle en le séquestrant. Des données préliminaires suggèrent une interaction entre E2F4 et ID2. Il est désormais nécessaire de prouver que cette interaction bloque l'activité transcriptionnelle d'E2F4 nécessaire aux étapes précoces de différenciation. Il est notamment concevable que le complexe ID2/E2F4 se fixe sur des promoteurs spécifiques comme cela est décrit pour le promoteur de *C-MYC* dans le foie (Rodríguez et al. 2006), et que la suppression d'ID2 par Noggin, entraîne une relocalisation d'E2F4 sur d'autres régions génomiques. E2F4, libéré de son interaction avec ID2, pourrait alors former de nouveaux complexes avec d'autres cofacteurs clés tels que GEMC1, ou Idas (Terré et al. 2016; Ma et al. 2014) et induire l'expression de gènes de la différenciation multiciliée. Un tel phénomène pourrait être caractérisé à l'aide d'expériences d'immunoprécipitation de chromatine par un anticorps E2F4 suivies par du séquençage à haut débit (ChIP-Seq), et ceci avec ou sans traitement Noggin. Ainsi, la relocalisation d'E2F4 sur d'autres promoteurs pourra être révélée par l'enrichissement de nouvelles séquences spécifiques. Les données de séquençage pourront également être comparées à celles obtenues chez le xénope par la même technique et également avec un anticorps reconnaissant E2F4 (Ma et al. 2014).

Le rôle de BMP dans la spécification des MCC rappelle l'implication de la voie Notch dans ce processus. Dans de nombreux contextes cellulaires, les voies BMP et Notch agissent en interaction pour contrôler certaines fonctions biologiques (Shin et al. 2009; Quillien et al. 2011; Munnamalai & Fekete 2016). Dans notre étude, nous avons démontré que chez le xénope l'activation précoce de BMP induit l'expression du ligand Notch DLL1 et bloque ainsi la formation des MCC. Par ailleurs, une stimulation plus tardive de la voie BMP n'a plus d'effet sur DLL1 ni sur le nombre de MCC. Un tel contrôle de la voie BMP sur la voie Notch n'a pu être mis en évidence dans notre modèle humain dans lequel la modulation de l'activité de BMP ne modifie pas l'expression de Notch1 et DLL1 ni celle des HES, effecteurs transcriptionnels de la voie Notch. Un faible niveau d'activité des deux voies en parallèle serait toutefois nécessaire à une cellule pour qu'elle s'engage vers une identité multiciliée. Ces deux voies représenteraient une sorte de double contrôle que des cellules basales doivent franchir pour que leur destin soit choisi.

III. Modulation de la voie BMP et des miR-34/449 in vivo : vers une approche thérapeutique ?

Comme nous l'avons vu dans la Partie I.F.3, certaines maladies respiratoires chroniques sont associées à une perte progressive des MCC. L'utilisation d'un modèle d'asthme, induit chez la souris, *in vivo* nous a permis de tester l'effet de l'inhibition de la voie BMP sur la multiciliogénèse dans une situation pathologique. Après induction d'une inflammation dans les voies respiratoires de souris par

administration d'ambroisie, l'ajout de Noggin entraîne une augmentation significative du nombre de MCC trachéales lors de la régénération. Une évaluation de l'effet de Noggin sur le nombre de cellules à mucus n'a pu encore être réalisée. D'autre part, et dans des perspectives thérapeutiques de l'utilisation de Noggin, il est indispensable de mesurer l'effet du traitement Noggin sur la clairance mucociliaire à partir de trachées de souris. L'évaluation du trajet de microbilles fluorescentes sur une trachée fraîchement analysée *ex situ* permettrait de répondre à cette question.

L'utilisation d'autres modèles pathologiques pourrait également être envisagée. En effet, dans notre étude, les protocoles réalisés correspondent à des inflammations de type asthmatiques par le contact chronique avec un allergène, l'ambroisie. Ce modèle a l'avantage de posséder un phénotype inflammatoire fort des voies respiratoires contrairement aux modèles de souris CF (possédant la mutation majeure $\Delta F508$ du CFTR responsable de la mucoviscidose) qui n'ont aucun phénotype pulmonaire et ne peuvent donc pas être utilisés. Un autre modèle prometteur est celui du cochon CF, qui lui présente un phénotype pulmonaire marqué (Partie I.F.3.c).

L'ensemble de nos résultats laisse entrevoir la possibilité de tester l'effet d'autres molécules, telles que les miARN sur la différenciation de l'épithélium mucocilié. En effet, étant donné les résultats obtenus pour les miR-34/449 sur la multiciliogénèse, il serait intéressant d'observer l'effet de ces miARN *in vivo* chez la souris sur la régénération des MCC des voies aériennes. Cependant, contrairement à Noggin qui est un ligand extracellulaire, les miARN doivent pénétrer au sein des cellules afin d'induire leurs effets. Pour cela, la galénique des miARN doit être judicieusement choisie afin qu'ils puissent être incorporés par le plus grand nombre de cellules au niveau des voies respiratoires. Une étude a souligné l'efficacité de l'inoculation d'un virus contenant la séquence du miARN mature let-7 par voie intranasale chez la souris (Esquela-Kerscher et al. 2008). Par ailleurs, l'utilisation de liposome a également été proposée pour l'administration de miARN (Shim et al. 2013; Fortunato et al. 2014; Wiggins et al. 2010). L'approche liposomale a d'ailleurs été choisie pour la première étude clinique impliquant l'administration de miR-34a.

Dans la perspective thérapeutique d'améliorer la multiciliogénèse, il est crucial de choisir la meilleure fenêtre d'action des miR-34/449 correspondant à cet effet, pour ne pas induire des effets indésirables de ces miARN (suppresseurs de tumeurs, anti-prolifératifs). Leur administration trop précoce sur un tissu lésé aurait pour effet de bloquer la ré-épithélialisation et donc à terme de bloquer la multiciliogénèse au lieu de l'activer.

Cette vaste étude nous a permis de lever le voile sur de nouveaux acteurs cruciaux de la multiciliogénèse. Malgré la diversité de fonctions qu'opèrent les cils dans les cellules animales, la

compréhension des mécanismes régissant leur mise en place, en particulier par centaines au sein des MCC, reste partielle. En effet, les avancées technologiques telles que le séquençage à haut débit mais aussi les outils génétiques tels que les souris transgéniques ont largement contribué aux nettes avancées dans ce domaine ces dix dernières années. L'identification des cellules progénitrices capables de se spécifier en différents types de cellules différenciées a fourni des informations majeures quant à la régulation de l'épithélium à l'homéostasie mais également suite à une lésion. Par ailleurs, grâce aux récentes découvertes concernant les voies de signalisation, les facteurs de transcription, les microARN et d'autres acteurs clés et conservés impliqués dans la différenciation des MCC, nous pouvons commencer à reconstituer la séquence d'événements qui contribuent à la mise en place des multiples cils vibratiles.

Nos travaux s'intègrent pleinement dans cette dynamique par la mise en évidence des miR-34/449 qui, au travers des nombreuses interactions qu'ils établissent avec différentes voies de signalisation, jouent un rôle de chefs d'orchestre de la multiciliogénèse. Enfin, nous espérons que nos découvertes sur les miR-34/449 pourront contribuer à améliorer l'arsenal thérapeutique destinés à lutter contre des pathologies associées à des désordres des cils mobiles, comme les ciliopathies ou encore les maladies respiratoires chroniques telles que l'asthme, la mucoviscidose ou la BPCO.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam, D. et al., 2014. Cystic fibrosis airway epithelium remodelling: involvement of inflammation. *The Journal of pathology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25348090> [Accessed December 22, 2014].
- Adams, M. et al., 2012. A meckelin-filamin A interaction mediates ciliogenesis. *Human molecular genetics*, 21(6), pp.1272–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22121117> [Accessed September 13, 2016].
- Ameres, S.L. & Zamore, P.D., 2013. Diversifying microRNA sequence and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8), pp.475–488. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm3611> [Accessed October 18, 2016].
- Anderson, R.G., 1972. The three-dimensional structure of the basal body from the rhesus monkey oviduct. *The Journal of cell biology*, 54(2), pp.246–65. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2108883&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 20, 2016].
- Antoniades, I., Stylianou, P. & Skourides, P.A., 2014. Making the Connection: Ciliary Adhesion Complexes Anchor Basal Bodies to the Actin Cytoskeleton. *Developmental Cell*, 28(1), pp.70–80.
- Arbi, M. et al., 2016. GemC1 controls multiciliogenesis in the airway epithelium. *EMBO reports*, 17(3), pp.400–413. Available at: <http://embor.embopress.org/lookup/doi/10.15252/embr.201540882> [Accessed September 7, 2016].
- Artavanis-Tsakonas, S. & Muskavitch, M.A.T., 2010. Notch: the past, the present, and the future. *Current topics in developmental biology*, 92, pp.1–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20816391> [Accessed September 16, 2016].
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D. & Lake, R.J., 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5415), pp.770–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10221902> [Accessed September 16, 2016].
- Asokanathan, N. et al., 2002. Activation of Protease-Activated Receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 Stimulates IL-6, IL-8, and Prostaglandin E2 Release from Human Respiratory Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*, 168(7), pp.3577–3585. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.168.7.3577> [Accessed August 25, 2016].
- Aubusson-Fleury, A., Cohen, J. & Lemullois, M., 2015. Ciliary heterogeneity within a single cell: the Paramecium model. *Methods in cell biology*, 127, pp.457–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25837404> [Accessed October 15, 2016].
- AUERBACH, O. et al., 1962. Changes in bronchial epithelium in relation to sex, age, residence, smoking and pneumonia. *The New England journal of medicine*, 267, pp.111–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13863213> [Accessed October 4, 2016].
- Auyeung, V.C. et al., 2013. Beyond Secondary Structure: Primary-Sequence Determinants License Pri-miRNA Hairpins for Processing. *Cell*, 152(4), pp.844–858.
- Azimzadeh, J. et al., 2016. Basal bodies across eukaryotes series: basal bodies in the freshwater planarian *Schmidtea mediterranea*. *Cilia*, 5(1), p.15. Available at: <http://www.ciliajournal.com/content/5/1/15> [Accessed October 15, 2016].
- Azimzadeh, J. et al., 2012. Centrosome loss in the evolution of planarians. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6067), pp.461–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22223737> [Accessed October 15, 2016].
- Azimzadeh, J. et al., 2009. hPOC5 is a centrin-binding protein required for assembly of full-length centrioles. *The Journal of cell biology*, 185(1), pp.101–14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2700515&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 26, 2016].

- Baas, D. et al., 2006. A deficiency in RFX3 causes hydrocephalus associated with abnormal differentiation of ependymal cells. *The European journal of neuroscience*, 24(4), pp.1020–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16930429> [Accessed December 4, 2014].
- Babiarz, J.E. et al., 2008. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes & development*, 22(20), pp.2773–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18923076> [Accessed August 4, 2016].
- Bachmann-Gagescu, R., 2014. [Genetic complexity of ciliopathies and novel genes identification]. *Médecine sciences : M/S*, 30(11), pp.1011–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25388584> [Accessed May 31, 2016].
- Bagheri, F. et al., 2016. Tumor-promoting function of single nucleotide polymorphism rs1836724 (C3388T) alters multiple potential legitimate microRNA binding sites at the 3'-untranslated region of ErbB4 in breast cancer. *Molecular medicine reports*, 13(5), pp.4494–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27035115> [Accessed August 16, 2016].
- Bals, R. et al., 1998. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), pp.9541–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9689116> [Accessed August 25, 2016].
- Bals, R., Weiner, D.J. & Wilson, J.M., 1999. The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *The Journal of clinical investigation*, 103(3), pp.303–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9927489> [Accessed August 23, 2016].
- Bao, J. et al., 2012. MicroRNA-449 and microRNA-34b/c function redundantly in murine testes by targeting E2F transcription factor-retinoblastoma protein (E2F-pRb) pathway. *The Journal of biological chemistry*, 287(26), pp.21686–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22570483> [Accessed October 8, 2016].
- Barbry, P. & Lazdunski, M., 1996. Structure and regulation of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel. *Ion channels*, 4, pp.115–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8744208> [Accessed August 21, 2016].
- Barkauskas, C.E. et al., 2013. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *The Journal of clinical investigation*, 123(7), pp.3025–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23921127> [Accessed September 1, 2016].
- Barlow, J.L. et al., 2013. IL-33 is more potent than IL-25 in provoking IL-13-producing nuocytes (type 2 innate lymphoid cells) and airway contraction. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(4), pp.933–941.
- Barlow, P.G. et al., 2010. The human cathelicidin LL-37 preferentially promotes apoptosis of infected airway epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 43(6), pp.692–702. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20097832> [Accessed August 25, 2016].
- Bartel, D.P., 2009. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136(2), pp.215–233.
- Basquin, C., Orfila, A.-M. & Azimzadeh, J., 2015. The planarian *Schmidtea mediterranea* as a model for studying motile cilia and multiciliated cells. *Methods in cell biology*, 127, pp.243–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25837395> [Accessed October 15, 2016].
- Basquin, J. et al., 2012. Architecture of the Nuclease Module of the Yeast Ccr4-Not Complex: the Not1-Caf1-Ccr4 Interaction. *Molecular Cell*, 48(2), pp.207–218.
- Basto, R. et al., 2006. Flies without centrioles. *Cell*, 125(7), pp.1375–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16814722> [Accessed October 3, 2016].
- Bawankar, P. et al., 2013. NOT10 and C2orf29/NOT11 form a conserved module of the CCR4-NOT complex that docks onto the NOT1 N-terminal domain. *RNA biology*, 10(2), pp.228–44. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23303381> [Accessed August 8, 2016].
- Bayless, B.A. et al., 2012. Bld10/Cep135 stabilizes basal bodies to resist cilia-generated forces. *Molecular biology of the cell*, 23(24), pp.4820–32. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3521689&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 18, 2016].
- Behm-Ansmant, I. et al., 2006. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & Development*, 20(14), pp.1885–1898. Available at: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1424106> [Accessed August 8, 2016].
- Behnia, R. & Munro, S., 2005. Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature*. Available at: <http://www.nature.com/nature/journal/v438/n7068/abs/nature04397.html> [Accessed September 16, 2016].
- Berezikov, E., 2011. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nature Publishing Group*, 12.
- Bernstein, E. et al., 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), pp.363–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11201747> [Accessed August 3, 2016].
- Bertero, T., Cottrill, K.A., Annis, S., et al., 2015. A YAP/TAZ-miR-130/301 molecular circuit exerts systems-level control of fibrosis in a network of human diseases and physiologic conditions. *Scientific reports*, 5, p.18277. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26667495> [Accessed October 14, 2016].
- Bertero, T., Cottrill, K.A., Lu, Y., et al., 2015. Matrix Remodeling Promotes Pulmonary Hypertension through Feedback Mechanoactivation of the YAP/TAZ-miR-130/301 Circuit. *Cell reports*, 13(5), pp.1016–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26565914> [Accessed October 14, 2016].
- Bertero, T., Cottrill, K., et al., 2015. The microRNA-130/301 family controls vasoconstriction in pulmonary hypertension. *The Journal of biological chemistry*, 290(4), pp.2069–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25505270> [Accessed October 14, 2016].
- Betleja, E. & Cole, D.G., 2010. Ciliary trafficking: CEP290 guards a gated community. *Current biology : CB*, 20(21), pp.R928–31. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982210012157> [Accessed April 26, 2016].
- Bhattacharyya, S.N. et al., 2006. Relief of microRNA-Mediated Translational Repression in Human Cells Subjected to Stress. *Cell*, 125(6), pp.1111–1124.
- Bhogaraju, S. et al., 2013. Molecular Basis of Tubulin Transport Within the Cilium by IFT74 and IFT81. *Science*, 341(6149).
- Bisceglia, M. et al., 2006. Renal cystic diseases: a review. *Advances in anatomic pathology*, 13(1), pp.26–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16462154> [Accessed October 3, 2016].
- Bisgrove, B.W. et al., 2012. RFX2 is essential in the ciliated organ of asymmetry and an RFX2 transgene identifies a population of ciliated cells sufficient for fluid flow. *Developmental biology*, 363(1), pp.166–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22233545> [Accessed September 14, 2016].
- Blatt, E.N. et al., 1999. Forkhead Transcription Factor HFH-4 Expression Is Temporally Related to Ciliogenesis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 21(2), pp.168–176. Available at: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/ajrcmb.21.2.3691> [Accessed September 14, 2016].
- Bloodgood, R.A., 1981. Flagella-dependent gliding motility in Chlamydomonas. *Protoplasma*, 106(3–4), pp.183–192. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/BF01275550> [Accessed May 4, 2016].
- Bobinnec, Y. et al., 1998. Centriole disassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. *The Journal of cell biology*, 143(6), pp.1575–89. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2132987&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

tract [Accessed April 22, 2016].

- Bockamp, E. et al., 2002. Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiological genomics*, 11(3), pp.115–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12464688> [Accessed October 5, 2016].
- Boele, J. et al., 2014. PAPD5-mediated 3' adenylation and subsequent degradation of miR-21 is disrupted in proliferative disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(31), pp.11467–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25049417> [Accessed August 12, 2016].
- Boers, J.E., Ambergen, A.W. & Thunnissen, F.B., 1998. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 157(6 Pt 1), pp.2000–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620938> [Accessed August 22, 2016].
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K. & Gorlich, D., 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA (New York, N.Y.)*, 10(2), pp.185–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14730017> [Accessed August 3, 2016].
- Boisvieux-Ulrich, E., Lainé, M.C. & Sandoz, D., 1990. Cytochalasin D inhibits basal body migration and ciliary elongation in quail oviduct epithelium. *Cell and tissue research*, 259(3), pp.443–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2317839> [Accessed September 12, 2016].
- Bommer, G.T. et al., 2007. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Current biology : CB*, 17(15), pp.1298–307. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17656095> [Accessed October 6, 2016].
- Bonnafe, E. et al., 2004. The Transcription Factor RFX3 Directs Nodal Cilium Development and Left-Right Asymmetry Specification. *Molecular and Cellular Biology*, 24(10), pp.4417–4427. Available at: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.24.10.4417-4427.2004> [Accessed September 14, 2016].
- Boon, M. et al., 2014. MCIDAS mutations result in a mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nature communications*, 5, p.4418. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25048963> [Accessed August 25, 2014].
- Bos, J., Rehmann, H. & Wittinghofer, A., 2007. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867407006551> [Accessed September 16, 2016].
- Bou Kheir, T. et al., 2011. miR-449 inhibits cell proliferation and is down-regulated in gastric cancer. *Molecular cancer*, 10, p.29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21418558> [Accessed October 6, 2016].
- Boucher, R.C., 2007. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. *Trends in molecular medicine*, 13(6), pp.231–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17524805> [Accessed August 24, 2016].
- Boucher, R.C., 2007. Evidence for airway surface dehydration as the initiating event in CF airway disease. *Journal of internal medicine*, 261(1), pp.5–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17222164> [Accessed August 24, 2016].
- Bourne, H., Sanders, D. & McCormick, F., 1990. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*. Available at: <http://www.pawelservers.com/rabs/files/0006.pdf> [Accessed September 16, 2016].
- Braun, J.E. et al., 2012. A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nature structural & molecular biology*, 19(12), pp.1324–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23142987> [Accessed August 8, 2016].
- Braun, J.E. et al., 2011. GW182 Proteins Directly Recruit Cytoplasmic Deadenylase Complexes to miRNA

- Targets. *Molecular Cell*, 44(1), pp.120–133.
- Bravo-Cordero, J.J. et al., 2013. Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(7), pp.405–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23778968> [Accessed October 12, 2016].
- Bray, S.J., 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(9), pp.678–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16921404> [Accessed September 16, 2016].
- Bray, S.J., 2016. Notch signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrm.2016.94> [Accessed September 16, 2016].
- Brechbuhl, H.M. et al., 2011. β -Catenin Dosage Is a Critical Determinant of Tracheal Basal Cell Fate Determination. *The American Journal of Pathology*, 179(1), pp.367–379.
- Breeze, R.G. & Wheeldon, E.B., 1977. The Cells of the Pulmonary Airways^{1,2}. *American Review of Respiratory Disease*, 116(4), pp.705–777. Available at: <http://www.atsjournals.org/doi/10.1164/arrd.1977.116.4.705> [Accessed August 21, 2016].
- Bretscher, A., Edwards, K. & Fehon, R.G., 2002. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(8), pp.586–99. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12154370> [Accessed September 12, 2016].
- Brody, S.L. et al., 2000. Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 23(1), pp.45–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10873152> [Accessed September 14, 2016].
- Brooks, E.R. & Wallingford, J.B., 2014. Multiciliated Cells. *Curr Biol*, 24(19), pp.R973–R982. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25291643>.
- Brown, N.J. et al., 2013. Cep63 and cep152 cooperate to ensure centriole duplication. *PLoS one*, 8(7), p.e69986. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23936128> [Accessed September 9, 2016].
- Burke, M.C. et al., 2014. Chibby promotes ciliary vesicle formation and basal body docking during airway cell differentiation. *The Journal of cell biology*, 207(1), pp.123–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25313408> [Accessed November 25, 2014].
- Burroughs, A.M. et al., 2010. A comprehensive survey of 3' animal miRNA modification events and a possible role for 3' adenylation in modulating miRNA targeting effectiveness. *Genome research*, 20(10), pp.1398–410. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2945189&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 1, 2015].
- Button, B. et al., 2012. A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6097), pp.937–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22923574> [Accessed December 4, 2014].
- Cao, M. et al., 2013. Activation loop phosphorylation of a protein kinase is a molecular marker of organelle size that dynamically reports flagellar length. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(30), pp.12337–42. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3725086&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 27, 2016].
- Carvalho-Santos, Z. et al., 2010. Stepwise evolution of the centriole-assembly pathway. *Journal of cell science*, 123(Pt 9), pp.1414–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20392737> [Accessed April 12, 2016].
- Chandradoss, S.D. et al., 2015. A Dynamic Search Process Underlies MicroRNA Targeting. *Cell*, 162(1), pp.96–107.

- Chang, J. et al., 2010. PLK2 phosphorylation is critical for CPAP function in procentriole formation during the centrosome cycle. *The EMBO journal*, 29(14), pp.2395–406. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2910268&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 20, 2016].
- Chang, T.-C. et al., 2007. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Molecular cell*, 26(5), pp.745–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17540599> [Accessed October 6, 2016].
- Cheloufi, S. et al., 2010. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, 465(7298), pp.584–589. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature09092> [Accessed August 4, 2016].
- Chen, F. et al., 2010. A retinoic acid-dependent network in the foregut controls formation of the mouse lung primordium. *The Journal of clinical investigation*, 120(6), pp.2040–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20484817> [Accessed September 2, 2016].
- Chen, J. et al., 1998. Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. *The Journal of clinical investigation*, 102(6), pp.1077–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9739041> [Accessed September 14, 2016].
- Chen, J.-H. et al., 2010. Loss of anion transport without increased sodium absorption characterizes newborn porcine cystic fibrosis airway epithelia. *Cell*, 143(6), pp.911–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21145458> [Accessed October 19, 2016].
- Chen, Y. et al., 2014. A DDX6-CNOT1 Complex and W-Binding Pockets in CNOT9 Reveal Direct Links between miRNA Target Recognition and Silencing. *Molecular Cell*, 54(5), pp.737–750.
- Cherfils, J. & Zeghouf, M., 2013. Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological Reviews*, 93(1).
- Chevalier, B. et al., 2015. miR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways. *Nature communications*, 6, p.8386. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26381333> [Accessed October 8, 2016].
- Chiang, H.R. et al., 2010. Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes & development*, 24(10), pp.992–1009. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20413612> [Accessed August 2, 2016].
- Chiba, Y. et al., 2009. Interleukin-13 augments bronchial smooth muscle contractility with an up-regulation of RhoA protein. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 40(2), pp.159–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18688040> [Accessed July 29, 2016].
- Chilosi, M. et al., 2002. Abnormal re-epithelialization and lung remodeling in idiopathic pulmonary fibrosis: the role of deltaN-p63. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 82(10), pp.1335–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12379768> [Accessed September 1, 2016].
- Choksi, S.P. et al., 2014. Switching on cilia: transcriptional networks regulating ciliogenesis. *Development*, 141(7), pp.1427–1441. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24644260>.
- Choksi, S.P. et al., 2014. Systematic discovery of novel ciliary genes through functional genomics in the zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, 141(17), pp.3410–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25139857> [Accessed September 14, 2016].
- Chong, M.M.W. et al., 2010. Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery. *Genes & Development*, 24(17), pp.1951–1960. Available at: <http://genesdev.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gad.1953310> [Accessed August 3, 2016].

- Christie, M. et al., 2013. Structure of the PAN3 Pseudokinase Reveals the Basis for Interactions with the PAN2 Deadenylase and the GW182 Proteins. *Molecular Cell*, 51(3), pp.360–373.
- Christodoulou, F. et al., 2010. Ancient animal microRNAs and the evolution of tissue identity. *Nature*, 463(7284), pp.1084–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20118916> [Accessed October 6, 2016].
- Chung, M.-I. et al., 2012. RFX2 is broadly required for ciliogenesis during vertebrate development. *Developmental biology*, 363(1), pp.155–65. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3640985&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 4, 2014].
- Chung, M.-I.I. et al., 2014. Coordinated genomic control of ciliogenesis and cell movement by RFX2. *Elife*, 3(0), p.e01439. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24424412> [Accessed December 4, 2014].
- Cibois, M. et al., 2015. BMP signalling controls the construction of vertebrate mucociliary epithelia. *Development*, 142(13), pp.2352–2363. Available at: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.118679>.
- Cizmecioglu, O. et al., 2010. Cep152 acts as a scaffold for recruitment of Plk4 and CPAP to the centrosome. *The Journal of cell biology*, 191(4), pp.731–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2983070&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 2, 2016].
- Clare, D.K. et al., 2014. Basal foot MTOC organizes pillar MTs required for coordination of beating cilia. *Nature communications*, 5, p.4888. Available at: <http://www.nature.com/gate1.inist.fr/ncomms/2014/140912/ncomms5888/full/ncomms5888.html> [Accessed April 25, 2016].
- Cloonan, N. et al., 2011. MicroRNAs and their isomiRs function cooperatively to target common biological pathways. *Genome biology*, 12(12), p.R126. Available at: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2011-12-12-r126> [Accessed October 1, 2014].
- Cole, B.B. et al., 2010. Tracheal Basal cells: a facultative progenitor cell pool. *The American journal of pathology*, 177(1), pp.362–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20522644> [Accessed September 1, 2016].
- Cole, D.G. et al., 1998. Chlamydomonas kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons. *The Journal of cell biology*, 141(4), pp.993–1008. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2132775&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 27, 2016].
- Comartin, D. et al., 2013. CEP120 and SPICE1 cooperate with CPAP in centriole elongation. *Current biology : CB*, 23(14), pp.1360–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23810536> [Accessed April 20, 2016].
- Comazzetto, S. et al., 2014. Oligoasthenoteratozoospermia and infertility in mice deficient for miR-34b/c and miR-449 loci. *PLoS genetics*, 10(10), p.e1004597. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25329700> [Accessed October 6, 2016].
- Conklin, M.W. et al., 2010. R-Ras regulates beta1-integrin trafficking via effects on membrane ruffling and endocytosis. *BMC cell biology*, 11, p.14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20167113> [Accessed October 14, 2016].
- Cooke, A., Prigge, A. & Wickens, M., 2010. Translational repression by deadenylases. *The Journal of biological chemistry*, 285(37), pp.28506–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20634287> [Accessed August 8, 2016].

- Coraux, C. et al., 2005. Réparation et régénération de l'épithélium respiratoire. *médecine/sciences*, 21(12), pp.1063–1069. Available at: <http://www.medecinesciences.org/10.1051/medsci/200521121063> [Accessed August 23, 2016].
- Corbit, K.C. et al., 2005. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature*, 437(7061), pp.1018–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16136078> [Accessed March 17, 2016].
- Cox, A. & Der, C., 2010. Ras history: The saga continues. *Small GTPases*. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/sgtp.1.1.12178> [Accessed September 16, 2016].
- Craige, B. et al., 2010. CEP290 tethers flagellar transition zone microtubules to the membrane and regulates flagellar protein content. *The Journal of Cell Biology*, 190(5), pp.927–940.
- Cruz, C. et al., 2010. Foxj1 regulates floor plate cilia architecture and modifies the response of cells to sonic hedgehog signalling. *Development (Cambridge, England)*, 137(24), pp.4271–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21098568> [Accessed September 14, 2016].
- Cui, Y.-H., Wang, Y.-Y. & Liu, Z., Transdifferentiation of Clara cell 10-kDa protein secreting cells in experimental allergic rhinitis. *American journal of rhinology & allergy*, 25(3), pp.145–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21294974> [Accessed August 22, 2016].
- Cutz, E. & Conen, P.E., 1971. Ultrastructure and cytochemistry of Clara cells. *The American journal of pathology*, 62(1), pp.127–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4099035> [Accessed August 21, 2016].
- D'Souza-Schorey, C. & Chavrier, P., 2006. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*. Available at: <http://www.nature.com/nrm/journal/v7/n5/abs/nrm1910.html> [Accessed September 16, 2016].
- Damkier, H.H., Brown, P.D. & Praetorius, J., 2013. Cerebrospinal fluid secretion by the choroid plexus. *Physiological reviews*, 93(4), pp.1847–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24137023> [Accessed July 26, 2016].
- Dammermann, A. & Merdes, A., 2002. Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *The Journal of cell biology*, 159(2), pp.255–66. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2173044&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 22, 2016].
- Danahay, H. et al., 2015. Notch2 Is Required for Inflammatory Cytokine-Driven Goblet Cell Metaplasia in the Lung. *Cell Reports*, 10(2), pp.239–252.
- Danielian, P.S. et al., 2007. E2f4 is required for normal development of the airway epithelium. *Developmental biology*, 305(2), pp.564–76. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1939821&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 16, 2015].
- Danielian, P.S., Hess, R.A. & Lees, J.A., 2016. E2f4 and E2f5 are essential for the development of the male reproductive system. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 15(2), pp.250–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26825228> [Accessed May 4, 2016].
- Daniely, Y. et al., 2004. Critical role of p63 in the development of a normal esophageal and tracheobronchial epithelium. *American journal of physiology. Cell physiology*, 287(1), pp.C171–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15189821> [Accessed August 22, 2016].
- David, H., 1990. [The concept of “organellopathies”--component of modern cellular pathology]. *Zentralblatt für allgemeine Pathologie u. pathologische Anatomie*, 136(1–2), pp.15–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2183527> [Accessed May 10, 2016].
- Davis, P.B., Drumm, M. & Konstan, M.W., 1996. Cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 154(5), pp.1229–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8912731> [Accessed

October 19, 2016].

- Dawe, H.R. et al., 2009. Nesprin-2 interacts with meckelin and mediates ciliogenesis via remodelling of the actin cytoskeleton. *Journal of cell science*, 122(Pt 15), pp.2716–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19596800> [Accessed September 13, 2016].
- Debec, A., Sullivan, W. & Bettencourt-Dias, M., 2010. Centrioles: active players or passengers during mitosis? *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(13), pp.2173–94. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2883084&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 9, 2016].
- Deblandre, G.A. et al., 1999. A two-step mechanism generates the spacing pattern of the ciliated cells in the skin of *Xenopus* embryos. *Development (Cambridge, England)*, 126(21), pp.4715–28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10518489> [Accessed December 4, 2014].
- Delgehyr, N. et al., 2015. Ependymal cell differentiation, from monociliated to multiciliated cells. *Methods in cell biology*, 127, pp.19–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25837384> [Accessed September 15, 2016].
- Denli, A.M. et al., 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), pp.231–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15531879> [Accessed August 2, 2016].
- Desai, T.J., Brownfield, D.G. & Krasnow, M.A., 2014. Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer. *Nature*, 507(7491), pp.190–194. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12930> [Accessed September 1, 2016].
- Dickey, B.F., 2012. Biochemistry. Walking on solid ground. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6097), pp.924–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22923570> [Accessed October 17, 2016].
- Didon, L. et al., 2013. RFX3 modulation of FOXJ1 regulation of cilia genes in the human airway epithelium. *Respiratory research*, 14, p.70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3710277&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 4, 2014].
- Doench, J.G. & Sharp, P.A., 2004. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & Development*, 18(5), pp.504–511. Available at: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1184404> [Accessed August 5, 2016].
- Doi, Y. et al., 1999. Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout. *The Journal of biological chemistry*, 274(4), pp.2315–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9890997> [Accessed October 18, 2016].
- Dubaissi, E. & Papalopulu, N., 2011. Embryonic frog epidermis: a model for the study of cell-cell interactions in the development of mucociliary disease. *Disease models & mechanisms*, 4(2), pp.179–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21183475> [Accessed September 15, 2016].
- Dubruille, R. et al., 2002. Drosophila regulatory factor X is necessary for ciliated sensory neuron differentiation. *Development (Cambridge, England)*, 129(23), pp.5487–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12403718> [Accessed September 14, 2016].
- Dye, B.R. et al., 2015. In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *eLife*, 4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25803487> [Accessed September 15, 2016].
- Dzhindzhev, N.S. et al., 2014. Plk4 phosphorylates Ana2 to trigger Sas6 recruitment and procentriole formation. *Current biology : CB*, 24(21), pp.2526–32. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982214010744> [Accessed April 18, 2016].
- Ehre, C., Ridley, C. & Thornton, D.J., 2014. Cystic fibrosis: an inherited disease affecting mucin-producing organs. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 52, pp.136–45. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24685676> [Accessed October 19, 2016].
- Eisen, J.S. & Smith, J.C., 2008. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development*, 135(10), pp.435–443.
- Elgeti, J. & Gompper, G., 2013. Emergence of metachronal waves in cilia arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(12), pp.4470–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23487771> [Accessed August 24, 2016].
- Elkayam, E. et al., 2012. The Structure of Human Argonaute-2 in Complex with miR-20a. *Cell*, 150(1), pp.100–110.
- Engel, B.D., Ludington, W.B. & Marshall, W.F., 2009. Intraflagellar transport particle size scales inversely with flagellar length: revisiting the balance-point length control model. *The Journal of cell biology*, 187(1), pp.81–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2762100&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 27, 2016].
- Epting, D. et al., 2015. The Rac1 regulator ELMO controls basal body migration and docking in multiciliated cells through interaction with Ezrin. *Development (Cambridge, England)*, 142(1), pp.174–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25516973> [Accessed December 18, 2014].
- Esquela-Kerscher, A. et al., 2008. The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(6), pp.759–64. Available at: m [Accessed October 10, 2016].
- Eulalio, A., Helms, S., et al., 2009. A C-terminal silencing domain in GW182 is essential for miRNA function. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(6), pp.1067–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19383769> [Accessed August 8, 2016].
- Eulalio, A., Huntzinger, E. & Izaurralde, E., 2008. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nature structural & molecular biology*, 15(4), pp.346–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18345015> [Accessed August 8, 2016].
- Eulalio, A., Tirschler, F. & Izaurralde, E., 2009. The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(8), pp.1433–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19535464> [Accessed August 8, 2016].
- Evans, C.M. et al., 2004. Mucin is produced by clara cells in the proximal airways of antigen-challenged mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 31(4), pp.382–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15191915> [Accessed August 22, 2016].
- Evans, M.J. et al., 1989. The role of basal cells in attachment of columnar cells to the basal lamina of the trachea. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 1(6), pp.463–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2637758> [Accessed August 22, 2016].
- Evans, M.J., Cabral-Anderson, L.J. & Freeman, G., 1978. Role of the Clara cell in renewal of the bronchiolar epithelium. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 38(6), pp.648–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/661220> [Accessed August 22, 2016].
- Evans, M.J. & Plopper, C.G., 1988. The role of basal cells in adhesion of columnar epithelium to airway basement membrane. *The American review of respiratory disease*, 138(2), pp.481–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3143289> [Accessed August 22, 2016].
- Fabian, M.R. et al., 2009. Mammalian miRNA RISC Recruits CAF1 and PABP to Affect PABP-Dependent Deadenylation. *Molecular Cell*, 35(6), pp.868–880.
- Fabian, M.R. & Sonenberg, N., 2012. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature structural & molecular biology*, 19(6), pp.586–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664986> [Accessed August 8, 2016].

- Falk, M.M., 2000. Connexin-specific distribution within gap junctions revealed in living cells. *Journal of cell science*, pp.4109–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11058097> [Accessed August 25, 2016].
- Fanning, A.S. et al., 1998. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry*, 273(45), pp.29745–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792688> [Accessed August 25, 2016].
- Farnaud, S. & Evans, R.W., 2003. Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*, 40(7), pp.395–405.
- FARQUHAR, M.G. & PALADE, G.E., 1963. Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of cell biology*, 17, pp.375–412. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13944428> [Accessed August 25, 2016].
- Fededa, J.P. et al., 2016. MicroRNA-34/449 controls mitotic spindle orientation during mammalian cortex development. *The EMBO journal*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27707753> [Accessed October 15, 2016].
- Feng, X.-H. & Derynck, R., 2005. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annual review of cell and developmental biology*, 21, pp.659–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212511> [Accessed September 16, 2016].
- Firth, A.L. et al., 2014. *Generation of multiciliated cells in functional airway epithelia from human induced pluripotent stem cells.*, Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4035971&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 6, 2015].
- Fort, C. et al., 2016. Intraflagellar transport is required for the maintenance of the trypanosome flagellum composition but not its length. *Journal of cell science*, 129(15), pp.3026–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27343245> [Accessed October 15, 2016].
- Fort, C. & Bastin, P., 2014. [Elongation of the axoneme and dynamics of intraflagellar transport]. *Médecine sciences : M/S*, 30(11), pp.955–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25388576> [Accessed April 27, 2016].
- Forteza, R.M. et al., 2012. Hyaluronan and layilin mediate loss of airway epithelial barrier function induced by cigarette smoke by decreasing E-cadherin. *The Journal of biological chemistry*, 287(50), pp.42288–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23048036> [Accessed October 10, 2016].
- Fortunato, O. et al., 2014. Therapeutic use of microRNAs in lung cancer. *BioMed research international*, 2014, p.756975. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25309923> [Accessed October 11, 2016].
- Frank, F., Sonenberg, N. & Nagar, B., 2010. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature*, 465(7299), pp.818–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20505670> [Accessed August 3, 2016].
- Friedländer, M. & Wahrman, J., 1970. The spindle as a basal body distributor. A study in the meiosis of the male silkworm moth, *Bombyx mori*. *Journal of cell science*, 7(1), pp.65–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5529252> [Accessed April 18, 2016].
- Fukunaga, R. et al., 2012. Dicer Partner Proteins Tune the Length of Mature miRNAs in Flies and Mammals. *Cell*, 151(3), pp.533–546.
- Funk, M.C. et al., 2015a. Cyclin O (Ccno) functions during deuterosome- mediated centriole amplification of multiciliated cells. , pp.1–12.
- Funk, M.C. et al., 2015b. Cyclin O (Ccno) functions during deuterosome-mediated centriole amplification of multiciliated cells. *The EMBO journal*, 34(8), pp.1078–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25712475> [Accessed September 12, 2016].

- Gandhi, V.D. & Vliagoftis, H., 2015. Airway Epithelium Interactions with Aeroallergens: Role of Secreted Cytokines and Chemokines in Innate Immunity. *Frontiers in Immunology*, 6, p.147. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2015.00147/abstract> [Accessed August 25, 2016].
- Gao, X. et al., 2013. Evidence for multiple roles for grainyhead-like 2 in the establishment and maintenance of human mucociliary airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(23), pp.9356–9361. Available at: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1307589110> [Accessed September 6, 2016].
- Gao, X. et al., 2015. GRHL2 coordinates regeneration of a polarized mucociliary epithelium from basal stem cells. *The Journal of Cell Biology*, 211(3), pp.669–682. Available at: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201506014> [Accessed September 6, 2016].
- Garcia-Gonzalo, F.R. et al., 2011. A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nature Genetics*, 43(8), pp.776–784. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ng.891> [Accessed July 27, 2016].
- García-Verdugo, J.M. et al., 2002. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain research bulletin*, 57(6), pp.765–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12031273> [Accessed May 4, 2016].
- Gawecka, J.E. et al., 2010. R-Ras regulates migration through an interaction with filamin A in melanoma cells. *PLoS one*, 5(6), p.e11269. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20585650> [Accessed October 14, 2016].
- Gegg, M. et al., 2014. Flattop regulates basal body docking and positioning in mono- and multiciliated cells by Research Unit Analytical Pathology , Helmholtz Zentrum München , 85764 Correspondence and requests for materials should be addressed to H . L . Heiko Lickert , Helmholtz. *Elife*.
- Gerovac, B.J. & Fregien, N.L., 2016. IL-13 Inhibits Multicilin Expression and Ciliogenesis via Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Independently of Notch Cleavage. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 54(4), pp.554–561. Available at: <http://www.atsjournals.org/doi/10.1165/rcmb.2015-0227OC> [Accessed September 7, 2016].
- Gerson, C. et al., 2000. The lactoperoxidase system functions in bacterial clearance of airways. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 22(6), pp.665–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837362> [Accessed August 25, 2016].
- Ghosh, M. et al., 2011. Context-dependent differentiation of multipotential keratin 14-expressing tracheal basal cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 45(2), pp.403–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21131447> [Accessed September 1, 2016].
- Giepmans, B.N.G. & van IJzendoorn, S.C.D., 2009. Epithelial cell–cell junctions and plasma membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(4), pp.820–831.
- Gilula, N.B. & Satir, P., 1972. The ciliary necklace. A ciliary membrane specialization. *The Journal of cell biology*, 53(2), pp.494–509. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2108734&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 26, 2016].
- Goldman, M.J. et al., 1997. Human β -Defensin-1 Is a Salt-Sensitive Antibiotic in Lung That Is Inactivated in Cystic Fibrosis. *Cell*, 88(4), pp.553–560.
- Gómez, M.I. & Prince, A., 2008. Airway epithelial cell signaling in response to bacterial pathogens. *Pediatric pulmonology*, 43(1), pp.11–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18041080> [Accessed August 25, 2016].
- Gomperts, B.N., Gong-Cooper, X. & Hackett, B.P., 2004. Foxj1 regulates basal body anchoring to the cytoskeleton of ciliated pulmonary epithelial cells. *Journal of cell science*, 117(Pt 8), pp.1329–37. Available

- at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14996907> [Accessed December 5, 2014].
- Goodenough, D.A., Goliger, J.A. & Paul, D.L., 1996. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annual review of biochemistry*, 65, pp.475–502. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8811187> [Accessed August 25, 2016].
- Graser, S. et al., 2007. Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation. *The Journal of cell biology*, 179(2), pp.321–30. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2064767&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 10, 2016].
- Greenwood, M.F. & Holland, P., 1972. The mammalian respiratory tract surface. A scanning electron microscopic study. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 27(3), pp.296–304. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5057534> [Accessed August 21, 2016].
- Gregory, R.I. et al., 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432(7014), pp.235–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15531877> [Accessed August 2, 2016].
- Griffiths, G.S. et al., 2011. R-Ras interacts with filamin a to maintain endothelial barrier function. *Journal of cellular physiology*, 226(9), pp.2287–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21660952> [Accessed October 14, 2016].
- Griffiths-Jones, S. et al., 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 34(90001), pp.D140–D144. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkj112> [Accessed August 2, 2016].
- Grimson, A. et al., 2007. MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Molecular Cell*, 27(1), pp.91–105.
- Gruenert, D.C., Finkbeiner, W.E. & Widdicombe, J.H., 1995. Culture and transformation of human airway epithelial cells. *The American journal of physiology*, 268(3 Pt 1), pp.L347-60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7900815> [Accessed October 5, 2016].
- Grünig, G. et al., 1998. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5397), pp.2261–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9856950> [Accessed September 6, 2016].
- Gu, H., Zou, Y.R. & Rajewsky, K., 1993. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell*, 73(6), pp.1155–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8513499> [Accessed October 5, 2016].
- Gu, S. et al., 2012. The Loop Position of shRNAs and Pre-miRNAs Is Critical for the Accuracy of Dicer Processing In Vivo. *Cell*, 151(4), pp.900–911.
- Gueron, S. et al., 1997. Cilia internal mechanism and metachronal coordination as the result of hydrodynamical coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), pp.6001–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9177158> [Accessed August 24, 2016].
- Gumbiner, B.M., 1993. Breaking through the tight junction barrier. *The Journal of cell biology*, 123(6 Pt 2), pp.1631–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8276885> [Accessed August 25, 2016].
- Guo, H. et al., 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466(7308), pp.835–840. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature09267> [Accessed August 8, 2016].
- Guo, Y. et al., 2015. Characterization of the mammalian miRNA turnover landscape. *Nucleic Acids Research*, 43(4), pp.2326–2341. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkv057> [Accessed August 16, 2016].
- Guseh, J.S. et al., 2009. Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development.

- Development (Cambridge, England)*, 136(10), pp.1751–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19369400> [Accessed September 5, 2016].
- Gwizdek, C. et al., 2003. Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. *The Journal of biological chemistry*, 278(8), pp.5505–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12509441> [Accessed August 3, 2016].
- Ha, M. & Kim, V.N., 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(8), pp.509–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25027649> [Accessed October 17, 2016].
- Habedanck, R. et al., 2005. The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nature cell biology*, 7(11), pp.1140–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16244668> [Accessed April 18, 2016].
- Hajj, R. et al., 2007. Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transit-amplifying cell properties. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 25(1), pp.139–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008423> [Accessed August 22, 2016].
- Hajj, R. et al., 2007. Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. *The Journal of pathology*, 211(3), pp.340–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17186573> [Accessed October 19, 2016].
- Halbert, S.A., Tam, P.Y. & Blandau, R.J., 1976. Egg transport in the rabbit oviduct: the roles of cilia and muscle. *Science (New York, N.Y.)*, 191(4231), pp.1052–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1251215> [Accessed May 4, 2016].
- Hamada, H. et al., 2002. ESTABLISHMENT OF VERTEBRATE LEFT–RIGHT ASYMMETRY. *Nature Reviews Genetics*, 3(2), pp.103–113. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg732> [Accessed July 26, 2016].
- Hammell, C.M. et al., 2009. nhl-2 Modulates MicroRNA Activity in *Caenorhabditis elegans*. *Cell*, 136(5), pp.926–938.
- Hammond, S.M. et al., 2001. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5532), pp.1146–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498593> [Accessed August 3, 2016].
- Han, B.W. et al., 2011. The 3′-to-5′ Exoribonuclease Nibbler Shapes the 3′ Ends of MicroRNAs Bound to *Drosophila* Argonaute1. *Current Biology*, 21(22), pp.1878–1887.
- Han, J. et al., 2006. Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell*, 125(5), pp.887–901.
- Hansell, M.M. & Moretti, R.L., 1969. Ultrastructure of the mouse tracheal epithelium. *Journal of morphology*, 128(2), pp.159–69. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5793184> [Accessed August 21, 2016].
- Hansen, A. & Zeiske, E., 1993. Development of the olfactory organ in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *The Journal of comparative neurology*, 333(2), pp.289–300. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8345108> [Accessed September 15, 2016].
- Hatch, E.M. et al., 2010. Cep152 interacts with Plk4 and is required for centriole duplication. *The Journal of cell biology*, 191(4), pp.721–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21059850> [Accessed September 9, 2016].
- Hattrup, C.L. & Gendler, S.J., 2008. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annual review of physiology*, 70, pp.431–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17850209> [Accessed August 23, 2016].
- Haycraft, C.J. et al., 2005. Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS genetics*, 1(4), p.e53. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1270009&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 13, 2016].
- Hayes, J.M. et al., 2007. Identification of novel ciliogenesis factors using a new in vivo model for mucociliary epithelial development. *Developmental Biology*, 312(1), pp.115–130.
- Haynes, J. et al., 2011. Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. *Molecular biology of the cell*, 22(24), pp.4750–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22031288> [Accessed October 18, 2016].
- Heo, I. et al., 2008. *Lin28 Mediates the Terminal Uridylation of let-7 Precursor MicroRNA*,
- Heo, I. et al., 2012. Mono-Uridylation of Pre-MicroRNA as a Key Step in the Biogenesis of Group II let-7 MicroRNAs. *Cell*, 151(3), pp.521–532.
- Heo, I. et al., 2009. TUT4 in Concert with Lin28 Suppresses MicroRNA Biogenesis through Pre-MicroRNA Uridylation. *Cell*, 138(4), pp.696–708.
- Herawati, E. et al., 2016. Multiciliated cell basal bodies align in stereotypical patterns coordinated by the apical cytoskeleton. *The Journal of Cell Biology*, 214(5), pp.571–586. Available at: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201601023> [Accessed September 14, 2016].
- Hessel, J. et al., 2014. Intraflagellar transport gene expression associated with short cilia in smoking and COPD. *PloS one*, 9(1), p.e85453. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24465567> [Accessed October 4, 2016].
- Hiemstra, P.S. et al., 1996. Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infection and immunity*, 64(11), pp.4520–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8890201> [Accessed August 25, 2016].
- Hild, M. & Jaffe, A.B., 2016. Production of 3-D Airway Organoids From Primary Human Airway Basal Cells and Their Use in High-Throughput Screening. *Current protocols in stem cell biology*, 37, p.IE.9.1-IE.9.15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27171795> [Accessed September 15, 2016].
- Hiraki, M. et al., 2007. Bld10p constitutes the cartwheel-spoke tip and stabilizes the 9-fold symmetry of the centriole. *Current biology : CB*, 17(20), pp.1778–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17900905> [Accessed April 18, 2016].
- Hirokawa, N. et al., 2006. Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell*, 125(1), pp.33–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16615888> [Accessed April 18, 2016].
- Hodges, M.E. et al., 2010. Reconstructing the evolutionary history of the centriole from protein components. *Journal of cell science*, 123(Pt 9), pp.1407–13. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2858018&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 12, 2016].
- Hogan, B.L.M. et al., 2014. Repair and Regeneration of the Respiratory System: Complexity, Plasticity, and Mechanisms of Lung Stem Cell Function. *Cell Stem Cell*, 15(2), pp.123–138.
- Hong, K.U. et al., 2004a. Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *The American journal of pathology*, 164(2), pp.577–88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14742263> [Accessed August 22, 2016].
- Hong, K.U. et al., 2001. Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 24(6), pp.671–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11415931> [Accessed August 22, 2016].
- Hong, K.U. et al., 2004b. In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 286(4), pp.L643-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871857> [Accessed August 22,

2016].

- Hu, Q. et al., 2010. A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5990), pp.436–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3092790&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 14, 2016].
- Huang, S.X.L. et al., 2014. Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*, 32(1), pp.84–91. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4101921&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 11, 2014].
- Huang, T. et al., 2003a. Foxj1 is required for apical localization of ezrin in airway epithelial cells. *Journal of cell science*, 116(Pt 24), pp.4935–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14625387> [Accessed December 12, 2014].
- Huang, T. et al., 2003b. Foxj1 is required for apical localization of ezrin in airway epithelial cells. *Journal of cell science*, 116(Pt 24), pp.4935–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14625387> [Accessed September 13, 2016].
- Huangfu, D. et al., 2003. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature*, 426(6962), pp.83–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14603322> [Accessed April 13, 2016].
- Huminięcki, L. et al., 2009. Emergence, development and diversification of the TGF-beta signalling pathway within the animal kingdom. *BMC evolutionary biology*, 9, p.28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19192293> [Accessed September 16, 2016].
- Hung, C.-H. et al., 2004. Regulation of TH2 responses by the pulmonary Clara cell secretory 10-kd protein. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 114(3), pp.664–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15356574> [Accessed August 21, 2016].
- Huntzinger, E. et al., 2013. The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets. *Nucleic acids research*, 41(2), pp.978–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23172285> [Accessed August 8, 2016].
- Huntzinger, E. et al., 2010. Two PABPC1-binding sites in GW182 proteins promote miRNA-mediated gene silencing. *The EMBO journal*, 29(24), pp.4146–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21063388> [Accessed August 8, 2016].
- Huntzinger, E. & Izaurralde, E., 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature reviews. Genetics*, 12(2), pp.99–110. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21245828> [Accessed August 8, 2016].
- Hutagalung, A. & Novick, P., 2011. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological reviews*. Available at: <http://physrev.physiology.org/content/91/1/119.short> [Accessed September 16, 2016].
- Hutvágner, G. et al., 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5531), pp.834–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11452083> [Accessed August 3, 2016].
- Inglis, P.N., Boroevich, K.A. & Leroux, M.R., 2006. Piecing together a ciliome. *Trends in genetics : TIG*, 22(9), pp.491–500. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16860433> [Accessed May 9, 2016].
- Ioannou, A., Santama, N. & Skourides, P.A., 2013. *Xenopus laevis* nucleotide binding protein 1 (xNubp1) is important for convergent extension movements and controls ciliogenesis via regulation of the actin cytoskeleton. *Developmental Biology*, 380(2), pp.243–258.
- Ishikawa, H. et al., 2005. Odf2-deficient mother centrioles lack distal/subdistal appendages and the ability to

- generate primary cilia. *Nature cell biology*, 7(5), pp.517–24. Available at: <http://www.nature.com.gate1.inist.fr/ncb/journal/v7/n5/full/ncb1251.html> [Accessed April 22, 2016].
- Iwasaki, S. et al., 2010. *Hsc70/Hsp90 Chaperone Machinery Mediates ATP-Dependent RISC Loading of Small RNA Duplexes*,
- James, A.L. & Wenzel, S., 2007. Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases. *The European respiratory journal*, 30(1), pp.134–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17601971> [Accessed August 1, 2016].
- Jeon, H.S. et al., 2012. Combining microRNA-449a/b with a HDAC inhibitor has a synergistic effect on growth arrest in lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 76(2), pp.171–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22078727> [Accessed October 6, 2016].
- Jeong, H.-W., Nam, J.-O. & Kim, I.-S., 2005. The COOH-terminal End of R-Ras Alters the Motility and Morphology of Breast Epithelial Cells through Rho/Rho-Kinase. *Cancer Research*, 65(2).
- Jonas, S. et al., 2014. An asymmetric PAN3 dimer recruits a single PAN2 exonuclease to mediate mRNA deadenylation and decay. *Nature structural & molecular biology*, 21(7), pp.599–608. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24880343> [Accessed August 8, 2016].
- Jones, M.R. et al., 2009. Zcchc11-dependent uridylation of microRNA directs cytokine expression. *Nature cell biology*, 11(9), pp.1157–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19701194> [Accessed August 16, 2016].
- Jord, A. Al et al., 2014. Centriole amplification by mother and daughter centrioles differs in multiciliated cells. *Nature*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25307055> [Accessed October 13, 2014].
- Kahlem, P. & Newfeld, S.J., 2009. Informatics approaches to understanding TGFbeta pathway regulation. *Development (Cambridge, England)*, 136(22), pp.3729–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19855015> [Accessed September 16, 2016].
- Kamenska, A. et al., 2016. The DDX6-4E-T interaction mediates translational repression and P-body assembly. *Nucleic acids research*, 44(13), pp.6318–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27342281> [Accessed August 8, 2016].
- Katoh, T. et al., 2009. Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes & development*, 23(4), pp.433–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19240131> [Accessed August 16, 2016].
- Katoh, T., Hojo, H. & Suzuki, T., 2015. Destabilization of microRNAs in human cells by 3' deadenylation mediated by PARN and CUGBP1. *Nucleic acids research*, 43(15), pp.7521–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26130707> [Accessed August 16, 2016].
- Kawamata, T., Seitz, H. & Tomari, Y., 2009. Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(9), pp.953–960. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nsmb.1630> [Accessed August 4, 2016].
- Kawamata, T. & Tomari, Y., 2010. Making RISC. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(7), pp.368–376.
- Keller, L.C. et al., 2009. Molecular architecture of the centriole proteome: the conserved WD40 domain protein POC1 is required for centriole duplication and length control. *Molecular biology of the cell*, 20(4), pp.1150–66. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2642750&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 12, 2016].
- Kerem, B. et al., 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science (New York, N.Y.)*, 245(4922), pp.1073–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2570460> [Accessed October 19, 2016].

- Kesimer, M. et al., 2013. Molecular organization of the mucins and glycocalyx underlying mucus transport over mucosal surfaces of the airways. *Mucosal immunology*, 6(2), pp.379–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22929560> [Accessed August 23, 2016].
- Khvorova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S.D., 2003. Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell*, 115(2), pp.209–216.
- Kilburn, C.L. et al., 2007. New *Tetrahymena* basal body protein components identify basal body domain structure. *The Journal of Cell Biology*, 178(6), pp.905–912. Available at: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.200703109> [Accessed October 15, 2016].
- Kim, T.-S. et al., 2013. Hierarchical recruitment of Plk4 and regulation of centriole biogenesis by two centrosomal scaffolds, Cep192 and Cep152. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(50), pp.E4849-57. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3864335&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 18, 2016].
- Kim, Y.-K., Kim, B. & Kim, V.N., 2016. Re-evaluation of the roles of DROSHA, Export in 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(13), pp.E1881-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26976605> [Accessed August 3, 2016].
- Kitagawa, M., 2016. Notch signalling in the nucleus: roles of Mastermind-like (MAML) transcriptional coactivators. *Journal of biochemistry*, 159(3), pp.287–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26711237> [Accessed September 16, 2016].
- Klos Dehring, D.A. et al., 2013. *Deuterosome-Mediated Centriole Biogenesis*,
- Kobayashi, T. et al., 2011. Centriolar kinesin Kif24 interacts with CP110 to remodel microtubules and regulate ciliogenesis. *Cell*, 145(6), pp.914–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21620453> [Accessed March 8, 2016].
- Kohl, L., Robinson, D. & Bastin, P., 2003. Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *The EMBO journal*, 22(20), pp.5336–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14532107> [Accessed October 15, 2016].
- Kollman, J.M. et al., 2011. Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(11), pp.709–721. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm3209> [Accessed October 13, 2016].
- Konstan, M.W., Cheng, P.W. & Boat, T.F., 1982. A comparative study of lysozyme and its secretion by tracheal epithelium. *Experimental lung research*, 3(2), pp.175–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7106064> [Accessed August 25, 2016].
- Kopan, R. & Ilagan, M.X.G., 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, 137(2), pp.216–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19379690> [Accessed September 16, 2016].
- Kozminski, K.G. et al., 1993. A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(12), pp.5519–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=46752&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 27, 2016].
- Kramer-Zucker, A.G. et al., 2005. Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 132(8), pp.1907–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15790966> [Accessed September 15, 2016].
- Kretschmar, M. & Massagué, J., 1998. SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. *Current opinion in genetics & development*, 8(1), pp.103–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529613> [Accessed September 16, 2016].

- Kudo, M. et al., 2012. IL-17A produced by $\alpha\beta$ T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. *Nature medicine*, 18(4), pp.547–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22388091> [Accessed July 29, 2016].
- Kunimoto, K. et al., 2012. Coordinated ciliary beating requires Odf2-mediated polarization of basal bodies via basal feet. *Cell*, 148(1–2), pp.189–200. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22265411> [Accessed April 25, 2016].
- Kuperman, D.A. et al., 2002. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nature medicine*, 8(8), pp.885–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12091879> [Accessed September 6, 2016].
- Kyrousi, C. et al., 2015. Mcidas and GemC1 are key regulators for the generation of multiciliated ependymal cells in the adult neurogenic niche. *Development (Cambridge, England)*, 142(21), pp.3661–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26395491> [Accessed September 7, 2016].
- Lafkas, D. et al., 2015. Therapeutic antibodies reveal Notch control of transdifferentiation in the adult lung. *Nature*, 528(7580), p.127. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature15715> [Accessed August 21, 2016].
- Lai, E.C., 2002. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nature Genetics*, 30(4), pp.363–364. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ng865> [Accessed August 5, 2016].
- Lai, E.C., 2004. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development (Cambridge, England)*, 131(5), pp.965–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14973298> [Accessed September 16, 2016].
- Lamblin, G. et al., 1992. Human respiratory mucins. *The European respiratory journal*, 5(2), pp.247–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1559590> [Accessed August 23, 2016].
- Laoukili, J. et al., 2001. IL-13 alters mucociliary differentiation and ciliary beating of human respiratory epithelial cells. *The Journal of clinical investigation*, 108(12), pp.1817–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11748265> [Accessed September 6, 2016].
- Lawo, S. et al., 2012. Subdiffraction imaging of centrosomes reveals higher-order organizational features of pericentriolar material. *Nature cell biology*, 14(11), pp.1148–58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23086237> [Accessed September 9, 2016].
- Lee, H.Y. & Doudna, J.A., 2012. TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro. *RNA (New York, N.Y.)*, 18(11), pp.2012–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23006623> [Accessed August 3, 2016].
- Lee, I. et al., 2009. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome research*, 19(7), pp.1175–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19336450> [Accessed August 6, 2016].
- Lee, L.W.I.K.W.E.E. et al., 2010. Complexity of the microRNA repertoire revealed by next-generation sequencing. *RNA (New York, N.Y.)*, 16(2010), pp.2170–2180. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876832> [Accessed September 11, 2014].
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. & Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), pp.843–854.
- Lee, Y. et al., 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*, 21(17), pp.4663–4670. Available at: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/cdf476> [Accessed August 2, 2016].
- Lee, Y. et al., 2003. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), pp.415–419. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature01957> [Accessed August 2, 2016].

- Lee, Y. et al., 2006. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *The EMBO Journal*, 25(3), pp.522–532. Available at: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7600942> [Accessed August 3, 2016].
- Lemullois, M. et al., 1988. Development and functions of the cytoskeleton during ciliogenesis in metazoa. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 63(2), pp.195–208. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2904829> [Accessed December 12, 2014].
- Leopold, P.L. et al., 2009. Smoking is associated with shortened airway cilia. *PloS one*, 4(12), p.e8157. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20016779> [Accessed October 4, 2016].
- Lewis, B.P. et al., 2003. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*, 115(7), pp.787–798.
- Lewis, B.P., Burge, C.B. & Bartel, D.P., 2005. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell*, 120(1), pp.15–20.
- Li, C. et al., 2016. MKS5 and CEP290 Dependent Assembly Pathway of the Ciliary Transition Zone. - PubMed - NCBI. *PLoS biology*, 14(3), p.e1002416. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate1.inist.fr/pubmed/26982032> [Accessed March 18, 2016].
- Li, J. et al., 2014. Identifying mRNA sequence elements for target recognition by human Argonaute proteins. *Genome Research*, 24(5), pp.775–785. Available at: <http://genome.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gr.162230.113> [Accessed August 5, 2016].
- Lindemann, C.B. & Lesich, K.A., 2010. Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible. *Journal of cell science*, 123(Pt 4), pp.519–28. Available at: <http://jcs.biologists.org/content/123/4/519> [Accessed April 19, 2016].
- Ling, H., Fabbri, M. & Calin, G.A., 2013. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nature reviews. Drug discovery*, 12(11), pp.847–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24172333> [Accessed October 6, 2016].
- Liu, C. et al., 2013. CLIP-based prediction of mammalian microRNA binding sites. *Nucleic acids research*, 41(14), p.e138. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23703212> [Accessed August 6, 2016].
- Liu, J. et al., 2005. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nature cell biology*, 7(12), pp.1261–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16284623> [Accessed August 8, 2016].
- Liu, N. et al., 2011. *The Exoribonuclease Nibbler Controls 3' End Processing of MicroRNAs in Drosophila*,
- Liu, N. et al., 2012. The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in Drosophila. *Nature*, 482(7386), pp.519–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22343898> [Accessed October 6, 2016].
- Liu, Y. et al., 2010. The expression of osteopontin and its association with Clara cell 10 kDa protein in allergic rhinitis. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 40(11), pp.1632–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20553297> [Accessed August 21, 2016].
- Lizé, M. et al., 2010. MicroRNA-449a levels increase by several orders of magnitude during mucociliary differentiation of airway epithelia. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(22), pp.4579–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21088493> [Accessed October 6, 2016].
- Lizé, M., Pilarski, S. & Dobbstein, M., 2010a. E2F1-inducible microRNA 449a/b suppresses cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell death and differentiation*, 17(3), pp.452–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19960022> [Accessed September 7, 2016].
- Lizé, M., Pilarski, S. & Dobbstein, M., 2010b. E2F1-inducible microRNA 449a/b suppresses cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell death and differentiation*, 17(3), pp.452–8. Available at: <http://www.nature.com.gate1.inist.fr/cdd/journal/v17/n3/full/cdd2009188a.html> [Accessed July 22, 2015].

- Llorens, F. et al., 2013. A highly expressed miR-101 isomiR is a functional silencing small RNA. *BMC genomics*, 14, p.104. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3751341&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Locksley, R.M., 2010. Asthma and Allergic Inflammation. *Cell*, 140(6), pp.777–783.
- Losa, D. & Chanson, M., 2015. The lung communication network. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(15), pp.2793–2808. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-015-1960-9> [Accessed October 4, 2016].
- Lukinavičius, G. et al., 2013. Selective chemical crosslinking reveals a Cep57-Cep63-Cep152 centrosomal complex. *Current biology : CB*, 23(3), pp.265–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23333316> [Accessed September 9, 2016].
- Lutter, D. et al., 2010. Intronic microRNAs support their host genes by mediating synergistic and antagonistic regulatory effects. *BMC genomics*, 11, p.224. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20370903> [Accessed October 10, 2016].
- M'hamdi, O., Ouertani, I. & Chaabouni-Bouhamed, H., 2014. Update on the genetics of bardet-biedl syndrome. *Molecular syndromology*, 5(2), pp.51–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24715851> [Accessed July 27, 2016].
- Ma, J.-B. et al., 2005. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*, 434(7033), pp.666–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15800629> [Accessed August 3, 2016].
- Ma, L. et al., 2014. Multicilin drives centriole biogenesis via E2f proteins. *Genes Dev*, 28(13), pp.1461–1471. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24934224>.
- Machen, T.E., 2006. Innate immune response in CF airway epithelia: hyperinflammatory? *American journal of physiology. Cell physiology*, 291(2), pp.C218-30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16825601> [Accessed August 1, 2016].
- Macrae, I.J. et al., 2006. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5758), pp.195–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16410517> [Accessed August 3, 2016].
- MacRae, I.J., Zhou, K. & Doudna, J.A., 2007. Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(10), pp.934–940. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nsmb1293> [Accessed August 3, 2016].
- Mahoney, J.E. et al., 2014. The hippo pathway effector Yap controls patterning and differentiation of airway epithelial progenitors. *Developmental cell*, 30(2), pp.137–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25043473> [Accessed August 29, 2016].
- Malicki, J. et al., 2011. Chapter 3 – Analysis of Cilia Structure and Function in Zebrafish. In *Methods in Cell Biology*. pp. 39–74.
- Malpel, S., Mendelsohn, C. & Cardoso, W. V., 2000. Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 127(14), pp.3057–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10862743> [Accessed September 2, 2016].
- Manzano, M. et al., 2015. Divergent target recognition by coexpressed 5'-isomiRs of miR-142-3p and selective viral mimicry. *RNA (New York, N.Y.)*, 21(9), pp.1606–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26137849> [Accessed September 28, 2015].
- Marcet, B., Chevalier, B., Luxardi, G., et al., 2011. Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nature cell biology*, 13(6), pp.693–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21602795> [Accessed September 5, 2016].

- Marcet, B. et al., 2007. Extracellular nucleotides regulate CCL20 release from human primary airway epithelial cells, monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *Journal of cellular physiology*, 211(3), pp.716–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17295217> [Accessed August 25, 2016].
- Marcet, B., Chevalier, B., Coraux, C., et al., 2011. MicroRNA-based silencing of Delta/Notch signaling promotes multiple cilia formation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 10(17), pp.2858–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21857154> [Accessed September 7, 2016].
- Margulis, L. et al., 2006. The last eukaryotic common ancestor (LECA): acquisition of cytoskeletal motility from aerotolerant spirochetes in the Proterozoic Eon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), pp.13080–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1559756&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 29, 2016].
- Marshall, C.B. et al., 2016. p73 Is Required for Multiciliogenesis and Regulates the Foxj1-Associated Gene Network. *Cell Reports*, 14(10), pp.2289–2300.
- Marshall, W.F. & Rosenbaum, J.L., 2001. Intraflagellar transport balances continuous turnover of outer doublet microtubules: implications for flagellar length control. *The Journal of cell biology*, 155(3), pp.405–14. Available at: <http://jcb.rupress.org.gate1.inist.fr/content/155/3/405.long> [Accessed April 27, 2016].
- Marszalek, J.R. et al., 1999. Situs inversus and embryonic ciliary morphogenesis defects in mouse mutants lacking the KIF3A subunit of kinesin-II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(9), pp.5043–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10220415> [Accessed July 26, 2016].
- Martin, E., Ganz, T. & Lehrer, R.I., 1995. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *Journal of leukocyte biology*, 58(2), pp.128–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7643008> [Accessed August 25, 2016].
- Martin, G. & Keller, W., 2007. RNA-specific ribonucleotidyl transferases. *RNA (New York, N.Y.)*, 13(11), pp.1834–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17872511> [Accessed August 12, 2016].
- Martin, W.R. et al., 1991. Growth and differentiation of primary tracheal epithelial cells in culture: regulation by extracellular calcium. *Journal of cellular physiology*, 147(1), pp.138–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2037619> [Accessed October 5, 2016].
- Masterson, J.C. et al., 2011. Bone morphogenetic protein signalling in airway epithelial cells during regeneration. *Cellular signalling*, 23(2), pp.398–406. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20959141> [Accessed February 16, 2015].
- Mathys, H. et al., 2014. Structural and Biochemical Insights to the Role of the CCR4-NOT Complex and DDX6 ATPase in MicroRNA Repression. *Molecular Cell*, 54(5), pp.751–765.
- Matsui, H. et al., 2006. A physical linkage between cystic fibrosis airway surface dehydration and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(48), pp.18131–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17116883> [Accessed August 1, 2016].
- Matsui, H. et al., 1998. Evidence for Periciliary Liquid Layer Depletion, Not Abnormal Ion Composition, in the Pathogenesis of Cystic Fibrosis Airways Disease. *Cell*, 95(7), pp.1005–1015.
- McGrath, J. et al., 2003. Two Populations of Node Monocilia Initiate Left-Right Asymmetry in the Mouse. *Cell*, 114(1), pp.61–73.
- Meijer, H.A. et al., 2013. Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science (New York, N.Y.)*, 340(6128), pp.82–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23559250> [Accessed August 8, 2016].
- Mennella, V. et al., 2012. Subdiffraction-resolution fluorescence microscopy reveals a domain of the

- centrosome critical for pericentriolar material organization. *Nature cell biology*, 14(11), pp.1159–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23086239> [Accessed September 9, 2016].
- Mercer, R.R. et al., 1994. Cell number and distribution in human and rat airways. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 10(6), pp.613–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8003339> [Accessed August 22, 2016].
- Metzger, D. et al., 1995. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(15), pp.6991–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7624356> [Accessed October 5, 2016].
- Meunier, A. & Azimzadeh, J., 2016. Multiciliated Cells in Animals. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27580630> [Accessed September 15, 2016].
- Million, K. et al., 2001. Effects of retinoic acid receptor-selective agonists on human nasal epithelial cell differentiation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 25(6), pp.744–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11726401> [Accessed September 2, 2016].
- Mitchell, D.R., 2004. Speculations on the evolution of 9+2 organelles and the role of central pair microtubules. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 96(9), pp.691–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3321483&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 27, 2016].
- Miyatake, K. et al., 2015. ERK7 regulates ciliogenesis by phosphorylating the actin regulator CapZIP in cooperation with Dishevelled. *Nature communications*, 6, p.6666. Available at: <http://www.nature.com/gate1.inist.fr/ncomms/2015/150331/ncomms7666/full/ncomms7666.html> [Accessed April 1, 2015].
- Monteys, A.M. et al., 2010. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA (New York, N.Y.)*, 16(3), pp.495–505. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20075166> [Accessed August 2, 2016].
- Moore, M.J. et al., 2015. miRNA–target chimeras reveal miRNA 3′-end pairing as a major determinant of Argonaute target specificity. *Nature Communications*, 6, p.8864. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms9864> [Accessed August 5, 2016].
- Moorman, J.E. et al., 2007. National surveillance for asthma--United States, 1980-2004. *Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries (Washington, D.C. : 2002)*, 56(8), pp.1–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17947969> [Accessed July 29, 2016].
- Morgan, T.H., 1917. The Theory of the Gene. *The American Naturalist*, 51(609), pp.513–544. Available at: <http://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/279629> [Accessed September 16, 2016].
- Mori, K. et al., 2009. Rho-kinase contributes to sustained RhoA activation through phosphorylation of p190A RhoGAP. *The Journal of biological chemistry*, 284(8), pp.5067–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19103606> [Accessed October 14, 2016].
- Mori, M. et al., 2015. Notch3-Jagged signaling controls the pool of undifferentiated airway progenitors. *Development (Cambridge, England)*, 142(2), pp.258–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25564622> [Accessed January 8, 2015].
- Morimoto, M. et al., 2012. Different assemblies of Notch receptors coordinate the distribution of the major bronchial Clara, ciliated and neuroendocrine cells. *Development (Cambridge, England)*, 139(23), pp.4365–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23132245> [Accessed September 5, 2016].
- Moritz, K.B. & Sauer, H.W., 1996. Boveri's contributions to developmental biology--a challenge for today. *The International journal of developmental biology*, 40(1), pp.27–47. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8735909> [Accessed October 3, 2016].
- Mou, H. et al., 2016. Dual SMAD Signaling Inhibition Enables Long-Term Expansion of Diverse Epithelial Basal Cells. *Cell Stem Cell*, 19(2), pp.217–231.
- Mullany, L.E. et al., 2015. SNP Regulation of microRNA Expression and Subsequent Colon Cancer Risk. *PLoS one*, 10(12), p.e0143894. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26630397> [Accessed August 16, 2016].
- Munitz, A. et al., 2008. Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor alpha1 and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(20), pp.7240–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18480254> [Accessed September 6, 2016].
- Munnamalai, V. & Fekete, D.M., 2016. Notch-Wnt-Bmp crosstalk regulates radial patterning in the mouse cochlea in a spatiotemporal manner. *Development (Cambridge, England)*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27633988> [Accessed October 18, 2016].
- Nachury, M. V et al., 2007. A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell*, 129(6), pp.1201–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17574030> [Accessed August 27, 2015].
- Nadel, J.A., 1985. Regulation of airway secretions. *Chest*, 87(1 Suppl), p.111S–113S. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2578032> [Accessed August 21, 2016].
- Najafi-Shoushtari, S.H. et al., 2010. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5985), pp.1566–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20466882> [Accessed October 10, 2016].
- Nakamura, T. & Gold, G.H., 1987. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature*, 325(6103), pp.442–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3027574> [Accessed April 18, 2016].
- Nakazawa, Y. et al., 2007. SAS-6 is a cartwheel protein that establishes the 9-fold symmetry of the centriole. *Current biology : CB*, 17(24), pp.2169–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18082404> [Accessed April 22, 2016].
- Narita, K. et al., 2010. Multiple primary cilia modulate the fluid transcytosis in choroid plexus epithelium. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 11(2), pp.287–301. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19958467> [Accessed July 26, 2016].
- Narita, K. & Takeda, S., 2015. Cilia in the choroid plexus: their roles in hydrocephalus and beyond. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, p.39. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fncel.2015.00039/abstract> [Accessed July 26, 2016].
- Nasevicius, A. & Ekker, S.C., 2000. Effective targeted gene knockdown in zebrafish. *Nature Genetics, Published online: 01 October 2000; | doi:10.1038/79951*, 26(2), p.216.
- Nauli, S.M. et al., 2003. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nature genetics*, 33(2), pp.129–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514735> [Accessed April 14, 2016].
- Neilsen, C.T., Goodall, G.J. & Bracken, C.P., 2012. IsomiRs--the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. *Trends in genetics : TIG*, 28(11), pp.544–9. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168952512001126> [Accessed November 10, 2014].
- Nemajerova, A. et al., 2016. TAp73 is a central transcriptional regulator of airway multiciliogenesis. *Genes & development*, 30(11), pp.1300–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27257214> [Accessed September 8, 2016].

- Neumüller, R.A. et al., 2008. Mei-P26 regulates microRNAs and cell growth in the *Drosophila* ovarian stem cell lineage. *Nature*, 454(7201), pp.241–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18528333> [Accessed August 6, 2016].
- Newman, M.A., Mani, V. & Hammond, S.M., 2011. Deep sequencing of microRNA precursors reveals extensive 3' end modification. *RNA (New York, N.Y.)*, 17(10), pp.1795–803. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21849429> [Accessed August 12, 2016].
- Niu, M. et al., 2016. MiR-29c regulates the expression of miR-34c and miR-449a by targeting DNA methyltransferase 3a and 3b in nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer*, 16(1), p.218. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/16/218> [Accessed October 7, 2016].
- Nogami, H. & Urist, M.R., 1970. A morphogenetic matrix for differentiation of cartilage in tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 134(2), pp.530–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4911502> [Accessed September 16, 2016].
- Nonaka, S. et al., 1998. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell*, 95(6), pp.829–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9865700> [Accessed May 26, 2016].
- Noonan, E.J. et al., 2009. miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer. *Oncogene*, 28(14), pp.1714–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19252524> [Accessed November 10, 2014].
- Ogino, T. et al., 2016. Characterization of multiciliated ependymal cells that emerge in the neurogenic niche of the aged zebrafish brain. *The Journal of comparative neurology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26991819> [Accessed March 20, 2016].
- Ohta, Y., Hartwig, J.H. & Stossel, T.P., 2006. FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nature Cell Biology*, 8(8), pp.803–814. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncb1437> [Accessed October 14, 2016].
- Oishi, I. et al., 2006. Regulation of primary cilia formation and left-right patterning in zebrafish by a noncanonical Wnt signaling mediator, *duboraya*. *Nature Genetics*, 38(11), pp.1316–1322. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ng1892> [Accessed September 13, 2016].
- Pan, J. et al., 2007. RhoA-mediated apical actin enrichment is required for ciliogenesis and promoted by Foxj1. *Journal of cell science*, 120(Pt 11), pp.1868–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17488776> [Accessed December 4, 2014].
- Pan, J.-H. et al., 2014. Myb permits multilineage airway epithelial cell differentiation. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 32(12), pp.3245–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25103188> [Accessed September 8, 2016].
- Pardo-Saganta, A., Law, B.M., et al., 2015. Injury induces direct lineage segregation of functionally distinct airway basal stem/progenitor cell subpopulations. *Cell stem cell*, 16(2), pp.184–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25658372> [Accessed September 2, 2016].
- Pardo-Saganta, A., Tata, P.R., et al., 2015. Parent stem cells can serve as niches for their daughter cells. *Nature*, 523(7562), pp.597–601. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature14553> [Accessed September 5, 2016].
- Park, J.-E. et al., 2011. Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature*, 475(7355), pp.201–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21753850> [Accessed August 3, 2016].
- Park, K.-S. et al., 2006. Transdifferentiation of Ciliated Cells during Repair of the Respiratory Epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 34(2), pp.151–157. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16239640> [Accessed January 8, 2016].
- Park, T.J. et al., 2008a. Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nature Genetics*, 40(7), pp.871–879. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ng.104> [Accessed September 13, 2016].
- Park, T.J. et al., 2008b. Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nature genetics*, 40(7), pp.871–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2771675&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 5, 2014].
- Park, T.J., Haigo, S.L. & Wallingford, J.B., 2006. Ciliogenesis defects in embryos lacking inturned or fuzzy function are associated with failure of planar cell polarity and Hedgehog signaling. *Nature Genetics*, 38(3), pp.303–311. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ng1753> [Accessed September 13, 2016].
- Pedersen, L.B. et al., 2012. The Ciliary Cytoskeleton. In *Comprehensive Physiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c110043> [Accessed October 13, 2016].
- Pelletier, L. et al., 2006. Centriole assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 444(7119), pp.619–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17136092> [Accessed March 5, 2016].
- Perez-Moreno, M., Jamora, C. & Fuchs, E., 2003. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell*, 112(4), pp.535–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600316> [Accessed August 25, 2016].
- Petit, A.-P. et al., 2012. The structural basis for the interaction between the CAF1 nuclease and the NOT1 scaffold of the human CCR4-NOT deadenylase complex. *Nucleic acids research*, 40(21), pp.11058–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22977175> [Accessed August 8, 2016].
- Pezzulo, A. a et al., 2012. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature*, 487(7405), pp.109–13. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3390761&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 12, 2014].
- Piasecki, B.P., Burghoorn, J. & Swoboda, P., 2010. Regulatory Factor X (RFX)-mediated transcriptional rewiring of ciliary genes in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(29), pp.12969–12974. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0914241107> [Accessed September 14, 2016].
- Pickett-Heaps, J., 1974. The evolution of mitosis and the eukaryotic condition. *Bio Systems*, 6(1), pp.37–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4157379> [Accessed April 29, 2016].
- Postma, D.S., Bush, A. & van den Berge, M., 2015. Risk factors and early origins of chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet*, 385(9971), pp.899–909.
- Puchelle, E. et al., 1992. Differential localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal and cystic fibrosis airway epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 7(5), pp.485–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1384582> [Accessed August 21, 2016].
- Quillien, A. et al., 2011. BMP signaling orchestrates photoreceptor specification in the zebrafish pineal gland in collaboration with Notch. *Development (Cambridge, England)*, 138(11), pp.2293–302. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21558377> [Accessed October 18, 2016].
- Rachel, R.A., Li, T. & Swaroop, A., 2012. Photoreceptor sensory cilia and ciliopathies: focus on CEP290, RPGR and their interacting proteins. *Cilia*, 1(1), p.22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23351659> [Accessed October 17, 2016].
- Raidt, J. et al., 2015. Ciliary function and motor protein composition of human fallopian tubes. *Human reproduction (Oxford, England)*, 30(12), pp.2871–80. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26373788> [Accessed May 4, 2016].
- Rajewsky, K. et al., 1996. Conditional gene targeting. *Journal of Clinical Investigation*, 98(3), pp.600–603. Available at: <http://www.jci.org/articles/view/118828> [Accessed October 5, 2016].
- Raver-Shapira, N. et al., 2007. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Molecular cell*, 26(5), pp.731–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17540598> [Accessed October 6, 2016].
- Rawlins, E.L., Clark, C.P., et al., 2009. The Id2+ distal tip lung epithelium contains individual multipotent embryonic progenitor cells. *Development (Cambridge, England)*, 136(22), pp.3741–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19855016> [Accessed September 1, 2016].
- Rawlins, E.L., Okubo, T., et al., 2009. The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium. *Cell stem cell*, 4(6), pp.525–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19497281> [Accessed September 1, 2016].
- Rawlins, E.L. & Hogan, B.L.M., 2008. Ciliated epithelial cell lifespan in the mouse trachea and lung. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 295(1), pp.L231-4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18487354> [Accessed August 31, 2016].
- Rawlins, E.L. & Hogan, B.L.M., 2006. Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? *Development (Cambridge, England)*, 133(13), pp.2455–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735479> [Accessed August 21, 2016].
- Rehwinkel, J. et al., 2005. A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA (New York, N.Y.)*, 11(11), pp.1640–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177138> [Accessed August 8, 2016].
- Reuther, G. & Der, C., 2000. The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Current opinion in cell biology*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095506749900071X> [Accessed September 16, 2016].
- Reynolds, S.D. et al., 2000. Conditional clara cell ablation reveals a self-renewing progenitor function of pulmonary neuroendocrine cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 278(6), pp.L1256-63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10835332> [Accessed September 1, 2016].
- Rhodin, J.A., 1966. The ciliated cell. Ultrastructure and function of the human tracheal mucosa. *The American review of respiratory disease*, 93(3), p.Supp1:1-15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5954680> [Accessed August 21, 2016].
- Ridley, A., 2006. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in cell biology*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962892406002236> [Accessed September 16, 2016].
- Rieder, C.L., Jensen, C.G. & Jensen, L.C., 1979. The resorption of primary cilia during mitosis in a vertebrate (PtK1) cell line. *Journal of ultrastructure research*, 68(2), pp.173–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/480410> [Accessed April 18, 2016].
- Riordan, J.R. et al., 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 245(4922), pp.1066–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2475911> [Accessed October 19, 2016].
- Rock, J.R. et al., 2009. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(31), pp.12771–12775. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19625615>.
- Rock, J.R. et al., 2009. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(31), pp.12771–12775. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19625615> [Accessed August 22, 2016].

- Rock, J.R. et al., 2011. Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell stem cell*, 8(6), pp.639–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21624809> [Accessed September 5, 2016].
- Rock, J.R., Randell, S.H. & Hogan, B.L.M., 2010. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis Model Mech*, 3(9–10), pp.545–556. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20699479> [Accessed August 31, 2016].
- Rodrigues-Martins, A. et al., 2007. Revisiting the role of the mother centriole in centriole biogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5827), pp.1046–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17463247> [Accessed April 17, 2016].
- Rodríguez, J.L. et al., 2006. Id2 leaves the chromatin of the E2F4-p130-controlled c-myc promoter during hepatocyte priming for liver regeneration. *The Biochemical journal*, 398(3), pp.431–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1559451&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 27, 2015].
- Rogers, D.F., 1994. Airway goblet cells: responsive and adaptable front-line defenders. *The European respiratory journal*, 7(9), pp.1690–706. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7995400> [Accessed August 22, 2016].
- Rommens, J.M. et al., 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science (New York, N.Y.)*, 245(4922), pp.1059–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2772657> [Accessed October 19, 2016].
- Rubin, B.K., 2009. Mucus, phlegm, and sputum in cystic fibrosis. *Respiratory care*, 54(6), p.726–32; discussion 732. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19467160> [Accessed October 19, 2016].
- Ruby, J.G., Jan, C.H. & Bartel, D.P., 2007. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448(7149), pp.83–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17589500> [Accessed August 4, 2016].
- Sachs, L.A., Finkbeiner, W.E. & Widdicombe, J.H., 2003. Effects of media on differentiation of cultured human tracheal epithelium. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 39(1–2), pp.56–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12892528> [Accessed October 5, 2016].
- Sachs, L., Finkbeiner, W. & Widdicombe, J., 2003. Effects of media on differentiation of cultured human tracheal epithelium. *In Vitro Cellular & ...*, (Cc), pp.56–62. Available at: [http://link.springer.com/article/10.1290/1543-706X\(2003\)039%3C0056:EOMODO%3E2.0.CO%3B2](http://link.springer.com/article/10.1290/1543-706X(2003)039%3C0056:EOMODO%3E2.0.CO%3B2) [Accessed November 25, 2014].
- Saetrom, P. et al., 2007. Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic acids research*, 35(7), pp.2333–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389647> [Accessed August 6, 2016].
- Salazar, V.S., Gamer, L.W. & Rosen, V., 2016. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nature reviews. Endocrinology*, 12(4), pp.203–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26893264> [Accessed October 17, 2016].
- Salzman, D.W. et al., 2016. miR-34 activity is modulated through 5'-end phosphorylation in response to DNA damage. *Nature communications*, 7, p.10954. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26996824> [Accessed October 15, 2016].
- Sampath, T.K. et al., 1993. Drosophila transforming growth factor beta superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(13), pp.6004–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8327474> [Accessed September 16, 2016].
- Sanderson, M.J. & Sleigh, M.A., 1981. Ciliary activity of cultured rabbit tracheal epithelium: beat pattern and metachrony. *Journal of cell science*, 47(1), pp.331–47. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7263784> [Accessed August 24, 2016].
- Sathananthan, A.H. et al., 2006. Rediscovering Boveri's centrosome in *Ascaris* (1888): its impact on human fertility and development. *Reproductive biomedicine online*, 12(2), pp.254–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16478594> [Accessed October 3, 2016].
- Satir, P. & Christensen, S.T., 2007. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annual review of physiology*, 69, pp.377–400. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17009929> [Accessed October 4, 2016].
- Satir, P., Mitchell, D.R. & Jékely, G., 2008. How did the cilium evolve? *Current topics in developmental biology*, 85, pp.63–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19147002> [Accessed April 29, 2016].
- Sauer, B., 1987. Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 7(6), pp.2087–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3037344> [Accessed October 5, 2016].
- Sauer, B. & Henderson, N., 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(14), pp.5166–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2839833> [Accessed October 5, 2016].
- Sayed, D. & Abdellatif, M., 2011. MicroRNAs in development and disease. *Physiological reviews*, 91(3), pp.827–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21742789> [Accessed August 5, 2016].
- Schäfer, I.B. et al., 2014. The structure of the Pan2-Pan3 core complex reveals cross-talk between deadenylase and pseudokinase. *Nature structural & molecular biology*, 21(7), pp.591–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24880344> [Accessed August 8, 2016].
- Schirle, N.T. & MacRae, I.J., 2012. The crystal structure of human Argonaute2. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6084), pp.1037–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22539551> [Accessed August 3, 2016].
- Schmidt, B.Z. et al., 2016. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis: current perspectives. *Clinical pharmacology : advances and applications*, 8, pp.127–140. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27703398> [Accessed October 19, 2016].
- Schmidt, T.I. et al., 2009. Control of centriole length by CPAP and CP110. *Current biology : CB*, 19(12), pp.1005–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19481458> [Accessed March 7, 2016].
- Schwarz, D.S. et al., 2003. Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell*, 115(2), pp.199–208.
- Schwiebert, E.M. et al., 1995. CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell*, 81(7), pp.1063–1073. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286740580011X> [Accessed August 1, 2016].
- Sears, P.R. et al., 2011. Mucociliary interactions and mucus dynamics in ciliated human bronchial epithelial cell cultures. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 301(2), pp.L181-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21531774> [Accessed August 24, 2016].
- Serafini, S.M. & Michaelson, E.D., 1977. Length and distribution of cilia in human and canine airways. *Bulletin européen de physiopathologie respiratoire*, 13(4), pp.551–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/912142> [Accessed August 21, 2016].
- Sha, Q. et al., 2004. Activation of Airway Epithelial Cells by Toll-Like Receptor Agonists. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 31(3), pp.358–364. Available at: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2003-0388OC> [Accessed August 25, 2016].
- Shaw, R.J. et al., 1998. RhoA-dependent phosphorylation and relocalization of ERM proteins into apical membrane/actin protrusions in fibroblasts. *Molecular biology of the cell*, 9(2), pp.403–19. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9450964> [Accessed September 12, 2016].
- Shaykhiev, R. et al., 2013. EGF shifts human airway basal cell fate toward a smoking-associated airway epithelial phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(29), pp.12102–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23818594> [Accessed October 4, 2016].
- Shebani, E. et al., 2005. Attachment of columnar airway epithelial cells in asthma. *Tissue & cell*, 37(2), pp.145–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15748741> [Accessed August 22, 2016].
- Shim, G. et al., 2013. Application of cationic liposomes for delivery of nucleic acids. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(2), pp.72–80.
- Shin, C. et al., 2010. Expanding the MicroRNA Targeting Code: Functional Sites with Centered Pairing. *Molecular Cell*, 38(6), pp.789–802.
- Shin, M., Nagai, H. & Sheng, G., 2009. Notch mediates Wnt and BMP signals in the early separation of smooth muscle progenitors and blood/endothelial common progenitors. *Development (Cambridge, England)*, 136(4), pp.595–603. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19168675> [Accessed October 18, 2016].
- Singla, V. et al., 2010. Ofd1, a human disease gene, regulates the length and distal structure of centrioles. *Developmental cell*, 18(3), pp.410–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2841064&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 4, 2016].
- Singla, V., 2006. The Primary Cilium as the Cell's Antenna: Signaling at a Sensory Organelle. *Science*, 313(5787), pp.629–633. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16888132> [Accessed October 5, 2015].
- Sir, J.-H. et al., 2011. A primary microcephaly protein complex forms a ring around parental centrioles. *Nature genetics*, 43(11), pp.1147–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21983783> [Accessed September 9, 2016].
- Smith, M.K., Koch, P.J. & Reynolds, S.D., 2012. Direct and indirect roles for β -catenin in facultative basal progenitor cell differentiation. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 302(6), pp.L580-94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22227204> [Accessed August 29, 2016].
- Song, J.-J. et al., 2003. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nature structural biology*, 10(12), pp.1026–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14625589> [Accessed August 3, 2016].
- Song, R. et al., 2014. miR-34/449 miRNAs are required for motile ciliogenesis by repressing cp110. *Nature*, 510(7503), pp.115–120. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24899310>.
- Song, R. et al., 2014. miR-34/449 miRNAs are required for motile ciliogenesis by repressing cp110. *Nature*, 510(7503), pp.115–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24899310> [Accessed September 6, 2016].
- Soni, K. et al., 2013. miR-34 is maternally inherited in *Drosophila melanogaster* and *Danio rerio*. *Nucleic acids research*, 41(8), pp.4470–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470996> [Accessed October 6, 2016].
- Sonnen, K.F. et al., 2012. 3D-structured illumination microscopy provides novel insight into architecture of human centrosomes. *Biology open*, 1(10), pp.965–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23213374> [Accessed September 9, 2016].
- Sonnen, K.F. et al., 2013. Human Cep192 and Cep152 cooperate in Plk4 recruitment and centriole duplication. *Journal of cell science*, 126(Pt 14), pp.3223–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23641073> [Accessed March 14, 2016].

- Sorokin, S.P., 1968. Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *Journal of cell science*, 3(2), pp.207–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5661997> [Accessed March 14, 2016].
- Soumelis, V. et al., 2002. Human epithelial cells trigger dendritic cell–mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nature Immunology*, 3(7), p.673. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni805> [Accessed August 25, 2016].
- Sountoulidis, A. et al., 2012. Activation of the canonical bone morphogenetic protein (BMP) pathway during lung morphogenesis and adult lung tissue repair. *PLoS one*, 7(8), p.e41460. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3423416&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 24, 2015].
- Spektor, A. et al., 2007. Cep97 and CP110 suppress a cilia assembly program. *Cell*, 130(4), pp.678–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17719545> [Accessed April 4, 2016].
- Starega-Roslan, J. et al., 2011. Structural basis of microRNA length variety. *Nucleic acids research*, 39(1), pp.257–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20739353> [Accessed August 12, 2016].
- Stark, A. et al., 2003. Identification of Drosophila MicroRNA Targets Ronald H. A. Plasterk, ed. *PLoS Biology*, 1(3), p.e60. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.0000060> [Accessed August 5, 2016].
- Stehbens, S.J. et al., 2006. Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *Journal of cell science*, 119(Pt 9), pp.1801–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16608875> [Accessed August 25, 2016].
- Stewart, M., 2007. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Available at: <http://www.nature.com/nrm/journal/v8/n3/abs/nrm2114.html> [Accessed September 16, 2016].
- Stoltz, D.A. et al., 2010. Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth. *Science translational medicine*, 2(29), p.29ra31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20427821> [Accessed October 19, 2016].
- Stripp, B.R. & Reynolds, S.D., 2008. Maintenance and repair of the bronchiolar epithelium. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 5(3), pp.328–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18403328> [Accessed August 21, 2016].
- Stubbs, J.L. et al., 2012. Multicilin promotes centriole assembly and ciliogenesis during multiciliate cell differentiation. *Nature cell biology*, 14(2), pp.140–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3329891&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 4, 2014].
- Stutts, M.J. et al., 1995a. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5225), pp.847–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7543698> [Accessed August 1, 2016].
- Stutts, M.J. et al., 1995b. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5225), pp.847–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7543698> [Accessed October 19, 2016].
- Summers, K.E. & Gibbons, I.R., 1971. Adenosine triphosphate-induced sliding of tubules in trypsin-treated flagella of sea-urchin sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(12), pp.3092–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=389597&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 29, 2016].
- Sun, F. et al., 2008. Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest. *FEBS letters*, 582(10), pp.1564–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18406353> [Accessed October 6,

2016].

- Swoboda, P., Adler, H.T. & Thomas, J.H., 2000. The RFX-Type Transcription Factor DAF-19 Regulates Sensory Neuron Cilium Formation in *C. elegans*. *Molecular Cell*, 5(3), pp.411–421.
- Szollosi, D., Calarco, P. & Donahue, R.P., 1972. Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes. *Journal of cell science*, 11(2), pp.521–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5076360> [Accessed April 18, 2016].
- Szymaniak, A.D. et al., 2015. Crumbs3-Mediated Polarity Directs Airway Epithelial Cell Fate through the Hippo Pathway Effector Yap. *Developmental cell*, 34(3), pp.283–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26235047> [Accessed August 29, 2016].
- Tadokoro, T. et al., 2016. BMP signaling and cellular dynamics during regeneration of airway epithelium from basal progenitors. *Development (Cambridge, England)*, 143(5), pp.764–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26811382> [Accessed September 6, 2016].
- Tadokoro, T. et al., 2014. IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(35), pp.E3641-9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4156689&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 21, 2015].
- Takeda, S. et al., 1999. Left-right asymmetry and kinesin superfamily protein KIF3A: new insights in determination of laterality and mesoderm induction by kif3A^{-/-} mice analysis. *The Journal of cell biology*, 145(4), pp.825–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10330409> [Accessed July 26, 2016].
- Tan, F.E. et al., 2013. Myb promotes centriole amplification and later steps of the multiciliogenesis program. *Development*, 140(20), pp.4277–4286. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24048590>.
- Tan, G.C. et al., 2014. 5' isomiR variation is of functional and evolutionary importance. *Nucleic acids research*, 42(14), pp.9424–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25056318> [Accessed November 10, 2014].
- Tang, C.-J.C. et al., 2009. CPAP is a cell-cycle regulated protein that controls centriole length. *Nature cell biology*, 11(7), pp.825–31. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1889> [Accessed April 20, 2016].
- Tarasov, V. et al., 2007. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 6(13), pp.1586–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17554199> [Accessed October 6, 2016].
- Tarran, R., 2004. Regulation of airway surface liquid volume and mucus transport by active ion transport. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 1(1), pp.42–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16113411> [Accessed August 24, 2016].
- Tata, P.R. et al., 2013. Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo. *Nature*, 503(7475), pp.218–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24196716> [Accessed September 1, 2016].
- Tateishi, K. et al., 2013. Two appendages homologous between basal bodies and centrioles are formed using distinct Odf2 domains. *The Journal of cell biology*, 203(3), pp.417–25. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3824012&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 22, 2016].
- Teixeira, V.H. et al., 2013. Stochastic homeostasis in human airway epithelium is achieved by neutral competition of basal cell progenitors. *eLife*, 2, p.e00966. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24151545> [Accessed September 1, 2016].
- Terré, B. et al., 2016. GEMC1 is a critical regulator of multiciliated cell differentiation. *The EMBO journal*, 35(9), pp.942–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26933123> [Accessed October 11, 2016].

- Thomas, B. et al., 2010. Ciliary dysfunction and ultrastructural abnormalities are features of severe asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(4), p.722–729.e2.
- Thomas, J. et al., 2010. Transcriptional control of genes involved in ciliogenesis: a first step in making cilia. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 102(9), pp.499–513. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20690903> [Accessed September 14, 2016].
- Tian, Y. et al., 2014. A Phosphate-Binding Pocket within the Platform-PAZ-Connector Helix Cassette of Human Dicer. *Molecular Cell*, 53(4), pp.606–616.
- Tichelaar, J.W. et al., 1999. HNF-3/Forkhead Homologue-4 (HFH-4) Is Expressed in Ciliated Epithelial Cells in the Developing Mouse Lung. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47(6), pp.823–831. Available at: <http://jhc.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/002215549904700612> [Accessed September 14, 2016].
- Tjabringa, G.S. et al., 2003. The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(12), pp.6690–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14662872> [Accessed August 25, 2016].
- Tokita, E. et al., 2014. Club cell 10-kDa protein attenuates airway mucus hypersecretion and inflammation. *The European respiratory journal*, 44(4), pp.1002–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24833761> [Accessed August 21, 2016].
- Toyota, M. et al., 2008. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer research*, 68(11), pp.4123–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18519671> [Accessed November 10, 2014].
- Treat, A.C. et al., 2016. The PDZ Protein Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor-1 (NHERF1) Regulates Planar Cell Polarity and Motile Cilia Organization. *PloS one*, 11(4), p.e0153144. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27055101> [Accessed September 13, 2016].
- Treutlein, B. et al., 2014. Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-seq. *Nature*, 509(7500), pp.371–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4145853&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 9, 2014].
- Tsao, P.-N. et al., 2009. Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways. *Development (Cambridge, England)*, 136(13), pp.2297–307. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2729343&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 4, 2014].
- Tsou, M.-F.B. & Stearns, T., 2006. Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle. *Nature*, 442(7105), pp.947–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16862117> [Accessed February 19, 2016].
- Tsui, L.C. et al., 1985. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science (New York, N.Y.)*, 230(4729), pp.1054–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2997931> [Accessed October 19, 2016].
- Tsutsumi, A. et al., 2011. Recognition of the pre-miRNA structure by Drosophila Dicer-1. *Nature structural & molecular biology*, 18(10), pp.1153–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21926993> [Accessed August 3, 2016].
- Tyner, J.W. et al., 2006. Blocking airway mucous cell metaplasia by inhibiting EGFR antiapoptosis and IL-13 transdifferentiation signals. *The Journal of clinical investigation*, 116(2), pp.309–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16453019> [Accessed August 22, 2016].
- Urist, M.R., 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science (New York, N.Y.)*, 150(3698), pp.893–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5319761> [Accessed September 16, 2016].

- Ustianenko, D. et al., 2013. Mammalian DIS3L2 exoribonuclease targets the uridylylated precursors of let-7 miRNAs. *RNA (New York, N.Y.)*, 19(12), pp.1632–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24141620> [Accessed August 12, 2016].
- Vella, M.C. et al., 2004. The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. *Genes & development*, 18(2), pp.132–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14729570> [Accessed August 5, 2016].
- Vetter, I. & Wittinghofer, A., 2001. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/294/5545/1299.short> [Accessed September 16, 2016].
- Vij, S. et al., 2012. Evolutionarily Ancient Association of the FoxJ1 Transcription Factor with the Motile Ciliogenic Program H. S. Malik, ed. *PLoS Genetics*, 8(11), p.e1003019. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1003019> [Accessed September 14, 2016].
- Villa, M. et al., 2016. The aryl hydrocarbon receptor controls cyclin O to promote epithelial multiciliogenesis. *Nature Communications*, 7, p.12652. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms12652> [Accessed September 7, 2016].
- Vladar, E.K. et al., 2016. Airway epithelial homeostasis and planar cell polarity signaling depend on multiciliated cell differentiation. *JCI insight*, 1(13). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27570836> [Accessed October 19, 2016].
- Vladar, E.K. et al., 2012. Microtubules enable the planar cell polarity of airway cilia. *Curr Biol*, 22(23), pp.2203–2212. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23122850>.
- Vladar, E.K. & Stearns, T., 2007. Molecular characterization of centriole assembly in ciliated epithelial cells. *J Cell Biol*, 178(1), pp.31–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17606865>.
- Wahle, E. & Winkler, G.S., 2013. RNA decay machines: Deadenylation by the Ccr4–Not and Pan2–Pan3 complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(6), pp.561–570.
- Walentek, P. et al., 2016. Ciliary transcription factors and miRNAs precisely regulate Cp110 levels required for ciliary adhesions and ciliogenesis. *eLife*, 5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27623009> [Accessed September 19, 2016].
- Wallmeier, J. et al., 2014. Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat Genet*, 46(6), pp.646–651. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24747639>.
- Wallmeier, J. et al., 2014. Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nature genetics*, 46(6), pp.646–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24747639> [Accessed September 12, 2016].
- Wang, H. et al., 2010. Clara cell 10-kD protein suppresses chitinase 3-like 1 expression associated with eosinophilic chronic rhinosinusitis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 181(9), pp.908–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20093645> [Accessed August 21, 2016].
- Wang, H., Liu, Y. & Liu, Z., 2013. Clara cell 10-kD protein in inflammatory upper airway diseases. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 13(1), pp.25–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23242114> [Accessed August 21, 2016].
- Wang, W., Wu, T. & Kirschner, M.W., 2014. The master cell cycle regulator APC-Cdc20 regulates ciliary length and disassembly of the primary cilium. *eLife*, 3, p.e03083. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4135350&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 18, 2014].
- Wanner, A., Salathé, M. & O'Riordan, T.G., 1996. Mucociliary clearance in the airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 154(6), pp.1868–1902. Available at:

- <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm.154.6.8970383> [Accessed August 24, 2016].
- WATSON, J.H. & BRINKMAN, G.L., 1964. ELECTRON MICROSCOPY OF THE EPITHELIAL CELLS OF NORMAL AND BRONCHITIC HUMAN BRONCHUS. *The American review of respiratory disease*, 90, pp.851–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14233790> [Accessed August 21, 2016].
- Watson, J.K. et al., 2015. Clonal Dynamics Reveal Two Distinct Populations of Basal Cells in Slow-Turnover Airway Epithelium. *Cell reports*, 12(1), pp.90–101. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124715006099> [Accessed January 22, 2016].
- Watson, J.K.K. et al., 2015. Clonal Dynamics Reveal Two Distinct Populations of Basal Cells in Slow-Turnover Airway Epithelium. *Cell reports*, 12(1), pp.90–101. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124715006099> [Accessed January 22, 2016].
- Weaver, M. et al., 1999. Bmp signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung development. , 4015, pp.4005–4015.
- Wegener, K.L. et al., 2008. Structural basis for the interaction between the cytoplasmic domain of the hyaluronate receptor layilin and the talin F3 subdomain. *Journal of molecular biology*, 382(1), pp.112–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18638481> [Accessed October 10, 2016].
- Werner, M.E. et al., 2011. Actin and microtubules drive differential aspects of planar cell polarity in multiciliated cells. *The Journal of cell biology*, 195(1), pp.19–26. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3187709&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2014].
- Werner, M.E. & Mitchell, B.J., 2012. Understanding ciliated epithelia: The power of *Xenopus*. *genesis*, 50(3), pp.176–185. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/dvg.20824> [Accessed September 15, 2016].
- Whitcutt, M.J., Adler, K.B. & Wu, R., 1988. A biphasic chamber system for maintaining polarity of differentiation of cultured respiratory tract epithelial cells. *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association*, 24(5), pp.420–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3372447> [Accessed September 15, 2016].
- Widdicombe, J.J.J.H. et al., 2015. Airway Gland Structure and Function. *Physiological reviews*, 95(4), pp.1241–319. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26336032> [Accessed August 23, 2016].
- Wiggins, J.F. et al., 2010. Development of a Lung Cancer Therapeutic Based on the Tumor Suppressor MicroRNA-34. *Cancer Research*, 70(14).
- Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G., 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), pp.855–862.
- Wijkstrom-Frei, C. et al., 2003. Lactoperoxidase and human airway host defense. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 29(2), pp.206–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626341> [Accessed August 25, 2016].
- Williams, C.L. et al., 2011. MKS and NPHP modules cooperate to establish basal body/transition zone membrane associations and ciliary gate function during ciliogenesis. - PubMed - NCBI. *The Journal of cell biology*, 192(6), pp.1023–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate1.inist.fr/pubmed/?term=MKS+and+NPHP+modules+cooperate+to+establish+basal+body/transition+zone+membrane+associations+and+ciliary+gate+function+during+ciliogenesis>. [Accessed April 26, 2016].
- Williams, S.E. et al., 2006. SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clinical science (London, England : 1979)*, 110(1), pp.21–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16336202> [Accessed August 25, 2016].
- Wilson, R.C. et al., 2015. Dicer-TRBP Complex Formation Ensures Accurate Mammalian MicroRNA Biogenesis. *Molecular Cell*, 57(3), pp.397–407.

- Winkelmann, A. & Noack, T., 2010. The Clara cell: a ‘Third Reich eponym’? *The European respiratory journal*, 36(4), pp.722–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20223917> [Accessed August 21, 2016].
- Wloga, D. et al., 2009. TLL3 Is a Tubulin Glycine Ligase that Regulates the Assembly of Cilia. *Developmental Cell*, 16(6), pp.867–876.
- Wolf, J. et al., 2014. Structural basis for Pan3 binding to Pan2 and its function in mRNA recruitment and deadenylation. *The EMBO journal*, 33(14), pp.1514–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24872509> [Accessed August 8, 2016].
- WORTHINGTON, W.C. & CATHCART, R.S., 1963. Ependymal cilia: distribution and activity in the adult human brain. *Science (New York, N.Y.)*, 139(3551), pp.221–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14001896> [Accessed May 3, 2016].
- Wren, K.N. et al., 2013. A differential cargo-loading model of ciliary length regulation by IFT. *Current biology : CB*, 23(24), pp.2463–71. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3881561&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 18, 2016].
- Wu, D. et al., 2014. Genome-wide association study combined with biological context can reveal more disease-related SNPs altering microRNA target seed sites. *BMC genomics*, 15, p.669. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25106527> [Accessed August 16, 2016].
- Wu, H. et al., 2009. Alternative processing of primary microRNA transcripts by Drosha generates 5' end variation of mature microRNA. *PLoS one*, 4(10), p.e7566. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19859542> [Accessed August 12, 2016].
- Wu, J. et al., 2014. Two miRNA clusters, miR-34b/c and miR-449, are essential for normal brain development, motile ciliogenesis, and spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24982181>.
- Wu, J. et al., 2014a. Two miRNA clusters, miR-34b/c and miR-449, are essential for normal brain development, motile ciliogenesis, and spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(28), pp.E2851-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24982181> [Accessed September 6, 2016].
- Wu, J. et al., 2014b. Two miRNA clusters, miR-34b/c and miR-449, are essential for normal brain development, motile ciliogenesis, and spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(28), pp.E2851-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24982181> [Accessed October 6, 2016].
- Wu, R., Yankaskas, J., et al., 1985. Growth and differentiation of human nasal epithelial cells in culture. Serum-free, hormone-supplemented medium and proteoglycan synthesis. *The American review of respiratory disease*, 132(2), pp.311–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3896079> [Accessed October 5, 2016].
- Wu, R., Nolan, E. & Turner, C., 1985. Expression of tracheal differentiated functions in serum-free hormone-supplemented medium. *Journal of cellular physiology*, 125(2), pp.167–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4055904> [Accessed October 5, 2016].
- Wurtzel, J.G.T., Kumar, P. & Goldfinger, L.E., 2012. Palmitoylation regulates vesicular trafficking of R-Ras to membrane ruffles and effects on ruffling and cell spreading. *Small GTPases*, 3(3), pp.139–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22751447> [Accessed October 14, 2016].
- Wyman, S.K. et al., 2011. Post-transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome complexity. *Genome research*, 21(9), pp.1450–61. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3166830&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 28, 2015].

- Yadav, S.P. et al., 2016. Centrosomal protein CP110 controls maturation of mother centriole during cilia biogenesis. *Development (Cambridge, England)*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26965371> [Accessed March 14, 2016].
- Yaghi, A. et al., 2012. Ciliary beating is depressed in nasal cilia from chronic obstructive pulmonary disease subjects. *Respiratory medicine*, 106(8), pp.1139–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22608352> [Accessed October 4, 2016].
- Yamakuchi, M., Ferlito, M. & Lowenstein, C.J., 2008. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), pp.13421–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18755897> [Accessed October 6, 2016].
- Yamashita, A. et al., 2005. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nature structural & molecular biology*, 12(12), pp.1054–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16284618> [Accessed August 8, 2016].
- Yang, J. et al., 2002. Rootletin, a novel coiled-coil protein, is a structural component of the ciliary rootlet. *The Journal of cell biology*, 159(3), pp.431–40. Available at: <http://jcb.rupress.org/content/159/3/431.full> [Accessed February 29, 2016].
- Yang, J. et al., 2005. The ciliary rootlet maintains long-term stability of sensory cilia. *Molecular and cellular biology*, 25(10), pp.4129–37. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1087714&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 24, 2016].
- Yang, X. et al., 2009a. miR-449a and miR-449b are direct transcriptional targets of E2F1 and negatively regulate pRb-E2F1 activity through a feedback loop by targeting CDK6 and CDC25A. *Genes & development*, 23(20), pp.2388–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19833767> [Accessed October 6, 2016].
- Yang, X. et al., 2009b. miR-449a and miR-449b are direct transcriptional targets of E2F1 and negatively regulate pRb-E2F1 activity through a feedback loop by targeting CDK6 and CDC25A. *Genes & development*, 23(20), pp.2388–93. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2764491&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2014].
- Yano, J., Valentine, M.S. & Van Houten, J.L., 2015. Novel Insights into the Development and Function of Cilia Using the Advantages of the Paramecium Cell and Its Many Cilia. *Cells*, 4(3), pp.297–314. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26230712> [Accessed October 15, 2016].
- Yasunaga, T. et al., 2015. The polarity protein Inturned links NPHP4 to Daam1 to control the subapical actin network in multiciliated cells. *The Journal of Cell Biology*, 211(5), pp.963–973. Available at: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201502043> [Accessed September 13, 2016].
- Yi, R. et al., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*, 17(24), pp.3011–3016. Available at: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1158803> [Accessed August 3, 2016].
- Yoda, M. et al., 2013. Poly(A)-Specific Ribonuclease Mediates 3'-End Trimming of Argonaute2-Cleaved Precursor MicroRNAs. *Cell Reports*, 5(3), pp.715–726.
- Yoshida, S. et al., 2012. Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6104), pp.226–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22983710> [Accessed July 26, 2016].
- You, Y. et al., 2004. Role of f-box factor foxj1 in differentiation of ciliated airway epithelial cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 286(4), pp.L650-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818891> [Accessed September 14, 2016].
- Yu, X. et al., 2008. Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. *Nature*

- Genetics*, 40(12), pp.1445–1453. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ng.263> [Accessed September 14, 2016].
- Yuan, S. et al., 2015. Intraciliary Calcium Oscillations Initiate Vertebrate Left-Right Asymmetry. *Current Biology*, 25(5), pp.556–567.
- Yuan, S. et al., 2015. Mir-34B/C and Mir-449a/B/C Are Required for Spermatogenesis, But Not for the First Cleavage Division in Mice. *Biology open*, 4(2), pp.212–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25617420> [Accessed February 19, 2015].
- Zahm, J.M. et al., 1990. Functional activity of ciliated outgrowths from cultured human nasal and tracheal epithelia. *Biorheology*, 27(3–4), pp.559–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2261521> [Accessed August 21, 2016].
- El Zein, L. et al., 2009. RFX3 governs growth and beating efficiency of motile cilia in mouse and controls the expression of genes involved in human ciliopathies. *Journal of cell science*, 122(Pt 17), pp.3180–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19671664> [Accessed September 24, 2014].
- Zekri, L., Kuzuoğlu-Öztürk, D. & Izaurralde, E., 2013. GW182 proteins cause PABP dissociation from silenced miRNA targets in the absence of deadenylation. *The EMBO journal*, 32(7), pp.1052–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23463101> [Accessed August 8, 2016].
- Zhang, E. et al., 2014. Long noncoding RNA ANRIL indicates a poor prognosis of gastric cancer and promotes tumor growth by epigenetically silencing of miR-99a/miR-449a. *Oncotarget*, 5(8), pp.2276–2292. Available at: <http://oncotarget.com/abstract/1902> [Accessed October 7, 2016].
- Zhang, H. et al., 2004. Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III. *Cell*, 118(1), pp.57–68.
- Zhao, H. et al., 2013. The Cep63 paralogue Deup1 enables massive de novo centriole biogenesis for vertebrate multiciliogenesis. *Nat Cell Biol*, 15(12), pp.1434–1444. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24240477>.
- Zhao, R. et al., 2014. Yap Tunes Airway Epithelial Size and Architecture by Regulating the Identity, Maintenance, and Self-Renewal of Stem Cells. *Developmental Cell*, 30(2), pp.151–165.
- Zhen, L. et al., 2016. Long noncoding RNA NEAT1 promotes glioma pathogenesis by regulating miR-449b-5p/c-Met axis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(1), pp.673–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26242266> [Accessed October 7, 2016].
- Zhou, F. et al., 2015. Gmnc Is a Master Regulator of the Multiciliated Cell Differentiation Program. *Current biology : CB*, 25(24), pp.3267–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26778655> [Accessed September 7, 2016].
- Zhou, H. et al., 2012. Deep annotation of mouse iso-miR and iso-moR variation. *Nucleic acids research*, 40(13), pp.5864–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22434881> [Accessed August 12, 2016].
- Zorc, M. et al., 2012. Catalog of microRNA seed polymorphisms in vertebrates. *PLoS one*, 7(1), p.e30737. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22303453> [Accessed August 16, 2016].