

Contribution des gènes des loci 5q11 et 11q23 à la multiciliogenèse et régulation de l'équilibre mucociliaire de l'épithélium des voies respiratoires au cours de la régénération in vitro

Amélie Cavard

▶ To cite this version:

Amélie Cavard. Contribution des gènes des loci 5q11 et 11q23 à la multiciliogenèse et régulation de l'équilibre mucociliaire de l'épithélium des voies respiratoires au cours de la régénération in vitro. Biologie moléculaire. Université Côte d'Azur, 2020. Français. NNT: 2020COAZ6006. tel-03200434

HAL Id: tel-03200434 https://theses.hal.science/tel-03200434

Submitted on 16 Apr 2021

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.





THÈSE DE DOCTORAT

Contribution des gènes des loci 5q11 et 11q23 à la multiciliogenèse et régulation de l'équilibre mucociliaire dans l'épithélium des voies respiratoires au cours de la régénération *in vitro*

Amélie Cavard

Institut de Pharmacologie Moléculaire et cellulaire

Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Sciences de la Vie et de la Santé d'Université Côte d'Azur Dirigée par : Brice Marcet Co-encadrée par : Laure-Emmanuelle Zaragosi Soutenue le : 29 Mai 2020 Devant le jury, composé de : Pascal Barbry, DRCE, IPMC Bénédicte Durand, PR, Institut Neuromyogène Xavier Gidrol, DR CEA, Laboratoire BGE Brice Marcet, DR2, IPMC Olivier Tabary, CR, Centre de Recherche Saint-Antoine Laure-Emmanuelle Zaragosi, CR, IPMC









Université Côte d'Azur

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé (ED85)

Thèse de doctorat

Présentée et soutenue par Amélie Cavard

Contribution des gènes des loci 5q11 et 11q23 à la multiciliogenèse et régulation de l'équilibre mucociliaire dans l'épithélium des voies respiratoires au cours de la régénération in vitro

Devant le jury composé de :

Président du jury	Dr. GIDROL Xavier Directeur de recherche CEA, Inserm, Laboratoire de Biologie à Grande Échelle
Rapporteur	Pr. DURAND Bénédicte Professeur des Universités, Institut NeuroMyoGène
Rapporteur	Dr. TABARY Olivier Chargé de Recherche, HDR, Inserm, Centre de Recherche Saint Antoine
Examinateur	Dr. BARBRY Pascal Directeur de Recherche classe exceptionnelle, CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire
Directeur de thèse	Dr. MARCET Brice Directeur de Recherche classe 2, CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire
Co-directrice de thèse	Dr. ZARAGOSI Laure-Emmanuelle Chargée de Recherche classe normale, Inserm, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire

Résumé

Les voies respiratoires sont bordées par un épithélium mucocilié constitué majoritairement de cellules basales, de cellules à mucus et de cellules multiciliées portant des centaines de cils motiles à leur pôle apical. Leur battement coordonné permet d'expulser les particules inhalées piégées dans le mucus. En cas de lésions, l'épithélium a la capacité de se régénérer à l'identique en maintenant un équilibre strict entre les proportions de chaque type cellulaire. Dans les maladies respiratoires chroniques comme la mucoviscidose, les inflammations et infections chroniques provoquent un remodelage de cet épithélium caractérisé par une hyperplasie sécrétoire et une perte progressive des cellules multiciliées.

Mon travail de thèse a consisté à apporter une meilleure compréhension des mécanismes contrôlant la régénération de l'épithélium respiratoire, prélude essentiel au développement de futures thérapies régénératives. Nous avons utilisé un modèle *in vitro* de culture d'épithélium des voies respiratoires humaines ou murines associé à des approches de séquençage haut-débit telles que le séquençage d'ARN sur cellules uniques.

La différenciation des cellules multiciliées à partir de cellules progénitrices requiert la génération de cils motiles, processus appelé multiciliogenèse. Mon laboratoire d'accueil a été le premier a démontrer que ce processus est contrôlé par les microARN miR-34b/c et miR-449a/b/c, ainsi que par *CDC20B*, gène hôte des miR-449 localisé sur le locus génomique humain 5q11. D'autres études ont montré par la suite que les gènes *MCIDAS* et *CCNO*, localisés à proximité de *CDC20B*/miR-449 sur le locus 5q11, contrôlent également la multiciliogenèse, faisant de ce locus un « hot spot » de régulateurs de multiciliogenèse.

Dans une première partie de mes travaux, nous avons identifié et caractérisé des variants des microARN miR-34/449, appelés isomiR-34/449. Ces isomiR, partageant certaines fonctions avec leurs homologues « canoniques », ont aussi des fonctions distinctes, et représentent ainsi un mécanisme additionnel de régulation de la multiciliogenèse.

Dans une deuxième partie de ma thèse, j'ai montré par analogie au locus 5q11, que les 3 gènes (*C11orf88, LAYN* et *BTG4*) les plus proches de la région génomique des miR-34b/c (locus 11q23) sont tous trois exprimés dans les cellules multiciliées. C11orf88, protéine de fonction inconnue, est fortement détectée dans les cils motiles, lui suggérant un rôle dans la fonction ciliaire. Ainsi, ce locus 11q23 constituerait également un autre « hot spot » de régulateurs de la multiciliogenèse.

Enfin, une dernière partie de mes travaux a contribué à établir une cartographie transcriptomique des différents types cellulaires au cours des différentes étapes de la régénération de l'épithélium respiratoire. Ceci nous a permis (1) d'identifier une nouvelle trajectoire de différenciation des cellules à mucus en cellules multiciliées et (2) de révéler des différences significatives selon le milieu de culture de prolifération et de différenciation utilisé sur la structure de l'épithélium, la composition cellulaire, et sur les profils d'expression génique des différents types cellulaires.

L'ensemble de mes travaux a permis d'apporter une compréhension plus complète des mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la régénération de l'épithélium respiratoire, et a fourni de nouveaux gènes candidats comme régulateurs potentiels de la multiciliogenèse.

Mots clés : épithélium, maladies respiratoires, cellules multiciliées, Single-cell RNA-seq

Summary

Airways are lined by a pseudostratified mucociliated epithelium which is mainly composed of basal, goblet and multiciliated cells harboring hundreds of motile cilia at their apical part. Their coordinated beating allows the expulsion of inhaled particles that get trapped in the mucus. Following tissue lesions, the epithelium must regenerate, and maintain a strict balance between proportions of each cell type. In chronic respiratory diseases, such as cystic fibrosis, chronic infections and inflammation lead to tissue repair defects and airway epithelium remodeling, characterized by secretory hyperplasia and progressive loss of multiciliated cells.

My PhD project aimed to improve our knowledge about mechanisms controlling the airway epithelium regeneration, which is a required step to the development of future regenerative therapies. We have used an *in vitro* cell culture model of human and murine airway epithelia and have performed single-cell RNA-sequencing approaches.

Multiciliated cells differentiate from progenitors to generate multiple motile cilia, a process called multiciliogenesis. My host laboratory has previously demonstrated that this process is controlled by both miR-34b/c and miR-449a/b/c microRNAs, together with *CDC20B*, miR-449 host gene which is localized in the 5q11 human genomic locus. This 5q11 locus was further established as a hot spot of multiciliogenesis regulators.

In a first part of my work, we identified and characterized variants of miR-34/449 microRNAs, called isomiR-34/449. These isomiRs, sharing certain functions with their "canonical" counterparts, also have distinct functions, and thus represents an additional mechanism for regulating multiciliogenesis.

In a second part of my thesis, I have demonstrated, by analogy to the 5q11 locus, that the 3 nearest genes (*C11orf88, LAYN* and *BTG4*) located in the genomic region of miR-34b/c (11q23 locus) were also expressed in multiciliated cells. Importantly, C11orf88, a protein of unknown function, was highly and exclusively expressed in motile cilia of multiciliated cells, suggesting a role in ciliary function. This 11q23 locus may constitute an additional hot spot of multiciliogenesis regulators.

Finally, a last part of my work contributed to established a transcriptomic cartography of distinct cell types during the constitutive steps of airway epithelium regeneration. This allowed us to (1) identify a new differentiation trajectory from goblet to multiciliated cells and (2) reveal that proliferation and differentiation cell culture media yield significant differences on epithelia morphology, cell composition and on the gene expression profiles of these distinct cell types.

Altogether data gathered during my PhD work have allowed to unravel new molecular mechanisms involved in airway epithelium regeneration, and has provided novel candidate genes as potential regulators of multiciliogenesis.

Keywords: epithelium, airway diseases, multiciliated cells, single-cell RNA-seq

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier l'association Vaincre la Mucoviscidose pour le soutien financier qu'elle attribue à notre équipe, ainsi que d'avoir financé cette thèse.

Ensuite, je souhaite remercier le Dr Pascal Barbry de m'avoir accueillie dans son équipe pour réaliser ces travaux. Je vous remercie pour la compréhension dont vous avez fait preuve, d'avoir été à mon écoute, ainsi que d'être toujours prêt à partager vos connaissances.

Je te remercie tout particulièrement Brice pour l'encadrement, les connaissances, et le soutien que tu m'as apporté tout au long de cette thèse malgré tes absences. Ton exemple m'inspire : ton énergie sans faille et tes idées sans fin sont vivifiantes et une véritable stimulation pour qui t'entoure. De plus, tu sais quand et comment témoigner ta compréhension et apporter tes encouragements. Une positivité (malgré les papiers Hedgehog !) dont je ne te remercierai jamais assez.

Laure-Emmanuelle, tu avais des projets à la pelle, deux autres étudiantes à t'occuper, et pourtant tu as su trouver le temps pour me guider tout au long de ma thèse. Ta pédagogie, ton savoir-faire et tes conseils avisés sur le plan professionnel comme personnel, m'ont apporté ce dont j'avais besoin pour avancer. Je te remercie encore pour toute l'aide que tu m'as apporté pendant ces années de thèse.

Je remercie Bénédicte Durand, Olivier Tabary et Xavier Gidrol d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, et Olivier Tabary et Bénédicte Durand d'avoir évalué ce manuscrit.

Gilles, tes chansons, tes discours, tes coups de gueules, tes divagations et ton humour me manqueront à un point inimaginable lorsque ma thèse au laboratoire sera terminée. Ton animation et ta joie de vivre sont un véritable bonheur pour qui travaille avec toi, mais ce ne serait pas justice de ne retenir que cela de toi. Tu as toujours été prêt à m'aider dès que j'avais besoin d'aide, toujours prêt à apporter ton expertise et tes connaissances et je t'en remercie infiniment.

Cédric, je t'en ai fait baver avec mes connaissances de noob en bio-informatique et avec les analyses Single-Cell (Laure m'a un peu aidé), tu m'as détesté (j'en ai la preuve par mail !), mais ces casses-têtes n'auront pas eu raison de nous (merci à Laure et Christophe aussi), et ça en valait la peine, vu la belle histoire qui ressortira de nos analyses (non ce n'est pas fini !). En tout cas, tu as toute ma gratitude, merci ! Et j'espère que tu n'as pas trop eu envie de jeter ton ordinateur par la fenêtre à cause de moi quand-même !

Sophie, la bonne humeur de l'institut, je te remercie pour tout le temps que tu as passé avec moi pour les acquisitions SP8 et STED, ton aide m'a été très précieuse. Notre conversation SMS se résumant à des « c'est bon » de ta part pour me dire que l'acquisition est terminée restera un très bon souvenir de cette période. Je remercie Fred aussi pour l'aide qu'il m'a apporté tout au long de ma thèse sur la plateforme de microscopie, et Julie pour avoir été toujours prompte à m'aider dès que j'en avais besoin.

Magali, un grand merci pour toute l'aide que tu m'as apporté au cours de cette dernière année de thèse. Sans toi ces dernières manips auraient été vraiment très compliquées. Par ailleurs, ta promptitude à rigoler ont aussi apporté du positif pendant ces derniers mois, qui était plus que le bienvenu !

Un double remerciement s'impose pour toi, Marie-Jeanne. Premièrement pour ta bonne humeur au labo, ton aide pour les manips (Single-Cell, et bien d'autres) ! Deuxièmement de m'avoir fait découvrir ce magnifique loisir qu'est la plongée sous-marine en bouteille, et la faune et la flore marine. Jamais je n'aurais imaginé trouver autant de plaisir à passer autant de temps dans la mer, moi qui avais si peur de mettre la tête sous l'eau. Je te remercie d'avoir insisté (pas trop fort), après l'échec de mon premier baptême et de m'avoir aidé à surmonter cette peur. J'en suis ressortie grandie, et ce sont des souvenirs que je chérirai précieusement !

Karine, je te remercie pour ta bonne humeur au labo, et particulièrement de m'avoir aidé à designer les promoteurs des gènes du locus !

Virginie et Géraldine, vos sourires, votre gentillesse m'ont touché au plus haut point au cours de ma thèse, notamment à mon retour après mon accident. Bien évidemment, je vous remercie aussi pour toutes les manip plateforme que vous avez réalisées.

Christophe, nous n'avons pas eu beaucoup l'occasion de faire connaissance, néanmoins je tiens à te remercier pour l'aide directe et indirecte que tu m'as apporté concernant les analyses bio-informatiques. Kévin, merci pour toutes les analyses bio-info dont tu prends soin.

Bruno, merci de m'avoir partagé ton expertise sur la voie Hedgehog et pour le coup de main que tu m'as donné sur les manips associées. Travailler avec toi était un véritable plaisir.

Alain, je te remercie de m'avoir aidé à prendre soin des souris, et pour la coordination à Anipro. Ta sympathie m'a beaucoup touchée.

Emmanuella, voisine de couloir et voisine de résidence, nos petites discussions lors de nos rencontres m'ont toujours fait très chaud au cœur, je te remercie pour te gentillesse.

Olivier, bien que nous ayons eu nos désaccords, je tiens à te remercier pour tout ce que tu m'as appris au début de ma thèse, et pour la collaboration pour les marquages C11 sur tes épendymo.

Sarah et Yvon, partager le bureau avec vous a été un vrai bonheur, bien que j'en étais absente la plupart du temps. Un bon bol d'air frais, gardez votre joie de vivre, elle est très plaisante.

Audrey, ma chère amie, je te remercie infiniment d'avoir été présente pour moi au laboratoire au cours de ces années (même quand j'étais absente). Un énorme merci aussi pour tout le temps hors labo que nous avons passé ensemble. Tu as créé les souvenirs faisant partie des plus beaux, et j'espère que notre amitié se poursuivra au-delà de la thèse. Bon courage à toi pour la fin !

Serena et Alberto, vous êtes tous les deux de véritables rayons de soleil. Vous croiser au labo est toujours une vraie joie !

Gauthier, c'est toujours un grand plaisir de te croiser dans les couloirs, ton sourire chaleureux restera un très bon souvenir.

Claire, tu es non seulement une soignante hors pair, mais par-dessus tout, tu es une amie merveilleuse. Tu as été là pour moi pendant les moments les plus difficiles, et je ne te remercierai jamais assez pour cela. Sache que je serai toujours présente pour toi également lorsque tu en auras besoin. Thomas, ta cool attitude, et tout ce que nous avons partagés sont de magnifiques souvenirs, merci pour ta présence et ton amitié

Combot, le thésard power de l'auberge du Combot Fringant nous lie ! Merci pour ces plus de dix années d'amitié, restée intacte malgré la distance. Tes coups de fil ont toujours eu le don de me remonter le moral, tu es une des personnes les plus précieuses de ma vie, et j'espère que notre amitié durera encore au moins dix ans de plus !

Les copains de Brest (Michaud, Nico, Céline, Romain, Céline, Sébastien, Alexandra, Vlap, Laeti, Thibaut, Mickaël, Maël, Thomas, Antho, Antoine et tous les autres) bien que je sois partie loin, vous avez su vous montrer présent pour moi d'une manière ou d'une autre depuis que j'ai quitté ma terre natale, et je vous en remercie. Ces années d'amitié, très longues pour certains, et les souvenirs associés resteront gravée en moi. Dédicace spéciale à Nico et Thibaut pour les petites soirées à chacun de mes passages à Paris pour les congrès !

Andrée, Marie, Lucie, Nico grosse pensée pour vous remercier d'avoir relu des petits bouts de ma thèse à la recherche de coquilles.

Un grand merci à toutes les personnes qui ont joué un rôle, même minime au cours de ces années, que je n'ai pas l'occasion de citer dans ces pages de remerciements.

Michèle et Eric, depuis notre rencontre vous avez fait preuve d'une gentillesse et d'un soutien envers moi qui m'a beaucoup touché. Je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi. Et je te remercie particulièrement Michèle, pour le temps que tu m'as accordé et d'avoir relu presque l'intégralité de mon manuscrit à la chasse aux fautes d'orthographe. Mille mercis.

Laëtitia, Jérémie, Stéphanie, Thibault et aussi Magalie, mes frangins et frangines, malgré la distance, vous êtes dans mon cœur pour la vie. Merci à vous pour vos pensées, attentions, soutiens qui comptent beaucoup pour la petite sœur que je suis !

A mes parents, bien que je sois partie loin, vous avez toujours été là pour moi en toute circonstance, et un véritable soutien et ancrage lorsque tout allait mal. Sans vous rien n'aurait été possible, ma gratitude envers vous est immense.

Loïc, j'aimerais te remercier tout spécialement, d'avoir pris soin de moi durant cette dernière année. Depuis notre rencontre ma vie a énormément changé, et pour le mieux, malgré les épreuves que nous avons traversées. Je ne te remercierai jamais assez pour toutes les choses que tu m'as apporté et pour le courage que tu as su me transmettre.

Abréviations

Abréviation	Signification	Abréviation	Signification
ABC	ATP Binding Cassette	JATD	Jeune syndrome
Ac-tub	Acetylated tubulin	JBST	Syndrome de Joubert
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	КВ	KiloBase
ADPKD	Maladie polykystique rénale autosomique dominante	КО	Knock-out
Ago	Argonaute	KRT	Kératine
AGR	Anterior Gradient	KSFM	Keratinocyte Serum Free Medium
ALI	Interface Air-Liquide	LAYN	Layilin
ALMS	Syndrome Alström	LCA	Amaurose congénitale de Leber
AMM	Autorisation de mise sur le marché	LEF	Lymphoid enhancer-binding factor
AMP	Adénosine MonoPhosphate	LFNG	Lunatic fringe
AMPc	Adénosine MonoPhosphate	LNA	Locked nucleic acids
	cyclique		
ANO	Anoctamin	LPO	Lactoperoxydase
APC	Anaphase Promoting Complex	LRP	Lipoprotein receptor-related proteins
ARN	Acide Ribonucléique	М	Mitose
ARPKD	Maladie polykystique rénale	МАРК	Mitogen-Activated Protein Kinase
	autosomique récessive		
ASL	Airway surface liquide	MARCKS	Myristoylated alanine-rich C kinase
АТР	Adénosine TriPhosphate	MCIDAS	Multiciliate Differentiation And DNA
			Synthesis Associated Cell Cycle Protein
ATPase	Adénosine TriPhosphate synthase	MiARN	MicroARN
B9D2	B9 domain containing	MiARNdb	MicroARN double brin
Bbof	Basal body orientation factor	MiARNsb	MicroARN simple brin
BBS	Syndrome de Bardet-Biedl	MiR	MicroARN
BBSome	Complexe de 8 BBS	miRISC	miRNA-induced silencing complex
BCL	B-Cell leukemia	MKS	Syndrome de Meckel
BEGM™	Bronchial Epithelial Cell Growth Medium	ММР	Métalloprotéinase
BMP	Bone-morphogenetic Proteins	Мо	Morpholino
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive	MSN	Moesin
BTG	B-Cell Translocation Gene	mTEC	Mouse Tracheal Epithelial Cells
C11orf88	Chromosome 11 open reading frame 11	мтос	MicroTubule Organising Center
CaCC	Canaux chlorure activés par le Calcium	MUC	Mucine
CAM	Molécules d'adhésion intercellulaire	Myb	Myeloblastosis oncogene
CapZ	Actin-capping protein	MYC	Myelocytomatosis oncogene
CapZIP	CapZ Interactin Protein	MYH10	Myosine 10
Cas-9	CRISPR Associated Protein 9	NE	Neuro-endocrine
CC2D2A	Coiled-coil and C2 domain containing 2A	NEB	Neuroepithélial bodies
CCDC	Coiled-Coil Domain Containing	NEDD1	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 1
CCL	C-C motif ligand	ΝϜκΒ	Nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells
CCND	Cyclin D	NICD	Notch IntraCellular Domain
CCNO	Cyclin O	NPHP	Néphronophtisis
CCSP	Clara cell secretory protein	NSCLC	Non Small Cells Lung Cancer
CCTα	Cytidylyltransferase-a	Nubp1	Nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells
CD	Cluster of differentiation	0 ²	Oxygène
CDC20B	Cell Division Cycle	ODF	Outer dense fiber protein

Abréviation	Signification	Abréviation	Signification
CDK	Cyclin-Dependent Kinase	OFD	Syndrome Oral-facial-digital
CDK5RAP2	CDK 5 Regulator Subunit associated	p160ROCK	Protéine kinase associée à Rho
	Protein 2		
CED	Syndrome Sensenbrenner	PAMP	Pathogen-associated molecular
	/Dysplasie cranioectodermale		pattern
Cen-2	Centrine 2	РС	Polycystine
CEP	Centrosomal Protein	PCR	Polymerase Chain Reaction
CF	Cystic Fibrosis	РСМ	Matériel péricentriolaire
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane	PCNT	Péricentrine
	conductance Regulator		
Cl-	Ions chlorure	РСР	Planar Cell Polarity
CO ²	Dioxyde de carbone	РІЗК	Phospholnositide 3 Kinase
CP110	Centriolar coiled-coil Protein 110	РК	Prickle
СРАР	Centrosomal-P4.1-Associated-	РКА	Protéine kinase dépendante de l'AMPc
	Protein		
СРМ	Cyclopamine	РКС	Protéine kinase dépendante des
			calmodulines
Cre-Lox	Causes recombination	PKG	Protéine kinase dépendante du GMPc
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced	PLD	Maladie du foie polykystique
	Short Palindromic Repeats		
CSL	CB1 Suppressor of Hairless Lag1	PLK4	Polo-Like Kinase4
DAAM1	Dishevelled-Associated Activator of	PLP	Péricentrine-Like
	Morphogenesis 1		
DAPT	N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-	PNEC	Pulmonary Neuro-Endocrine Cells
	alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester		
DCP	Dyskinésie Ciliaire Primaire	Pri-miARN	MicroARN primaires
DEUP1	Deuterosome protein 1	PTCH1	Patched 1
DGCR8	DiGeorge syndrome Chromosomal	q-PCR	Quantitative-Polymerase Chain
	Region 8		Reaction
DLG3	Disks large homolog 3	R-Ras	Ras Related protein
DLK	Delta-like homolog	RBPJk	Recombination signal binding protein
			for immunoglobulin kappa J region
DLL	Delta-like	RCPG	Récepteurs membranaires Couplés au
			Protéines G
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	RFX	Regulatory Factor X
DNAH	Dynein Axonemal Heavy Chain	RGCM	Génération Réduite de Cil Motile
DNALI1	Dynein Axonemal Light	RHAMM	Hyaluronan mediated motility receptor
	Intermediate Chain		
DRC	Complexe Régulateur de Dynéines	RISC	RNA-induced silencing complex
DYNC2H1	Dynein Cytoplasmic 2 Heavy chain 1	RNA-seq	RiboNucleic Acid - sequencing
EB1	End Binding protein	ROCK	Rho associated coiled-coil containing
			protein kinase
EBP50	Ezrin-radixin-moesin-binding	ROS	Espèces oxygénées réactives
	phosphoprotein-50		
Eda	Ectodysplasin-A	RP55	Rétinite pigmentaire
Edar	Ectodysplasin-A Receptor	RSPH	Radial spoke head
EGF	Epidemial Growth Factor	S	Synthesis phase
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	SAM	Sterile alpha motif
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent	SAS6	Spindle assembly abnormal
	Assay		
ELMO	Eukaryotic EnguLfment and cell	SAP30	Sin3A associated protein 30
	MOtility		
ERK	Extracellular signal-Regulated	SCGB	Secrétoglobine
	Kinases		

Abréviation	Signification	Abréviation	Signification
ERM	Ezrine / Radixine / Moésine	SCLC	Small-cell lung cancer
ETS	E26 transformation-specific	SNTN	Sentan
EVC	Syndrome Ellis van Creveld	SHH	Sonic Hedgehog
FAK	Focal Adhesion Kinase	shARN	Short hairpin ARN
FAP	Flagellar Associated Protein	siARN	Small interference ARN
FGF	Fibroblast Growth Factor	scRNA-seq	Single-Cell RNA sequencing
FLAM8	FLAgellar Member8	SIRT	Sirtuin
FLNA	Filamine A	SLS	Syndrome de Senior-Loken
Fmi	FlaMIngo	SMAD	Interleukine-D
FOX	Forkhead box	SMO	Smoothened
FUZ	Fuzzy	SP-A	Surfactant Protein A
G1	Gap 1 phase	SPAG	Sperm associated antigen
G2	Gap 2 phase	SPDEF	SAM pointed domain containing ETS
			transcription factor
GCNT	Glucosaminyl (N-acetyl)	SRPR	Signal recognition particle receptor
	Transferase		
G-CSF	Granulocyte colony stimulating facto	SRTD	Short rib polydactyly
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor	STIL	SCL/TAL1 interrupting locus
GFP	Green Fluorescente Protein	SUFU	Suppressor of fused
GLI	Gliome	TAZ	Tafazzin
GM-CSF	Granulocyte/macrophage colony	TCF	Transcription factor
	stimulating factor		
GMNC	Géminine C	TCTN1	Tectonic family member
GMPc	Guanosine MonoPhosphate	TGF	Transforming growth factor
GPR	G Protein-coupled Receptor	ТІМР	Tissue inhibitor of metalloproteases
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3	TLR	Toll-Like Receptor
GTPases	Guanosine TriPhophaste synthase	TMEM	Transmembran
H6PD	Hexose-6-phosphate	TNF	Tumor necrosis factor
	dehydrogenase		
HAEC	Human Airway Epithelial Cells	ТР	Tumor Protein
HCO3-	lon bicarbonate	TRAM	Translocating chain-associated
			membrane protein
HDAC	Histone DéACétylase	TSB	Target Site Blocker
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1- pipérazine éthane sulfonique)	TSLP	Thymic Stromal Lymphopoletin
HES	Hairy/enhancer of split	TTBK2	Tau tubulin kinase 2
HEY	Hes-related with YRPW motif	TUBG1	Tubulin gamma 1
Hh	Hedgehog	UI	Unité Infectieuse
HSP70	Heat Shock Protein	UTP	Uridine TriPhosphate
IFT	IntraFlagellar Transport	UTR	Untranslated Transcribed Region
IL	Interleukine	Vangl	Vang-Gogh-like
INPP5E	Inositol polyphosphate-5- phosphatase E	VEMS	Volume Expiré Moyen / seconde
JAG	Jagged	WNT	Wingless integration site
JAK-STAT	Janus kinase - Signal Transducers	ZO	Zonula Occludens
	and Activator of Transcription		
JAM	Molécules d'adhésion	γ-TURC	γ Tubulin Ring Complex
	jonctionnelles		

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 1 : Les voies respiratoires	1
Chapitre 2 : L'épithélium des voies respiratoires – Composition, fonction et distribution cellulaire	e 4
I. Composition cellulaire de l'épithélium des voies respiratoires	5
I.1 – Les cellules basales	6
I.2 – Les cellules suprabasales	6
I.3 – Les cellules sécrétrices ou cellules « club »	7
I.4 – Les cellules à mucus (cellules en gobelet)	7
I.5 – Les cellules glandulaires	8
I.6 – Les ionocytes	9
I.7 – Les cellules pulmonaires neuro-endocrines (PNEC)	10
I.8 – Les cellules Tuft ou Brush	10
I.9 – Les cellules multiciliées	11
II. Distribution cellulaire de l'épithélium des voies respiratoires	. 11
III. Fonctions de l'épithélium des voies respiratoires	16
II.1 – La clairance mucociliaire	16
II.2 - Réponse aux toxiques et interaction avec le système immunitaire	17
II.3 - Barrière épithéliale	18
I.3.A - Jonctions cellulaires non communicantes	19
I.3.B - Jonctions cellulaires communicantes	21
Chapitre 3 : Les cils	21
I - La structure du cil	22
I.1 – Les centrioles / centrosomes	22
I.2 - Les corps basaux	26
I.3 – La zone de transition	27
I.4 – La poche ciliaire (ciliary pocket)	29
I.5 – L'axonème	29
I.5.A - Cil primaire (9+0)	31
I.5.B - Cil motile (9+2)	32
I.5.C - Exceptions	33
I.6 – Transport Intra-Flagellaire (IFT)	35
I.7 – L'apex	36
II. Fonction des cils	. 37

II.1 – Cil primaire	37
II.1.A- Voies de signalisation	37
II.1.B - Mécanosenseur	37
II.1.C - Photosensibilité	37
II.2 - Cils motiles	38
Chapitre 4 : Régénération de l'épithélium des voies respiratoires	38
I. Modèles d'étude	38
I.1 - Modèles in vivo	38
I.1.A – La souris (mus musculus)	38
I.1.B – L'humain	39
I.1.C - Le poisson zèbre (danio rerio)	39
I.1.D - Le xénope (xenopus laevis)	41
I.2 - Modèles in vitro	42
I.2.A - Modèle de culture primaire de cellules épithéliales des voies respirato humaines (HAEC) en Interface Air-Liquide (ALI)	ires 42
I.2.B - Modèle de culture primaire de cellules épithéliales de trachées de sou (mTEC) en Interface Air-liquide (ALI)	ris 43
I.2.C - Modèle de culture de cellules épendymales primaires sur lame de verr	e 44
I.2.D - Organoïdes	44
II. La régénération de l'épithélium des voies respiratoires	45
II.1 - Colonisation de la lame basale dénudée : migration et prolifération	45
II.2 – Polarisation de l'épithélium des voies respiratoires	46
II.3 – Initiation de la différentiation cellulaire : quels progéniteurs ?	47
II.4 - La multiciliogenèse (différenciation des cellules multiciliées)	49
II.4.A - Arrêt du cycle cellulaire	49
II.4.B - Amplification des centrioles	50
II.5 - Migration et ancrage des corps basaux au pôle apical - Implication et remodelage du cytosquelette d'actine	58
II.6 - Motilité des cils	63
Chapitre 5 - Les mécanismes moléculaires régulateurs de la différenciation de l'épithélium des voies respiratoires	65
I. Les voies de signalisation	66
I.1 - La voie de signalisation de l'EGF (Epidermal Growth Factor)	66
I.2 - La voie de signalisation Notch	68
I.4 - La voie de signalisation dépendante des BMP	70

I.3 - La voie de signalisation TGF-B	72
I.5 - La voie de signalisation WNT/β-caténine	73
I.6 - La voie de signalisation Hedgehog (Hh)	76
II - La famille des microARN miR-34/449	80
II.1 - Les microARN	80
II.2 - Les isomiR	82
II.3 - Les miR-34/449	83
II.3.A - Rôle dans la multiciliogenèse	
II.3.B - Localisation génomique	
III. Les facteurs de transcription	87
III.1 - Le facteur de transcription TP63	
III.2 - Le facteur de transcription TP53	87
III.3 – Le complexe E2F/Géminine/TP73	
III.3.A - Les facteurs de transcription E2F	88
III.3.B - La famille des Géminines	89
III.3.C - Le facteur de transcription TP73	91
III.4 - Facteur de transcription MYB	91
III.5 - Facteur de transcription FOXJ1	93
III.6 - Facteurs de transcription RFX	94
IV. Autres acteurs	95
IV.1 - CDC20B	95
IV.2 - CCNO	98
Chapitre 6 : Les maladies respiratoires	
I. Ciliopathies non-motiles	100
II. Ciliopathies motiles ou Dyskinésies Ciliaires Primitives (DCP)	102
III. Dyskinésies ciliaires secondaires	102
III.1 - Asthme	103
III.2 - Bronchopneumopathie chronique obstructives (BPCO)	106
III.3 - La Mucoviscidose	108
Méthodologie	116
Chapitre 1 : Méthodologie des modèles d'études	116
I. Modèle de culture primaire de cellules épithéliales des voies respiratoires humaines (Interface Air-Liquide (ALI)	HAEC) en 116
II. Modèle de culture primaire de cellules épithéliales de trachées de souris (mTEC) en la Air-liquide (ALI)	nterface
······································	

	III. ARN interférence dans les modèles de culture ALI de HAEC et mTEC	. 118
	Chapitre 2 : Méthologie du séquençage transcriptomique de cellules uniques (« Single-cell RNA	4-
	seq »)	. 119
Ré	ésultats	. 122
	Chapitre 1 : Caractérisation des isomiR de la famille miR-34/449	. 122
	Chapitre 2 : Caractérisation des gènes du locus des miR-34b/c C11orf88, LAYN et BTG4 pendan régénération in vitro de l'épithélium des voies respiratoires	it la . 124
	Chapitre 3 : Identification de nouvelles dynamiques de différenciation cellulaire pendant la régénération de l'épithélium des voies respiratoires humaines par Single-cell RNA-seq	. 126
	Chapitre 4 : Influence du milieu de culture sur les dynamiques de différenciation pendant la régénération <i>in vitro</i> de l'épithélium des voies respiratoires humaines	. 129
	Chapitre 5 : Rôle de la voie Sonic Hedgehog pendant la régénération <i>in vitro</i> de l'épithélium de voies respiratoires humaines en culture ALI	es . 131
	I. Contexte / Avant-propos	. 131
	II. Introduction	. 131
	III. Résultats	. 132
	III.1 – Etude de l'expression des gènes de la voie Hh dans l'épithélium des voies respiratoires	. 132
	III.2 – Effet de l'inhibition de la voie Hh sur la différenciation de l'épithélium des v respiratoires	oies . 134
	III.3 – Effet de la suractivation de la voie Hh sur la différenciation de l'épithélium o voies respiratoires	des . 136
	III.4 – Effet de la modulation de la voie Hh sur l'expression des facteurs de transcription GLI	. 137
	III.3 – GLIS3 un acteur de la voie Hh non canonique impliqué dans la	
	multiciliogenèse ?	. 138
	IV. Conclusion	. 140
Ré	ésultats additionnels & Discussion	. 142
	I. Les 5'-isomiR-34b et 5'-isomiR-449c	. 142
	II. Les loci 5q11 et 11q23 : deux loci « multiciliaires » ?	. 145
	II.1 – Rôle du locus 5q11 humain dans la multiciliogenèse	. 145
	II.2 – Rôle du locus 11q23 humain dans la multiciliogenèse	. 146
	II.2.A – C11orf88	. 147
	11.2.B – LAYN	. 156
	II.2.C – BTG4	. 157
	III. Mécanisme de contrôle transcriptionnel des loci 5011 et 11023	. 158
	IV. Locus 11g23 et dyskinésies ciliaires primitives ?	. 160
		-

V. Implication de la voie Hh dans la multiciliogenèse	161
VI. Identification des populations composant l'épithélium des voies respiratoires pendant la	
régénération <i>in vitro</i>	166

Liste des figures

Figure 1 : Voies respiratoires extra-thoraciques	1
Figure 2 : Voies respiratoires intra-thoraciques	2
Figure 3 : Alvéole pulmonaire	3
Figure 4 : Epithélium pseudostratifié des voies respiratoires (Ruiz-Garcia et al, 2019)	5
Figure 5 : Représentation schématique de chaque type cellulaire composant l'épithélium	n des
voies respiratoires sans notion de proportion quantitative (NE= neuro-endocrine)	
(Vaincrelamuco.org)	5
Figure 6 : Cellule à mucus	7
Figure 7 : Structure d'une glande sous-muqueuse et composition cellulaire de l'épithéliu	m la
tapissant (adapté de Collawn et al, 2012)	8
Figure 8 : « Neuroepithélial body »	10
Figure 9 : Cellule multiciliée	11
Figure 10: Distribution cellulaire de l'épithélium le long des voies respiratoires de l'huma	in et
de la souris (adapté de Rao Tata, Rajagopal, 2017)	13
Figure 11 : Echantillonnage des voies respiratoires pour le "Lung Atlas" (Deprez et al, 201	19)
	14
Figure 12 : Typage cellulaire des voies respiratoires du « Lung Atlas » (Deprez et al, 2019) 14
Figure 13 : Distribution des types cellulaires dans les voies respiratoires (Deprez et al, 20	19)
	15
Figure 14 : Liquide de surface des voies respiratoires (adapté de Deckel et al, 2012)	16
Figure 15 : Jonctions cellulaires (adapté de Giepmans 2009)	19
Figure 16: Structure d'un cil (adapté de Pederson et al, 2012)	21
Figure 17 : Structure d'un centriole (A) et ses composants microtubulaires (B) (adapté de	ġ
Kollman et al, 2011)	22
Figure 18 : Structure d'un centriole immature (adapté de Loncarek, 2018 et Dawe, 2007)	22
Figure 19 : Structure d'un centriole mature (adapté de Dawe et al, 2007)	23
Figure 20 : Matériel péricentriolaire organisé autour du centriole (adapté de Mennella 20	012)
	24
Figure 21 : Satellites centriolaires (adapté de Prosser et al, 2020)	25
Figure 22: Structure du corps basal (adapté de Dawe et al, 2007 et Pedersen et al 2012).	26
Figure 23 : Zone de transition (adapté de Gonzalves, Pelletier, 2017)	27
Figure 24 : Interactions entre les modules MKS, NPHP et Cep290 dans la zone de transitie	on
(adapté de Czarnecki & Shah, 2012)	27
Figure 25 : Poche ciliaire (adapté de Ke & Wang, 2014)	29
Figure 26 : Structure de l'axonème ciliaire (adapté de Ke & Wang, 2014)	30
Figure 27 : Structure de l'axonème du cil primaire (Sun et al, 2019)	31
Figure 28 : Structure de l'axonème 9+2 (adapté de Lindemann & Lesich, 2010)	32
Figure 29 : Nœud embryonnaire (adapté de Yuan et al, 2015)	33
Figure 30 : Bulbe olfactif	33
Figure 31 : Kinocils et stéréocils de l'oreille interne (adapté de Schwander et al, 2010)	34
Figure 32 : Transport Intra-Flagellaire (adapté de Pedersen et al, 2012)	35
Figure 33 : Structure de l'apex des cils primaires et motiles (adapté de Soares et al, 2019)36

Figure 34 : Organismes unicellulaires ou cellule propulsées par un ou des cil(s)/flagelles 38
Figure 35 : Organes du poisson zèbre présentant des cil (Song et al, 2016)
Figure 36 : Modèle du xénope (adapté de Dubaissi et al, 2010 et Walentek et al, 2017) 41
Figure 37 : Modèle de culture en Interface Air-Liquide (ALI)
Figure 38 : Cellules épendymales de souris pour la culture cellulaire (Mercey et al, 2019) 44
Figure 39 : Régénération de l'épithélium des voies respiratoires
Figure 40 : Polarisation planaire de l'épithélium des voies respiratoires (adapté de Vladar et
al. 2015)
Figure 41 : Les cellules basales et sécrétrices : des progéniteurs dans l'épithélium des voies
respiratoires (adapté de Rao Tata et al. 2017) 48
Figure 42 : Duplication des centrioles (adapté de Bettencourt et al. 2007)
Figure 43 : Mécanismes moléculaire de l'assemblage du procentriole (adapté de Tang et al.
2013) 51
Figure 44 : Flongation distale unidirectionnelle du microtubule A coiffé du v-TURC (adapté de
Canaday et al. 2015).
Figure 45 : Désengagement des centrioles (adapté de Mardin et al. 2012)
Figure 46 : Amplification des centrioles par la voie centrosomale (adapté de Tang et al. 2013)
Figure 47 : Amplification des centrioles (adapté de Meunier et al. 2016) 54
Figure 48 · Phases d'amplification deutérosomale (adapté de Al Jord et al. 2014) 55
Figure 49 : Amplification centriolaire en absence du centrosome (adapté de Ravamaibi et
Roy 2020)
Figure 50 : Amplification centriolaire en absence de deutérosomes (adanté de de Ravamaihi
et Boy 2020)
Figure 51 · Amplification centriolaire en absence de centrosome et de deutérosomes (adanté
de de Ravamaibi et Roy 2020) 58
Figure 52 · Migration en fusée des corns basaux grâce au système d'actine-myosine (adanté
de Vicente Manzanares et al. 2009) 59
Figure 53 · Cytosquelette anical autour des corps basaux (adapté de Tateishi et al. 2017) 59
Figure 54 : Réseau d'actine anical et sous-anical orientant les corps basaux (adapté de
Meunier & Azimzadeh 2016) 60
Figure 55 : Liaison des centrioles aux vésicules ciliaires par l'intermédiaire de Chibby (adapté
de Burke et al. 2014) 62
Figure 56 · Glissement des bras dynéines permettant le ploiement ciliaire 63
Figure 57 : Battement ciliaire en deux couns (adanté de Baidt 2014) 64
Figure 58 : Coordination des cils formant une onde métachronale (adapté de Brooks &
Wallingford 2014) 65
Figure 59 · Voie de signalisation de l'EGE (adapté de Cappione et al. 2012) 66.
Figure 60 : Expression des mucines induite par la voie de signalisation EGER (adapté de
Burgel et al. 2000)
Figure 61 : Voie de signalisation Notch (adanté de Kitagawa et al. 2016) 68
Figure 62 : Signalisation de la voie Notch dans la différenciation de l'énithélium des voies
respiratoires (adanté de Pardo-Saganta et al. 2015) 60
Figure 63 · Voie de signalisation BMP (adanté de Sagorny et al. 2012) 71
There are subministration birin (adapte de Sagorny et al, 2012)

Figure 64 : Rôle de la voie BMP dans la multiciliogenèse	. 72
Figure 65 : Voie de signalisation TGF-β (adapté de Kahlem et al, 2009)	. 72
Figure 66 : Rôle de la voie de signalisation TGF-β dans l'élongation du cil (Tözser et al, 201	5)
	. 73
Figure 67 : Voie de signalisation WNT/-caténine (adapté de Baarsma et al, 2017)	.74
Figure 68 : Implication de la voie de signalisation WNT/β-caténine dans la différenciation α	de
l'épithélium des voies respiratoires (adapté de Haas et al, 2019)	. 75
Figure 69 : Voie de signalisation Hedgehog dans le cil primaire (adapté de Gorojankina et a	al,
2016)	. 76
Figure 70 : Localisation des membres de la voie Hh dans les cellules multiciliées bronchiqu	ies
(Mao et al,2018)	. 77
Figure 71 : Localisation d'acteurs de la voie Hh non-canonique dans les cellules multiciliée	S
bronchiques (Mao et al, 2018)	. 77
Figure 72 : Localisation de SHH dans les cellules multiciliées nasales (Belgacemi et al, 2020)78
Figure 73 : Sécrétion de SHH dans les compartiments apical et baso-latéral pendant la	
différenciation de l'épithélium des voies respiratoires nasales humaines en culture ALI	
(Belgacemi et al, 2020)	. 79
Figure 74 : Localisation des membres de la voie Hedgehog dans l'épithélium des voies	
respiratoires bronchiques de personnes atteintes de BPCO ou non (Belgacemi et al, 2020)	. 80
Figure 75 : Biogenèse des miARN (adapté de He et al, 2004)	.81
Figure 76 : Les isomiR (Neilsen et al, 2012)	. 82
Figure 77 : Proportion des miR-34/449 dans les cellules multiciliées respiratoires humaine	S
ou d'épiderme d'embryon de xénope (Marcet et al, 2011)	. 84
Figure 78 : L'inhibition des miR-449 dans l'épiderme multicilié de xénope ou l'épithélium c	les
voies respiratoires en culture ALI inhibe la multiciliogenèse (Marcet et al, 2011)	. 85
Figure 79 : Gènes localisés sur les loci humains 5q11 (miR-449) et 11q23 (miR-34)	. 87
Figure 80 : Implication du facteur de transcription TP53 dans la multiciliogenèse (adapté d	e
Mc Connell et al, 2016)	. 87
Figure 81 : Localisation de E2F4 pendant la différenciation de l'épithélium des voies	
respiratoires murines (Adapté de Mori et al, 2017)	. 89
Figure 82 : Implication des membres de la famille de la Géminine dans la multiciliogenèse	
(adapté de Arbi et al, 2016)	. 90
Figure 83 : Implication de MCIDAS dans la multiciliogenèse (adapté de Boon et al, 2014)	. 90
Figure 84 : Implication du facteur de transcription TP73 dans la multiciliogenèse (adapté d	le
Nemajerova et al, 2018)	.91
Figure 85 : Implication du facteur de transcription MYB dans la multiciliogenèse (adapté d	e
Tan et al, 2013)	. 92
Figure 86 : Implication des facteurs de transcription FOXJ1 et RFX dans la multiciliogenèse	
(adapté de Choksi et al, 2014)	. 94
Figure 87 : Cibles communes et spécifiques des facteurs de transcription FOXJ1 et RFX	
(adapté de Choksi et al 2014)	. 95
Figure 88 : Localisation de CDC20B dans les deutérosomes des cellules multiciliées (Revins	ski
et al, 2018)	. 96

Figure 89 : Implication de CDC20B dans le désengagement des centrioles des deutérosomes
dans les cellules multiciliées (adapté de Revinski et al, 2018)
Figure 90 : Localisation de CCNO dans les cellules multiciliées (Wallmeier et al, 2014)
Figure 91 : Chevauchement des mutations génétiques au sein des ciliopathies (Mitchison et
al, 2016)
Figure 92 : Changements morphologiques des bronches dans l'asthme (adapté de bphc.org
et everydayhealth.com)
Figure 93 : Symptômes de la BronchoPneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) (adapté
de polkahontas.wordpress.com)
Figure 94 : Canal chlorure CFTR (adapté de advancingcfscience.com)
Figure 95 : Classification des mutations de CFTR (adapté de jorgereyes83.blogspot.com) 109
Figure 96 : Ionocyte exprimant CFTR à sa surface apicale (adapté de Vaincrelamuco.org) 110
Figure 97 : Conséquences de la mutation du gène CFTR dans l'épithélium des voies
respiratoires (adapté de Lopes-Pacheco et al, 2016)
Figure 98 : Problème de différenciation observé avec le milieu BEGM™ (DAPI = noyaux,
Actine = cytosquelette, Ac-tub = cellules multiciliées)
Figure 99 : Comparaison de différenciation des mTEC en milieu Ultro-Ser G™ ou milieu
Pneumacult [™] (DAPI = novau, Ac-tub = cellules multiciliées)
Figure 100 : Comparaison de différenciation des mTEC après ensemencement direct sur
insert ou amplification préalable en milieu KSFM (DAPI = novau, Ac-tub = cellules
multiciliées)
Figure 101 : Etapes de dissociation des cellules pour le "Single-cell RNA-seq »
Figure 102 : Etapes de séparation des cellules dans les gouttelettes
Figure 103 : Etapes de séguencage transcriptomique
Figure 104 : "Clustering" et identification des types cellulaires et des trajectoires cellulaires
120
Figure 105 : Expression protéigue du ligand SHH et du récepteur Smo dans les HAEC en
culture ALL en cours de différenciation en Western Blot (A) et immunoflurescence (B) 133
Figure 106 : Expression des transcrits des GLI dans les HAEC en culture ALI (ALI15)
Figure 107 : Effets de l'inhibition pharmacologique de la voie Hh par la cyclopamine (CPM 10
uM) au cours de la différenciation des HAEC en culture ALL
Figure 108 : Effets de l'inhibition pharmacologique de la voie Hb par le MRT-92 au cours de la
différenciation des HAEC en culture ALL
Figure 109 : Effets de l'inhibition de la voie Hb par ARN interférence au cours de la
différenciation des HAEC en culture ALL 136
Eigure 110 : Effets de la suractivation de la voie Hb au cours de la différenciation des HAEC
on culture All
En culture ALI
l'expression transcriptomique des GU au cours de la différenciation des HAEC en culture AU
Texpression transcriptornique des GLI au cours de la differenciation des FREC en culture ALI
Eigure 112 : Expression transcriptomique et protéique du factour de transcription CUS2 eu
rigure 112. Expression transcriptionnique et proteique du facteur de transcription GLISS au
Eigure 112 : Effets de la modulation de la voie Ub sur l'averession transcriptomique de CUS2
Figure 115. Effets de la modulation de la vole mi sur l'expression transcriptomique de GLISS
au cours de la différenciation des fracc en culture ALI

Figure 114 : Hypothèse de l'encombrement stérique de la région de fixation de
microprocesseur par plusieurs protéines (adapté du manuscrit de thèse d'Olivier Mercey)143
Figure 115 : La moésine (MSN) semble être une cible spécifique des 5'isomiR-34b
Figure 116 : Modèle illustrant le rôle des miR-34/449 au cours de la multiciliogenèse (Mercey
et al, 2015)
Figure 117 : Membres des loci 5q11 et 11q23 humains146
Figure 118 : Conservation du locus 11q23 chez les vertébrés (Genomicus v98.01)147
Figure 119 : Localisation de C11orf88 dans les placodes olfactives et le pronéphros de
l'embryon de poisson zèbre
Figure 120 : Effets de l'infection lentivirale de shCTRL ou shC11orf88 à différentes
concentrations sur l'expression de FOXJ1 et C11orf88, dans les mTEC à ALI15149
Figure 121 : Effet de l'infection lentivirale de shCTRL sur la différenciation des cellules
multiciliées dans les mTEC à ALI15150
Figure 122 : Effet de l'infection lentivirale de shC11orf88 sur la différenciation des cellules
multiciliées dans les mTEC à ALI15150
Figure 123 : Effets des morpholinos C11orf88 (Mo C11orf88) sur le développement du
pronéphros du poisson zèbre151
Figure 124 : Structure 3D du domaine « Tubulin-stathmin-like complex » 4F61 (Protein Data
Bank)
Figure 125 : Relation entre cil primaire et cils motiles pendant la multiciliogenèse des mTEC
en culture ALI (adapté de Jain et al, 2010)153
Figure 126 : Observation par immunofluorescence des cils des cellules multiciliées après
infection lentivirale de shCTRL et shC11orf88 dans les mTEC en culture ALI
Figure 127 : Isoformes de C11orf88 visualisés sur Ensembl (transcrits) ou en Western Blot
(protéines) 155
Figure 128 : Effets de l'inhibition de BTG4 par infection lentivirale de shCTRL ou shBTG4 sur
l'expression de BTG4 et de FOXJ1 et CDC20B, deux marqueurs de la multiciliogenèse 158
Figure 129 : Schéma proposé pour le contrôle de l'expression transcriptomique des loci 5q11
et 11q23 160
Figure 130 : Expression protéique et transcriptomique du ligand SHH dans l'épithélium de
voies respiratoires nasales et bronchique provenant d'Epithelix [®] , et dans nos cultures de
HAEC en ALI en milieu BEGM163
Figure 131 : Réponse luciférase induite par la présence du ligand SHH dans les milieux de
culture de cellules épithéliales des voies respiratoires nasales et bronchiques164
Figure 132 : Expression transcriptomique de MUC5AC en milieu BEGM ou Pneumacult en
"Single-Cell RNA-seq" 171
Figure 133 : Expressions transcriptomiques de CDH1 (E-cadherin), TJP1 (ZO-1) et TSLP en
milieu BEGM ou Pneumacult en "Single-Cell RNA-seq"172

Introduction

Chapitre 1 : Les voies respiratoires

Les voies respiratoires sont un ensemble de tissus organisés conduisant l'air inspiré le long d'un chemin au cours duquel il va être réchauffé, humidifié et purifié de tout microbe ou particule. Une fois arrivé dans le parenchyme pulmonaire, au niveau des alvéoles qui se situent à l'extrémité des voies respiratoires, cet air est engagé dans les échanges gazeux d'oxygène et de dioxyde de carbone avec le sang. L'air parcourt ainsi trois zones distinctes :

- Les voies respiratoires extra-thoraciques, ou supérieures, constituées du nez, du pharynx et du larynx (Figure 1),
- Les voies respiratoires intra-thoraciques, ou inférieures, constituées de la trachée, des bronches, des bronchioles (Figure 2),
- Une dernière zone formée par les alvéoles, constitue la zone d'échange 0₂/CO₂ (Figure 2).



Figure 1 : Voies respiratoires extra-thoraciques

Dans les voies supérieures, l'air subit une première filtration dans le nez, bloquant les plus grosses particules inhalées (fibres et macromolécules). Les deux fosses nasales forment deux vestibules indépendants séparés par la cloison nasale (ou septum nasal). Les parois latérales de ces fosses forment 3 protubérances : les cornets supérieurs, moyens et inférieurs, s'étageant du bas vers le haut de la paroi. Ces cornets augmentent la surface de contact entre l'air et la muqueuse tapissant leurs parois, et permettent de limiter la perte de vapeur d'eau à chaque respiration. Ils sont tapissés d'une muqueuse composée d'un

épithélium pseudostratifié (page 4), lui-même recouvert d'un mucus capable de piéger les particules inhalées (bactéries, virus, poussières...) et d'humidifier l'air inhalé. Ce mucus provient des glandes muqueuses, sous-muqueuses (page 8) et séro-muqueuses présentes dans le chorion sur lequel repose l'épithélium des voies respiratoires, tissu conjonctif présentant également une forte vascularisation qui contribue au réchauffement de l'air inhalé. Ce mucus est en permanence transporté le long de la muqueuse pour être évacué par un mécanisme appelé clairance mucociliaire.

A la sortie du nez, un air filtré, réchauffé et humidifié traverse alors les choanes et le pharynx. Cet organe est séparé en 3 parties : (1) le <u>rhinopharynx</u> dont le plafond présente les amygdales (tissu lymphoïde, zone de contrôle immunitaire), et au niveau duquel débouchent latéralement les trompes d'Eustache (canaux permettant d'équilibrer la pression de l'air externe s'exerçant sur le tympan dans l'oreille) ; (2) <u>l'oropharynx</u> situé à l'arrière de la cavité orale, présentant également des amygdales, constitue un véritable carrefour où transitent l'air provenant du nez, de la bouche et les aliments ; (3) le <u>laryngopharynx</u> ou hypopharynx, zone où divergent les voies respiratoires et digestives.



Figure 2 : Voies respiratoires intra-thoraciques

L'air, arrivant enfin dans le larynx, est alors aiguillé vers la trachée, alors que les aliments le sont vers l'œsophage. Lors de la respiration, le larynx est toujours ouvert pour permettre le passage de l'air vers la trachée. Lors de l'arrivée du bol alimentaire, c'est le mouvement impliquant des tissus cartilagineux, musculo-membraneux et l'os hyoïde entourant le larynx qui vont soulever l'épiglotte pour fermer le passage vers la trachée et orienter ainsi les aliments vers l'œsophage. C'est dans le larynx qu'arrive également le mucus évacué des voies respiratoires inférieures par la clairance mucociliaire qui sera avalé ou expectoré. Le larynx abrite également les cordes vocales.

L'air traverse la trachée, tube cartilagineux entouré d'une vingtaine d'anneaux cartilagineux en forme de «C» la rendant rigide. Sa surface interne est totalement recouverte par l'épithélium pseudostratifié mentionné plus haut. La trachée se sépare ensuite en deux bronches principales pénétrant chacune dans un poumon, où elles se divisent elles-mêmes en 3 bronches lobaires dans le poumon droit (correspondant au nombre de lobes dans le poumon droit) et en 2 bronches dans le poumon gauche (correspondant au nombre de lobes dans le poumon gauche). Lors de leur progression vers les parties profondes des poumons, les bronches se subdivisent encore, diminuant progressivement leur calibre pour obtenir un ordre maximum de 23 divisions (certains tronçons n'en comportent qu'une quinzaine). Lorsque la taille des bronches atteint un diamètre inférieur à 1 mm, elles sont alors appelées bronchioles. Plus le diamètre diminue, plus les bronches sont entourées de fibres musculaires lisses et plus l'épaisseur de l'épithélium pseudostratifié diminue. Dans le prolongement du dernier ordre de bronchioles, l'air arrive ensuite aux conduits alvéolaires, composés d'anneaux de fibres musculaires lisses, de fibres élastiques et de collagène. L'air débouche finalement sur les grappes alvéolaires, composées de plusieurs alvéoles. Ces alvéoles sont des saccules enveloppés dans un réseau dense de capillaires sanguins formant, avec la paroi alvéolaire, une membrane alvéolocapillaire où s'opère la diffusion simple des gaz entre l'air et le sang.



Figure 3 : Alvéole pulmonaire

La surface interne des alvéoles est recouverte d'un épithélium composé principalement de 2 types cellulaires : les pneumocytes (ou cellules alvéolaires) de type I, qui correspondent aux cellules les plus fines de tout l'organisme, et qui couvrent l'essentiel de la surface sur laquelle s'opèrent les échanges gazeux ; et les pneumocytes de type II, dont une des fonctions principales est de produire le surfactant (surfactant protein A ; SP-A), tensioactif constitué de lipides, dont la présence prévient l'affaissement alvéolaire appelé collapsus, en augmentant la tension de surface dans les alvéoles (Figure 3). Les pneumocytes de type II ont également des capacités d'auto-renouvellement et de différenciation, leur conférant un rôle dans la maintenance et la réparation pour obtenir à nouveau les 2 types de cellules alvéolaires en cas de blessure [1].

Pendant l'expiration, l'air appauvri en oxygène et enrichi en gaz carbonique et déchets métaboliques, emprunte le chemin inverse pour être expulsé dans l'environnement.

Chapitre 2 : L'épithélium des voies respiratoires – Composition, fonction et distribution cellulaire

Les voies respiratoires sont bordées par un épithélium, qui a un rôle de protection en empêchant les particules et pathogènes inhalés de rentrer dans l'organisme. Cet épithélium est dit « mucocilié » de par la présence conjointe de cellules caliciformes dites en « gobelet » capables de produire le mucus, et des cellules multiciliées, présentant des centaines de cils motiles à leur surface apicale, dont le battement coordonné permet d'activer un flux directionnel de mucus vers l'extérieur, phénomène mécanique appelé clairance mucociliaire.

D'autres épithéliums multiciliés sont retrouvés dans d'autres organes du corps tels que les trompes de Fallope, dans lesquelles les battements ciliaires permettent un flux de fluide des ovaires vers l'utérus, indispensable au transport des ovules lors de l'implantation [2–4]. Un épithélium multicilié est également retrouvé dans les canaux efférents au niveau de l'épididyme dans lequel il contribue au transport des spermatozoïdes dans les canaux déférents [5,6]. Il est également présent dans le plexus choroïde [7,8], les ventricules cérébraux et l'épendyme [9–11], et dans la moelle épinière [12,13], où la circulation du liquide cérébrospinal est assuré par le battement des cils des cellules épendymaires de l'épithélium multicilié bordant ces organes.

Il existe des épithéliums mucociliés chez d'autres vertébrés, comme dans les organes olfactifs des poissons [14], ou sur la surface de l'embryon du xénope [15–18]. Ces systèmes ont été exploités comme modèles biologiques pour documenter les mécanismes d'élaboration du tissu mucocilié (page 38).

I. Composition cellulaire de l'épithélium des voies respiratoires

L'épithélium mucocilié est un épithélium majoritairement pseudostratifié reposant sur une matrice extra-cellulaire appelée lame basale (Figure 4) [19–21]. En effet, bien que les noyaux des cellules de cet épithélium soient positionnés à différentes profondeurs comme c'est le cas dans les épithéliums stratifiés, toutes les cellules sont attachées à la lame basale. Les cellules dont le noyau est proche de la lame basale et n'ayant pas accès à la lumière de l'organe sont en position dite « basale » et celles dont le noyau se positionne plus haut et ayant accès à la lumière de l'organe sont dites « luminales » [22,23] (Figure 4).



Figure 4 : Epithélium pseudostratifié des voies respiratoires (Ruiz-Garcia et al, 2019)

L'épithélium des voies respiratoires est composé de plusieurs types cellulaires ayant des fonctions différentes. En effet, au moins 5 types cellulaires majoritaires sont présents : les cellules basales, les cellules suprabasales, les cellules sécrétrices (cellules « club »), les cellules à mucus (cellules en gobelet) et les cellules multiciliées [24]. D'autres types cellulaires, plus rares, ont été également décrits, comme les cellules neuro-endocrines, les cellules tuft, ou brush, et les ionocytes (Figure 5) [25–30].



Figure 5 : Représentation schématique de chaque type cellulaire composant l'épithélium des voies respiratoires sans notion de proportion quantitative (NE= neuro-endocrine) (Vaincrelamuco.org)

I.1 – Les cellules basales

Les cellules basales recouvrent la majorité de la lame basale à laquelle elles sont ancrées grâce aux intégrines et jonctions cellulaires (page 18) [31–33]. Elles doivent leur nom à leur position basale et leur incapacité à atteindre la lumière [23] (Figure 5). Elles sont également les cellules progénitrices multipotentes de l'épithélium des voies respiratoires, capables de s'auto-renouveler et de produire les autres types cellulaires [24,32–40]. En effet, une étude inoculant des cellules basales sur des trachées dénudées, montre une différenciation mucociliaire en 2 à 4 semaines, avec présence de cellules basales, de cellules multiciliées, de cellules à mucus et de cellules sécrétrices [41,42]. Les cellules basales peuvent interagir avec les autres cellules de l'épithélium des voies respiratoires, les neurones, les cellules mésenchymateuses sous-jacentes et la lame basale, mais également avec les cellules du système immunitaire. Elles ont par ailleurs une fonction dans la réponse inflammatoire et dans le stress oxydatif (page 17) [33].

Leur signature est caractérisée par l'expression des gènes TP63, keratin5 (KRT5) et keratin14 (KRT14), et de la voie EGF (voie de signalisation dont le rôle sera décrit ultérieurement, page 66) [24,34,36,37,40,43–46]. Ces cellules subissent une expansion proliférative en réponse aux dommages provoqués par exemple par les infections, qui contribue à renouveler l'épithélium des voies respiratoires [38,39,44,45].

Cette population de cellules basales est hétérogène, comprenant un nombre égal de cellules souches multipotentes et de précurseurs en cours de différenciation de forme non distinguables [47]. Néanmoins, deux types de cellules basales sont reconnues : le premier présente de nombreux filaments intermédiaires, des hémi-desmosomes très développés ; le deuxième présente peu de filaments intermédiaires, des hémi-desmosomes très peu développés (page 18) [48].

I.2 – Les cellules suprabasales

Les cellules suprabasales, encore appelées parabasales ou intermédiaires, sont localisées entre les cellules basales et les autres types cellulaires en position luminale (Figure 5) [32]. Elles ne partagent pas de caractéristiques morphologiques communes avec les cellules multiciliées, muqueuses ou neuroendocrines [49], mais elles partagent la morphologie fusiforme des cellules basales ainsi que leur incapacité à atteindre la surface de l'épithélium des voies respiratoires [23]. Nous verrons dans la partie « Résultats » (page 122) qu'elles partagent également une fonction progénitrice avec les cellules basales.

I.3 - Les cellules sécrétrices ou cellules « club »

Les cellules sécrétrices sont détectées en position luminale et caractérisées par une forme cuboïdale, par la présence de granules sécrétoires ovoïdes denses aux électrons liées à la membrane plasmique et un réticulum endoplasmique lisse ample à la membrane apicale [50]. Elles sont aussi caractérisées par l'expression des protéines codées par les gènes CCSP (Clara Cell Secretory Protein, ou SCGB1A1 : sécrétoglobine 1A1), SCGB3A1 (sécrétroglobine 3A1) et SCGB3A2 (secretoglobin 3A2) [51–56].

Elles sont les progénitrices des cellules multiciliées et des cellules à mucus [40,57– 59], et contribuent à l'homéostasie de l'épithélium des voies respiratoires et à sa réparation en cas de blessure [55,60]. Elles sont aussi capables de se différencier en cellules à mucus en situations de sensibilisation à un antigène [54], et jouent un rôle dans la régulation des réponses inflammatoires médiées par les lymphocytes T grâce à l'action de SCGB1A1 [52].



I.4 – Les cellules à mucus (cellules en gobelet)

Figure 6 : Cellule à mucus

Les cellules à mucus contiennent des granules intracellulaires qui contiennent des molécules de mucines de haut poids moléculaire, des lipides et de petites glycoprotéines formant le mucus (Figure 6). Les granules sont capables de se décharger très rapidement pour libérer de grandes quantités de mucus à la surface de l'épithélium des voies respiratoires par exocytose [61,62] (Figure 5). La décharge de mucus peut se produire en réponse à de multiples stimuli : gaz irritants, médiateurs de l'inflammation, espèces

réactives à l'oxygène, activation nerveuse, action de protéinases, changement de l'environnement biophysique, et notamment la diminution du diamètre des bronches [63]. L'exocytose de mucines est contrôlée par la kinase MARCKS (Myristoylated Alanine-Rich C KinaSe) en interaction coopérative avec les protéines kinases PKC et PKG [61].

La différenciation des cellules à mucus, à partir des cellules sécrétrices, débute par le contrôle de leur programme transcriptionnel par l'expression de *SPDEF* (SAM Pointed Domain containing ETS transcription Factor), qui permet l'expression de *FOXA3*, *AGR2* et *GCNT3* [58,64]. Elle implique aussi la voie de signalisation de l'EGF (Epidemial Growth Factor) (page 66), et l'activation de la production des mucines MUC5AC et MUC5B [65].

Les mucines sécrétées (MUC5AC, MUC5B) sont les principaux composants du mucus. Elles sont synthétisées et sécrétées soit par les cellules à mucus de l'épithélium des voies respiratoires de surface, soit par des cellules à mucus situées au niveau des glandes sousmuqueuses (glandulaires – page 8). Elles appartiennent à une large famille d'Oglycoprotéines, dont les 21 membres se répartissent en 2 familles : les mucines sécrétées (dont MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6) et les mucines membranaires (dont MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC17) [66]. MUC5AC et MUC5B sont les mucines majoritaires dans les cellules à mucus. Dans les voies respiratoires saines, MUC5B est la mucine sécrétée dominante. Elle est produite majoritairement par les cellules de l'épithélium des voies respiratoires. MUC5AC est produite uniquement par les cellules à mucus de cet épithélium de surface. L'augmentation de son expression est un signe de pathologie respiratoire [67].



I.5 – Les cellules glandulaires

Figure 7 : Structure d'une glande sous-muqueuse et composition cellulaire de l'épithélium la tapissant (adapté de Collawn et al, 2012)

Les glandes sous-muqueuses sont retrouvées dans les voies respiratoires entourées de cartilage (page 1). Elles forment des invaginations dans l'épithélium des voies respiratoires contenant une ou plusieurs branches terminées par des acini bulbeux (Figure 7). Ces glandes sont tapissées d'un épithélium constitué de deux types cellulaires contribuant à la production du mucus [61,68]:

- les cellules à mucus glandulaires sont des cellules lisses et rectangulaires sécrétant des mucines. Elles diffèrent des cellules à mucus de surface par la sécrétion plus modérée de MUC5B et l'absence de sécrétion de MUC5AC, ainsi que par le contrôle de la libération du mucus *via* des neurotransmetteurs adrénergiques, cholinergiques ou autres, et non par l'ATP ou l'UTP luminal;
- les cellules séreuses d'apparence pyramidale, car elles possèdent une petite membrane apicale, plus bosselées et présentant des expansions tubulaires de la membrane apicale, sont la source primaire des composants du fluide recouvrant les voies respiratoires. En effet, elles sécrètent la plupart des molécules de défenses non mucines, dont des composés antimicrobiens de manière abondante (page 17).

I.6 – Les ionocytes

Les ionocytes pulmonaires constituent un type cellulaire rare, qui pourrait être impliqué dans la maintenance de l'homéostasie osmotique, au vu de l'expression dans ces cellules d'un grand nombre de systèmes de transports ioniques [69] (Figure 5). Ces cellules sont riches en mitochondries [70], et expriment le facteur de transcription FOXI1, qui apparaît comme le facteur clé contrôlant l'expression de plusieurs molécules de transport, comme certaines sous-unités de l'ATPase H+ de type vacuolaire mais aussi le transporteur d'anions CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), dont le gène muté est responsable de la mucoviscidose [26,71] (page 108). L'inhibition de l'expression de FOXI1 dans les ionocytes conduit à une perte de l'expression de CFTR et des perturbations dans le liquide de surface des voies respiratoires (page 16) et dans la physiologie du mucus (conditions caractéristiques de la mucoviscidose) [26].

I.7 – Les cellules pulmonaires neuro-endocrines (PNEC)



Figure 8 : « Neuroepithélial body »

Les cellules pulmonaires neuro-endocrines (« NE » Figure 5) constituent une population épithéliale rare, innervée [72]. Elles peuvent se trouver seules au sein de l'épithélium des voies respiratoires ou former des organoïdes sensoriels, appelés « neuroepithelial bodies » (NEB) (Figure 8). Elles sont en contact avec des fibres nerveuses et entourées de cellules sécrétrices spécialisées. La présence de ces cellules est contrôlée par l'expression du gène Robo (Roundabout receptor) [25,55,73–75]. Elles apparaissent dans le poumon à des stades très précoces du développement, seraient les premières cellules spécialisées à apparaitre dans cet organe, et sont plus particulièrement étudiées pour leur fréquente transformation cancéreuse, dans le cadre de cancers du poumon à petites cellules (SCLC, small-cell lung cancer), qui représente 14% de tous les cancers du poumon [76]. Elles peuvent également contribuer aux populations des cellules sécrétrices et multiciliées [75]. Les PNEC ont donc des capacités progénitrices, et sont de ce fait, capables de s'auto-renouveler contribuant ainsi à la réparation de l'épithélium des voies respiratoires [55].

I.8 – Les cellules Tuft ou Brush

Les cellules Tuft sont des cellules en forme de poire, présentant une base large et un apex apical étroit présentant une centaine de microvillosités en touffes ramassées (Figure 5). Leur localisation est limitée dans l'épithélium des voies respiratoires, et elles sont associées à une fonction chimiosensorielle, utilisant la cascade de transduction du goût pour détecter les irritants et moduler la réponse du système immunitaire [27,77–79].

I.9 - Les cellules multiciliées



Figure 9 : Cellule multiciliée

Les cellules multiciliées sont des cellules post-mitotiques de forme pyramidale ou cylindrique, présentant des centaines de cils motiles à leur surface apicale, entrecoupés de microvillosités dont le nombre est estimé à la moitié du nombre de cils [80] (Figure 5 & Figure 9). Ces cellules ne sont pas directement attachées à la lame basale par les hémidesmosomes, mais plutôt par des desmosomes aux cellules adjacentes (cellules basales notamment) [81]. Leur noyau est localisé au niveau basal, alors que le niveau apical sous les cils est enrichi en mitochondries pour fournir l'énergie nécessaire au battement ciliaire [82].

Les cils des cellules multiciliées diminuent en longueur le long des voies respiratoire de la trachée vers les poumons, bien que leur structure ne varie pas [73,83,84]. Leur fréquence synchronisée de battements diminue également des bronches proximales, vers les bronches distales [85]. Les cils des cellules multiciliées étant la clé d'une clairance mucociliaire correcte, un chapitre est dédié à la description de cette organelle (page 21).

II. Distribution cellulaire de l'épithélium des voies respiratoires

Les voies respiratoires connaissent des différences structurelles en fonction de leur localisation et diamètre. En effet, en se déplaçant vers les voies distales, le diamètre des conduits diminue, et l'épithélium des voies respiratoires s'affine. Au-delà des différences morphologiques, il a été montré que la distribution cellulaire de l'épithélium des voies respiratoires varie significativement le long de l'axe proximo-distal chez la souris et l'humain. En effet, une étude morphométrique des poumons humains a révélé que le volume des noyaux des cellules diminuait des voies proximales vers les voies distales, de même que le volume des cellules multiciliées [86]. D'autres observations basées sur la morphologie cellulaire après pneumectomie révèlent que l'épaisseur du tissu épithélial des voies respiratoires adultes humaines diminue en partie distale, et que les cellules basales deviennent moins nombreuses [87]. Des marquages immunohistochimiques de poumons humains obtenus après autopsies montrent que le nombre de cellules basales diminuent avec le diamètre des bronches [32], et que les cellules sécrétrices, presque absentes des voies proximales, augmentent dans la région distale [88]. Une étude par marquages immunohistochimiques réalisée dans les voies respiratoires de souris stimulées par certains antigènes pour induire une réponse allergique, montre que la sécrétion de mucines est restreinte aux voies proximales et que le nombre de cellules à mucus se fait plus rare en distal qu'en proximal [54]. Cette série non exhaustive d'études de géolocalisation des différents types cellulaires le long de l'arbre respiratoire chez l'homme et la souris a été résumée dans une revue [73]. Le schéma récapitulatif de cette revue illustre la perte des cellules basales (présentes seulement dans la trachée chez la souris), la diminution de la taille des anneaux cartilagineux, la perte des glandes sous-muqueuses (beaucoup plus rapide chez la souris que chez l'humain) vers les segments les plus distaux. L'apparition des « neuroépithélial bodies » (NEB) formés par plusieurs cellules neuroendocrines dans les bronchioles y est également illustrée. En revanche, cette figure n'illustre pas la distribution des cellules à mucus dans l'épithélium des voies respiratoires. Elle n'illustre pas non plus la différence d'épaisseur observée le long de l'axe proximo-distal (Figure 10) [73].



Figure 10: Distribution cellulaire de l'épithélium le long des voies respiratoires de l'humain et de la souris (adapté de Rao Tata, Rajagopal, 2017)

Ces études, bien qu'ayant largement contribué à une meilleure connaissance de la structure et de l'organisation de l'épithélium des voies respiratoires, ne sont pas exhaustives. En effet, elles sont basées sur l'analyse *a priori* d'un nombre unique ou limité de gènes, pour la plupart marqueurs de types cellulaires spécifiques et connus, ce qui, par définition, rend impossible l'identification de nouveaux types, sous-types, ou états cellulaires dont les gènes marqueurs n'auraient pas encore été définis.

La méthode de séquençage transcriptomique de cellules uniques (Single-Cell RNAsequencing, scRNA-Seq) (page 119), permet l'analyse du transcriptome de chaque cellule de manière indépendante au sein d'un échantillon tissulaire hétérogène et pallie ainsi la limite de résolution de l'analyse de masse et de choix de gènes marqueurs. Cette technique, développée sous plusieurs formes dans notre équipe [89,90], a conduit à l'élaboration d'un atlas des cellules respiratoires [28–30]. Ces travaux s'intègrent au projet « Human Cell Atlas », dont le but est de créer un atlas de référence de toutes les cellules du corps humain.

A l'aide d'une technique d'échantillonnage des voies respiratoires depuis le nez jusqu'à la 12^{ème} génération des bronches chez 10 volontaires sains (Figure 11), cette étude a contribué à l'identification des différentes populations constituant l'épithélium des voies respiratoires incluant les cellules basales, suprabasales, sécrétrices, à mucus et multiciliées

ainsi que les types cellulaires rares évoqués précédemment (page 5), mais aussi les populations des glandes sous-muqueuses comme les cellules séreuses (Figure 12).



Figure 11 : Echantillonnage des voies respiratoires pour le "Lung Atlas" (Deprez et al, 2019)

La technique d'échantillonnage a également permis d'identifier des types cellulaires mésenchymateux comme des cellules des muscles lisses, des péricytes, des fibroblastes et des cellules endothéliales, ainsi que des cellules immunitaires comme des macrophages, des cellules dendritiques, des monocytes, des lymphocytes B et T, des mastocytes et des plasmocytes. Ces trois catégories de types cellulaires (épithéliaux, mésenchymateux, immunitaires) représentent respectivement 89%, 5% et 6% des cellules totales (Figure 12). La définition des types cellulaires épithéliaux a été présentée dans une étude précédente à laquelle j'ai participée, et que je détaillerai dans la partie « Résultats » (page 126).



Figure 12 : Typage cellulaire des voies respiratoires du « Lung Atlas » (Deprez et al, 2019)

La comparaison des échantillons prélevés le long des voies respiratoires a permis de déterminer, que 1) la taille des cellules diminue selon l'axe proximo-distal, 2) les calculs de pourcentages cellulaires ont révélé tout d'abord qu'un biais d'échantillonnage était présent entre les échantillons prélevés par brossage (« brushing ») ou après biopsie (« biopsy »). En tenant compte de ce biais, il a été déterminé que les cellules sécrétrices sont enrichies dans le nez, tandis que les cellules multiciliées sont enrichies au niveau distal, et les cellules neuro-endocrines pulmonaires sont principalement localisées dans la trachée et dans les échantillons intermédiaires. Les ionocytes sont principalement dans les bronches et dans les brossages, suggérant une position luminale dans la région distale (Figure 13).



Figure 13 : Distribution des types cellulaires dans les voies respiratoires (Deprez et al, 2019)

Ces analyses déterminent que les types cellulaires composant les glandes sousmuqueuses sont présents dans le nez et les échantillons proximaux et que leur fréquence diminue le long de l'axe proximo-distal. Les cellules mésenchymateuses sont plus représentées dans les échantillons proximaux et intermédiaires, confirmant leur rôle dans la maintenance de la structure de l'organe. Les cellules immunitaires sont principalement retrouvées dans les échantillons distaux, à l'exception des plasmocytes et des cellules dendritiques qui sont plus présents dans la trachée et les échantillons intermédiaires.

Cette analyse montre également que la prolifération et la différenciation sont renforcées dans l'épithélium des voies respiratoires nasales, par rapport à l'épithélium des voies respiratoires trachéo-bronchiques, témoignant d'un renouvellement cellulaire plus rapide dans le nez et suggérant que l'épithélium des voies respiratoires nasales serait plus fréquemment « endommagé » par les agressions externes et développerait une réponse transcriptomique adaptative [29,30].
III. Fonctions de l'épithélium des voies respiratoires

II.1 – La clairance mucociliaire

Les surfaces respiratoires sont exposées chaque jour des centaines de milliards, voire dizaine de trillions, de particules et de pathogènes différents [91]. La clairance mucociliaire, qui est un mécanisme de défense protégeant les voies respiratoires, a pour tâche d'évacuer ces substances inhalées [68,92,93]. Cette défense est composée d'un fluide et du battement ciliaire nécessaire au mouvement de ce fluide vers l'extérieur.

Le fluide est un liquide de surface aérien (airway surface liquide, ASL) protégeant toutes les surfaces des voies respiratoires, produit par les glandes sous-muqueuses en grande partie et par les cellules à mucus (page 7) [68,92,93] (Figure 14).



Figure 14 : Liquide de surface des voies respiratoires (adapté de Deckel et al, 2012)

Ce fluide est composé de deux couches superposées (Figure 14) :

- une couche externe de mucus épais [94] forme un gel composé d'électrolytes,
 d'eau et des glycoprotéines telles que les mucines (principalement MUC5B et MUC5AC). Ce film piège les substances inhalées [68,92,93] ;
- une couche périciliaire, située au contact des cellules, fournissant un environnement favorable au battement des cils et à la lubrification de la surface cellulaire. Cette couche, plutôt « aqueuse », forme un bouclier contre les infections et contient des mucines transmembranaires, et des polysaccharides fortement attachés à la surface des cellules. Elle est régulée et maintenue par l'épithélium des voies respiratoires lui-même, qui perçoit et

autorégule son volume par le transport actif d'ions, en ajustant le taux d'ions sodium et d'ions chlorure pour maintenir le transport du mucus [95–98].

La barrière protectrice de mucus, en perpétuel renouvellement, capture donc les particules, et l'ensemble est éliminé des voies respiratoires. Cette élimination est menée par le balayage orchestré par les cils motiles des cellules multiciliées, qui prévient la pénétration des pathogènes dans l'espace périciliaire et induit la formation des deux couches distinctes de l'ASL [68,92,93,95–98]. Pour que la clairance mucociliaire soit optimale, les cils motiles présentent une organisation spatiale précise et une synchronisation de leurs battements avec un léger décalage de phase entre chaque cil successif, générant ainsi une onde métachronale à la surface (page 63) [99–101].

II.2 - Réponse aux toxiques et interaction avec le système immunitaire

Les cellules épithéliales, en plus de sécréter le liquide de surface, peuvent également reconnaître certaines structures des micro-organismes, appelées PAMP (modèles moléculaires associés aux agents pathogènes), ou les ARN viraux (par les « Toll-Like Receptor » TLR3 et TLR7), à travers des récepteurs apicaux exposés ou intracellulaires. Elles peuvent ensuite initier les signaux appropriés pour la défense contre ces agents pathogènes et/ ou pour le recrutement du système immunitaire [102,103].

Les récepteurs apicaux ou intracellulaires (TLR (Toll-Like Receptor) et TNF α R1 (TNF α Receptor 1)) reconnaissent les bactéries, déclenchent par la suite la réponse proinflammatoire des cellules épithéliales et du système immunitaire en activant différentes cascades de signalisation intracellulaire, dont celle du TNF α et la voie de signalisation NF κ B. Ces cascades conduisent à la production de cytokines (telles que le TNF α , l'IL-1 β , l'IL-6, la TSLP et des chimiokines comme IL-8 ou CCL20), glycoprotéines ayant une fonction d'attraction et d'activation des cellules du système immunitaire. Cette chimioattraction permet le recrutement des polymorphonucléaires, autrement appelées phagocytes (cellules neutrophiles, macrophages et cellules dendritiques), qui sont des cellules immunitaires spécialisées dans la phagocytose des composés étrangers. Les cellules épithéliales sécrètent également des facteurs de croissance des cellules du système immunitaire comme le GM-CSF, G-CSF, TGF α et TGF β . Elles expriment également des molécules d'adhésion intercellulaire (CAM) qui permettent l'adhésion des phagocytes recrutés [102–104].

17

La phagocytose mise en place pour éradiquer les bactéries produit cependant des composés toxiques comme les espèces oxygénées réactives (ROS) et élastase qui peuvent léser l'épithélium des voies respiratoires. L'élastase est notamment un stimulus puissant de l'IL-8, qui recrute alors d'autres phagocytes, pouvant créer ainsi un cycle d'inflammation continue. Ces composés peuvent alors être responsables de la nécrose des tissus, en bouleversant l'équilibre entre une phagocytose efficace et le maintien de l'homéostasie respiratoire. Dans ces conditions en effet, l'épithélium des voies respiratoires est alors soumis à la fois à une destruction directe par les microorganismes et à des dommages dus à la réponse inflammatoire [102]. Les cellules des voies respiratoires sécrètent néanmoins des cytokines anti-inflammatoires, comme la sécrétoglobine 1A1 (SCGB1A1) sécrété par les cellules sécrétrices pour réguler l'inflammation provoquée par les lymphocytes Th2 [52,105]

Des molécules antimicrobiennes sont également sécrétées par les cellules épithéliales. Le mucus contient ainsi des β-défensines (notamment induites par les TLR), la lactoferrine, des enzymes, dont le lysozyme, l'antileukoprotéase et la lactoperoxydase (LPO), mais aussi le peptide anti-microbien cathelicidine (gène LL-37), ou CCL20 [102,104,106–111]. La lactoperoxydase joue également un rôle dans les défenses oxydatives, en prenant en charge le traitement des espèces oxygénées réactives (provenant entre autres des pollutions atmosphériques et des phagocytes) [112].

Par ailleurs, d'autres molécules ont un rôle dans la défense de l'épithélium des voies respiratoires [102]. En effet, la présence de MUC5B est nécessaire à la formation des cellules multiciliées, au recrutement des leucocytes, à la fonction de phagocytose des macrophages et à la production d'IL-23 par ces derniers et/ou les cellules dendritiques. Il faut savoir que la sécrétion de MUC5B est diminuée de 90% chez les personnes atteintes de BPCO (page 106) ou d'asthme (page 103) expliquant en partie leurs symptômes [92]. La sécrétion de MUC5AC est augmentée en réponse aux bactéries, chimiokines et cytokines. MUC2 l'est également, en réponse à la cascade TLR. Des espèces nitrogéniques sont également libérées, et ont un rôle de vasodilatation pour favoriser l'accès aux cellules du système immunitaire arrivant par le sang et une activité anti-bactérienne, ainsi qu'un rôle anti-inflammatoire [102].

II.3 - Barrière épithéliale

Les cellules épithéliales forment une barrière semi-perméable avec l'environnement, permettant un échange moléculaire régulé entre l'organisme et l'extérieur. Ces deux

propriétés sont conférées respectivement par la présence de jonctions non communicantes et d'autres communicantes, entre autres.



Figure 15 : Jonctions cellulaires (adapté de Giepmans 2009)

I.3.A - Jonctions cellulaires non communicantes

La surface basale de chaque type cellulaire repose sur une matrice extracellulaire (appelée lame basale composée de collagène, fibronectine, laminine...), et l'adhésion se fait via des protéines transmembranaires appelées intégrines, se liant d'un côté directement aux protéines de la matrice extracellulaire, et de l'autre dans le cytoplasme, aux fibres d'actine et aux protéines d'adhésions focales. Leur surface latérale fait face aux cellules voisines, auxquelles elles adhèrent également *via* des jonctions, et leur surface apicale fait face à l'environnement extérieur ou à la lumière de l'organe recouvert par l'épithélium. Les cellules épithéliales ont une remarquable polarisation de leur membrane plasmique, attestée par la présence de domaines de surface de fonction, de composition et de structure distinctes [19].

Parmi les domaines importants pour la polarisation des cellules, les jonctions cellulecellule jouent un rôle à la fois de barrières physiques, d'adhésion cellule-cellule et de communication cellule-cellule. Ces jonctions contiennent des protéines transmembranaires se liant à leur homologue dans la cellule voisine et s'associant avec des protéines cytoplasmiques et le cytosquelette. Elles sont donc retrouvées entre deux cellules adjacentes et forment un complexe jonctionnel tripartite (Zonula occludens, Zonula adherens et Macula adherens) caractéristique, assez proche de la lumière, se succèdant les unes aux autres dans l'ordre donné par une direction apicale – basale (Figure 15) [19,113] : a) <u>Zonula occludens</u> (ou jonction serrée) : jonction la plus apicale (Figure 15) fournissant une barrière intercellulaire physique imperméable aux pathogènes et protéines limitant ainsi le transport paracellulaire (transport à travers l'épithélium par les espaces intercellulaires). Elle est caractérisée par la fusion des membranes des cellules adjacentes résultant en une oblitération de l'espace intercellulaire sur des distances variables. Ce sont des structures continues entourant les cellules et liant ensemble les membranes plasmiques de l'épithélium entier [113]. Les protéines transmembranaires essentielles de cette jonction sont les claudines (23 membres), les occludines, et les molécules d'adhésion jonctionnelles (JAM). Dans le cytoplasme, les protéines ZO (Zonula Occludens) sont enrichies au niveau de la jonction et font la connexion au cytosquelette d'actine.

b) <u>Zonula adherens</u> (ou jonction intermédiaire) : ce type de jonction fournit la force d'adhésion cellule-cellule. Elle est caractérisée par la présence d'un espace intercellulaire occupé par un matériel homogène, apparemment amorphe, de faible densité. Les membranes de cellules voisines sont strictement parallèles, plus fines et plus asymétriques qu'en région apicale et la matrice cytoplasmique sous-jacente est très dense. Ces jonctions forment un attachement intercellulaire en forme de ceinture continue autour de chaque cellule. Les protéines transmembranaires essentielles de cette jonction font partie de la famille des cadhérines, la E-cadhérine étant la plus abondante, qui interagissent avec le cytosquelette d'actine et microtubulaire [114]. Les protéines cytoplasmiques en interaction sont les caténines (α -caténine et β -caténine) et la plakoglobine. La protéine Zonula-Occludens-1 (ZO-1) est également retrouvée au niveau de cette jonction. Les caténines et ZO-1 servent de liaison au cytosquelette d'actine microtubulaire [115]. Les intégrines pourraient aussi avoir un rôle de signalisation extérieure dans cette jonction.

c) <u>Macula adherens</u> (ou desmosome) : cette jonction cellulaire est la plus basale (Figure 15). Elle est cruciale pour l'intégrité tissulaire, car elle sert à résister aux forces de décrochage des cellules. Ce sont des points d'adhésion permis par la liaison des protéines membranaires appelées desmoplakines aux filaments intermédiaires présents dans la cellule. Elles forment un attachement intercellulaire discontinu en forme de boutons [113]. De structure similaire, les hémi-desmosomes permettent eux, l'interaction d'une cellule à la lame basale. Ils sont donc situés au pôle basal de la cellule et permettent leur maintien stable en connectant la matrice extracellulaire aux filaments intermédiaires intracellulaires.

20

Cette connexion est permise par des intégrines, composées d'hétérodimères de sous-unité α et β , qui agissent aussi comme des récepteurs transduisant des signaux cellulaires [116].

I.3.B - Jonctions cellulaires communicantes

Au sein de cette barrière, les cellules peuvent également partager des ions, des messagers secondaires, des petits métabolites à travers un cluster de canaux intercellulaires appelés jonctions communicantes (ou jonction gap) (Figure 15). Ces canaux sont formés de deux assemblages de protéines membranaires oligomériques, appelées connexines, qui traversent la membrane plasmique de deux cellules adjacentes et se rejoignent en un étroit « gap » extracellulaire [117]. ZO est un partenaire des jonctions gap, agissant comme un échafaudage pour recruter les protéines de signalisation. Des interactions avec le cytosquelette microtubulaire, et indirectement avec le cytosquelette d'actine, sont également décrites dans ces jonctions.

Chapitre 3 : Les cils

Les cils sont des organelles, extensions spécifiques de la membrane plasmique qui se projettent de la surface apicale des cellules vers l'espace extracellulaire. Ils sont composés de trois régions allant de la base à l'apex du cil, connectées continuellement par un squelette de microtubules : le corps basal dérivé d'un centriole, la zone de transition et l'axonème (Figure 16). Deux composants caractéristiques annexes sont la présence d'une poche ciliaire et l'existence d'une machinerie spécifique permettant le Transport Intra-Flagellaire.



Figure 16: Structure d'un cil (adapté de Pederson et al, 2012)

I - La structure du cil





Figure 17 : Structure d'un centriole (A) et ses composants microtubulaires (B) (adapté de Kollman et al, 2011)

Les centrioles sont des organelles cylindriques cytoplasmiques multifonctionnelles composées de microtubules (Figure 17 A) qui sont des protofilaments constitués d'hétérodimères de tubulines α et β polymérisés en direction longitudinale (Figure 17 B). Ces microtubules, organisés en 9 triplets organisés en symétrie autour d'une structure centrale appelé « hub », forment ainsi le « mur » du centriole (Figure 17 & Figure 18) [118–124].





Les triplets de microtubules sont constitués d'un microtubule A complet de 13 protofilaments, en position interne, et de microtubules B et C incomplets de 10 protofilaments, partageant 3 protofilaments avec les microtubules A et B (Figure 18). Ils s'assemblent indépendamment les uns des autres, dans le sens des aiguilles d'une montre [119,124–126]. Le centriole présente une polarité proximo/distale. A la lumière proximale

des centrioles peut se trouver une structure en symétrie par 9 avec un pivot central et 9 rayons radiaux appelée cartwheel (Figure 18) qui sert d'échafaudage pendant la formation des centrioles et peut disparaître après maturation [121,127]. A leur extrémité proximale, les centrioles ont aussi une structure striée, appelée rootlet (Figure 17), composée de protofilaments homopolymériques de protéine rootletin groupés en filaments épais de formes variables [126,128,129]. La centrine-2 localisée à la lumière distale, est communément utilisée pour la détection protéique des centrioles [130,131]. En distal, Cep97 recrute CP110 qui forme un capuchon au-dessus des microtubules et contrôle leur croissance [132]. ODF1 est un autre composant du centriole distal qui contrôle la longueur des centrioles, et est aussi important pour la formation des appendices du centriole [133].



Figure 19 : Structure d'un centriole mature (adapté de Dawe et al, 2007)

Pour être qualifié de « mature », un centriole doit construire 9 appendices distaux et un nombre variable d'appendices sous-distaux formés de microtubules (Figure 19). Les appendices distaux sont formés par le recrutement de ODF1 et C2cd3, suivi par Cep83 qui recrute à son tour Cep89 et Cep164. Les appendices sous-distaux, eux, sont formés par le recrutement de ODF2 suivi par le recrutement de CCDC120, CCDC68, Ninein et Cep170 se liant aux microtubules. Les appendices distaux sont équivalents aux fibres observées à l'extrémité distale des corps basaux des cils motiles (page 32), et les appendices sous-distaux sont équivalents au pied basal des corps basaux (page 26) [126,134,135].

Les centrioles ont donc une dualité de fonction. Assemblés par deux, un centriole père mature et un centriole fils immature, reliés par leur rootlet, forment les centrosomes (Figure 17 A) (appelés aussi MTOC (« MicroTubule Organising Center »)) qui permettent l'organisation du réseau microtubulaire dans les cellules en prolifération, ou forment un cil primaire (page 31) à partir du centriole père dans les cellules quiescentes (Figure 16). Après la mitose, les centrioles migrent vers la membrane pour former le cil, puis en transition G2/M, le cil est résorbé et les corps basaux migrent au centre de la cellule pour participer à la formation des fuseaux mitotiques pour la division cellulaire [118]. Les fonctions des centrioles, en tant que centrosome ou cil sont diverses, allant de l'organisation de la polarité cellulaire, à la signalisation, ou la prolifération cellulaire. Effectivement, le centrosome et les microtubules qui y sont ancrés régulent le positionnement de nombreuses molécules et structures, comme le noyau et l'appareil de Golgi, ainsi que la stabilité des jonctions et adhésions cellulaires contribuant ainsi à la forme de la cellule et sa polarité. Le cil, lui, a des rôles variés qui seront décrits ultérieurement (page 37) [126,128,136].



Figure 20 : Matériel péricentriolaire organisé autour du centriole (adapté de Mennella 2012)

La terminaison proximale du centriole organise également le matériel péricentriolaire (PCM) indispensable au centrosome pour la nucléation les microtubules (Figure 20) [126]. Le PCM est un complexe supramoléculaire dense aux électrons entourant les centrioles avec des anneaux complexes de γ -tubuline. Il fournit ainsi une plateforme pour ancrer les microtubules directement, ou *via* une plateforme de nucléation des microtubules (γ -TURC) [126,136–138]. L'un des composants principaux du PCM est la péricentrine (PCNT) qui s'étend radialement à partir du centriole [126]. Le PCM est organisé en 2 domaines structuraux principaux : (1) une couche juxtaposée au mur du centriole et (2) des protéines s'étendant plus loin du centriole, organisées en une matrice. Le PCM est constitué de 9 composants majeurs : CPAP, Cep120, Cep192, Cep152, centrine-2, péricentrine (PCNT),

CDK5RAP2, NEDD1 et TUBG1 (ces deux derniers deux forment le γ-TURC), organisés autour de l'extrémité proximale du centriole père d'une manière toroïdale (Figure 20) [139]. La couche la plus proximale du mur centriolaire est composée de fibrille de protéines Péricentrine-Like (PLP), se liant au mur du centriole par leur domaine C-terminal et rayonnant vers l'extérieur de la matrice. Cette couche montre une organisation symétrique dérivée de l'organisation en symétrie par 9 du centriole. PLP est requise pour le recrutement protéique et l'organisation de la couche externe du PCM, et forme également un portail sur le centriole père, dont l'ouverture est corrélée avec la formation du centriole fils [137,139] (page 50). Dans le PCM se trouvent de nombreuses protéines : Ninein, Centriolin, Dynactin, EB1, CAP FOP... responsables de l'ancrage des microtubules, et Katanin responsable du relargage des microtubules dans le cytoplasme [118].



Figure 21 : Satellites centriolaires (adapté de Prosser et al, 2020)

Autour du centrosome se trouvent des granules cytoplasmiques appelées satellites centriolaires (Figure 21). Ils sont constitués principalement par PCM-1 et BBS4, mais contiennent en réalité une soixantaine de protéines comme Cep290, OFD1. Ces complexes protéiques peuvent bouger vers le centrosome le long des microtubules de manière dépendante des moteurs moléculaires dynéines/dynactines et sont responsables du transport de protéines comme centrine-2, péricentrine, Ninein et d'autres protéines centrosomales ou ciliaires. Bien que OFD1 soit impliqué dans le recrutement des protéines du centrosome requises pour l'organisation microtubulaire de l'interphase, comme centrine-2 et Ninein, l'absence des satellites ne perturberait pas l'assemblage du centrosome. D'autres voies de transport prendraient le relais pour éviter l'absence de centrosome, les désordres d'organisation du fuseau mitotique et les instabilités chromosomiques associées lors de la division cellulaire. Par contre, en séquestrant ou en fournissant les composants protéiques, les satellites peuvent affecter la composition des centrioles et leur nombre lors

de la multiciliogenèse (différenciation des cellules multiciliées) (page 54) Par ailleurs, la perturbation du trafic protéique ciliaire par les satellites perturbe fortement la formation des cils, témoignant l'importance de ces structures dans ce processus [140-144].



I.2 - Les corps basaux

Figure 22: Structure du corps basal (adapté de Dawe et al, 2007 et Pedersen et al 2012)

Les corps basaux sont des centrioles matures composés également d'un ensemble de 9 triplets de microtubules espacés symétriquement de manière équidistante [145,146]. Ils diffèrent des centrioles par l'élongation des tubules A et B pour constituer l'armature de la zone de transition et générer la nucléation de la polymérisation de l'axonème, et par la perte de CP110 pour l'élongation des cils [132]. Ils présentent également un pied basal formé le long de certains triplets de microtubules, permettant d'organiser la position et l'orientation exactes des corps basaux. C'est une forme pyramidale se projetant en un angle droit à partir de la région moyenne du corps basal (Figure 22) [118,145,147]. A l'extrémité distale, des fibres de transition permettent l'ancrage des microtubules à la membrane plasmique et serviraient également de site d'amarrage aux protéines entrant dans le cil (Figure 22) [118,128,145,146,148]. Le rootlet, situé à l'extrémité proximale du cil, forme un cytosquelette interagissant avec les filaments d'actine dont la fonction primaire est de fournir un support structurel pour le cil [129,149]. Le corps basal s'ancre à la membrane plasmique grâce, entre autres, à la protéine ODF2, et forme à son extrémité distale une zone de transition (Figure 22), contiguë à l'axonème [118,150].



Figure 23 : Zone de transition (adapté de Gonzalves, Pelletier, 2017)

La zone de transition est située entre la terminaison distale des corps basaux et la partie la plus proximale de l'axonème ciliaire. Elle englobe les fibres transitionnelles du corps basal, colonne vertébrale de la zone de transition, composée des 9 doublets de microtubules externes, et de multiples rangées de liens en forme de « Y », appelés connecteurs microtubulaires, se projetant vers l'extérieur du doublet externe et connectant chaque doublet à la membrane ciliaire (Figure 23). La membrane ciliaire entourant les liens Y est un domaine membranaire spécialisé appelé collier ciliaire, jouant un rôle de portail lipidique [150–154]. La zone de transition se termine en distal par la dernière rangée de connecteurs tubulaires, qui correspond au niveau de la plaque basale où se trouve la terminaison proximale de la paire centrale de microtubules des cils 9+2 (page 32) [150,151,153,154].



Figure 24 : Interactions entre les modules MKS, NPHP et Cep290 dans la zone de transition (adapté de Czarnecki & Shah, 2012)

La zone de transition est composée de protéines solubles ou associées à la membrane par 3 modules : MKS, NPHP et Cep290 (Figure 24). Chaque module est constitué de plusieurs protéines différentes et dépend des autres pour assurer leur localisation dans cette zone [150,152]. Des protéines de MKS et NPHP seraient des constituants ou des stabilisateurs des connecteurs microtubulaires, expliquant leur rôle, entre autres, dans l'attachement du corps basal et de la zone de transition à la membrane plasmide [155].

La présence de ces fibres de transition, connecteurs tubulaires et collier ciliaire constituent une limite physique formant un mécanisme de portail bidirectionnel à l'entrée du cil, où siège un contrôle strict de la composition protéique ciliaire, cloisonnant ainsi le cil [152,153,156,157]. Ce contrôle de la composition ciliaire repose en fait sur une combinaison des différents composants de la zone de transition [151–154,157–159] :

- les structures du cytosquelette, qui occupent beaucoup d'espace dans et autour de la lumière du cil à sa base, rendant le transport vésiculaire peu probable par cette zone [151],
- des domaines membranaires, s'étendant en « patches » membranaires apicaux autour de la base du cil et présentant une composition lipidique et protéique spécifique distincte du reste de la membrane apicale, qui serviraient d'ancrage pour les vésicules contenant les composants des cargos ciliaires et qui voyageraient latéralement à travers la zone de transition [151],
- un réseau de Septin2, en association avec TMEM231, B9D1 et CC2D2A du complexe MKS, formant une barrière passive [159],
- les connecteurs tubulaires, certains membres de MKS, NPHP et Cep90, et la protéine transmembranaire TRAM qui ont également des rôles de sélectivité des composants entrant dans le cil par la zone de transition [151,152],
- TCTN1, TCTN2, CC2D2A et TMEM67 qui ont pour rôle de maintenir les composants dans le cil [151].

Le rôle de la zone de transition est autant d'empêcher l'entrée de molécules non désirées dans le cil, que d'autoriser certaines molécules à y entrer, ce qui est notamment important pour la transduction de cascades de signalisation comme celles des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), des récepteurs à tyrosines kinases, ou même des canaux ioniques [151]. La zone de transition agit également comme un portail lipidique. L'enzyme

INPP5E (inositol polyphosphate-5-phosphatase E) se localise dans cette zone et régule la composition en phosphoinositol et ainsi le trafic protéique orchestré par le Transport Intra-Flagellaire (page 35) à la membrane ciliaire [152].

Des dysfonctionnements au sein de la zone de transition, provoqués par des mutations dans les gènes codant les protéines constituant cette barrière, sont à l'origine de nombreuses pathologies ciliaires, appelées ciliopathies. C'est le cas des syndromes de Joubert ou de Meckel, entre autres [154] (page 98).



I.4 - La poche ciliaire (ciliary pocket)

Figure 25 : Poche ciliaire (adapté de Ke & Wang, 2014)

La poche ciliaire est une dépression de la membrane plasmique dans laquelle le cil est ancré (Figure 25). Ce domaine membranaire commence à partir des fibres de la zone de transition jusqu'à la région où le cil émerge dans l'environnement extracellulaire. Cette structure est spécialisée dans le trafic moléculaire. En effet, elle joue un rôle dans l'endocytose et l'exocytose par la formation de puits et de vésicules recouvertes de Clathrines, de protéines endosomales et de CD44. Elle permettrait d'évacuer les lipides et protéines en excès. Par ailleurs, la poche ciliaire se connecte avec le cytosquelette d'actine et sert probablement d'interface entre ce dernier et le cil [124,160].

I.5 – L'axonème

L'axonème est la partie principale du cil, qui crée une protrusion à partir du corps cellulaire. Il est constitué de doublets de microtubules (polymères de tubuline- $\alpha\beta$), entourés

de nombreuses autres protéines, encapsulés dans la membrane plasmique (Figure 26). Ces doublets de microtubules sont constitués de microtubules A cylindriques complets, et des microtubules B incomplets attachés au microtubule A avec lequel ils partagent 3 protofilaments. Ils s'étendent à partir des triplets de microtubules des corps basaux [128,137].



Figure 26 : Structure de l'axonème ciliaire (adapté de Ke & Wang, 2014)

L'établissement de microtubules fonctionnels requiert des modifications posttraductionnelles réversibles des tubulines α/β . Une combinaison variée de modification corégule leur motilité et/ou leur stabilité : palmitoylation, tyrosination/détyrosination (ajout/élimination du résidu tyrosine situé à l'extrémité C-terminale de la tubuline α , $\Delta 2$ modification, glutamylation, glycylation (ajout de résidus glycine à l'extrémité C-terminale de la tubuline), et acétylation (ajout de résidus acétylés à la lysine 40 de la tubuline α : Acetylated α -tubulin (Ac-tub)). Cette dernière modification post-traductionnelle la plus fréquente est associée à la stabilisation des microtubules et est la modification posttraductionnelle la plus utilisée pour la détection des cils en immunofluorescence. Elle est mise en place par l' α -Tubuline AcétylTransférase 1 (α TAT1) et peut être retirée par l'Histone DéACétylase 6 (HDAC6) ou la SIRTuin 2 (SIRT2) [124,161].

Deux types d'axonèmes sont répertoriés : ceux constituant les cils primaires et ceux constituant les cils motiles.

I.5.A - Cil primaire (9+0)

Le cil primaire est non motile et formé par la juxtaposition de 9 doublets microtubules sans axe central, lui conférant la dénomination « 9+0 » (Figure 27D) [162,163].



Figure 27 : Structure de l'axonème du cil primaire (Sun et al, 2019)

En réalité, la configuration 9+0 et la symétrie par 9 ne sont effectives que sur une courte longueur du cil, au-dessus de la zone de transition. L'architecture évolue ensuite progressivement en remontant vers l'apex. Deux doublets se glissent au centre du cil et l'axonème prend une configuration 7+2 avec 2 doublets de microtubules centraux entourés de 7 doublets (Figure 27 F). Une configuration 8+1 est également possible en remontant vers l'apex du cil (Figure 27 G-H). Par ailleurs, les doublets de microtubules deviennent progressivement des singulets de microtubules A, le microtubule B étant perdu au fur et à mesure de l'extension (Figure 27 G-H-I-J). D'autre part, les singulets n'ont pas tous la même longueur, et seuls certains atteignent l'apex du cil (Figure 27 H-I-J). L'axonème se termine ainsi avec un nombre limité de singulets de microtubules atteignant l'apex. Ces éléments expliquent la diminution graduelle du diamètre du cil vers l'extrémité distale [124,164]. Les microtubules sont connectés entre eux et à la membrane plasmique par un réseau de

protéines denses fibreuses inconnues à ce jour, augmentant leur stabilité structurale et renforçant le cil pour résister aux flux de liquides et favoriser un ploiement élastique réversible [164]. La perte de la symétrie de l'axonème lors de la progression vers l'apex, contribuerait également au ploiement du cil par le flux extracellulaire [124].



I.5.B - Cil motile (9+2)

Figure 28 : Structure de l'axonème 9+2 (adapté de Lindemann & Lesich, 2010)

Le cil motile est généralement plus long que le cil primaire. Il est retrouvé dans les cellules multiciliées et possède également 9 doublets de tubuline, ainsi que deux singulets supplémentaires formant un axe central (« 9+2 ») (Figure 28). Les doublets externes adjacents sont reliés par des bras de dynéines internes et externes, et un Complexe Régulateur de Dynéines (DRC), ou nexine, rendant possible la motilité. La paire centrale est reliée aux autres doublets par des ponts radiaires (radial spokes). Les doublets 5-6 sont reliés en permanence par un pont les empêchant de glisser l'un par rapport à l'autre [165]. L'extrémité proximale de l'axonème n'est pas constituée de dynéine, ni de pont radiaire. La présence des protéines FAP59 et FAP172 régule la périodicité des dynéines, nexines et des ponts radiaires [134,148,162,166]. La perte progressive de la symétrie par 9 de l'axonème vers l'apex serait également observée dans le cil motile et conduirait à la motion asymétrique provoquant le battement ciliaire et le flux directionnel du cil respiratoire [124].

I.5.C - Exceptions



Il existe des exceptions de structure et de mobilité ciliaires.

Figure 29 : Nœud embryonnaire (adapté de Yuan et al, 2015)

Le cil nodal, présent pendant le développement dans le nœud embryonnaire (Figure 29), est un cil motile de type 9+0, déterminant l'asymétrie gauche-droite de l'individu [162,163]. Pendant le développement des vertébrés, l'embryon passe d'une configuration symétrique bilatérale, à une configuration asymétrique. La symétrie est rompue au sein de ce qu'on appelle l'organisateur gauche-droite (left-right organizer), par la motilité ciliaire des cils nodaux dont le battement produit un flux de fluide extracellulaire unidirectionnel dirigé vers la gauche, appelé le flux nodal [167–171]. Les cils nodaux sont inclinés vers la partie postérieure des cellules du nœud ventral, dont la rotation permet le mouvement vers la gauche des particules membranaires, appelées paquets nodaux ventriculaires (« Nodal Vesicular Parcels » NVPs), pouvant résulter de l'activation de voies de signalisation (Hedgehog non-canonique par exemple), une élévation asymétrique du calcium intracellulaire et au changement de l'expression génique.



I.5.C.b - Les cils olfactifs

Figure 30 : Bulbe olfactif

Les cils présents à l'extrémité des dendrites des neurones olfactifs, présents dans le bouton olfactif de la cavité nasale sont des cils non motiles, mais de configuration (9+2) (Figure 30). Ils présentent à leur membrane des RCPG (Récepteurs membranaires Couplés aux Protéines G) auxquels se fixent les complexes odorants. L'activation de ces récepteurs, par des molécules odorantes, provoque une accumulation du second messager AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) engendrant une dépolarisation de la membrane, et donc un signal électrique remontant jusqu'au bulbe olfactif [172].





Figure 31 : Kinocils et stéréocils de l'oreille interne (adapté de Schwander et al, 2010)

Les kinocils sont des longs cils de type (9+2) immobiles, présents à la surface des cellules du vestibule de l'oreille interne. Chaque cellule, à sa surface apicale, contient des faisceaux d'une douzaine de stéréocils organisés en lignes de tailles croissantes. Les stéréocils sont des projections en forme de cheveux composées de filaments d'actine parallèles. Le plus long stéréocil est juxtaposé à côté d'un kinocil (Figure 31). Les stéréocils sont reliés entre eux et au kinocil par des filaments extracellulaires entre l'extrémité du stéréocil le plus court et la membrane du stéréocil adjacent plus grand. Ils jouent un rôle primordial dans l'audition, l'équilibre et l'orientation dans l'espace. Les pressions d'air provenant d'ondes sonores ou du positionnement de la tête, arrivent dans l'oreille interne et sont converties en pression de fluides induisant une déviation des stéréocils, provoquant une tension du filament extracellulaire. Cette tension permet l'ouverture d'un canal ionique, à l'extrémité du stéréocil, à l'origine de la dépolarisation de la membrane et du signal électrique remontant aux neurones sensitifs de l'oreille [173,174].

I.5.C.d – Les cils du plexus choroïde

Les cils des cellules épithéliales du plexus choroïde dans les ventricules cérébraux ont une structure 9+0 et présentent une mobilité transitoire lors de la période périnatale chez la souris, bien que leur rôle soit encore inconnu à ce jour [7,8].

Le fonctionnement des cils nécessite un assemblage précis de l'axonème, la biogenèse de la membrane et la localisation des protéines ciliaires, en étroite coordination avec le Transport Intra-Flagellaire et le trafic vésiculaire [175].



I.6 – Transport Intra-Flagellaire (IFT)

Figure 32 : Transport Intra-Flagellaire (adapté de Pedersen et al, 2012)

Le cil étant dépourvu de ribosomes, les protéines nécessaires à l'assemblage des cils nécessitent un transport entre le cytoplasme et l'extrémité distale du cil, à laquelle elles seront incorporées pendant l'élongation. Ce système de transport, appelé Transport Intra-Flagellaire (IFT), est un mouvement de trains, capables de porter des cargos contenant les molécules de structure du cil, disposés entre le doublet périphérique et la membrane (Figure 32). Les trains se déplacent soit de la base vers l'extrémité distale (transport antérograde), soit dans le sens inverse (transport rétrograde) [134,148,176–178]. Le Transport Intra-Flagellaire est donc un mouvement rapide et bidirectionnel de complexes protéiques le long des doublets de microtubules, orchestré par des kinésines dans le sens antérograde et des dynéines dans le sens rétrograde. Les trains antérogrades sont plus gros que les trains rétrogrades. A l'extrémité la plus distale, un gros train antérograde est converti en 3 trains rétrogrades plus petits en 3 à 4 secondes sur le même doublet. A la base du cil, les trains rétrogrades sont réutilisés pour construire de nouveaux trains antérogrades [148,179]. Les protéines IFT constituent une famille de 15 polypeptides composés de 2 sous-complexes : les IFT A (6 membres protéiques) et les IFT B (au moins 11 membres). Ces protéines sont localisées le long de l'axonème, mais une proportion significative est concentrée à la base des cils [180]. Les IFT74 et IFT81 présentent un domaine calponine capable de lier les tubulines et sont donc notamment responsables de leur transport [181]. Après l'élongation, le cil continue de renouveler ses composants et les recycle en maintenant l'IFT [134].

I.7 – L'apex

Le domaine distal du cil, ou apex, a une structure variable selon qu'il s'agit des cils primaires ou des cils motiles. Premièrement, cette zone subit une altération et une désorganisation de la conformation 9+2 ou 9+0 (page 29) qui peut être variable dans les deux cas. Deuxièmement, ils présentent des structures différentes entre la membrane ciliaire et les microtubules. En effet, dans les cils motiles, la paire centrale est coiffée par deux plaques orientées perpendiculairement à l'axe microtubulaire, attachées par des filaments distaux émanant des tubules A des microtubules externes, et reliés par d'autres filaments à la couronne ciliaire, constituée d'un amas de fibrille émanant de la membrane ciliaire à l'extrémité de l'organelle (Figure 33 B). Le cil primaire, lui, n'a pas de coiffe, ni de structure particulière à son apex (Figure 33 A) [182].





L'apex est un compartiment particulier où les trains acheminés par l'IFT relâchent leurs cargos contenant les composants structurels du cil, puis subissent une réorganisation et changent de protéine moteur pour retourner vers la partie proximale du cil, chargés de nouveaux cargos contenant les composants à recycler. Ainsi, l'apex est un centre de nucléation ou de dénucléation pour l'assemblage ou le désassemblage des microtubules, nécessitant la présence de nombreux acteurs, comme des protéines chaperonnes pour la stabilisation (HSP70 et CCT α), des régulateurs de la dynamique des microtubules (EB1 et IFT172), des protéines formant des canaux ioniques, ou propageant des signalux de signalisation comme Fuz (voie de signalisation PCP) et SUFU (voie de signalisation Hedgehog), des protéines de structures spécifiques et particulières comme SENTAN et FLAM8, des enzymes de modifications post-traductionnelles (comme l'arginine méthyltransférase), des protéines de liaison à l'actine (comme Myosine 6) ou aux protéines moteurs et des jonctions d'ancrage (comme l'intégrine α 8 et la protocadhérine-15 α) [182].

II. Fonction des cils

II.1 – Cil primaire

Le cil primaire est présent dans presque toutes les cellules vertébrées et joue un rôle dans différents processus physiologiques [183].

II.1.A- Voies de signalisation

Le cil contient de nombreux récepteurs de signalisation cellulaire, permettant la transduction de signaux de signalisation de la voie Hedgehog (page 76), ou des voies WNT canoniques ou non-canonique (page 73) qui est celle impliquée dans la polarité cellulaire planaire (Planar Cell Polarity, PCP) (page 46) [183].

II.1.B - Mécanosenseur

Le cil primaire est capable de détecter les mouvements extracellulaires. Il joue ainsi un rôle de mécano-senseur dans les reins : la courbure directionnelle du cil dépendant du flux d'urine dans les tubules rénaux active des canaux ioniques polycystine (PC1 ou 2) contrôlant la prolifération et la différenciation cellulaire dans les reins [183].

II.1.C - Photosensibilité

Le cil primaire joue également un rôle dans la photoréception : il est présent dans les cellules photosensibles dans le fond de l'œil et présente des Récepteurs membranaires Couplés au Protéines G (RCPG) permettant la conversion des signaux lumineux en signaux électriques [183].

II.2 - Cils motiles

Les cils motiles permettent le mouvement d'organismes unicellulaires comme les paramécies, *Chamydomonas, Trypanosomes, Tetrahymena,* ou de cellules uniques spécialisées comme les spermatozoïdes (Figure 34). Ils permettent également la génération de flux de fluides dans les organismes pluricellulaires au sein des épithéliums multiciliés comme le chez xénope, le poisson zèbre, ou les mammifères (page 38) [152,184].



Figure 34 : Organismes unicellulaires ou cellule propulsées par un ou des cil(s)/flagelles

Chapitre 4 : Régénération de l'épithélium des voies respiratoires

A l'équilibre, l'épithélium des voies respiratoires subit un lent renouvellement grâce aux cellules basales, qui jouent le rôle de cellules progénitrices. Cependant, malgré le système de défense abordé dans le deuxième chapitre, l'épithélium des voies respiratoires subit de fréquentes lésions provoquées par des polluants, des micro-organismes et des virus inhalés. L'activation du potentiel réparateur des cellules progénitrices permet alors sa réparation rapide et la restauration de ses fonctions de défenses. Ces lésions peuvent aller de la perte d'imperméabilité de surface et de la desquamation cellulaire partielle du tissu épithélial jusqu'à la dénudation totale de la lame basale [73,185–187].

L'étude de cette régénération demande la mise en place de modèles d'études *in vivo* et *in vitro*, dont certains seront décrits ci-après.

I. Modèles d'étude

I.1 - Modèles in vivo

I.1.A – La souris (mus musculus)

La souris, comme tous les mammifères, possède plusieurs organes bordés par un épithélium multicilié : les canaux efférents des testicules, les trompes utérines, les ventricules cérébraux et les voies respiratoires. La trachée est la structure la plus utilisée pour étudier les mécanismes qui régulent les processus de développement, de différenciation, ou de réparation des cellules des voies respiratoires. L'utilisation de techniques de modifications géniques, telles que les systèmes Cre-Lox ou CRISPR Cas-9, permettent de modifier l'expression génique dans l'embryon et d'en observer les effets phénotypiques pendant le développement, mais il est également possible de coupler génétiquement certains gènes à des séquences codant des protéines fluorescentes comme la GFP (Green Fluorescente Protein) de manière à pouvoir suivre leur localisation, ou encore pour réaliser des études de lignage cellulaire (marquage d'un gène permettant de suivre la localisation de son expression au cours de la différenciation cellulaire et déterminer ainsi l'origine des cellules matures) [188].

I.1.B – L'humain

L'épithélium des voies respiratoires humaines peut être étudié *ex vivo* à partir de différents tissus issus de plusieurs types de prélèvements :

- la turbinectomie : geste opératoire consistant en l'ablation des cornets nasaux hypertrophiés de patients souffrant d'allergies ou de rhinites chroniques

 la polypectomie : geste opératoire consistant en l'ablation des polypes nasaux (tumeurs bénignes inflammatoires de la muqueuse nasale) obstruant les sinus des fosses nasales

- les brossages bronchiques permettant le diagnostic de maladies respiratoires

- le prélèvement d'anneaux trachéaux ou bronchiques issus de poumons transplantés.

I.1.C - Le poisson zèbre (danio rerio)

L'embryon du poisson zèbre est notamment utilisé pour l'étude des cils car il présente plusieurs caractéristiques intéressantes [189] :

- L'embryon est transparent, rendant les observations et analyses des organes internes relativement aisées ;
- certains de ses organes présentent des cils à des stades précoces du développement, rendant ce modèle rapide à mettre en place pour l'observation de ces structures;

- l'altération de l'expression de gènes ciliaires provoque une courbure de l'axe du corps facilement observable permettant un criblage génétique très rapide ;
- les modifications d'expression génique peuvent être obtenues rapidement et de manière peu coûteuse grâce à l'utilisation d'oligonucléotides morpholino antisens permettant la répression de l'expression génique de manière spécifique [190,191]. Cette technique commence à être remplacée par la technique, encore plus spécifique, de CRISPR-Cas9 [192].

Les poissons zèbres possèdent des cils motiles (9+2) dans les placodes olfactives (Figure 35 A-E), les canaux du pronéphros (équivalent du rein), la vésicule otique et les vésicules de Kuppfer et des monocils (9+0) dans les portions postérieures des canaux du pronéphros. La moelle épinière contient les deux types de cils (Figure 35 H) [161,193].



Figure 35 : Organes du poisson zèbre présentant des cil (Song et al, 2016)

L'utilisation du poisson zèbre comme modèle d'étude des cils présente toutefois plusieurs inconvénients. Alors que les cellules multiciliées humaines projettent plusieurs centaines de cils à leur surface apicale, les cellules multiciliées du poisson zèbre n'en présentent que 16 au maximum [194]. Ceci laisse présager un mécanisme d'amplification des centrioles différent entre les deux espèces. En effet, certains gènes impliqués dans le processus d'amplification centriolaire (page 50) chez l'homme, sont absents du génome du poisson zèbre. C'est le cas de CCDC67/DEUP1 codant pour la protéine Deup1 [195] et de CDC20B dont le deuxième intron produit les microARN de la famille miR-449 dont le rôle dans la multiciliogenèse sera décrit ultérieurement [196,197] (page 83).

I.1.D - Le xénope (xenopus laevis)

L'embryon de xénope est un modèle très utilisé pour étudier la formation et la fonction des cils et de l'épithélium mucocilié *in vivo*. En effet, comme l'épithélium des voies respiratoire, son épiderme contient des cellules multiciliées, des cellules à mucus, de petites cellules sécrétrices, ainsi que des ionocytes (Figure 36). L'embryon de xénope respire à travers son épiderme et les cellules multiciliées qu'il contient génèrent un flux d'eau permettant le renouvellement de l'oxygène. Pendant l'embryogenèse, le développement de l'épiderme est rapide pour générer rapidement un flux efficace autour de l'embryon. Les cellules multiciliées présentent également une polarité planaire (page 46) permettant l'étude de ce mécanisme [17]. Par ailleurs, la nature externe de ce tissu permet de réaliser facilement des analyses microscopiques sur des animaux intacts et son utilisation, couplée aux nombreux outils moléculaires et génétiques disponibles (comme les morpholinos ou le système CRISPR-Cas9), rend ce modèle particulièrement intéressant et performant [16–18].



Figure 36 : Modèle du xénope (adapté de Dubaissi et al, 2010 et Walentek et al, 2017)

Cependant, des différences notables existent entre les deux épithéliums. Par exemple, les cellules à mucus représentent environ 60% de la surface de l'épiderme embryonnaire, et les cellules multiciliées environ 16%, soit une balance inversée par rapport à l'épithélium des voies respiratoires. Par ailleurs, le nombre de cils est seulement de plusieurs dizaines chez le xénope, alors qu'il est de plusieurs centaines dans l'épithélium des voies respiratoires [18]. En revanche, ces deux modèles partagent les principaux acteurs de l'amplification des centrioles, contrairement au poisson zèbre.

I.2 - Modèles in vitro

I.2.A - Modèle de culture primaire de cellules épithéliales des voies respiratoires humaines (HAEC) en Interface Air-Liquide (ALI)

Le modèle de culture de cellules épithéliales des voies respiratoires humaines (HAEC) placées à l'Interface Air-Liquide est un des modèles que j'ai le plus utilisé au laboratoire pendant ma thèse. Ce modèle de culture *in vitro* a été élaboré en 1988 par l'équipe de Reen Wu [198] à partir de cellules épithéliales isolées après digestion enzymatique de tissus provenant des voies respiratoires (cornets ou polypes le plus souvent). Ces cellules ainsi obtenues peuvent être mises en culture directement dans des inserts dont le fond est constitué d'un filtre semi-perméable préalablement recouvert de collagène de type IV (Figure 37). Les cellules obtenues après dissociation et déposées sur les inserts sont de plusieurs types : cellules basales, cellules à mucus et cellules multiciliées. Seules les cellules basales adhéreront sur le collagène IV, les autres seront aspirées lors des changements de milieux. Avant l'ensemencement sur les inserts, il est également possible d'utiliser une phase d'expansion en cultivant d'abord les cellules en flask sur plastique recouvert de collagène I. Le recours à cette étape permet d'enrichir la population en cellules basales et en multiplier le nombre pour ensemencer un plus grand nombre d'insert lorsque les expériences l'exigent.



Figure 37 : Modèle de culture en Interface Air-Liquide (ALI)

Après ensemencement sur les inserts, les cellules sont d'abord cultivées en condition immergée (milieu en position apicale et basolatérale) dans en milieu riche en facteurs de croissance, pauvre en Ca²⁺ et acide rétinoïque, favorisant la prolifération des cellules basales. Quand la confluence est atteinte et que l'épithélium devient étanche grâce à l'établissement des jonctions cellulaires, le milieu apical est retiré de manière à former une Interface Air/Liquide (ALI) et mimer les conditions physiologiques des voies respiratoires [199–201]. Cette transition est associée à un changement de milieu dans lequel les concentrations de Ca²⁺ et d'acide rétinoïque sont adaptées pour favoriser la polarisation et la différenciation des cellules [21,202]. Le temps nécessaire à la formation d'un épithélium différencié contenant les différentes populations cellulaires retrouvées *in vivo* est compris entre 20 et 25 jours. Les conditions expérimentales de culture sont détaillées dans le « Materials et Methods » des différents articles présentés dans la partie Résultats (page 122).

Plusieurs milieux de culture sont utilisés pour permettre la différenciation des cellules épithéliales des voies respiratoires humaines (HAEC) en ALI. Au début de mon travail de thèse, le plus utilisé était le milieu BEGM™ (Bronchial Epithelial Cell Growth Medium produit par Lonza référence CC-3170), mais depuis plus de 2 ans, un autre milieu de différenciation, le milieu Pneumacult™ produit par la société commerciale StemCell™ Technologies (référence 05001) est commercialisé et voit son utilisation se répandre. Des milieux non commerciaux existent aussi parmi lesquels figure celui mis au point par Clancy et collaborateurs, utilisé majoritairement pour des tests de courts-circuits permettant d'évaluer l'activité des canaux anioniques à la surface apical de l'épithélium [203]. Plus récemment, des études ont décrit un milieu dit « Half&Half » dont les propriété permettent, en théorie, d'obtenir des épithéliums différenciés dont la composition cellulaire serait plus fidèle à celle de l'épithélium des voies respiratoires *in vivo* [204].

I.2.B - Modèle de culture primaire de cellules épithéliales de trachées de souris (mTEC) en Interface Air-liquide (ALI)

Le modèle de culture de cellules épithéliales de trachées de souris en ALI est le deuxième modèle que j'ai utilisé au cours de ma thèse. Après dissociation enzymatique des cellules épithéliales de trachées de souris, suivie d'une étape d'adhésion sur plastique permettant d'éliminer des fibroblastes, les cellules sont ensemencées directement dans les inserts (Figure 37), recouverts dans ce cas de collagène de type I. Comme dans le cas des HAEC, les cellules sont d'abord cultivées en immersion (liquide en apical et en basolatéral) pendant quelques jours, le milieu de culture de prolifération (classiquement les « single quots » du milieu BEGM™ dans un milieu DMEM/F-12 1 :1 supplémenté avec 15mM d'HEPES) étant renouvelé tous les deux jours. La confluence cellulaire qui conduira à l'étanchéité de la culture et autorisera la transition ALI est évaluée en mesurant la résistance transépithéliale. Lorsque cette dernière atteint les 1000 Ohms, le milieu apical est aspiré

pour passer en ALI, et le milieu basolatéral est également aspiré puis remplacé par un milieu de différenciation (soit le milieu de différenciation BEGM[™], soit le milieu DMEM/F-12 1 :1 supplémenté avec 15mM d'HEPES contenant 2% d''UtroSer[™] G Serum Subsitute). Les cellules se différencient alors en un épithélium des voies respiratoires en 10 jours en moyenne. Les avantages de l'utilisation de mTEC sont la rapidité de différenciation de l'épithélium des voies respiratoires par rapport aux HAEC, ainsi qu'une phase d'amplification centriolaire très synchrone, qui intervient entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jour après la mise en ALI. Les conditions expérimentales de culture sont également détaillées dans le « Materials et Methods » des différents articles présentés dans la partie Résultats (page 122).

I.2.C - Modèle de culture de cellules épendymales primaires sur lame de verre

Les cellules épendymales de souris nouveau-née (Figure 38), obtenues après dissection du cerveau et dissociées par digestion enzymatique, sont amplifiées en plastique pendant 4 à 5 jours, puis ensemencées sur une lame de verre déposée dans un puits de culture. La différenciation de l'épithélium se produit ensuite en une semaine [205–207].



Figure 38 : Cellules épendymales de souris pour la culture cellulaire (Mercey et al, 2019)

I.2.D - Organoïdes

Les organoïdes de poumons humains dérivés de cellules souches humaines pluripotentes possèdent une structure tissulaire complexe incluant à la fois l'épithélium des voies respiratoires et les tissus de soutien *in vitro* (fibroblastes, cartilages et muscles lisses). Ces tissus reflètent les voies respiratoires fœtales et développent des structures ressemblant aux voies respiratoires adultes une fois transplantés *in vivo* [208–212]



II. La régénération de l'épithélium des voies respiratoires

Figure 39 : Régénération de l'épithélium des voies respiratoires

Les études de régénération de l'épithélium des voies respiratoires après blessure mécanique de l'épithélium trachéal de hamster ou celles décrivant la recolonisation de trachées de rat dénudées par des cellules de trachées fœtales humaines décrivent des étapes similaires (Figure 39) [186,213,214] :

- adhésion pour les cellules trachéales fœtales humaines,
- étalement des cellules (bordant la lésion mécanique, ou venant d'adhérer),
- migration des cellules basales et une adhésion dans toute la zone dénudée,
- rétablissement des jonctions serrées,
- prolifération active des cellules formant un épithélium malpighien,
- différenciation progressive en cellules matures.

Ces différentes étapes nécessitent des événements moléculaires et cellulaires bien précis dont je ferai la description dans les sous-parties suivantes.

II.1 - Colonisation de la lame basale dénudée : migration et prolifération

Lorsque les cellules basales migrent pour coloniser la lame basale dénudée par une blessure mécanique, celles-ci adhèrent transitoirement à la matrice extracellulaire et modifient cette dernière. Certains de leurs récepteurs, comme les intégrines, situés au pôle basal de ces cellules, utilisent les principaux composants de la lame basale comme la laminine ou le collagène IV comme support. Parallèlement, de la fibronectine polymérisée est déposée à l'interface entre les cellules et la matrice, favorisant ainsi la migration. Les intégrines activent également la kinase FAK (Focal Adhesion Kinase) qui, complexée avec d'autres kinases, provoque la réorganisation du cytosquelette d'actine *via* l'activation des petites GTPases Ras-MAP. Pendant la migration et l'adhésion, les métalloprotéinases MMP éliminent les molécules partiellement dénaturées et remodèlent la matrice nouvellement synthétisée. La prolifération des cellules basales, qui accompagne la colonisation de la lame basale, intervient sous contrôle de nombreux acteurs, dont les MMP sécrétées par les cellules du cartilage sous-jacent, facilitant ainsi le relargage de facteurs de croissance comme EGF (page 66), le TGF (page 72), sous contrôle de facteur de transcription (TP63) exprimé par les cellules basales (page 87) [186,215,216].

Une fois l'espace colonisé et les jonctions serrées reformées, le relargage de facteurs de croissance par les cellules mésenchymateuses (sous la lame basale) ou par les cellules basales nouvellement formées, initie la différenciation en cellules matures comme les cellules multiciliées, dont les étapes seront décrites dans une prochaine sous-partie.



Figure 40 : Polarisation planaire de l'épithélium des voies respiratoires (adapté de Vladar et al, 2015)

La polarité basale/apicale est définie par les jonctions cellulaires comme décrit précédemment (page 18). La polarité planaire et l'alignement des cellules de l'épithélium des voies respiratoires sont aussi instaurés dès la mise en place de ces jonctions cellulaires dans les cellules basales, sous l'impulsion de la voie de signalisation PCP (« Planar Cell Polarity »). Les membres principaux de cette voie se localisent de manière asymétrique au niveau du cortex cellulaire (couche spécialisée de cytoplasme sur la face interne de la membrane plasmique), au niveau des jonctions cellulaires apicales dans les cellules multiciliées, ainsi que dans les autres types cellulaires. Le côté distal des cellules contient les membres Vang-Gogh-like (Vangl), Prickle et Fmi. Le côté proximal contient Frizzled, Dishevelled, Diego et Flamingo. Les complexes Frizzled/Dishevelled recrutent et interagissent avec Vangl/Pickle de la membrane de la cellule adjacente pour former des complexes et une communication intercellulaire (Figure 40) [217–219]. Cette localisation asymétrique est la marque de la polarisation planaire de l'épithélium des voies respiratoires.

II.3 – Initiation de la différentiation cellulaire : quels progéniteurs ?

Les études portant sur la régénération de l'épithélium des voies respiratoires après blessure montrent que les cellules basales sont les progéniteurs de l'épithélium des voies respiratoires [47,186,213,214]. Toutefois, de nombreuses questions se sont posées concernant la plasticité des autres types cellulaires constituant l'épithélium des voies respiratoires. En effet, la distribution cellulaire démontre que les cellules basales ne sont présentes que dans les voies respiratoires extra-thoraciques, et même uniquement dans la trachée chez la souris [73]. En absence de cellules basales, ce sont les cellules sécrétrices qui prennent le relais et exercent un rôle de progéniteur. Elles peuvent alors se différencier en cellules multiciliées [47,220] et en cellules à mucus [58,221,222]. Par ailleurs, une étude a découvert qu'après ablation génétique (KO KRT5) des cellules basales chez la souris, les cellules sécrétrices, peuvent se dédifférencier en cellules basales [59]. Une étude a également mis en évidence qu'en cas d'exposition de l'épithélium bronchiolaire de souris (ne contenant donc pas de cellules basales) au naphtalène, un composé qui entre dans les cellules sécrétrices et les détruit, la lame basale qui semble alors dénudée, est en fait recouverte de cellules squameuses qui ont des caractéristiques des cellules multiciliées, à savoir des cils désorganisés, des corps basaux et des structures ciliaires intracellulaires. De plus, elles expriment FOXJ1 et la Tubuline BIV, mais n'expriment pas SCGB1A1, excluant qu'elles proviennent des cellules sécrétrices. La présence de ces cellules indiquerait que les cellules multiciliées subiraient une transformation en cellules squameuses en cas de déplétion des cellules sécrétrices. Les cellules squameuses se redifférencient ensuite progressivement en 4 à 7 jours en un épithélium des voies respiratoires contenant à nouveau des cellules sécrétrices et des cellules multiciliées. Cette étude montre que les cellules multiciliées seraient capables de transdifférenciation en cas de blessure qui occasionnerait la suppression des cellules sécrétrices [223]. Il a également été suggéré que les cellules des glandes sous-muqueuses pourraient proliférer et migrer pour repeupler l'épithélium des voies respiratoires endommagé par une blessure sévère [224–227]. Les

cellules neuro-endocrines pourraient également servir de cellules progénitrices pour les cellules sécrétrices et cellules multiciliées [75]. Il semble ainsi que les cellules basales seraient donc les principales cellules progénitrices dans les voies respiratoires extrathoraciques chez l'hommes et la souris, alors que dans les voies thoraciques de souris, ce sont les cellules sécrétrices qui exerceraient ce rôle. Par ailleurs, en cas de blessure, chaque type cellulaire peut exposer une plasticité pour que l'épithélium des voies respiratoires puisse revenir à l'homéostasie. D'ailleurs, en condition homéostasique, des expériences de « traçage de lignée » (« lineage tracking ») suggèrent que les cellules basales se différencient d'abord en cellules sécrétrices, qui se différencient ensuite en cellules multiciliées (Figure 41) [47]. Par ailleurs, les nouvelles méthodes de séquençage transcriptomique de cellules uniques (page 119) fournissent une autre méthode pour tracer les étapes de différenciation des cellules de l'épithélium des voies respiratoires. Notre laboratoire a confirmé par cette technique que, dans l'épithélium des voies respiratoires, les rôles de progéniteurs étaient bien exercés à la fois par les cellules basales et par les cellules sécrétrices, mais aussi par les cellules suprabasales. Ayant participé à cette étude, je détaillerai ces résultats dans la partie « Résultats » (page 126) [28].



Figure 41 : Les cellules basales et sécrétrices : des progéniteurs dans l'épithélium des voies respiratoires (adapté de Rao Tata et al, 2017)

Le processus de régénération de l'épithélium des voies respiratoires implique de nombreux facteurs moléculaires. Certains jouent un rôle particulier dans la multiciliogenèse

et ont fait l'objet de très nombreuses études qui ont particulièrement intéressé notre équipe et font l'objet de mon projet d'étude. Ils seront ainsi décrits dans les prochaines parties.

II.4 - La multiciliogenèse (différenciation des cellules multiciliées)

La multiciliogenèse requiert plusieurs étapes : (1) la sortie du cycle cellulaire, (2) la génération d'une centaine de centrioles par multiplication massive des centrioles (page 50), (3) la migration et l'ancrage des corps basaux à la surface apicale (page 58), (4) élongation des cils à partir des corps basaux (page 29) [228], détaillées dans les paragraphes suivants.

II.4.A - Arrêt du cycle cellulaire

Rappels sur le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un processus duquel résulte la duplication de l'ADN et la division cellulaire. Ce cycle est typiquement divisé en 4 phases : (1) la phase G1 (Gap 1 phase), ou interphase, pendant laquelle la cellule acquiert de l'énergie et se prépare pour la synthèse de l'ADN ; (2) la phase S (Synthesis phase), pendant laquelle la cellule réplique son matériel génétique ; (3) la phase G2 (Gap 2 phase), pendant laquelle la cellule vérifie l'intégrité de son matériel génétique et se prépare à la mitose ; et finalement (4) la phase M (Mitosis phase), pendant laquelle le noyau, le cytoplasme et la membrane plasmique se divisent. Les cellules quiescentes qui ne sont pas en phase de croissance sont en phase G0. Les phases G1, S et G2 correspondent à ce qu'on appelle l'interphase, et la mitose est divisée elle aussi en 4 phases : (1) La prophase pendant laquelle les chromosomes se condensent, (2) la métaphase, pendant laquelle les chromosomes viennent s'aligner au centre de la cellule, (3) l'anaphase, pendant laquelle les 2 chromatides de chaque chromosome se séparent vers les deux côtés opposés de la cellules grâce aux fuseaux mitotiques mis en place préalablement par les centrosomes, (4) la télophase, pendant laquelle les chromosomes atteignent les pôles du fuseau mitotique, la chromatine se décondense et la cytokinèse sépare les deux cellules filles [229,230].

Après prolifération massive des cellules basales pour recoloniser la lame basale, les cellules s'engageant dans un processus de différenciation sortent du cycle cellulaire (phase G0). Notre équipe a présenté dans l'étude du « Human Cell Atlas » (page 11) que pendant l'homéostasie, environ 1% de la population des cellules basales est en prolifération pour maintenir la population basale, et qu'un sous-groupe de cellules suprabasales exposent un profil d'expression génique qui indique qu'elles sont en prolifération [29]. Ce pourcentage faible est en cohérence avec le renouvellement lent en condition homéostasie rapporté précédemment [32]. Le reste de la population des cellules basales est sorti du cycle cellulaire après prolifération pour participer au renouvellement de l'épithélium des voies respiratoires.

Cette sortie du cycle cellulaire est indispensable car les centrioles, impliqués classiquement dans la mitose, doivent être alors affiliés à une autre mission : la multiciliogenèse. Dans ce contexte, les centrioles pourront ensuite évoluer pour devenir des corps basaux afin de former un ou plusieurs cils (page 26) [132,146,196,228,231,232]. La sortie du cycle cellulaire est possible grâce à l'inhibition de gènes régulateurs du cycle cellulaire comme les cyclines B1 et E2, la phosphatase CDC25A, mais également grâce à l'inhibition de l'expression de certains facteurs de croissance comme l'amphiréguline (membre de la famille EGF (page 66)) [196,228]. Cette inhibition est en partie due à l'action des microARN de la famille miR-34/449 qui seront décrits plus loin (page 80).

II.4.B - Amplification des centrioles

Dans les précurseurs des cellules multiciliées, des centaines de centrioles sont formés presque simultanément pour permettre la nucléation future de centaines de cils motiles. Ces cellules ne contiennent initialement que les deux centrioles du centrosome, qu'elles doivent amplifier pour obtenir jusqu'à 300 centrioles. Deux voies sont potentiellement mises en place : la voie centrosomale et la voie deutérosomale.

Dans la voie centrosomale, les procentrioles se forment autour des centrioles parentaux du centrosome, et dans la voie deutérosomale, autour d'une dizaine de structures sphériques denses aux électrons appelées deutérosomes (Figure 47) [206,207,233,234].

II.4.B.a - Voie centrosomale

La duplication semi-conservatrice est décrite initialement pour la duplication des centrosomes se produisant au long du cycle cellulaire (Figure 42) [131,235,236] :



Figure 42 : Duplication des centrioles (adapté de Bettencourt et al, 2007)

- A la fin de la mitose, la nouvelle cellule formée possède un centrosome unique constitué de deux centrioles (Figure 42 A).

- A la transition M/G1, la paire de centriole se « désengage » (se sépare), et perd sa conformation orthogonale. Le matériel péricentriolaire se sépare pour donner 2 structures indépendantes (Figure 42 B).
- Pendant la phase G1, chaque centriole recrute un matériel péricentriolaire pour préparer la duplication.
- Pendant la transition G1/S, un nouveau centriole (procentriole) croit perpendiculairement à chaque centriole père, formant ainsi 2 centrosomes constitués chacun d'un centriole père et d'un centriole fils (Figure 42 B).
- Pendant la phase G2, les procentrioles s'allongent (Figure 42 C).
- Pendant la mitose, les centrosomes se séparent et forment le fuseau mitotique pour une nouvelle division (Figure 42 D). Chaque cellule fille hérite ainsi d'un seul centrosome.



Figure 43 : Mécanismes moléculaire de l'assemblage du procentriole (adapté de Tang et al, 2013)

La formation du procentriole se fait de manière perpendiculaire au mur proximal du centriole père. La protéine Cep192, localisée le long du centriole père, permet le recrutement de Cep63 et Cep152 qui ensemble vont former un anneau autour de l'extrémité proximale du centriole père. Ces 3 acteurs coopèrent pour recruter et lier la kinase PLK4, initiatrice de la formation du centriole. PLK4 s'associe avec STIL et le phosphoryle, et ce dernier recrute alors SAS6. Ces 3 protéines forment le cartwheel, structure guidant l'assemblage du procentriole. SAS6 forme des homodimères en forme de tige, dont les têtes dimériques interagissent pour former un anneau central avec 9 extensions filamentaires de ses domaines C-terminaux qui rayonnent vers l'extérieur. Ce cartwheel détermine l'arrangement symétrique lors de l'assemblement des triplets de microtubules. Après la formation du cartwheel, CPAP, en association avec Cep135 et Cep120, catalyse la liaison des
dimères de tubulines et contribue ainsi à la formation et la stabilisation du mur de microtubule du centriole, puis à l'élongation des microtubules (Figure 43) [126,134,237,238].



Figure 44 : Elongation distale unidirectionnelle du microtubule A coiffé du γ-TURC (adapté de Canaday et al, 2015)

Cep192, qui est localisé sur toute la longueur du centriole, s'étale à travers le matériel péricentriolaire et est impliqué dans l'assemblage de ce dernier. Pour rappel, le matériel péricentriolaire est composé d'anneaux de γ-tubulines qui fournissent une plateforme pour ancrer les microtubules directement, ou à travers une plateforme de nucléation des microtubules (γ-TURC). Le microtubule A présente une élongation distale unidirectionnelle grâce au γ-TURC qui coiffe l'extrémité proximale pour empêcher son élongation dans cette direction (Figure 44). Le microtubule B utilise la surface externe du microtubule C se sert à son tour de la surface externe du microtubule B pour s'allonger de manière bidirectionnelle. CP110 et Cep97 limitent la longueur des centrioles en coiffant leurs extrémités distales [118,119,125–127,131,132,205,233,239–241].



Figure 45 : Désengagement des centrioles (adapté de Mardin et al, 2012)

Au cours du cycle cellulaire, le centrosome doit se dupliquer une, et une seule fois, pour éviter la formation de plusieurs fuseaux mitotiques et de générer ainsi des instabilités chromosomiques. L'engagement des centrioles (leur attachement l'un à l'autre) jusqu'à la fin de la mitose est suffisant pour empêcher la formation d'un autre procentriole. Dans ce cas, PLK4, STIL et SAS6 restent recrutés au centriole fils et un mécanisme intrinsèque inhibe la duplication d'autres centrioles par reconnaissance de ce complexe [126,131,242]. Le désengagement centriolaire à la fin de la mitose est dépendant d'APC (Anaphase Promoting Complex) ciblant la séparase qui va cliver les fibres interconnectantes entre les deux centrioles du centrosome (Figure 45) [131,242]. En fait, c'est la péricentrine au pôle proximal des centrioles, clivée par la séparase et phosphorylée par PLK1, qui va permettre la suppression de Cep215 désengageant ainsi les deux centrioles. Deux régulateurs du cycle cellulaire, Cdk1 et Cdk2 inhibent également la reduplication des centrioles. Cdk2 phosphoryle Cep76 pour empêcher l'activation prématurée de PLK1 et éviter un désengagement précoce. Cdk1 phosphoryle STIL pour l'empêcher de former un autre complexe avec PLK4 et SAS6 [126,242].



Duplication en forme de rosette

Duplication ectopique

Figure 46 : Amplification des centrioles par la voie centrosomale (adapté de Tang et al, 2013)

Concernant l'amplification les centrioles dans une cellule multiciliée en différenciation (en phase G0), il existe 3 types de duplications centrosomales permettant d'aboutir à la formation de plus de deux centrioles (Figure 46) [233] :

- la duplication orthogonale (canonique) qui vient d'être décrite,
- la duplication multiple en forme de rosette : de multiples nouveaux centrioles sont produits autour de l'extrémité du centriole père,
- la duplication ectopique où des centrioles surnuméraires sont formés et verticalement alignés le long de l'axe des centrioles pré-existants.

Les deux derniers types nécessitent une hyper-expression de PLK4, SAS6 et STIL pour contrer le contrôle empêchant la formation de centrioles supplémentaires autour des centrioles [239,241,243–248].

II.4.B.b – Voie deutérosomale

L'amplification centriolaire deutérosomale participe à l'amplification massive des centrioles dans les précurseurs des cellules multiciliées, et est amorcée par le facteur de transcription E2F4 (page 88) associé à MCIDAS (page 90) [249]. Après avoir induit le programme de transcription de la biogenèse des centrioles, E2F4 subirait une transition progressive entre le noyau et le cytoplasme et y forme des centres organisateurs pour l'assemblage et la nucléation des deutérosomes [250]. Le deutérosome est une structure dense aux électrons, une organelle non basée sur les microtubules, où les centrioles se répliquent. C'est la source majeure des centrioles pendant l'amplification (90%). Il est constitué principalement de deux composés spécifiques : CCDC78 et DEUP1 (CCDC67). La production massive des procentrioles y est réalisée par une cascade moléculaire mimant le programme de duplication des centrioles (Figure 47) [206,207,233,234].



Figure 47 : Amplification des centrioles (adapté de Meunier et al, 2016)

La présence du facteur Deup1 est indispensable à l'assemblage des deutérosomes. L'amplification centriolaire autour de ces structures se réalise en 3 étapes avec de nombreux acteurs commun à la voie centrosomale (Figure 48) [141,206,207,234,240,242,250–255] :



Figure 48 : Phases d'amplification deutérosomale (adapté de Al Jord et al, 2014)

- phase A (pour Amplification) : E2F4, Cep152 (dont le recrutement est géré par CCDC78), PLK4, STIL, SAS6 (pour la formation du cartwheel) et DEUP1 s'accumulent fortement autour du centriole fils (et pas du centriole père), microenvironnement local conduisant à la formation des deutérosomes. Une dizaine de foyers de précurseurs en forme de « halo » bourgeonnent séquentiellement du centriole fils du centrosome avant de s'accumuler plus profondément dans le cytoplasme. Ces halos sont composés d'un assemblage sphérique de plusieurs procentrioles immatures de taille identique contenant la centrine-2, disposés en forme de morula autour de DEUP1 (Figure 48),
- phase G (pour Growth (croissance)) : après la formation du dernier halo, il y a une intensification progressive et collective du signal centrine-2. L'ensemble des halos se transforme en structures organisées ressemblant à des fleurs. Les centrioles s'allongent et deviennent mature (de manière synchronisée chez la souris). Au même moment, une dizaine de procentrioles s'allongent de manière orthogonale aux extrémités proximales des centrioles du centrosome (voie centrosomale) (Figure 48),
- phase D (pour Désengagement) : ces fleurs se dissocient de manière synchronisée pour laisser apparaitre de multiples centrioles qui migrent et

s'ancrent à la membrane apicale pour devenir des corps basaux à partir desquels l'élongation des cils motiles s'initie (Figure 48).

Au début de la phase A, Cep164 n'est pas présent dans le centriole fils, le distinguant du centriole père. Au fur et à mesure que les deutérosomes augmentent, l'expression de Cep164 augmente en parallèle dans le centriole fils qui devient alors indistinguable du centriole père, témoignant de la conversion du centriole fils en centriole père [206].

Une étude récente a montré, dans les cellules épendymales de souris, que la déplétion du centriole fils n'est pas compensée par le centriole père, qui reste incapable d'accumuler DEUP1 pour former des deutérosomes. Par ailleurs, la déplétion totale des centrioles du centrosome ne bloque pas la capacité des progéniteurs des cellules multiciliées à former des deutérosomes ou des procentrioles, montrant ainsi qu'en réalité, les deutérosomes n'ont pas besoin du centrosome pour se former [206] (Figure 49). Ce qui est d'ailleurs confirmé par une autre étude de déplétion des centrioles [256]. En revanche, une quantité plus importante de deutérosomes est formée, compensant ainsi l'absence des centrioles du centrosome. Les centrioles apparaissent à partir d'un nuage de matériel péricentriolaire, ou de manière stochastique dans le cytosol. Les 3 phases sont toujours présentes et ont une durée inchangée, et les centrioles formés n'ont pas de défaut de structure. En présence ou en absence de centrosome, les deutérosomes et leurs procentrioles apparaissent séquentiellement à partir de régions focales caractérisées par la convergence de microtubules et l'accumulation de matériel péricentriolaire, appelées Centre Organisateur de microTubules (mTOC) acentriolaire [206].



Figure 49 : Amplification centriolaire en absence du centrosome (adapté de Rayamajhi et Roy, 2020)

Une autre étude récente a démontré que les deutérosomes eux-mêmes ne sont pas indispensables à l'amplification centriolaire dans les cellules épendymaires de souris et chez le xénope (Figure 50) En effet, en l'absence de deutérosome, mais en présence de centrosome, l'amplification centriolaire présente toujours les 3 phases décrites précédemment (phases A, G et D), dont la durée ne change pas non plus. Pendant la phase A, il n'y a pas d'apparition d'anneau de centrine-2 représentant normalement les procentrioles organisés autour des deutérosomes. En revanche, il y a présence d'un signal de centrine-2 augmenté autour des centrioles, et une accumulation graduelle de foci flous de centrine-2 venant de la région proche des centrioles. Pendant la phase G, les structures en forme de fleurs sont absentes et le signal centrine-2 s'intensifie autour des centrioles parentaux, indiquant que la voie centrosomale est augmentée en absence de deutérosome. Les foci flous sont ensuite remplacés par des spots représentant des procentrioles en croissance seuls ou en petits groupes dans une poche nucléaire dans laquelle du matériel fibrogranulaire est concentré. En absence de deutérosomes, la voie centrosomale prend donc le relais et l'amplification ne se restreint pas à l'extrémité proximale des centrioles, mais sur toute leur longueur. A leur proximité sont également produits des procentrioles en petits groupes qui sont relâchés dans le cytoplasme. Les centrioles restent préférentiellement produits par le centriole le plus jeune, lui conférant une plus grande capacité de nucléation centriolaire [207].



Figure 50 : Amplification centriolaire en absence de deutérosomes (adapté de de Rayamajhi et Roy, 2020)

Dans cette même étude, les auteurs ont généré des cellules privées à la fois de deutérosomes et de centrosomes et ils montrent que l'absence concomittante des deutérosomes et des centrioles parentaux n'affectent ni le nombre de procentrioles ni leur cinétique d'amplification dans les cellules multiciliées. Dans ces conditions, ces derniers sont amplifiés au sein d'un nuage marqué par la péricentrine, protéine du matériel péricentriolaire, et caractérisé par une proximité à la membrane nucléaire et la présence d'autres matériels péricentriolaires et de matériel fibrogranulaire (Figure 51) [207].



Figure 51 : Amplification centriolaire en absence de centrosome et de deutérosomes (adapté de Rayamajhi et Roy, 2020)

Ces deux études ont fait l'objet d'une revue récente qui fait la comparaison avec une étude plus ancienne réalisée également chez le xénope, montrant que l'inhibition de la formation des deutérosomes par l'utilisation de morpholino antisens bloque la formation des procentrioles [240]. Si ces deux études utilisent la même approche technologique dans le modèle du xénope, celle de Mercey et al. inclut également un modèle de souris KO pour le gène DEUP1 renforçant leurs conclusions. Par ailleurs, leurs résultats sont étayés par une étude récente montrant que la péricentrine, dans le matériel péricentriolaire, pouvait recruter SAS6 et promouvoir la biogenèse des centrioles [257]. La revue conclut que le matériel péricentriolaire serait le microenvironnement minimal suffisant pour la biogenèse des centrioles, et émet deux hypothèses. Dans la première, les deutérosomes et centrosomes seraient des sites secondaires non essentiels pour la nucléation des procentrioles, dans la seconde, les deutérosomes parentaux seraient la source de production des procentrioles dont la perte serait compensée par le matériel péricentriolaire [258].

Finalement, les centrioles matures migrent vers la surface apicale de la cellule, maturent en corps basaux et s'ancrent à la membrane plasmique [233].

II.5 - Migration et ancrage des corps basaux au pôle apical - Implication et remodelage du cytosquelette d'actine

Avant la migration, les centrioles sont maintenus à leur place dans le cytosol par leur composant p160ROCK (protéine kinase associée à Rho). L'activité de cette protéine doit être inhibée pour permettre leur migration [146,259]. La migration se fait grâce à l'association du centriole avec le système actine-myosine interne à la cellule, par polymérisation de l'actine F (forme filamentaire de l'actine) et par le glissement de la myosine MYH10 sur les filaments d'actine. L'assemblage des filaments d'actine génère une force qui propulse le corps basal le long du filament formé à travers le cytoplasme, s'apparentant à la motilité en « fusée » retrouvée pour la propulsion de bactéries intracellulaires (Figure 52) [135,146,195,260–266]. Pendant leur migration, les centrioles sont regroupés et connectés à la périphérie cellulaire par des câbles d'actine. Ce réseau interne d'actine est maintenu par Nubp1, qui joue un rôle dans la polarité cellulaire. Après ancrage des corps basaux, ce réseau d'actine interne est remplacé, ou probablement remodelé en réseau d'actine apical [266].



Figure 52 : Migration en fusée des corps basaux grâce au système d'actine-myosine (adapté de Vicente Manzanares et al, 2009)

Le cytosquelette apical subit une réorganisation dynamique et drastique, requise pour maintenir un espacement correct entre les corps basaux, la coordination globale de la polarité des cils et la coordination du battement métachronique des cils [267] (page 63). Ce réseau de cytosquelette est enrichi en actine, myosine, microtubules cytoplasmiques et filaments intermédiaires et sert d'ancrage aux corps basaux [146].



Figure 53 : Cytosquelette apical autour des corps basaux (adapté de Tateishi et al, 2017)

Les microtubules cytoplasmiques, associés à l'actine et des filaments intermédiaires, organisent un réseau dense de cytosquelette entourant les corps basaux sous la membrane apicale (Figure 53). Ce réseau crée un plan horizontal où les filaments intermédiaires s'organisent en un réseau/feuillet mince, quasiment en 2 dimensions juste sous la membrane plasmique au niveau du pied basal, en forme d'un filet circulaire autour de chaque corps basal. Les microtubules cytoplasmiques, eux, forment un réseau épais et complexe en 3 dimensions sous le niveau du pied basal, en forme de polygone (Figure 53). Les microtubules sont ancrés aux jonctions serrées par la protéine Cingulin. Un autre réseau du microtubule s'étend également verticalement jusqu'à la région basale de la cellule. Le réseau d'actine apical, lui, est composé de 2 pools distincts interconnectés. Un pool apical, qui dessine un maillage dense à la membrane, dans le même plan que les corps basaux de manière à ce que l'axonème du cil émerge de la cellule à travers les trous de ce maillage, et un pool sous-apical composé de filaments courts d'actine qui s'alignent et constituent un pont pour connecter le pied basal et l'extrémité distale du rootlet du corps basal voisin postérieur (Figure 54). Le pool apical d'actine commence à se construire pendant les étapes précoces de la différenciation en s'accumulant d'abord sous forme de foyers, puis devient organisé après l'ancrage des corps basaux. Le pool sous-apical est nécessaire à un battement ciliaire correct, mais pas pour la croissance des cils [135,195,266–268].



Figure 54 : Réseau d'actine apical et sous-apical orientant les corps basaux (adapté de Meunier & Azimzadeh, 2016)

Les centrioles sont connectés au réseau d'actine cytoplasmique pour leur migration et aux ponts d'actine sous-apicaux pour leur ancrage par des liaisons entre leur rootlet et des complexes protéiques connus pour réguler les adhésions focales qui lient habituellement le cytosquelette d'actine à la matrice extracellulaire. Ces complexes sont formés par les protéines FAK, Paxillin, Vinculin et Talin qui constituent des sites d'ancrages appelés « adhésions ciliaires » [195,269].

L'ancrage des centrioles/corps basaux est correct lorsque ces derniers sont alignés physiquement dans la même cellule, mais aussi avec ceux de la cellule voisine, et orientés le long de l'axe proximo-distal, dans le cas des voies respiratoires, dans la direction du battement ciliaire ; c'est-à-dire, lorsque le pied basal pointe dans la direction proximale (vers le nez) et que le rootlet strié pointe dans la direction distale (vers les bronches) (Figure 54) [217,218,266]. Dans l'épithélium des voies respiratoires humaines, ceci est permis grâce au réseau de cytosquelette décrit précédemment, et à la voie de signalisation PCP (Planar Cell Polarity) (page 46). Prickle 2 (PK2) est la seule protéine de la voie PCP qui est spécifique des cellules multiciliées. Avec la protéine Vangl, elle se localise au pôle distal après génération des corps basaux. Les protéines PCP polarisent les corps basaux en orientant leur réseau vers la région proximale par l'accumulation asymétrique de leurs composants. Des microtubules cytoplasmiques s'étendent du pied basal et se lient aux protéines PCP des jonctions apicales proximales. Les forces hydrodynamiques générées par les flux de fluides participent également à l'orientation des corps basaux [270–272]. Les protéines Dishevelled et Diversin sont également localisées à la base du cil et interviennent dans son ancrage [217,272].

L'organisation du cytosquelette apical est orchestrée par le recrutement de régulateurs d'actine par la voie de signalisation PCP (Planar Cell Polarity). En effet, Disheveled facilite l'activation de CapZIP, une protéine coiffant et régulant l'actine F, par la kinase ERK7. Flattop s'associe aussi avec Dishevelled et DLG3 pour l'ancrage des corps basaux. Par ailleurs, NPHP4, composant de la zone de transition qui relie les rootlets striés et le réseau apical d'actine, recrute Inturned, un autre membre de la voie PCP, qui lui-même recrute DAAM1 (Dishevelled-Associated Activator of Morphogenesis 1) pour permettre la formation du réseau sous-apical d'actine. Pour cela, DAAM1 recrute à son tour Dishevelled et RhoA (petite GTPase qui sont des protéines commutatrices dont le statut « on » « off » est déclenché par l'hydrolyse du GTP [273]. Disheveled active RhoA qui phosphoryle les protéines de liaison à l'actine comme ERM (Ezrine / Radixine / Moésine) favorisant ainsi leur localisation membranaire, leur permettant de relier l'actine à la membrane apicale. Ezrine, notamment, associe les corps basaux à la membrane et recrute EBP50 qui interagit à

nouveau avec les membres de la voie PCP. Ezrine interagit également avec ELMO, qui permet la modulation du niveau de phosphorylation d'Ezrine via Rac1 pour la migration et l'ancrage des corps basaux au pôle apical [195,252,265,274–284].

D'autres acteurs sont impliqués dans l'activation de RhoA, nécessaire au remodelage du cytosquelette d'actine. A la membrane apicale, MKS1 après interaction avec Meckeline, exprimée au niveau des centrioles, colocalise avec l'actine F, et interagissent avec Nesprine 2 et la filamine A, deux protéines de liaison à l'actine F, pour la migration et l'ancrage des centrioles. Meckeline en interaction avec la filamine A, active RhoA pour réguler l'activité de la myosine et les interactions avec le cytosquelette d'actine. Le remodelage du cytosquelette d'actine médié par RhoA pourrait permettre la migration et l'ancrage des centrioles à la membrane apicale [263,285]. Mon laboratoire a par ailleurs montré que les microARN miR-34/449 contrôlent la formation du réseau apical d'actine au cours de la multiciliogenèse en inhibant l'expression de la petite GTPase R-Ras, en induisant une relocalisation apicale de la filamine A et en activant la petite GTPase RhoA [286,287] (page 83).



Figure 55 : Liaison des centrioles aux vésicules ciliaires par l'intermédiaire de Chibby (adapté de Burke et al, 2014)

L'ancrage des centrioles nécessite la liaison d'une vésicule ciliaire à leur extrémité distale et la fusion de cette vésicule à la membrane plasmique. Elle est formée après le recrutement et l'attachement de plus petites vésicules dérivant de l'appareil de Golgi, aux appendices distaux du centriole, et la fusion de ces vésicules sous le contrôle de protéines de remodelage membranaires et la cascade Rab11/Rab8. Chibby, un composant des centrioles se liant à Cep164 des appendices distaux, permet le recrutement de la petite GTPase Rab8 et son activateur GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) appelé Rabin8 (Figure 55). La voie PCP agit dans ce processus en recrutant les vésicules contenant Sec8 [195,288].

Finalement Cep164 recrute TTBK2 pour induire le retrait de CP110 et permettre l'élongation des cils, et le recrutement du Transport Intra-Flagellaire. Nous verrons plus tard (page 83) que CP110 est aussi réprimé par les microARN de la famille miR-34/449 [289].

II.6 - Motilité des cils

L'axonème 9+2 est composé d'unités répétitives composées de 4 bras de dynéines externes, 3 bras de dynéines internes et 3 rayons radiaux. Les bras externes sont attachés au doublet de microtubules et sont des molécules de type bouquet à deux têtes contenant chacune une chaine dotée d'une activité ATPase. Ces chaines interagissent avec les microtubules adjacents et font bouger les microtubules les uns par rapport aux autres. En tout, 4000 bras composeraient l'axonème d'un cil. La motilité ciliaire est accomplie par le changement de conformation des bras de dynéines internes et externes, induit par l'hydrolyse de l'ATP, qui fait alors glisser les doublets adjacents les uns par rapport aux autres. Ce glissement est limité par les ponts protéiques entre les doublets adjacents et par l'ancrage basal de l'axonème, ce qui entraine une motilité en flexion (Figure 56). Les bras internes sont responsables de la formation du pli du cil et de la forme du battement ciliaire. Les bras externes, eux, ajustent la fréquence du battement [101,166,184,195,290].



Figure 56 : Glissement des bras dynéines permettant le ploiement ciliaire

Le battement ciliaire des cellules multiciliées comprend 2 phases : (1) le coup efficace (rapide), dans lequel le cil s'étend à travers un arc perpendiculaire à la cellule, (2) le coup de

récupération (2 à 3 fois plus lent), au cours duquel les cils restent courbés, largement parallèles au corps cellulaire jusqu'à ce qu'ils retrouvent leur position initiale (Figure 57). La nature bi-phasique du coup ciliaire est une considération importante pour la motilité efficace dans un environnement essentiellement sans inertie, dans lequel les cils agissent généralement [101,184,195,291,292]. Dans les voies respiratoires, les battements ciliaires sont dirigés le long de l'axe nez/bronche, vers le nez. Cette direction est contrôlée par deux mécanismes : des signaux de polarité planaire affectant la position des corps basaux (page 58), et les forces hydrodynamiques générées et perçues par le cil [145,255].



Figure 57 : Battement ciliaire en deux coups (adapté de Raidt 2014)

Juste après la maturation des cils, les corps basaux ne sont pas tout à fait alignés. Des biais d'orientation sont induits par les signaux PCP. S'en suit un flux initial faible dont les forces hydrodynamiques établissent une boucle de rétrocontrôle positif, dans laquelle les cils répondent au flux par raffinement de la position de leurs corps basaux, jusqu'à ce qu'ils soient alignés. En effet, les cils des cellules multiciliées ont également des fonctions de senseurs du flux pour adapter leurs battements. Cette réponse requiert à nouveau les signaux PCP, notamment Vangl2 pour remodeler le cytosquelette. Cette réponse au flux ne peut se faire que sur la période où les cellules multiciliées ne sont pas encore entièrement polarisées. Une fois cette période passée, les cellules bloquent l'orientation des cils par la protéine Bbof1 (Basal body orientation factor 1) [195,267,270,271,293].

En considérant l'axe du coup efficace des cils des cellules multiciliées, chaque cil le long de cet axe synchronise son battement en accord avec ses voisins et ceux des cellules voisines avec une petite phase de décalage. Le long de l'axe perpendiculaire à l'axe du coup efficace, les cils sont synchronisés (Figure 58). Cette synchronisation particulière est telle que les apex des cils forment une onde de surface connue comme onde métachronale, qui propulse les fluides d'une manière concertée. Cette onde métachronale est dite antiplectique, c'est-à-dire qu'elle bouge dans la direction opposée du flux de mucus. Elle est déterminée par l'arrangement géométrique des corps basaux, au même titre que leur espacement et leur orientation. Les ponts d'actine relient le pied basal d'un cil et le rootlet strié du corps basal voisin créant une connexion physique entre les cils, servant de levier physique pour faciliter la propagation de l'onde au sein de la cellule. L'onde métachronale est aussi déterminée par la coordination du battement ciliaire avec les forces hydrodynamiques. Cette coordination impliquerait un mécanisme de retour qui régulerait l'activité des dynéines de l'axonème (page 32) [99–101,195,290,292,294].



Axe métachronal

Figure 58 : Coordination des cils formant une onde métachronale (adapté de Brooks & Wallingford, 2014)

Le motif et la fréquence de battement peuvent changer en réponse à une augmentation de la viscosité du mucus ou en réponse à des signaux de messagers intracellulaires tel que l'AMPc ou le GMPc, le signal calcique, ou encore une modification du pH intracellulaire. Si deux cils voisins perdent leur synchronicité métachronale, ils se synchronisent à nouveau en seulement deux cycles de battement [99–101,290,292,294].

Chapitre 5 - Les mécanismes moléculaires régulateurs de la différenciation de l'épithélium des voies respiratoires

De nombreux acteurs, voies de signalisation et facteurs de transcription interviennent dans les différentes étapes de la différenciation de l'épithélium des voies respiratoires. Les acteurs principaux vont être décrits dans les prochaines parties.

I. Les voies de signalisation

I.1 - La voie de signalisation de l'EGF (Epidermal Growth Factor)

Le récepteur de l'EGF, EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) mais également les proligands (ligands non matures) de cette voie, EGF et TGF- α sont enrichis à la surface des cellules basales de l'épithélium des voies respiratoires [295]. Certains stimuli, une blessure par exemple, permettent la libération de ces proligands de la surface de ces cellules, par clivage protéolytique (par des métalloprotéases notamment). Ainsi libérés, les ligands EGF ou TGF- α se lient alors à leurs récepteurs EGFR à la surface des cellules. Cette liaison conduit à une autophosphorylation du récepteur EGFR par son domaine tyrosine kinase, et à l'activation subséquente de la cascade de signalisation, passant par l'activation des voies PI3K (« Phospholnositide 3 Kinase »), MAPK (« Mitogen-Activated Protein Kinase ») et JAK-STAT (« Janus kinase » - « Signal Transducers and Activator of Transcription ») (Figure 59).



Figure 59 : Voie de signalisation de l'EGF (adapté de Cappione et al, 2012)

En fait, la phosphorylation d'EGFR peut s'effectuer de manière dépendante ou indépendante de ses ligands. Dans les polynucléaires neutrophiles, par exemple la libération des radicaux libres oxygénés (stress oxydatif) suffit à activer EGFR de manière indépendante de ses ligands. Les macrophages ou les polynucléaires éosinophiles expriment les ligands de type EGF à leur surface. Les polynucléaires éosinophiles peuvent induire la sécrétion de TGF- α par les cellules basales. Les bactéries présentent à leur surface d'autres molécules permettant également le clivage des proligands, activant ainsi l'EGFR [296].

La cascade d'activation d'EGFR subséquente intervient notamment dans la réparation de l'épithélium des voies respiratoires suite à une blessure, où elle participe à la migration des cellules pour accélérer la fermeture. Elle induit également l'expression de mucines (notamment de MUC5AC) (Figure 60) [296–301].



Figure 60 : Expression des mucines induite par la voie de signalisation EGFR (adapté de Burgel et al, 2000)

L'activation d'EGFR induit l'expression de chimiokines comme l'IL-8, recrutant en retour les cellules du système immunitaire. Les infections respiratoires et les blessures à répétition, conduisant à une activation fréquente de la voie de l'EGFR, pourraient induire une réponse exagérée du système immunitaire, particulièrement dans les maladies respiratoires chroniques (page 102). La voie EGFR entre dans une inflammation chronique induite par le système immunitaire, conduisant à une surproduction de mucus qui contribue à l'aggravation de ces maladies et à l'apparition d'une hyperplasie tissulaire caractérisée par une augmentation du nombre de cellules à mucus [297-300]. Une étude réalisée sur l'exposition à la fumée de cigarette montre qu'elle induit l'expression du proligand EGF dans les cellules multiciliées, et qu'après activation subséquente de la voie EGFR dans les cellules basales, ces dernières effectuent une transition dans leur programme de différenciation et se transforment en cellules squameuses formant une barrière épithéliale plus perméable (diminution des jonctions épithéliales). La multiciliogenèse et la différenciation des cellules sécrétrices sont alors inhibées et la barrière jonctionnelle perd son intégrité [295]. Ces informations désignent donc l'EGFR comme une cible thérapeutique potentielle dont l'inhibition pourrait atténuer les conséquences d'inflammations chroniques de l'épithélium des voies respiratoires. Cependant, l'inhibition thérapeutique de cette voie dans ces cas, ne peut être envisagée qu'après avoir évalué les potentiels effets bénéfiques et délétères d'une telle opération, notamment concernant l'inhibition de la réparation des blessures [297,298].

I.2 - La voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch est impliquée dans de nombreux processus physiologiques, comme la segmentation lors du développement [302,303], la morphogenèse [304,305], le développement du système nerveux, l'hématopoïèse [306,307] et des processus pathologiques, comme les cancers [305,308–310].



Figure 61 : Voie de signalisation Notch (adapté de Kitagawa et al, 2016)

Cette voie s'active lorsque le récepteur transmembranaire Notch se lie à un ligand transmembranaire, présenté par une cellule adjacente (Figure 61). La signalisation est donc restreinte aux seules cellules avoisinantes [311-316]. Les récepteurs sont au nombre de 4 : Notch 1 à 4, et les ligands au nombre de 5 parmi lesquels figurent Jagged 1 et 2, et Delta-like Dll1, 3 et 4. Ces ligands sont tous des activateurs, excepté Dll3 [305,317]. Après liaison avec son ligand, le domaine intracellulaire de Notch est alors libéré par protéolyse (NICD, Notch IntraCellular Domain), se lie au complexe activateur CSL/RBPJK transloque dans le noyau où il régule directement l'expression des gènes, comme les membres de la famille HEY/HES (Figure 61). Cette voie de signalisation intervient dans différents contextes développementaux grâce à la large variété de modifications post-transcriptionnelles ainsi que via d'autres processus cellulaires modifiant l'activité de Notch et de ses ligands Jagged et Delta-like [305,311–314]. La régulation transcriptionnelle des gènes cibles de la voie Notch se fait également grâce à un cofacteur de Notch, nommé CSL (CBF1, Suppressor of Hairless, Lag1), qui en absence de signalisation Notch, réprime la transcription des gènes cibles et, en présence de signalisation, est converti en activateur transcriptionnel [303,305,307,318]. La constante d'affinité entre ligand et récepteur dépend de modifications post-traductionnelles des récepteurs Notch, particulièrement par les protéines de la famille Fringe (Lunatic, Maniac et Radical). Par exemple, Lunatic permet l'activation de Notch par DLL1 et diminue son activation par Jag1 [305].

Dans l'épithélium des voies respiratoires matures, les cellules basales expriment continuellement à leur surface un ligand de la voie Notch permettant ainsi une activation constitutive de cette même voie dans les cellules sécrétrices filles avoisinantes. Cette activation permet de maintenir un pool de cellules sécrétrices avant leur engagement dans le processus de différenciation terminale en cellules multiciliées qui sera déclenchée lors d'une inhibition de la voie Notch [35,188]. L'activation de Notch est requise pour la différenciation, mais pas l'auto-renouvellement, des cellules basales vers le lignage des cellules sécrétrices (Figure 62) [319].



Figure 62 : Signalisation de la voie Notch dans la différenciation de l'épithélium des voies respiratoires (adapté de Pardo-Saganta et al, 2015)

Au cours de la différenciation, les cellules qui entrent en différenciation multiciliée produisent les ligands responsables de l'activation de Notch, suggérant une inhibition latérale, de cellule voisine à cellule voisine, médiée par Notch régulant la sélection de cellules sécrétrices au détriment des cellules multiciliées (Figure 62) [23,320–324]. En effet, Notch agit lorsque l'engagement vers une cellule multiciliée ou non-« multiciliée » survient, en inhibant le programme multicilié dans les cellules qui restent dans le lignage des cellules sécrétrices [322]. Cette inhibition latérale implique la répression du facteur de transcription RFX2 (page 94) [321]. Notch contribue également à la régulation de l'abondance des cellules neuroendocrines [320,324]. Le blocage des ligands de la voie Notch induit une perte des cellules sécrétrices et à mucus, ainsi qu'une augmentation des cellules multiciliées, sans modification de la mort cellulaire ou de la prolifération, ce qui suggère que les premiers

types cellulaires sont directement convertis en cellules multiciliées. Parmi les gènes régulés par cette voie de signalisation, sont retrouvés les facteurs Hes1, Hes7 [303] qui sont des répresseurs transcriptionnels, inhibiteurs de la différenciation. Hes6 est un répresseur de la voie de signalisation Notch qui agit en inhibant directement l'activité de Hes1 [325]. Il est d'ailleurs retrouvé dans les cellules multiciliées immatures, probablement pour renforcer l'inhibition de la voie Notch dans cette population précurseur des cellules multiciliées [326].

Il existe une sollicitation spécifique de Notch pendant l'hyperplasie des cellules à mucus induite par les cytokines, résultant également en une diminution des cellules multiciliées, plaçant l'inhibition de la voie Notch comme une prévention de la métaplasie malpighienne [327,328]. En effet, l'inhibition de Jagged permet également d'inverser la métaplasie des cellules à mucus dans un modèle d'asthme [317].

La voie de signalisation Notch a un rôle controversé dans la différenciation des ionocytes. Deux études réalisées chez le poisson zèbre montrent que la voie Notch est inhibée par FOXI1 pour permettre la différenciation des ionocytes [69,70]. Une étude chez le xénope montre également que l'inhibition de la voie Notch est requise pour la différenciation des ionocytes. Cependant le mécanisme impliquant FOXI1 est différent. Il agirait en aval de Notch dans ce modèle, contrairement au poisson zèbre, et régulerait négativement l'expression de FOXI1 [329]. Une dernière étude plus récente sur les ionocytes, réalisée chez l'humain, montre que l'activation de la voie Notch est nécessaire à l'expression de FOXI1 pour permettre la production des ionocytes [71]. Cette activation nécessaire de la voie Notch interpelle face à l'expression de Hes6, inhibiteur de la voie Notch dans ces cellules. Des investigations plus poussées semblent nécessaires pour comprendre ces différences entre chaque modèle.

I.4 - La voie de signalisation dépendante des BMP

Les « Bone-morphogenetic Proteins » (BMP) sont membres de la famille TGF- β [330– 332]. Ils ont été initialement décrits comme de puissants acteurs de la formation des os et des cartilages, expliquant l'origine de leur nom [333,334]. La signalisation BMP est médiée par des récepteurs spécifiques qui sont des tétramères hétérodimèriques constitués de 2 différentes sous-unités sérine/thréonine kinase. Ces sous-unités sont de type I et II. Après la liaison d'un ligand, le récepteur de type II phosphoryle et active le récepteur de type I qui, à son tour, phosphoryle les cibles cytoplasmiques incluant les membres de la famille protéique SMAD (Figure 63). SMAD1/5/8 s'associent avec SMAD4 et sont transportés dans le noyau où ils exercent leur fonction d'activateur ou de répresseur de transcription génique [335–337].



Figure 63 : Voie de signalisation BMP (adapté de Sagorny et al, 2012)

Des résultats, obtenus dans notre équipe sur les modèles de HAEC en culture ALI et sur l'embryon de xénope, ont montré que la voie SMAD est active (phosphorylation des protéines SMAD1/5/8) à un stade précoce dans les cellules multiciliées et les ionocytes chez le xénope, ainsi qu'au cours de la prolifération et de la polarisation des HAEC [338]. En revanche, cette activation diminue dès le début de la multiciliogenèse. Par ailleurs, l'augmentation de l'activité de la voie BMP, induite par l'ajout de BMP2/4, induit une diminution de nombre de cellules multiciliées, de cellules à mucus et d'ionocytes dans les deux modèles. De plus, dans l'épithélium de l'embryon de xénope, une diminution de l'activité de BMP est nécessaire pour l'identité des cellules multiciliées (traduite par l'expression de FOXJ1), des ionocytes et des petites cellules sécrétrices. Inversement, son activité est nécessaire à leur insertion dans l'épiderme en développement. Elle est également nécessaire pour la différenciation des cellules à mucus. Finalement, dans l'épithélium des voies respiratoires normales et pathologiques (mucoviscidose, CF), l'inhibition de BMP stimule également très fortement la formation des cellules multiciliées, tandis que son activation présente les effets opposés. Ce travail identifie la voie BMP comme un régulateur clé de la différenciation et morphogenèse de l'épithélium mucociliaire des vertébrés (Figure 64) [338].



Figure 64 : Rôle de la voie BMP dans la multiciliogenèse

I.3 - La voie de signalisation TGF-B

La famille TGF- β agit *via* un complexe de récepteurs hétéromériques présent à la surface cellulaire et un signal intracellulaire transduit par un complexe formé de plusieurs membres de la famille SMAD. Les récepteurs sont des sérine/thréonine kinases transmembranaires de type II et I. Les SMAD sont activées par phosphorylation par le récepteur du TGF- β , puis forment des complexes hétéromériques SMAD-SMAD qui migrent dans le noyau pour orchestrer une réponse transcriptionnelle (Figure 65) [339,340]. Cette voie de signalisation peut être régulée par des modifications post-traductionnelles [341].



Figure 65 : Voie de signalisation TGF-8 (adapté de Kahlem et al, 2009)

L'activité de la voie du TGF- β , en concert avec celle de BMP (page 70), absente dans les cellules basales, augmente au début de la différenciation, dans les progéniteurs intermédiaires (cellules suprabasales et cellules sécrétrices). Cette activité, qui se manifeste par la présence de phospho-SMAD1/5/8 (pour BMP) et de phospho-SMAD 2/3 (pour TGF- β), est nécessaire pour les étapes précoces de la différenciation de l'épithélium des voies respiratoires, mais doit, dans le cas de BMP, être inactivée par la suite pour permettre la différenciation des cellules [342]. La voie du TGF- β , elle, reste active et Xnr1, membre de cette famille, également cible de la voie Notch, induit la phosphorylation de SMAD2 qui intervient dans le contrôle de la longueur des cils *via*, entre autre TTC25 de manière indépendante à MCIDAS, FOXJ1 ou RFX2 (Figure 66) [343].



Figure 66 : Rôle de la voie de signalisation TGF-8 dans l'élongation du cil (Tözser et al, 2015)

I.5 - La voie de signalisation WNT/β-caténine

L'activation de la voie de signalisation WNT/ β -caténine repose sur la dégradation ou la stabilisation de la β -caténine. En absence de ligand WNT, la voie est inactive car le complexe de destruction GSK3/AXIN/APC/caséine-kinase1 α phosphoryle la β -caténine qui est alors ubiquitinylée et dégradée par le protéasome. La voie est activée par la liaison extracellulaire de ligands WNT sur le récepteur Frizzled et son co-récepteur LRP5/6, qui recrutent la kinase GSK3 à la membrane où cette dernière est inhibée. La β -caténine est ainsi stabilisée et entre dans le noyau pour agir en co-régulateur transcriptionnel à travers la liaison aux facteurs de transcription TCF/LEF (Figure 67) [344,345].



Figure 67 : Voie de signalisation WNT/-caténine (adapté de Baarsma et al, 2017)

Peu d'études ont été réalisées à propos de cette voie de signalisation dans l'épithélium des voies respiratoires. Néanmoins, des études récentes rapportent un rôle très finement régulé de cette voie dans la multiciliogenèse. Au début de la régénération de l'épithélium des voies respiratoires, l'activité WNT/β-caténine est très élevée dans les cellules basales [344]. Cette activité est nécessaire à leur maintien via l'activation du facteur de transcription TP63 (page 87) [344]. L'augmentation de l'activité WNT/β-caténine, par un inhibiteur de GSK3 (complexe de destruction de β-caténine appelé CHIR), pendant la culture en phase immergée des cellules basales humaines cultivées sur inserts, augmente la prolifération des cellules basales [346]. En revanche, cette activation de l'activité WNT/βcaténine après traitement CHIR pendant la différenciation de l'épithélium des voies respiratoires humaines en culture en insert à l'Interface Air/liquide empêche la différenciation en cellules multiciliées [346,347]. Il semblerait donc que l'inhibition de la voie WNT soit nécessaire à la formation des cellules multiciliées dans l'épithélium des voies respiratoires. Ce qui est confirmé par l'absence de ces cellules en cas d'activation de la voie WNT/ β -caténine par fortes doses du ligand WNT3a pendant la phase de culture cellulaire à l'Interface Air/Liquide. Cependant, un traitement des cellules avec une dose plus modérée de WNT3a augmente le nombre de cellules multiciliées à la fin de la différenciation, témoignant d'un rôle de la voie WNT dans la multiciliogenèse [346]. Par ailleurs, la déstabilisation de la β-caténine pendant les étapes précoces de la multiciliogenèse en culture ALI empêche la formation de cellules multiciliées [347]. Il semblerait donc que

l'activité de la voie WNT/β-caténine soit finement régulée pendant la différenciation de l'épithélium des voies respiratoires. En effet, la mesure de l'activité globale WNT/β-caténine pendant la régénération, diminue progressivement et se restreint progressivement aux cellules multiciliées chez le xénope, la souris et l'humain [344]. Dans ces modèles, cette même activité est un peu plus faible dans les cellules multiciliées que dans les cellules basales, mais elle est nécessaire à la formation des cellules multiciliées par l'activation de FOXJ1 (page 93), et d'autres gènes de la multiciliogenèse (MCIDAS (page 90), CCNO (page 98), CDC20B (page 95)...) [344]. Un maintien d'une activité trop élevée de l'activité WNT/β-caténine inhibe la spécification des cellules basales en cellules multiciliées chez le xénope, la souris et l'humain (Figure 68) [344,346–349]. La régulation de la voie WNT/β-caténine au cours de la différenciation impliquerait les cofacteurs P300 et CBP, inhibiteurs de la β-caténine en concert avec la voie de signalisation Notch [347].



Figure 68 : Implication de la voie de signalisation WNT/6-caténine dans la différenciation de l'épithélium des voies respiratoires (adapté de Haas et al, 2019)

De par sa capacité à induire une hyperplasie basale en cas d'activation élevée et prolongée, la voie de signalisation WNT/ β -caténine est impliquée dans plusieurs pathologies respiratoires telles que les BPCO, ou l'asthme (page 102) [344,348–351].

I.6 - La voie de signalisation Hedgehog (Hh)

La voie de signalisation canonique Hh a été clairement décrite dans le cil primaire. En effet, ce cil porte spécifiquement les récepteurs de la voie Hh. En l'absence du ligand SHH, PTCH1 (Patched 1), son récepteur, inhibe la protéine SMO (Smoothened) et la cascade de signalisation qui lui est associée. En revanche, en présence du ligand SHH, sa liaison sur récepteur PTCH1 libère SMO qui migre à la membrane du cil et active les facteurs de transcription GLI (GLI1, GLI2 et GLI3) le long du cil. Ces derniers se retrouvent alors transloqués dans le noyau où ils activent l'expression des gènes cibles (Figure 69) [352].



Figure 69 : Voie de signalisation Hedgehog dans le cil primaire (adapté de Gorojankina et al, 2016)

En revanche, le rôle de la voie Hh dans les cils motiles n'avait pas été décrit avant la publication de deux études récentes qui décrivent différents rôles de cette voie dans l'épithélium des voies respiratoires. Une partie de mes travaux s'inscrivant dans cette problématique, je les présenterai dans la partie Résultats (page 131).

La première étude décrit les membres de la voie Hh dans un épithélium des voies respiratoires bronchiques pleinement différencié cultivé à l'Interface Air/Liquide [353]. Les transcrits de SHH, SMO, SUFU, GLI2 et GLI3 y sont présents. Le transcrit de GLI1 est détecté, mais très faiblement exprimé. SHH est détecté au niveau protéique dans le pôle apical des cellules multiciliées, et serait sécrété dans le compartiment apical et basolatéral. PTCH1,

SUFU, SMO, GLI2 et GLI3 sont localisés dans les cils des cellules multiciliées, mais aucun d'eux n'est localisé dans les cellules non ciliées (Figure 70).



Figure 70 : Localisation des membres de la voie Hh dans les cellules multiciliées bronchiques (Mao et al,2018)

A la différence de la voie canonique Hh dans le cil primaire, PTCH1 et SMO sont tous deux présents dans le cil. Par ailleurs, l'activation pharmacologique ou génétique n'exclut pas PTCH1 du cil et n'augmente pas son expression comme ce serait le cas dans la voie canonique. De plus, les niveaux de GLI1 restent faibles et ni l'activation ni l'inhibition pharmacologique de la voie Hh ne modifie leur activité. Ces éléments ont conduit les auteurs à conclure qu'une voie Hh non-canonique était impliquée dans les cils motiles de l'épithélium des voies respiratoires. Dans cette voie, SMO s'associe à G α i qui inhibe l'adénylate-cyclase 5/6 pour réduire la concentration cellulaire d'AMPc. Ces nouveaux acteurs sont également présents dans les cils des cellules multiciliées (Figure 71).



Figure 71 : Localisation d'acteurs de la voie Hh non-canonique dans les cellules multiciliées bronchiques (Mao et al, 2018)

L'inhibition pharmacologique de SMO fait en effet augmenter la concentration d'AMPc. La surexpression de SHH conduit à la diminution de la concentration d'AMPc dans les cellules multiciliées, et non dans les autres cellules. Pour rappel, la concentration d'AMPc joue sur la fréquence des battements ciliaires (page 63). Ainsi l'activation de la voie de signalisation Hh ralentit la fréquence du battement ciliaire. Par ailleurs, l'AMPc régule aussi la PKA (Protéine Kinase dépendante de l'AMPc), également présente dans les cils motiles. Celle-ci phosphoryle à son tour le canal CFTR qui sécrète, dans le liquide de surface des voies respiratoires, des ions Cl⁻ mais aussi des ions HCO₃- (page 108), modifiant ainsi son pH. La voie de signalisation pourrait donc jouer un rôle dans la défense contre les pathogènes en modifiant la fréquence des battements ciliaires et en modifiant le pH du mucus.

La deuxième étude décrit les membres de la voie Hh principalement dans un épithélium des voies respiratoires nasales en différenciation cultivé en ALI [354]. Les transcrits SMO, PTCH1, GLI2 et GLI3 sont présents et augmentent pendant la différenciation. Les transcrits SHH et GLI1 sont absents. Cependant, la protéine SHH est présente, et préférentiellement dans les cellules non différenciées (Figure 72).



Figure 72 : Localisation de SHH dans les cellules multiciliées nasales (Belgacemi et al, 2020)

Sa sécrétion dans le milieu extérieur se fait principalement dans le milieu basolatéral, et augmente au fur à et à mesure de la différenciation, elle est plus faible dans le milieu apical, et semble diminuer (Figure 73).



Figure 73 : Sécrétion de SHH dans les compartiments apical et baso-latéral pendant la différenciation de l'épithélium des voies respiratoires nasales humaines en culture ALI (Belgacemi et al, 2020)

La protéine GLI1 est également présente dans des cellules non ciliées, ainsi que SMO, PTCH1, GLI2 et GLI3. L'expression protéique de GLI2 augmente pendant la différenciation, et précède FOXJ1 (page 93), indiquant une implication précoce de la voie Hh. Bien qu'une augmentation du niveau des transcrits des autres protéines soit visible, aucune ne présente de modulation particulière au niveau protéique pendant la différenciation. L'inhibition constitutive de la voie Hh pendant la différenciation de l'épithélium des voies respiratoires, par inactivation de SHH avec un anticorps spécifique, n'influence pas la prolifération des cellules avant la mise en ALI. En revanche, immédiatement après la mise en ALI, la prolifération diminue dans ces cellules par rapport aux cellules non traitées, mais devient ensuite plus élevée, alors qu'elle diminue progressivement dans les cellules non traitées. Par ailleurs, la multiciliogenèse est affectée par l'inhibition de SHH, avec une expression globale de FOXJ1 diminuée. En revanche, la production de cellules à mucus n'est pas affectée, bien qu'une diminution de l'expression globale de MUC5AC et MUC5B soit visible. L'efficacité de l'inhibition de la voie Hh est visualisée par l'inhibition de l'expression de GLI2 et de la balance GLI2/GLI3. D'une part, la localisation protéique nucléaire de GLI2 diminue en cas d'inhibition de la voie Hh. D'autre part, cette étude présente des marguages en immunofluorescence des membres de la voie Hh sur des coupes d'épithélium des voies respiratoires bronchiques de sujets sains ou atteints de BPCO (Figure 74) (page 106). Chez les sujets sains, PTCH1 et SMO sont localisés dans les cils des cellules multiciliées. GLI2 est localisé en apical, dans les cils et le noyau des cellules multiciliées. GLI1 et GLI3 sont localisés dans le noyau et en région apicale des cellules multiciliées. En cas de BPCO, SMO n'est pas

exprimé, GLI3 est plus faible et l'expression de GLI2 dans le noyau et les cils est perdue, témoignant d'une altération de la voie en cas de BPCO.



Figure 74 : Localisation des membres de la voie Hedgehog dans l'épithélium des voies respiratoires bronchiques de personnes atteintes de BPCO ou non (Belgacemi et al, 2020)

Malgré les différences notables entre ces deux études, concernant notamment l'expression transcriptionnelle de GLI1 et SHH et la localisation de GLI3 dans l'épithélium des voies respiratoires nasales, la voie Hedgehog jouerait bien un rôle dans l'épithélium des voies respiratoires, à travers la voie canonique pour réguler la différenciation, et à travers une voie non-canonique lorsque l'épithélium des voies respiratoires est pleinement différencié, pour réguler la fréquence des battements ciliaire et le pH du mucus.

II - La famille des microARN miR-34/449

II.1 - Les microARN

Les microARN (miARN ou miR) constituent une famille de petits ARN non codants (~22 nucléotides) qui répriment l'expression post-transcriptionnelle ou la stabilité d'ARN messagers, en se liant à eux au niveau de séquences complémentaires de leur région « seed » [306,355–363]. La séquence « seed » d'un miARN correspond aux nucléotides 2 à 7 du miARN [364]. La liaison miARN/ARN se fait en général sur la région 3'-UTR de l'ARN et induit une inhibition de la production protéique à partir de l'ARN messager, et/ou une déstabilisation de cet ARN [357,360,361,365,366]. Grâce à cela, les miARN peuvent réguler de nombreux processus développementaux et physiologiques [306], comme l'apoptose, la

prolifération, et la différenciation cellulaire [355,361]. Ces petits ARN non codants sont répandus chez les eucaryotes et sont phylogénétiquement conservés [355,358,367].



Figure 75 : Biogenèse des miARN (adapté de He et al, 2004)

Les miARN sont initialement exprimés dans le noyau sous forme de long transcrits doubles brins appelés miARN primaires (pri-miARN) (Figure 75). Dans le noyau, les pri-miARN sont clivés par un complexe protéique nucléaire nommé « microprocesseur » formé, notamment, des enzymes Drosha et DGCR8 pour générer des miARN intermédiaires en forme d'épingle à cheveux, ou tige-boucle (« hairpin ») d'environ 65-70 nucléotides, appelés pré-miARN [368,369]. Ces pré-miARN sont exportés dans le cytoplasme par l'exportine 5. Une fois dans le cytosol, les pré-miARN sont clivés par un complexe enzymatique comprenant un membre de la famille Dicer qui permet l'hydrolyse de la structure boucle, pour libérer un petit ARN double-brin d'approximativement 22 nucléotides appelé « duplex mi-ARN/miARN* (lire miARN étoile) » mature, ou miARNdb (db pour double brin) avec un brin guide et un brin passager [358,361,362,368–378]. Ce duplex miARN/miARN* interagit ensuite avec une protéine de la famille Argonaute (Ago1 ou Ago2) pour former un complexe « RISC » (« RNA-Induced Silencing Complex ») appelé aussi miRISC. Au cours de la formation du RISC, il y a un passage d'un miARNdb à un miARN sb (sb = simple brin) dit miARN mature. C'est au sein du complexe RISC, que les miARN matures exercent leur répression posttranscriptionnelle (Figure 75) [360]. Leur séquence nucléotidique sert de guide pour

identifier les ARN messagers cibles [379,380]. GW182 est également retrouvé dans ce complexe miRISC. Il interagit avec Ago2 et est requis pour la répression traductionnelle, la déadényalation ou la dégradation des ARN messagers cibles [381–385].

Les miARN peuvent être classifiés en deux catégories : les miARN intergéniques (entre les gènes) et les miARN introniques (intégrés dans un gène). Les miARN intergéniques ont leur propre promoteur. Environ 30% des miARN sont localisés dans l'intron d'un gène codant une protéine, et leur expression est sous le contrôle du promoteur du gène hôte de manière synergétique ou antagonique [366,386]. Mais il a également été montré que 35% des miARN introniques ont des éléments régulateurs en amont correspondant à des fonctions promotrices. Ces éléments sont généralement situés dans le promoteur du gène hôte du miARN. Il est ainsi communément accepté que les miARN intergéniques sont exprimés à partir du promoteur du gène hôte [386].

Une base de données de référence accessible en ligne, appelée miRBase, a été créée et mise à disposition de la communauté scientifique pour répertorier, annoter et archiver les séquences de tous les miARN [387].





Figure 76 : Les isomiR (Neilsen et al, 2012)

La majorité des gènes des miARN génère des isomères matures, appelés isomiR, dont la longueur diffère de celle du miARN « canonique » d'une ou plusieurs bases supplémentaires aux extrémités 3' et/ou en 5' (Figure 76). Ces séquences, produites à partir d'un seul et même pré-miARN, sont biologiquement fonctionnelles et peuvent varier en proportions entre les cellules et les tissus. Elles peuvent agir en coopération avec les séquences canoniques de miARN pour cibler les mêmes voies de signalisation, mais cibler également des ARN messagers différents de manière substantielle. Elles peuvent même apparaître comme le transcrit dominant d'un cluster pour certaines cellules, ce qui a parfois conduit à modifier la base de référence miRBase et à remplacer la séquence canonique par la séquence d'un isomiR [377,388–392]. Nous verrons qu'une telle situation a été rencontrée pour la famille miR-34/449, que j'ai étudiée au début de ma thèse. La plupart des isomiR générés sont dus à une variabilité dans le clivage des précurseurs des miARN par Dicer ou Drosha [378,393], bien qu'une large proportion d'isomiR dérive également d'un clivage par Ago2, indépendant de Dicer [389].

C'est grâce au développement de technologies de séquençage à haut-débit que l'identification des isomiR a été possible [393,394], et c'est encore cette technologie qui nous a justement permis d'identifier des isomiR dans la famille des miARN miR-34/449 au cours du processus de différenciation des HAEC en culture ALI. Ayant participé à l'étude de ces isomiR [395], je présenterai ses conclusions dans la partie « Résultats » (page 122).

II.3 - Les miR-34/449

La famille des miARN miR-34/449 est constituée de 6 miARN homologues localisés sur 3 *loci* chromosomiques distincts. L'invalidation de l'expression d'un de ces miARN est parfois compensée par la surexpression d'un autre, suggérant une redondance [289]. Leur rôle dans certains cancers [396–398], et dans la spermatogenèse [399,400] a été démontré.

Leur inhibition conjointe chez la souris provoque une mortalité post-natale, une infertilité, des défauts de croissance et d'importants dysfonctionnements respiratoires résultants d'une défaillance de la clairance mucociliaire. Ces manifestations phénotypiques sont corrélées à la dérégulation d'environ 240 gènes, qui sont majoritairement impliqués dans le contrôle du destin cellulaire, la dynamique microtubulaire et le développement cérébral [289]. Concernant ce dernier point, la famille miR-34/449 est un régulateur clé de l'orientation des fuseaux mitotiques pendant le développement du cortex cérébral, en ciblant JAM-A (Junction adhesion molecule-A) [401].

Leur expression est régulée par le facteur de transcription E2F1 [402,403], mais aussi par le gène TP53 dans le cas des miR-34 [404,405]. La principale classe de gènes régulés par les miR-34 est responsable de la régulation du cycle cellulaire. Une diminution considérable de leur expression a été relevée dans des cancers des poumons non à petites cellules (NSCLC) et leur restauration inhibe la croissance de ces cancers. Les miR-34 seraient donc des effecteurs clés dans la fonction de suppresseur de tumeur de TP53 [405].

II.3.A - Rôle dans la multiciliogenèse

Le rôle des miR-34/449 dans la multiciliogenèse a fait l'objet de plusieurs études réalisées par mon laboratoire d'accueil avant mon arrivée.

En 2011, notre équipe a été la première à établir un lien fonctionnel, conservé des amphibiens jusqu'à l'humain, entre les miR-34/449 et la multiciliogenèse. Ces miARN, spécifiquement exprimés dans les cellules multiciliées, contrôlent la multiciliogenèse de manière précoce en réprimant le cycle cellulaire et la voie de signalisation Notch [196,228].

Au cours d'une première étude, notre équipe, parallèlement à celle de l'équipe de Dobbelstein, a montré que l'expression des miR-34/449 est très importante au cours de la différenciation de l'épithélium des voies respiratoires [196,228,402]. Notre équipe, plus particulièrement, a démontré la spécificité d'expression des miR-34/449 dans les cellules multiciliées de vertébrés aussi bien dans l'épithélium des voies respiratoires humain que dans l'épiderme d'embryon de xénope [196]. Elle a montré aussi que les miR-449 sont les miR-34 le sont également, mais dans une moindre mesure. Ensemble, les miR-34/449 représentent près de 5 à 10% de tous les miARN présents dans l'ensemble des cellules en différenciation chez l'humain (Figure 77). D'autres études ont par la suite identifié leur expression dans d'autres tissus multiciliés tels que les ventricules cérébraux, les trompes utérines ou les testicules [289,400,406]. En revanche, miR-34a possède un profil d'expression beaucoup plus ubiquitaire suggérant un rôle en partie distinct.



Figure 77 : Proportion des miR-34/449 dans les cellules multiciliées respiratoires humaines ou d'épiderme d'embryon de xénope (Marcet et al, 2011)

Notre équipe a ensuite montré que l'inhibition des miR-34/449 par des oligonucléotides antisens (antagomiR) spécifiques provoque une réduction concomitante du nombre de cellules multiciliées aussi bien dans l'épithélium des voies respiratoires humaines en culture ALI que dans l'épiderme d'embryon de xénope (Figure 78). Ces résultats indiquent ainsi que les miR-34/449 sont requis pour la multiciliogenèse chez les vertébrés, et interviennent précocement dans la différenciation, avant l'étape de l'amplification des centrioles.



Figure 78 : L'inhibition des miR-449 dans l'épiderme multicilié de xénope ou l'épithélium des voies respiratoires en culture ALI inhibe la multiciliogenèse (Marcet et al, 2011)

D'une part, la surexpression des miR-34/449 dans l'épithélium des voies respiratoires humaines en culture ALI induit un enrichissement significatif de l'expression de gènes associés au point de contrôle G2/M du cycle cellulaire et à la multiciliogenèse. L'analyse *in vitro* des cibles des miR-449 révèle 2 groupes majoritaires. Le premier comprend des gènes codant des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, et le deuxième des gènes associés à la prolifération et la différenciation, incluant Notch et DLL1. D'ailleurs, la séquence 3'-UTR de ces 2 gènes contient des sites de liaison des miR-34/449 et la mutation de ces sites est suffisante pour abroger l'inhibition de l'expression de Notch (page 68) et DLL1 induite par la surexpression des miR-34/449. De plus, la protection du site de liaison des miR-34/449 sur Notch par des oligonucléotides protecteurs, empêche cette inhibition, et conduit à une diminution significative du nombre de cellules multiciliées. Ces éléments tendent à prouver que la répression directe de la voie de signalisation Notch par les miR-34/449 est essentielle pour la multicliogenèse. D'autre part, l'invalidation des miR-34/449 augmente l'expression de Notch et DLL1, et l'inhibition de Notch induit une augmentation de

l'expression des miR-34/449, révélant une boucle de rétroaction négative entre les miR-34/449 et la voie de signalisation Notch au cours de la multiciliogenèse.

Une deuxième étude du laboratoire basée sur les mêmes approches a révélé le rôle conservé des miR-34/449 dans la formation du réseau d'actine apical pendant la multiciliogenèse en agissant sur les petites protéines G [286]. En effet, le blocage des miR-34/449, aussi bien chez l'humain que chez le xénope, induit une diminution du nombre de cellules positives pour la tubuline acétylée (Ac-tub), mais également pour l'Ezrine (page 83), membre de la famille des protéines ERM impliquées dans la formation du cytosquelette d'actine au pôle apical, indiquant la suppression de la formation du réseau d'actine apical en l'absence des miR-34/449. En parallèle, la surexpression de ces miARN augmente la formation de points focaux d'adhésion, des fibres de stress et la phosphorylation des ERM. Etant donné que l'inhibition de Notch par son inhibiteur DAPT n'a pas d'impact sur ces trois derniers paramètres, il apparait que les miR-34/449 induisent un remodelage du cytosquelette d'actine de manière indépendante de la voie de signalisation Notch. En effet, les miR-34/449 agissent également sur d'autres cibles. Ils provoquent entre autres, l'augmentation de l'activité de RhoA-GTP et une diminution de l'activité de Rac1-2-3, ce qui permet la polymérisation de l'actine apicale.

Parmi d'autres gènes cibles des miR-34/449 figure CP110 (page 84), une protéine centriolaire responsable de l'inhibition de l'assemblage du cil [289,406].

II.3.B - Localisation génomique

Chez l'humain, les miR-449 sont localisés dans l'intron 2 du gène *CDC20B* sur le locus 5q11 du chromosome 5 (Genome Browser Human GRCh37 / hg19) [407]. Ce locus contient également les gènes *MCIDAS* et *CCNO*. miR-34a est localisé entre les gènes *GPR157* et *H6PD* sur le locus 1p36 sur le chromosome 1. Les miR-34b/c sont localisés entre les gènes *BTG4* et *C11orf88* sur le locus 11q23 (Genome Browser Human GRCh37 / hg19) [407] sur le chromosome 11. Ce locus contient également le gène *LAYN* (Figure 79). Les gènes localisés sur le locus génomique miR-449 (*CDC20B*, *MCIDAS* et *CCNO*), seront décrits au cours de la prochaine partie. Ceux localisés sur le locus génomique 11q23 le seront dans la partie Résultats (page 124), lors d'une étude que j'ai réalisé au cours de ma thèse sur le rôle de ces gènes dans la multiciliogenèse.



Figure 79 : Gènes localisés sur les loci humains 5q11 (miR-449) et 11q23 (miR-34)

III. Les facteurs de transcription

III.1 - Le facteur de transcription TP63

Le facteur de transcription TP63, exprimé dans les cellules basales, est responsable de leur capacité de migration et de prolifération en cas de blessure épithéliale. En effet, son expression permet l'expression de gènes impliqués dans la réparation et différenciation comme la β-caténine (page 73), EGFR (page 66), et Jagged1 (page 68). Elle permet aussi l'expression de MKI67 pour permettre la prolifération. Elle limite également l'expression de E-cadherine, dont la fonction est de maintenir l'adhésion des cellules, facilitant ainsi leur migration et leur prolifération. L'inhibition de l'expression de TP63 induit une perte des cellules basales et sécrétrices, et une augmentation du nombre de cellules multiciliées, neuroendocrines et à mucus [215,216,408].





Figure 80 : Implication du facteur de transcription TP53 dans la multiciliogenèse (adapté de Mc Connell et al, 2016)
Le facteur de transcription TP53 maintient la quiescence des cellules dans les voies respiratoires homéostatiques. Son expression détermine la densité de l'épithélium des voies respiratoires en limitant la prolifération des progéniteurs en régulant l'expression de l'inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines (CDK) p21, l'un de ses gènes cibles. Elle permet également la différenciation des cellules sécrétrices en cellules multiciliées de manière indépendante de CDK1. En effet, l'absence d'expression de TP53 dans les cellules sécrétrices conduit à une diminution de nombre de cellules multiciliées. A l'inverse, l'augmentation de l'expression de TP53 induit une augmentation du nombre de cellules multiciliées (Figure 80) [409].

Dans certaines maladies chroniques, en cas de remodelage de l'épithélium des voies respiratoires avec métaplasie ou hyperplasie de cellules à mucus (page 102), l'expression de TP53 permet de restaurer l'équilibre dans l'épithélium des voies respiratoires humaines en culture ALI, en diminuant l'expression de *BCL2* [410].

III.3 – Le complexe E2F/Géminine/TP73

III.3.A - Les facteurs de transcription E2F

Les facteurs de transcription E2F ont été initialement impliqués dans la régulation de l'entrée et sortie du cycle cellulaire. Toutefois, dans cette famille, les facteurs E2F4 et E2F5 n'ont pas de rôle répertorié dans la prolifération cellulaire. En revanche, ils sont détectés dans le noyau des cellules sécrétrices, progénitrices de cellules multiciliées, et dans le noyau et le cytoplasme de ces dernières. La localisation d'E2F4/5 subirait une transition progressive entre le noyau et le cytoplasme au cours de la multiciliogenèse. Dans le noyau, E2F4 joue un rôle d'inducteur de la transcription de gènes associés à la biogenèse des centrioles, comme DEUP1, CCNO, MYB, FOXJ1 et β-tubuline. Dans le cytoplasme, E2F4 présenterait 2 localisations chez la souris. Premièrement sous le cil primaire, chevauchant partiellement le cil, et dans ses environs immédiats sous forme de granules. Sous le cil primaire, E2F4 forme une structure en forme d'anneau avec Cep63 dans la région d'initiation du procentriole des centrioles parentaux. En dehors de cette structure, E2F4 forme un anneau enrichi en Cep152, centrine-2 et DEUP1, indiquant une localisation dans les deutérosomes (Figure 81). Dans ces structures, E2F4 s'associe avec SAS6, DEUP1 et Pcm1 pour former un centre organisationnel de la biogenèse des centrioles.



Figure 81 : Localisation de E2F4 pendant la différenciation de l'épithélium des voies respiratoires murines (Adapté de Mori et al, 2017)

Ainsi E2F4 et E2F5 dont les fonctions sont redondantes, sont nécessaires à la multiciliogenèse. En leur absence, les cellules multiciliées sont remplacées par des cellules sécrétrices de substances ressemblant à des mucines (mais qui ne sont pas MUC5AC ni MUC5B). La différenciation des cellules à mucus n'est cependant pas affectée [411]. Les facteurs de transcription E2F4/5 en interaction avec GemC1 (page 90), activent l'expression de MCIDAS (page 90) et s'associent avec ce dernier pour activer l'expression de MYB (page 91), et RFX (page 94) pour permettre l'amplification des centrioles, et l'expression de FOXJ1 (page 93) pour autoriser la maturation des corps basaux (acquisition des appendices distaux (Cep164) et sous-distaux (ODF2) (page 26) et l'extension des cils. L'expression de MCIDAS (page 90) avec E2F4/5 est suffisante pour induire le programme de multiciliogenèse dans d'autres cellules [5,207,249,250,411–414].

III.3.B - La famille des Géminines

La famille des Géminines est composée de MCIDAS, de la Géminine et de GemC1 [6,415]. Ces gènes ont tous les trois des domaines coiled-coil, et ont été précédemment impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire [242,416–419].

III.3.B.a - Géminine

La Géminine est un inhibiteur de la multiciliogenèse, dont l'inhibition permet l'activité de GemC1, régulateur central essentiel pour ce mécanisme [417] (Figure 82).

III.3.B.b - GemC1

GemC1, régulé en amont par la voie de signalisation Notch, est spécifiquement exprimé dans les épithéliums ciliés. Son expression est nécessaire et suffisante pour induire les étapes précoces de la multiciliogenèse, en transactivant les séquences régulatrices en amont des gènes *MCIDAS, FOXJ1* et *MYB*. Cette activité est optimisée par E2F4/5 avec qui elle interagit. GemC1 cible également E2F4/5 par une boucle de rétroaction positive. GemC1 recrute également TP73 au complexe qu'il forme avec E2F4/5, pour son activité de transactivation, ainsi qu'une autre boucle de rétroaction positive de TP73. GemC1, MCIDAS, E2F4/5 et TP73 agissent ensuite en complexe pour activer l'expression de gènes gouvernant l'amplification des centrioles et la formation des cils (Figure 82) [6,242,415–421].



Figure 82 : Implication des membres de la famille de la Géminine dans la multiciliogenèse (adapté de Arbi et al, 2016)

III.3.B.c - MCIDAS

L'expression de Multicilin, ou MCIDAS (« Multiciliate differentiation and DNA synthesis associated cell cycle protein ») est nécessaire et suffisante pour induire la multiciliogenèse. Son expression nécessite une inhibition de la voie de signalisation Notch, et une activation par GemC1/E2F5. Elle forme alors un complexe avec GemC1/E2F5, et activent l'expression de *FOXJ1*, *MYB*, *CCNO*, *CDC20B* ainsi que d'autres gènes de la biogenèse des centrioles, et MCIDAS lui-même en boucle d'amplification (Figure 83). Ce complexe permet également l'expression de DEUP1, pour la formation des deutérosomes [242,417,420–425].



Figure 83 : Implication de MCIDAS dans la multiciliogenèse (adapté de Boon et al, 2014)

III.3.C - Le facteur de transcription TP73

L'expression de TP73 est régulée par le complexe MCIDAS/E2F5 (Figure 84), et est induite précocement après l'initiation de la multiciliogenèse. Dans certaines cellules basales et dans les cellules multiciliées, TP73 est exprimé dans le noyau et proche des cils dans ces dernières. L'absence de TP73 réduit considérablement le nombre et la taille des cils, sans pour autant affecter vraiment l'amplification centriolaire. En revanche, les centrioles présentent des défauts d'ancrage et d'alignement au niveau de la membrane apicale, et sont incapables de produire un axonème. Le facteur de transcription TP73 transactive l'expression de 155 gènes ciliaires, dont les régulateurs clés FOXJ1 (page 93), RFX2/RFX3 (94), MYB (91), JAG1 (68) et miR-34b/c (page 83) ainsi que 50 gènes qui ont des rôles structuraux et de fonctions ciliaires associés au Transport Intra-Flagellaire (IFT), à l'organisation des corps basaux, à la Polarité Cellulaire Planaire (PCP) et à la motilité (beaucoup de gène de moteur dynéine) (Figure 84). Le facteur de transcription TP73 joue un rôle dans l'ancrage et l'alignement des corps basaux. En effet, il est nécessaire au remodelage des microfilaments d'actine et à l'activation de la myosine. Il permet la localisation ponctiforme de la myosine II au niveau des jonctions membranaires et avec les clusters de corps basaux en migration, et régule l'assemblage des microtubules jonctionnels permettant ainsi la localisation asymétrique des protéines de la voie PCP (page 46).



Figure 84 : Implication du facteur de transcription TP73 dans la multiciliogenèse (adapté de Nemajerova et al, 2018)

Ces différentes propriétés font de TP73 un régulateur clé de la multiciliogenèse, car sa présence est nécessaire et suffisante pour induire ce processus [408,426–429].

III.4 - Facteur de transcription MYB

Le facteur de transcription MYB est exprimé dans les cellules sécrétrices et au début de la multiciliogenèse. C'est un facteur de différenciation de lignage multiple, puisque son expression permet l'expression de gènes spécifiques des cellules sécrétrices (SCGB1A1, SCGB3A1...), des cellules à mucus (MUC5AC, SPDEF...), et des cellules multiciliées (FOXJ1 (page 93), RFX (page 94), Cep120 (page 22),...). Dans les cellules multiciliées, MYB intervient avant l'amplification centriolaire et est requis pour cette étape. Ce facteur de transcription agit en aval de la voie Notch (page 68) et de MCIDAS (90), et en amont de FOXJ1 (Figure 85). Une interrelation est possible avec les cibles en aval de la voie Notch [430,431]. Concernant l'expression de MYB dans les cellules basales, deux études rapportent une expression de MYB dans une population cellulaire intermédiaire post-mitotique non basale chez la souris [430,431] et l'humain [431]. Mais une autre étude portant sur les réponses cellulaires aux blessures de l'épithélium des voies respiratoires rapporte que chez la souris, en condition homéostatique ou en cours de régénération, deux populations de cellules basales sont présentes, l'une exprimant le domaine intracellulaire de Notch2 (voie Notch active) et l'autre exprimant faiblement MYB [188]. La première population se différencierait en cellules basales, et l'autre directement en cellules multiciliées. Au vu des marquages immunologiques en condition homéostatique, le faible marquage TP63 (page 87) tend à faire penser que les cellules présentant aussi un marquage MYB sont des cellules basales déjà bien engagées dans la différenciation en cellule multiciliée. Ce qui irait dans le sens des premières études concernant une expression précoce pendant les étapes de multiciliogenèse et l'expression de MYB dans des cellules intermédiaires. Cependant, il est possible d'imaginer que des mécanismes moléculaires différents de la régulation de l'expression de MYB se mettent en place en fonction du type de blessure. En condition de régénération après blessure au naphtalène ciblant les cellules sécrétrices, MYB est absent dans les population basales [431], alors qu'en cas de blessure par exposition au SO₂ l'expression de MYB est présente dans une population de cellules basales [188].



Figure 85 : Implication du facteur de transcription MYB dans la multiciliogenèse (adapté de Tan et al, 2013)

III.5 - Facteur de transcription FOXJ1

Le facteur de transcription FOXJ1, membre de la famille Forkhead/winged-helix, est exprimé dans les tissus présentant des cils motiles et son expression est corrélée à l'apparition de ces cils. FOXJ1 est nécessaire pour la formation et/ou la motilité des cils dans les ventricules cérébraux, le nez et le nœud embryonnaire. Son expression est suffisante pour induire la multiciliogenèse chez le poisson zèbre et le xénope, mais pas chez la souris, bien qu'elle conduise à l'expression de la tubuline-β4. En effet, FOXJ1 ne permet pas l'amplification des centrioles, mais joue un rôle dans la maturation de ceux-ci, ainsi que dans leur ancrage à la membrane plasmique apicale, mais aussi dans la structure et la motilité des cils [432,433]. Il est spécifiquement exprimé dans le noyau des cellules multiciliées, et induit l'expression de nombreux gènes associés à la motilité des cils comme des dynéines (DNAH1, DNALI1, DNAH9, DNAH8) ou à la structures de l'axonème comme les tubulines (TUBA1A), des constituants de la paire centrale (SPAG6) ou des rayons radiaires (RSHL2, RSHL3, RSPH1) (Figure 86 & Figure 87). De manière cohérente, FOXJ1 n'induit pas l'expression de gènes associés aux cellules basales (KRT5, KRT14 ou TP63), ou aux cellules sécrétrices (SCGB1A1, MUC5AC ou MUC5B). Pour l'ancrage des corps basaux, l'expression de FOXJ1 permet notamment l'organisation du cytosquelette d'actine à la membrane apicale et ainsi leur ancrage. En effet, FOXJ1 induit l'expression de la calpastatine qui inhibe l'activité protéolytique de la calpaïne, permettant ainsi la localisation de l'Ezrine à la membrane apicale directement ou par l'intermédiaire d'EBP50. Ce dernier est également une cible de FOXJ1. La phosphorylation sur thréonine du complexe ERM est requise pour le maintien de ce complexe à la membrane apicale et est dépendant également de FOXJ1. Ainsi FOXJ1 permet la localisation apicale d'Ezrine pour la maturation et l'ancrage des corps basaux à la membrane. FOXJ1 agit aussi sur la réorganisation du cytosquelette d'actine apicale et la localisation d'Ezrine à la membrane apicale en augmentant l'activité des petite GTPases RhoA, RhoB, mais pas de Rac1 (page 84) [184,280,281,284,329,433-436]. Dans une étude identifiant un sous-groupe de cellules basales exprimant à la fois TP63 et TP73 (des cellules basales en différenciation précoce), il a été montré que ces deux molécules agissent directement sous la forme d'un complexe hétérodimérique sur l'expression de FOXJ1. Leur hypothèse est que TP63 est un répresseur transcriptionnel de TP73, permettant ainsi de retarder l'expression de FOXJ1 dans les précurseurs de cellules multiciliées, étant donné que TP73 agit à des étapes plus précoces de la multiciliogenèse que FOXJ1[408].



Figure 86 : Implication des facteurs de transcription FOXJ1 et RFX dans la multiciliogenèse (adapté de Choksi et al, 2014)

III.6 - Facteurs de transcription RFX

Les facteurs de transcription RFX2 et RFX3 (Regulatory Factor X) font également partie de la famille Winged-helix. Ils sont au nombre de 8, RFX1-8, et présentent des spécificités différentes de liaison à l'ADN, mais également des cibles communes pour certains d'entre eux. Les RFX1-4 partagent des fonctions et des cibles pour contrôler la croissance ciliaire, et les RFX2 et 3 sont particulièrement décrits pour leur rôle dans l'assemblage et la motilité des cils motiles. Parmi la centaine de gènes induits par RFX2, sont principalement retrouvés des gènes associés au Transport Intra-Flagellaire (page 35) (Figure 87). Par ailleurs, d'autres gènes sont induits comme ceux codant pour les composants de la zone de transition, du BBSome, ainsi que les tubulines, les enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelle des tubulines, les protéines liant les microtubules, certains gènes de la voie PCP, des gènes impliqués dans la motilité du cil (dynéines, composants des rayons radiaux, gènes de battement... (page 63)). Les cibles transcriptionnelles de RFX2 et RFX3 se chevauchent globalement et ils jouent ainsi un rôle dans la longueur et la motilité des cils en passant entre autres par l'assemblage des microtubules. La différence entre les deux facteurs de transcription porte sur leur rôle dans la spécification des cellules multiciliées. RFX3 est nécessaire à la spécification des cellules multiciliées, alors que RFX2 ne l'est pas. En effet, l'inhibition de RFX2 ne provoque pas de diminution du nombre de cellules multiciliées, mais affecte la formation des cils et leur longueur. L'inhibition de RFX3, elle, affecte le nombre de cellules multiciliées et altère la formation et la longueur des cils dans les quelques cellules qui sont malgré tout produites. [432,433,437-441].



Figure 87 : Cibles communes et spécifiques des facteurs de transcription FOXJ1 et RFX (adapté de Choksi et al 2014)

RFX et FOXJ1 coopèrent pour réguler un groupe de gènes nécessaires à la motilité ciliaire (la dynéine DNAH9, DYNC2h1 entre autres), et ont des cibles distinctes, dans l'assemblage des corps basaux et de la zone de transition pour RFX, et dans la maturation et l'ancrage des corps basaux pour FOXJ1 (Figure 87). Ils régulent aussi leur expression mutuelle dans une boucle d'autorégulation positive [184,432,433,435,437,442]. Une étude rapporte que FOXJ1 agirait en aval de RFX et serait le principal inducteur de l'autorégulation positive. Cependant cette expérience, réalisée en surexprimant ces acteurs couplés à la luciférase pour pouvoir mesurer leurs activités transcriptionnelles, ne reflète pas la physiologie. En effet, RFX joue un rôle dans des étapes précoces de la différenciation (formation des centrioles), alors que FOXJ1 intervient plus tardivement, il est possible de douter des résultats de cette expérience. Cependant cette étude rapporte tout de même que RFX3 seul n'est pas suffisant pour induire l'expression des gènes de la multiciliogenèse dans les cellules basales, contrairement à FOXJ1. Cette étude réalisée chez l'humain, alors que les autres ont été réalisées chez la souris, le poisson zèbre ou le xénope, laisse présager un rôle différent de co-activateur transcriptionnel de FOXJ1 chez l'humain [433].

IV. Autres acteurs IV.1 - CDC20B

CDC20B (Cell Division Cycle 20B) est le gène hôte des miR-449 localisés dans le deuxième intron de ce gène. Le rôle de CDC20B lors de la multiciliogenèse a été demontré

récemment par une étude collaborative réalisée par notre équipe [197]. Lors de cette étude, CDC20B s'est révélé être un candidat intéressant, premièrement par sa localisation dans le locus génomique contenant d'autres régulateurs de la multiciliogenèse, à savoir MCIDAS (page 90) et CCNO (page 98). De plus, l'analyse transcriptomique des cellules HAEC pendant leur différentiation, a révélé que ces 3 gènes étaient coexprimés au cours de ce processus. Par ailleurs, le promoteur de CDC20B est fortement activé par les partenaires de MCIDAS : E2F1 et E2F4 (page 88).

L'étude a été réalisée sur différents modèles biologiques : 1) la culture de cellules épithéliales des voies respiratoires humaines en culture ALI (HAEC), 2) un modèle de différenciation de cellules épendymaires et trachéales de souris et 3) l'embryon de xénope (page 41). Les résultats de cette étude ont démontré plusieurs points.

1- CDC20B est associé aux deutérosomes. En effet, l'expression de CDC20B est spécifiquement détectée dans les cellules multiciliées immatures (dites deutérosomales (page 126)), pendant la phase d'amplification des centrioles (page 50). En regardant plus précisément les deutérosomes, plateforme d'amplification des centrioles, CDC20B est enrichi dans la partie la plus profonde du matériel pérideutérosomal, probablement très proche du cœur des deutérosomes, à des étapes tardives de l'amplification des centrioles (Figure 88). CDC20B est également détecté près des corps basaux et dans les cils des cellules multiciliées matures. Il y est en étroite association avec la centrine-2 et la tubuline- α acétylée (Ac-tub) dans ces deux structures respectivement.



Figure 88 : Localisation de CDC20B dans les deutérosomes des cellules multiciliées (Revinski et al, 2018)

2- CDC20B est requis pour la multiciliogenèse. En effet, son invalidation par des shARN diminuant l'expression de CDC20B, bien qu'elle n'altère pas l'identité des cellules multiciliées, comme l'atteste l'expression inchangée de FOXJ1, elle augmente le nombre de cellules multiciliées défectueuses. Ces cellules multiciliées présentent des centrioles toujours engagés dans les deutérosomes, et en parallèle une diminution de centrioles désengagés, un faible ancrage à la membrane plasmique apicale et en conséquence un manque de cils à la surface apicale. Les analyses montrent également que le cytosquelette d'actine qui entoure normalement les corps basaux est perturbé, mais ceci serait secondaire à l'absence des centrioles. Ces observations ont mené à la conclusion que CDC20B est requis pour le désengagement des centrioles au niveau des deutérosomes (Figure 89).

3- Les partenaires de CDC20B ont pu être déterminés lors de cette étude. En effet, CDC20B pourrait coopérer avec la kinase PLK1, car celle-ci est également enrichie dans le matériel pérideutérosomal des deutérosomes matures. Il a été montré que CDC20B interagit avec SPAG5, qui contrôle l'activation de la séparase pendant le cycle cellulaire. SPAG5 est également associée à DEUP1 et est détectable dans les deutérosomes matures. CDC20B pourrait donc participer à l'assemblage d'un complexe protéique dans les deutérosomes matures, requis pour coordonner l'activité de PLK1 et de la séparase dans le désengagement centriolaire. D'ailleurs, cette étude a aussi montré que la surexpression de la séparase dans des cellules privées de CDC20B par des shARN restaure le désengagement des centrioles et la formation des cils des cellules multiciliées.

CDC20B est donc impliqué dans la libération des centrioles matures par les deutérosomes, médié par la séparase, dans les cellules multiciliées.



Figure 89 : Implication de CDC20B dans le désengagement des centrioles des deutérosomes dans les cellules multiciliées (adapté de Revinski et al, 2018)

IV.2 - CCNO

L'expression de CCNO, ou Cycline O, de la famille des cyclines, régulée par MCIDAS [425,443,444], est restreinte au cytoplasme apical des cellules multiciliées [443] (Figure 90).



Figure 90 : Localisation de CCNO dans les cellules multiciliées (Wallmeier et al, 2014)

CCNO est responsable de la génération des centrioles par les deutérosomes. En son absence, peu de deutérosomes sont formés, et ces deutérosomes présentent des difficultés à assembler le cartwheel (page 22) (SAS6 n'est pas recruté correctement). Si certains centrioles sont tout de mêmes formés, leur maturation (recrutement de Cep164 et décrochage de CP110) ne se fait pas correctement, induisant une mauvaise orientation et une mauvaise localisation de ces centrioles qui n'atteignent pas le pôle apical. Les cellules multiciliées présentent néanmoins quelques cils fonctionnels car la voie centrosomale de duplication des centrioles n'est pas affectée [443,445–449].

Maintenant que nous avons découvert ce qu'étaient les cils et comment ils étaient formés, je vais vous parler des différentes maladies associées à des défauts ciliaires.

Chapitre 6 : Les maladies respiratoires

Les défauts de cellules ciliées ou multiciliées causent deux types de maladies respiratoires chroniques :

- les ciliopathies « primaires », d'origine génétique (page 102) ;
- les dyskinésies ciliaires acquises (ou secondaires) (page 102), où les défauts ciliaires ne sont pas à l'origine de la maladie, mais découlent de la maladie, et en aggravent les symptômes en réduisant la clairance mucociliaire (page 16).

Les ciliopathies regroupent un large panel de défauts causés par des dysfonctionnements du cil primaire et/ou du cil motile et concernent plusieurs organes majeurs, incluant le cerveau, les yeux, les reins, le foie, les voies respiratoires et les membres. Elles incluent de nombreux syndromes comme le syndrome de Joubert (JBTS), de Bardet-Biedl (BBS), de Meckel (MKS), l'amaurose congénitale de Leber (LCA), la néphronophtisis (NPHP), la Dyskinésie Ciliaire Primitive (DCP)... (Tableau 1). Ces maladies sont classifiées comme maladies rares (affectant moins d'une personne sur 30 000 selon la classification française). Toutefois, lorsqu'elles sont comptabilisées de manière collective, elles peuvent affecter une personne sur 2000. Les ciliopathies partagent des caractéristiques cliniques communes et les caractéristiques génétiques et phénotypiques se recoupent considérablement, rendant les maladies très difficiles à classifier [450-452]. Je vais néanmoins présenter les classifications qui ont été réalisées, en se basant sur l'atteinte du cil primaire (Ciliopathies non-motiles) ou du cil motile (Ciliopathies motiles ou Dyskinésie Ciliaire Primitive). Cette dernière catégorie peut être scindée en deux groupes suivant qu'elle atteint (Ciliopathie motile ou Dysnikésie Ciliaire Primitive) ou non (Dyskinésies ciliaires secondaires) la structure du cil lui-même. Ce dernier point sur les dyskinésies ciliaires secondaires me permettra de détailler les trois maladies respiratoires majeures.

Tableau 1 : Ciliopathies et défauts courants associés (adapté de Sreekumar et al, 2019)CiliopathiesDéfauts courants

Maladie polykystique rénale autosomique dominante (ADPKD)	Rénal, hépatique, pancréatique, thyroïde, kystes vésiculaires sous- arachoïdiens et séminaux, anévrismes intracrâniens, maladie cardiaque vulvaire
Maladie polykystique rénale autosomique récessive (ARPKD)	Kystes rénaux, hypoplasie pulmonaire, apparence faciale inhabituelle, déformation de la colonne vertébrale, fibrose hépatique congénitale
Néphronophthisis (NPHP)	Kystes rénaux, dégénération rétinienne, hypoplasie cérébrale, fibrose hépatique, <i>situs inversus</i> , infirmité intellectuelle
Syndrome de Senior-Loken (SLS)	Kystes rénaux, polyurie, polydipsie, photophobie, nystagmus, hypermétropie
Syndrome de Meckel (MKS)	Kystes rénaux, encéphalocèle, polydactylie, défauts cardiaques congénitaux, fente palatine, hydrocéphale, anomalies rénales et hépatiques
Syndrome de Joubert (JBTS)	Hypoplasie de vermis cérébelleux, signe de la dent molaire, schéma respiratoire dérégulé, dystrophie rétinienne, anomalies rénales et hépatiques, infirmité intellectuelle

Syndrome de Bardet–Biedl (BBS)	Défauts cérébelleux, obésité, polydactylie, rétinite pigmentaire, anosmie, défauts cardiaques congénitaux, défauts de situs, infirmité intellectuelle
Syndrome Alström (ALMS)	Dystrophie conique, pertes auditives, hyperinsulinémie, résistance à l'insuline, obésité, hypertriglycéridémie, cardiomyopathie dilatée, dysfonction hépatique et rénale.
Syndrome Oral-facial-digital de type I (OFD1)	Fente labiale, langue, palais, syndactylie, brachydactylie, polydactylie, kystes rénaux
Syndrome Ellis van Creveld (EVC)	Polydactylie post-axiale, défauts congénitaux cardiaques, dents natales, nanismes des membres courts, côtes courtes, fente palatine
Jeune syndrome (JATD)	Petite poitrine et côtes courtes, bassin de forme inhabituelle, polydactylie, défauts rénaux et cardiaques
Short rib polydactyly (SRTD)	Côtes et os longs raccourcis, polydactylie, polykystose rénale, dégénération rétinienne, anomalies cardiaques, hépatiques, et cérébrales.
Syndrome Sensenbrenner /Dysplasie cranioectodermale (CED)	Thorax étroit, membres proximaux raccourcis, brachydactylie, dysplasie cranioectodermale, dysfonction rénale
Maladie du foie polykystique (PLD)	Foie kystique, défauts canaux biliaires
Amaurose congénitale de Leber (LCA)	Rétinopathie, nystagmus
Rétinite pigmentaire (RP55)	Rétinopathie
Dyskinésie ciliaire primaire (DCP)	Infection chronique du tractus respiratoire, défaut de situs, fertilité réduite

I. Ciliopathies non-motiles

Les ciliopathies non-motiles constituent un groupe de désordres héréditaires hautement hétérogènes causés par des défauts dans l'assemblage et dans la fonction du cil primaire « 9+0 ». Une très large variabilité phénotypique est notable, et des chevauchements génétiques et cliniques étendus reflètent une complexité moléculaire sousjacente. En effet, le cil primaire est très ubiquitaire dans l'organisme, fonctionnant comme senseur de molécules extracellulaires régulant de nombreux signaux intracellulaires et des cascades de transduction, comme par exemple la voie Hedgehog décrite précédemment (page 76). A travers les signaux qu'ils génèrent, les cils primaires activent une variété de réponses incluant des modulations de voies développementales clés du contrôle de la polarité cellulaire dans les tissus épithéliaux, la transduction de stimuli sensoriels et la régulation de la prolifération et la maintenance des cellules souches [450].

Depuis deux décennies, le nombre de désordres regroupés sous l'appellation ciliopathies a augmenté significativement. Actuellement, ce terme inclut plusieurs syndromes dont le diagnostic clinique est basé sur les organes majeurs impliqués. Ces désordres peuvent être classifiés comme suit :

- un groupe comprenant les désordres de reins polykystiques : PKD et NPH (voir la signification des abréviations dans le tableau ci-dessus (Tableau 1)
- un groupe comprenant les BBS (ciliopathie la plus légère), JBTS et MKS (létal)
- un groupe comprenant les ciliopathies squelettiques (au moins 16 différents sous-types dont le SRPR (létal), le Jeune syndrome, EVC)



- un groupe comprenant les OFD (très hétérogène - plus de 15 formes décrites)

Figure 91 : Chevauchement des mutations génétiques au sein des ciliopathies (Mitchison et al, 2016)

Alors que cette classification est adoptée, il est important de garder en mémoire que le chevauchement entre les caractéristiques cliniques et anomalies génétiques de chacune est frappant, rendant difficile le diagnostic d'un patient (Figure 91). Pour ajouter de la complexité, les patients présentent souvent des anomalies typiques de plusieurs ciliopathies (exemple : OFD IV = SRPS + OFD + MKS) [450].

II. Ciliopathies motiles ou Dyskinésies Ciliaires Primitives (DCP)

Les ciliopathies motiles sont des dysfonctions qui touchent des tissus, organes et cellules qui portent un ou des cils motiles ou un flagelle (e.g gamètes), spermatozoïdes spécialisés dans la génération de flux de fluides ou de mouvements à travers les fluides. Une défaillance de ces mécanismes compromet la clairance mucociliaire causant des maladies respiratoires chroniques associées à des défauts de latéralité, de fertilité et de développement du cerveau. La moitié des individus atteints présente des défauts de latéralité, le plus souvent un *situs inversus totalis* (Syndrome de Kartagener). Une proportion de cas présente des défauts de latéralité plus complexes avec des isomérismes gauches accompagnés de maladies cardiaques congénitales. La maladie caractéristique des ciliopathies motiles est la Dyskinésie Ciliaire Primitive (DCP). La Génération Réduite de Cil Motile (ou RGCM) récemment décrite par l'équipe de Omran [443,444] est un sous-type de DCP présentant un même spectre de maladie avec une étiologie distincte [450] :

- la DCP et le syndrome de Kartagener résultent de défauts structurels et d'assemblage des composants du cil. Les cils sont formés mais immobiles ou avec une motilité défectueuse, causée par des mutations de gènes requis pour cette fonction comme RSPH9 [453,454],
- la RGCM provient de défauts du programme de multiciliogenèse et n'est pas associée à des défauts de latéralité. En effet, la RGCM n'induit pas de défaut de « monocils » motiles. C'est la multiciliogenèse qui est affectée et les cils ne sont pas ou sont peu formés dans ces cellules, à cause de mutations dans des gènes comme MCIDAS ou CCNO, dont le rôle dans la multiciliogenèse a été décrit précédemment [37,123,443,444,446–449,455].

III. Dyskinésies ciliaires secondaires

La dyskinésie ciliaire secondaire, ou acquise, se différencie de la DCP par des anomalies structurales des cils retrouvées pendant ou après des blessures/agressions comme des infections respiratoires, et ne sont pas directement dues à des mutations génétiques affectant des gènes de la ciliogenèse. Elle correspond à une altération de la viscosité du mucus et à des anomalies qui ne concernent pas la structure même du cil. Ces désordres sont généralement locaux et réversibles. L'asthme, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BCPO) et la mucoviscidose sont rangées dans cette catégorie [454].

III.1 - Asthme

L'asthme est une maladie pulmonaire chronique dont souffrent environ 235 millions de personnes dans le monde (World Health Organization WHO 2017 [456]). Cette pathologie ne définit pas une maladie unique, mais plutôt un groupe de caractéristiques physiologiques et cliniques incluant différents phénotypes, associés ou non à un épisode allergique [457].

Les patients atteints de cette pathologie souffrent de difficultés à respirer, d'une respiration sifflante, de toux et d'un raccourcissement du souffle. Ces symptômes sont provoqués par des changements structuraux des voies respiratoires, autrement appelés remodelages, dus à une inflammation éosinophilique des bronches et des bronchioles et une réponse exacerbée des voies respiratoires. Cette réponse exacerbée est provoquée par différents types de stimuli comme des allergènes environnementaux conduisant à une inflammation réversible des voies respiratoires. Cette inflammation rend les conduits respiratoires étroits et gonflés, obstruant ainsi la circulation de l'air dans les poumons (Figure 92). Cette obstruction est partiellement réversible, et se résorbe spontanément ou après traitement, mais beaucoup d'asthmatiques présentent une perte progressive des fonctions pulmonaires au cours du temps [458]. Les voies respiratoires présentent également une réponse exacerbée aux forces mécaniques survenant pendant les épisodes de bronchoconstriction, un stress mécanique qui lui aussi conduit au remodelage selon un mécanisme indépendant du processus inflammatoire [187,459,460].



Figure 92 : Changements morphologiques des bronches dans l'asthme (adapté de bphc.org et everydayhealth.com)

Deux types cellulaires sont critiques dans cette pathologie : les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses. Les cellules épithéliales initient l'inflammation et entrainent la production excessive de mucus contribuant fortement à l'obstruction des bronches. Chronologiquement, les stimuli induits par diverses particules inhalées (allergènes, virus, polluants), déclenchent la sécrétion de cytokines comme TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin), et les interleukines IL-25 et IL-33. Ces médiateurs agissent sur les cellules sous-épithéliales entrainant la libération d'autres cytokines (IL-5 et IL-13 par exemple) par les lymphocytes Th2 [461–464]. Cette réponse est amplifiée par le recrutement et la différenciation de certains lymphocytes T, engendrant la sécrétion continue de cytokines. Ces dernières agissent alors sur les cellules épithéliales et musculaires, entrainant une réponse inadaptée contribuant aux symptômes énoncés. Les agressions chroniques conduisent au remodelage de l'épithélium des voies respiratoires, caractérisé par une hyperplasie des cellules à mucus associée à une hypersécrétion de mucus. La surproduction de MUC5AC est notamment un effecteur central de l'inflammation, et son invalidation génétique chez la souris abolit l'hyper-réactivité des voies respiratoires des asthmatiques montre également une diminution du nombre de cellules multiciliées, une mauvaise orientation des cils et une réduction de la fréquence de leur battement. Ces changements de population cellulaire se font sans changement du nombre total de cellules [466–468].

Le remodelage est également caractérisé par une fibrose dans le compartiment sousépithélial, et finalement une hypertrophie et hyperplasie des cellules musculaires lisses [187,458–460,469,470]. La contribution des fibres musculaires lisses est importante : en répondant à la présence des différents allergènes ou stimuli contractant, leur contractilité accrue aboutit à un rétrécissement ou une constriction des conduits respiratoires. Ceci conduit à une détresse respiratoire et peut même entrainer la mort. Ces contractions anormales peuvent être causées par une sécrétion de neurotransmetteurs comme l'acétylcholine par le système nerveux parasympathique en réponse à des stimuli environnementaux. Les asthmatiques sont généralement hyper-sensibles à ces signaux nerveux. Cela peut être également dû à la sécrétion de cytokines comme IL-13 ou IL-17 induisant l'expression de la petite GTPase RhoA, un effecteur important de la contraction musculaire [471–473]. Wnt5a produit par les cellules épithéliales peut également cibler l'hyper-réactivité des cellules musculaires lisses [474].

L'asthme peut être catégorisé en différent phénotypes cliniques :

 Inflammation des poumons résultant d'une réponse éosinophilique non allergique, causé principalement par des virus

- Inflammation médiée par les lymphocytes T induits par les neutrophiles
- Asthme pauci-granulocytique
- Asthme le plus fréquent : réponse lymphocytaire T/Th2 médiée par la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-4, IL-5, eotaxine ou IL-13).

Ces différentes catégories se distinguent par leur réponse aux différentes classes de médicaments. L'interleukine IL-13 est une cible importante visée par quelques médicaments spécifiques [470,475–477]. L'expression de cette interleukine provoque la perte des cellules multiciliées et la diminution du battement ciliaire. L'interleukine IL-13 induit la diminution de l'expression de FOXJ1 et MCIDAS, de manière indépendante de la voie Notch, et affecte l'expression et la localisation de l'Ezrine du complexe ERM (page 58) [20,467,478,479]. L'observation de cellules doubles positives FOXJ1 et MUC5AC dans l'épithélium des voies respiratoires a soulevé la question de l'origine des cellules à mucus lors de l'hyperplasie de cellules à mucus pendant le remodelage de l'épithélium des voies respiratoires. Une étude suggère, après avoir suivi le lignage de cellules multiciliées pendant le remodelage, leur transdifférenciation en cellules à mucus [479]. Mais ces résultats ne sont pas confirmés par l'étude de l'équipe de J. Rajagopal, qui démontre que les cellules à mucus produites ne dérivent pas des cellules multiciliées [20]. Ils ne concordent pas non plus avec notre étude de lignage cellulaire, qui démontre que les cellules doubles positives FOXJ1 et MUC5AC correspondent en réalité à des cellules à mucus devenant des cellules multiciliées, dont je parlerai dans la partie Résultats (page 126) [28–30].

Différentes thérapies aident à mitiger/atténuer les symptômes de l'asthme, en se basant sur la prise d'anti-inflammatoires et bronchodilatateurs. Par exemple par inhalation ou prise orale journalière de corticostéroïdes combinés à des agonistes β2 à action longue, des antileukotriennes ou modificateurs de leukotriennes, du cromolyne sodium, des méthylxanthines ou des immunomodulateurs (Olizumab ou QGE031) [476,477,480–484]. L'asthme est classé sévère lorsque les traitements ont besoin d'être pris à haute intensité, ou lorsque les symptômes restent hors de contrôle malgré la prise de traitement à haute dose, nécessitant la prise d'autres bloqueurs de cytokines [476,480,483]. Il faut également savoir que l'arrêt du stress chronique des voies respiratoires est suffisant pour inverser le remodelage de l'épithélium des voies respiratoires [62].

III.2 - Bronchopneumopathie chronique obstructives (BPCO)

La BPCO est une maladie inflammatoire chronique obstructive des voies respiratoires, qui apparait cliniquement chez les sujets âgés (plus de 40 ans). Plus de 3,5 millions de personnes dans le monde en sont atteintes et cette maladie tue 16 000 malades en France chaque année. La BPCO est très hétérogène en termes de symptômes, de progression et de réponse aux traitements [485]. La principale cause de cette maladie est le tabagisme, facteur de risque retrouvé chez plus de 80% des patients. Dans certains cas, des prédispositions génétiques ont été trouvées. De plus, les infections respiratoires fréquentes pendant l'enfance constituent un terrain propice pour le développement ultérieur de la BPCO.



Figure 93 : Symptômes de la BronchoPneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) (adapté de polkahontas.wordpress.com)

Les patients atteints de BPCO présentent 3 altérations principales : emphysèmes, bronchites chroniques et asthme réfractaire (non réversible) (Figure 93). Les symptômes sont caractérisés par une difficulté à respirer, une obstruction des flux d'air et dyspnée dénotant le rétrécissement des voies respiratoires, une augmentation de la toux qui peut devenir sifflante, une inflammation des voies respiratoires. Ces symptômes sont associés à un remodelage de l'épithélium des voies respiratoires, à savoir, une hyperplasie des cellules à mucus associée à une surproduction de mucus (Figure 93). Ce phénomène est dû à l'expression d'EGF dans les cellules multiciliées (page 66), qui est augmentée par le tabagisme, et qui active le récepteur à l'EGF (EFGR) dans les cellules basales et engendre leur différenciation partielle en cellules à mucus, au détriment des cellules multiciliées [295]. Ainsi, une diminution du nombre de cellules multiciliées, de la taille des cils, de la fréquence

du battement ciliaire des cellules multiciliées est également observée, altérant la clairance mucociliaire et contribuant à la rétention des sécrétions et aux infections. Ces symptômes n'apparaissent pas avant que les dommages soient suffisants et empirent habituellement avec le temps. Les patients présentent également un plus haut risque de développer une maladie cardiaque et un cancer du poumon [486–492].

L'exposition à la fumée de cigarette provoque une perte des cellules multiciliées, et une hypertrophie des glandes sous-muqueuses, associées à une augmentation de sécrétion de mucus, induisant ainsi une diminution de la clairance mucociliaire, favorisant la colonisation microbienne. De manière générale, la BPCO est causée par une exposition à long terme à des gaz ou particules irritants inhalés à cause de pollution de l'air, d'expositions professionnelles ou domestiques aux poussières ou substances chimiques [491,493].

Cette maladie présente de nombreuses similitudes avec l'asthme, bien que ces deux pathologies soient distinctes avec des caractéristiques et des mécanismes différents [492]. En effet, la diminution de l'élasticité et du diamètre des bronches dans la BPCO affecte de plus petits conduits que l'asthme (<2mm), la diminution du diamètre est également plus forte. D'autre part, dans la BPCO, la réponse inflammatoire spécifique se fait en présence de lymphocytes T/Th1, CD8⁺, avec présence de neutrophiles, ce qui n'est pas le cas dans l'asthme (Th2 et présence d'éosinophile) [493]. De ce fait, l'asthme est sensible aux corticothérapies, ce qui n'est pas le cas dans la BPCO. Puis, les modifications de la musculature bronchique lisse et du dépôt de matrice collagène sont plus marqués dans l'asthme [487]. Une autre principale raison qui permet de distinguer l'asthme de la BPCO est que les grandes études sélectionnent les cas typiques de la maladie pour les étudier. Néanmoins, pour de nombreux patients, le clinicien ne peut clairement différencier ces deux maladies, une situation qui peut être qualifiée de « syndrome de chevauchement entre asthme et BPCO ». Il est important de reconnaître cette entité car les patients souffrant d'un syndrome de chevauchement entre asthme et BPCO sont plus symptomatiques, ont une moins bonne qualité de vie, souffrent de plus d'exacerbations et ont de moins bons pronostics que les patients atteints d'une seule de ces deux maladies [494].

III.3 - La Mucoviscidose

La mucoviscidose (Cystic Fibrosis (CF) en anglais) est la maladie autosomique récessive grave la plus fréquente dans la population caucasienne avec une incidence d'environ 1 naissance sur 4500 [495–497]. Cependant, la fréquence de l'affection varie selon l'origine géographique et ethnique des patients. En l'absence de traitement palliatif, la médiane de survie est de 3 à 5 ans. Bien que quelques patients puissent être asymptomatiques jusqu'à l'âge adulte [498], 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 de retarder le plus possible 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 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 [495,496].

Le gène responsable de la maladie a été isolé par clonage positionnel. En 1985, le locus CF a été localisé sur le bras long du chromosome 7 (7q31) [499]. C'est en 1989 que le gène impliqué dans la mucoviscidose a été finalement isolé, identifié et cloné [500–502]. Il s'agit du gène CFTR (« Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator ») contenant 27 exons s'étendant sur 250 kb (kilobase) (7q31), l'ARNm transcrit est de 6,5 kb et code la protéine CFTR composée de 1480 acides aminés. Le gène CFTR code une protéine transmembranaire appartenant à la superfamille des transporteurs ABC (« ATP Binding Cassette »), exprimée au pôle apical de la membrane cellulaire, où elle exerce plusieurs fonctions dont la mieux caractérisée est celle de canal anionique (notamment les ions Cl-) activé par l'AMPc et l'hydrolyse de l'ATP (Figure 94) [503–505].



Figure 94 : Canal chlorure CFTR (adapté de advancingcfscience.com)

Plus de 2000 mutations du gène CFTR, responsable de la maladie, ont été identifiées à ce jour, et sont regroupées en 5 classes selon leurs effets sur la protéine CFTR. Ces mutations peuvent altérer la synthèse, la maturation, la fonction ou la stabilité de la protéine (Figure 95) [495,499,506,507] :

- Classe I : production d'une protéine défectueuse à cause d'une mutation nonsens, ou de larges insertions ou délétions,
- Classe II : protéine subissant une synthèse défectueuse,
- Classe III : déclenchement défectueux de la protéine (le canal ne s'ouvre pas),
- Classe IV : protéine présentant un défaut de conduction,
- Classe V : mutants rares générant une faible quantité de protéine fonctionnelle.



Figure 95 : Classification des mutations de CFTR (adapté de jorgereyes83.blogspot.com)

La mutation la plus fréquente (plus de 70% des patients), est une mutation de classe II. Elle correspond à une délétion spécifique de 3 paires de bases, résultant à la perte d'une phénylalanine en position 508 du gène (CFTR-F508del), affectant ainsi la synthèse et la fonction de CFTR qui est rapidement dégradée (Figure 95) [500,506–511].

Ce canal, exprimé au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales, a une fonction cruciale dans l'homéostasie des couches liquides extracellulaires puisqu'il est capable de transporter les ions chlorure (Cl⁻) et bicarbonates (HCO³⁻). Ces ions contribuent à la composition ionique des liquides de surface [510–517]. Une mutation de CFTR cause un

défaut de transport d'anions perturbant la balance des échanges hydroélectrolytiques entre la surface de l'épithélium des voies respiratoires et le milieu intérieur. Il en résulte une déshydratation du liquide périciliaire et de la couche de mucus qui recouvre la surface épithéliale. En conséquence, il y a une réduction de la hauteur du liquide périciliaire et une concentration du mucus [518,519]. La sécrétion de bicarbonate dépendante de CFTR étant requise pour l'expansion normale des mucines, l'altération de ce transport conduit à l'agrégation des mucines, les rendant insolubles [520,521].

La plupart des organes comportant des tissus épithéliaux sont le siège des transports hydro-électrolytiques transépithéliaux. Par conséquent, le transport ionique défectueux conduit à des troubles obstructifs pulmonaires chroniques, une insuffisance pancréatique et hépatique, des sécrétions sudoripares anormalement concentrées, et une stérilité masculine sécrétoire due à une agénésie congénitale bilatérale des canaux déférents. Environ 15% des enfants naissent également avec un iléus méconial correspondant à une occlusion intestinale [495,498,515,521]. La mucoviscidose est ainsi caractérisée comme une génopathie des glandes exocrines dont la principale conséquence est une hypersécrétion du mucus anormalement visqueux et tenace qui obstrue différents organes [498]. Par ailleurs, il a été montré qu'une étape précoce des pathologies respiratoires dans la mucoviscidose est l'altération de la fonction des glandes sous-muqueuses où CFTR a été localisé la première fois [68,522]. Dans l'épithélium des voies respiratoires, ce sont néanmoins les ionocytes pulmonaires (Figure 96), population rare dans l'épithélium des voies respiratoires découverte récemment grâce aux technologies de séquençage transcriptomique de cellules uniques (page 119), qui sont la source majeure de l'activité CFTR, jouant ainsi un rôle important dans la cette pathologie [71]. Ce point est notamment discuté dans la partie Résultats, notamment à travers la présentation d'un article auquel j'ai participé à la rédaction (page 126) [523].



Figure 96 : Ionocyte exprimant CFTR à sa surface apicale (adapté de Vaincrelamuco.org)

Les atteintes pulmonaires sont à ce jour les manifestations les plus préjudiciables associées à une obstruction progressive des voies respiratoires, des difficultés à respirer, une production excessive de mucus avec une augmentation de sa viscosité et de sa ténacité, conduisant à des cycles chroniques d'inflammations pulmonaires et d'infections qui affectent progressivement les fonctions pulmonaires (Figure 97). L'atteinte pulmonaire est responsable de plus de 90% de la morbidité et mortalité. En effet, les propriétés anormales du liquide tapissant les voies respiratoires des patients altèrent la clairance mucociliaire et fournit une niche hypoxique propice à la colonisation par des pathogènes opportunistes comme *Pseudomonas aeruginosa,* le pathogène le plus fréquemment retrouvé chez les patients adultes [520,521]. Par ailleurs, le dysfonctionnement de CFTR pourrait entrainer une augmentation de la concentration des ions chlorures et sodiques dans la couche périciliaire, ce qui entraverait l'activité antimicrobienne de certaines molécules comme la β-défensine et nuirait donc à l'élimination des bactéries des voies respiratoires [524].



Figure 97 : Conséquences de la mutation du gène CFTR dans l'épithélium des voies respiratoires (adapté de Lopes-Pacheco et al, 2016)

Les infections chroniques découlant de ces paramètres conduisent à des lésions fréquentes de l'épithélium des voies respiratoires dont la régénération devient défectueuse et se caractérise par un remodelage. La culture de cellules de patients CF, en modèle ALI ou en modèle murin de xénogreffe, montre un phénotype hyperinflammatoire. La régénération de l'épithélium des voies respiratoires dans ces modèles conduit à un épithélium pluristratifié caractérisé par une prolifération plus marquée et une hyperplasie de cellules basales. Le nombre de cellules à mucus MUC5AC+ est similaire dans l'épithélium obtenu à partir de patients CF ou d'individus sains. Le nombre de cellules à mucus MUC5B+ est cependant plus faible dans l'épithélium malade. Un délai dans la multiciliogenèse a également été observé. De plus, l'expression d'IL-8, de MMP7, de MMP9 et de TIMP1 est renforcée, témoignant d'une réponse pro-inflammatoire et du remodelage par les métalloprotéinases. Ce phénotype se perd avec le temps en absence d'inflammation exogène. Il est possible de mimer ce remodelage sur un épithélium sain en stimulant la réponse inflammatoire des cellules avec l'interleukine IL-13 par exemple [525,526].

La mucoviscidose a donné lieu à de nombreuses études pour clarifier la relation entre l'inflammation et les infections des voies respiratoires. Il serait logique de penser que l'inflammation est une conséquence des infections pathogènes, qui seraient la genèse du remodelage de l'épithélium des voies respiratoires. Cependant, certaines études indiquent que le stade inflammatoire est possible en absence d'infection bactérienne [515,516,527]. En effet, l'utilisation de xénogreffes chez la souris à partir de cellules primaires de patients ou d'individus sains, ou bien la culture dans le modèle ALI de cellules de patients maintenus en environnement stérile, montrent un état pro-inflammatoire de l'épithélium des voies respiratoires bien que les cellules aient été obtenues de patients ne montrant pas la présence de bactéries. De plus, cet état inflammatoire diminue avec le temps dans les cultures de cellules en absence de stimulation inflammatoire [525,526]. Cependant, grâce à un modèle récent d'étude de la mucoviscidose, le cochon CF dans lequel le gène CFTR a été invalidé ou code une protéine présentant la mutation CFTR-F508del, il a été possible de réévaluer ce lien entre infection et inflammation dans la mucoviscidose. Ces animaux développent spontanément les caractéristiques de la maladie, incluant inflammation et remodelage des voies respiratoires, l'accumulation de mucus et les infections bactériennes. Il a pu être démontré que les poumons de ces cochons CF nouveau-nés ne montraient pas d'inflammation, mais présentaient plus souvent des bactéries dans les voies respiratoires que les poumons des animaux non-mutés. En effet, en absence de CFTR, la sécrétion des ions HCO³⁻ est défectueuse et le pH du liquide de surface des voies respiratoires devient donc plus acide, ce qui inhibe l'activité des molécules antimicrobiennes produites par les voies respiratoires. En conclusion, il apparait que c'est la mauvaise capacité d'élimination des bactéries qui est l'événement initiateur de l'inflammation et de la pathologie dans les poumons de cochons CF. Des manipulations visant à augmenter le pH du liquide des voies respiratoires pourraient donc prévenir l'infection initiale chez les sujet CF [515,527,528].

Des améliorations dans la prise en charge de certains patients CF sont possibles depuis quelques années avec le développement du premier traitement pharmacologique à visée « curative » ciblant directement le canal CFTR muté. Cette première molécule découverte par le laboratoire Vertex[®] est l'Ivacaftor (Kalydeco[®]), qui potentialise l'activité de CFTR présentant des défauts d'ouverture (Classe III) comme c'est le cas pour la mutation G551D. Ce composé augmente de plus de 10% le volume expiré en une seconde (VEMS) lors d'une expiration forcée chez les patients CF porteurs de cette mutation G551D. Ce traitement normalise également les électrolytes de leur sueur [496]. L'efficacité de ce traitement, bien que ne guérissant pas ces patients, améliore significativement leur qualité de vie. Néanmoins, ces patients G551D susceptibles de bénéficier de Kalydeco® représentent seulement moins de 5% de l'ensemble des patients CF. Tout récemment, un nouveau traitement appelé Trikafta[®], basé sur une trithérapie combinant Elexacaftor (VX-445), Tezacaftor (VX-661) et lvacaftor a été découvert par ce même laboratoire Vertex[®], et permet en théorie de cibler près de 90% des patients CF dont les nombreux patients porteurs d'au moins un allèle CFTR-F508del. Les essais cliniques de phase II et III de ce traitement ont montré une augmentation moyenne du VEMS de 13,8% dans une grande majorité de patients CF testés présentant un tableau clinique modéré avec un VEMS initial supérieur à 40% [506,507]. Ce traitement vient d'obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2020 aux Etats-Unis, et une AMM a été déposée et est en attente d'acceptation dans l'ensemble des pays du monde, dont la France. Ce nouveau traitement, bien que ne guérissant pas non plus les patients CF, et notamment les patients présentant un tableau clinique grave, apporte une augmentation significative de la qualité et de l'espérance de vie dans une grande majorité des cas et offre un réel espoir pour de nombreux patients.

Quoique très prometteurs dans la thérapeutique de la mucoviscidose, la problématique de ces traitements corrigeant l'activité de CFTR, est l'existence de plus de 2000 mutations dans le gène qui code CFTR, et la difficulté de trouver des molécules correctrices efficaces et spécifiques de chacune de ces mutations. Des approches alternatives ont été proposées, se basant sur la compensation de la perte de l'activité de CFTR en stimulant d'autres canaux anioniques, comme les Canaux Chlorures activés par le Calcium (CaCC), et particulièrement le canal ANO-1 (ANOctamin-1 ou TMEM16A (TransMEMbrane protein 16A)), CaCC majeur de l'épithélium des voies respiratoires. De manière intéressante, ANO-1 est impliqué dans la perméabilité des ions bicarbonates, la

prolifération, la migration, la cicatrisation et l'inflammation. ANO-1 présente le même modèle d'expression que CFTR, et son expression est diminuée chez la patients CF [529-531]. Une étude récente a démontré que le miARN miR-9 régule directement ANO-1, causant la diminution de son expression et donc de son activité à la surface cellulaire [532]. De plus, l'expression de miR-9 est augmentée chez les patients CF, ce qui pourrait expliquer la diminution de l'expression de ANO-1 [532,533]. Pour étudier les effets du blocage de la reconnaissance de ANO-1 par miR-9, cette étude utilise la stratégie d'oligonucléotides « Target Site Blocker » (TSB), basée sur la technologie LNA (« Locked Nucleic Acid ») qui fournit une haute stabilité pendant l'hybridation sur les ARN cibles [532,533], et vise à protéger spécifiquement un transcrit cible donné de l'effet d'un miARN particulier. L'oligonucléotides TSB a été choisi de manière à se lier parfaitement dans la région du 3'UTR du transcrit de ANO1, directement sur la région seed de miR-9, et le protéger de l'action inhibitrice de miR-9 sur son expression. L'effet fonctionnel de ce TSB a été testé in vitro et in vivo dans les trachées de souris CF. Dans cette étude menée par l'équipe du Dr Tabary, les auteurs ont montré que miR-9 cible et inhibe spécifiquement ANO-1 et que le blocage de cette interaction entre miR-9 et ANO-1 par des TSB améliore le transport d'anions chlorure et du mucus in vivo dans les trachées de souris CF. Ainsi, cette étude propose une approche thérapeutique alternative originale visant à corriger les flux chlorures chez les patients CF via un canal alternatif au CFTR et basée sur la levée de répression de l'expression de ANO-1 par miR-9 en utilisant l'administration d'oligonucléotides LNA « TSB » [532,533].

Dans cette introduction, j'ai dressé un état de l'art concernant les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la régénération de l'épithélium des voies respiratoires, et plus particulièrement ceux mis en jeu dans les différentes étapes de la multiciliogenèse au cours de la différenciation des cellules multiciliées.

Notre équipe a déterminé que la famille miR-34/449 jouent un rôle majeur dans le contrôle de la multiciliogenèse (page 83) [196,228,286,287,338,534]. Les mécanismes d'action de ces miARN demeurent encore mal élucidés. Dans ce contexte, une première partie de mon travail de thèse a consisté à déterminer le rôle fonctionnel et le mécanisme d'action de deux variants de cette famille (page 122) (5'-isomiR-449c et 5'-isomiR-34b), que notre équipe venait d'identifier peu de temps avant mon arrivée au laboratoire [535]. Dans la continuité des travaux sur les miR-34/449, notre équipe a démontré que *CDC20B*, gène

hôte des miR-449 localisé sur le locus génomique 5q11, était également un acteur clé de la multiciliogenèse (page 95) [197]. MCIDAS (page 90) et CCNO (page 98), deux autres gènes adjacents de CDC20B/miR-449, localisés aussi sur ce locus 5q11 (page 86) ont par la suite été démontrés comme deux nouveaux régulateurs de la multiciliogenèse [536,537]. L'ensemble de ces résultats ont établi ainsi cette région 5q11 comme un « locus multiciliaire ».

Sous cet aspect, comme les miR-34b/c sont aussi des régulateurs conservés de la multiciliogenèse [228,286,535], un deuxième objectif de ma thèse a été de déterminer si par analogie avec le locus 5q11, les membres du locus des miR-34b/c (locus 11q23) (page 86) chez l'humain, joueraient également un rôle dans la multiciliogenèse dans nos modèles d'épithélium des voies respiratoires humains ou murins (page 124).

L'avènement de la méthode du séquençage du transcriptome de cellules uniques (page 119) a conduit notre équipe à mettre au point cette technique afin d'identifier et de caractériser les différentes populations cellulaires composant l'épithélium des voies respiratoires à chaque étape de la régénération dans nos modèles humain et murin de culture ALI. Dans ce contexte, un troisième objectif de mon travail de thèse a été d'apporter mon expertise dans le modèle murin mTEC afin qu'il puisse être comparé au modèle HAEC, afin d'en déterminer les populations cellulaires, d'identifier de nouvelles populations et de tracer la trajectoire de différenciation par laquelle passent les cellules au cours de leur maturation de cellules progénitrices à cellules matures, comme les cellules multiciliées (page 126). Enfin, plusieurs protocoles de culture cellulaire sont utilisés dans la littérature pour étudier les mécanismes de différenciation de l'épithélium respiratoire humain. A cet égard, un dernier objectif de ma thèse a consisté à utiliser l'approche de séquençage de cellules uniques afin d'évaluer l'impact de l'utilisation de quatre milieux de culture différents sur la différenciation mucociliaire et la composition des différentes populations cellulaires de l'épithélium des voies respiratoires dans notre modèle de régénération (page 129).

Tandis que le laboratoire avait montré dans des études antérieures que les voies de signalisation Notch et BMP jouaient un rôle clé dans la différenciation de l'épithélium respiratoire mucocilié [228,286,338], un dernier aspect de ma thèse a été d'évaluer l'implication d'une autre voie de signalisation (Hedgehog) dans la multiciliogenèse au cours de la régénération de l'épithélium des voies respiratoires *in vitro* (page131).

115

Méthodologie

Les matériels et méthodes des expériences réalisées au cours des études présentées dans les « Résultats » (page 122) sont détaillés dans les articles. Cette partie présente les difficultés rencontrées ou des améliorations apportées depuis mon arrivée au laboratoire et les détails non précisés dans les articles à propos des matériels et méthodes.

Chapitre 1 : Méthodologie des modèles d'études

I. Modèle de culture primaire de cellules épithéliales des voies respiratoires humaines (HAEC) en Interface Air-Liquide (ALI)

A mon arrivée au laboratoire, le milieu utilisé communément pour les cultures ALI de HAEC était le milieu BEGM[™]. Le milieu Pneumacult[™] commençait également à être utilisé en parallèle. Cependant, depuis 2017, des problèmes de différenciation des cellules ont commencé à survenir lors de l'utilisation du milieu BEGM[™] (Figure 98). Les problèmes de différenciation devenant plus fréquents, alors que le milieu Pneumacult[™] n'en présentait pas, nous avons choisi d'utiliser préférentiellement ce dernier milieu de culture. Je présenterai dans la partie des Résultats (page 129), les études de comparaison du développement d'épithélium des voies respiratoires cultivés dans ces différents milieux.



Figure 98 : Problème de différenciation observé avec le milieu BEGM™ (DAPI = noyaux, Actine = cytosquelette, Ac-tub = cellules multiciliées)

II. Modèle de culture primaire de cellules épithéliales de trachées de souris (mTEC) en Interface Air-liquide (ALI)

A mon arrivée au laboratoire, le milieu de prolifération utilisé pour la culture ALI de mTEC était un milieu DMEM/F-12 1 :1 supplémenté avec 15mM d'HEPES dans lequel étaient ajoutés les « single quots » du milieu BEGM™ pour la phase de culture en immersion. Et lors

du passage en ALI, le milieu de différenciation utilisé était soit du milieu BEGM[™], soit du milieu DMEM/F-12 1 :1 supplémenté avec 15mM d'HEPES contenant 2% d''UtroSer[™] G Serum Subsitute. Au cours de leur utilisation, j'ai pu observer que peu de cellules multiciliées étaient produites à la fin de la différenciation (Figure 99). J'ai donc remplacé le milieu de différenciation par du milieu Pneumacult[™], et j'ai pu obtenir un plus grand nombre de cellules multiciliées à la fin de la différenciation (Figure 99).



Figure 99 : Comparaison de différenciation des mTEC en milieu Ultro-Ser G™ ou milieu Pneumacult™ (DAPI = noyau, Ac-tub = cellules multiciliées)

En routine, une trachée de souris permet d'ensemencer 2 à 3 inserts si les cellules sont ensemencées directement après dissociation. Par souci d'efficacité et respect de la règle des 3R en expérimentation animale (Remplacer, Réduire, Raffiner), nous avons cherché au laboratoire à réaliser une phase d'amplification des cellules basales sur plastique avant l'ensemencement sur filtre. J'ai alors mis en place le protocole de Eenjes [538] qui permet une amplification sur plastique dans du milieu KSFM contenant un inhibiteur de ROCK (Y-27632) et un inhibiteur de la voie Notch (γ-sécrétase DAPT). Ce protocole m'a permis d'obtenir des mTEC pleinement différenciées à ALI10 (Figure 100), et nous permet à présent de pouvoir amplifier les cellules basales avant de les mettre en culture en insert, et de réduire ainsi le nombre de souris utilisées par expérience. L'inconvénient de cette technique est qu'elle rallonge le temps total avant d'obtenir un épithélium des voies respiratoires différencié, puisque l'amplification sur plastique peut prendre jusqu'à une semaine.



Figure 100 : Comparaison de différenciation des mTEC après ensemencement direct sur insert ou amplification préalable en milieu KSFM (DAPI = noyau, Ac-tub = cellules multiciliées)

III. ARN interférence dans les modèles de culture ALI de HAEC et mTEC

L'inhibition de l'expression des gènes a représenté un challenge au cours de ma thèse. En effet, les techniques disponibles pour modifier l'expression génique des HAEC en culture ALI se résumaient à l'utilisation de la technologie de transfection de siARN au moment de l'ensemencement sur filtre. Cependant, cette inhibition de l'expression génique n'est que transitoire et disparaît entre une et deux semaines, alors que la différenciation des HAEC prend 3 à 4 semaines à partir de l'ensemencement. Par ailleurs, nous verrons dans les résultats que l'expression génique de gènes impliqués dans la multiciliogenèse, ont une expression très faible ou absente en début de différenciation comme il a été le cas pour C11orf88 (page 124). De plus, j'ai observé que les transfections de siARN ne sont pas reproductibles dans le milieu Pneumacult. Dans les mTEC en culture ALI, les transfections siARN ne fonctionnant pas, j'ai essayé de mettre en place une inhibition de l'expression génique stable en utilisant des infections lentivirales. J'ai également tenté de la mettre en place en parallèle dans les HAEC pour pallier le problème de C11orf88 et du milieu Pneumacult, notamment pour la technologie des siARN. Cependant cette technique s'est révélée peu reproductible, rendant l'interprétation des résultats peu évidente, l'infection lentivirale elle-même affectant fortement la régénération de l'épithélium des voies respiratoires.

Chapitre 2 : Méthologie du séquençage transcriptomique de cellules uniques (« Single-cell RNA-seq »)

1- Dissociation des cellules épithéliales à partir des cultures ALI



Figure 101 : Etapes de dissociation des cellules pour le "Single-cell RNA-seq »

La technique de « Single-cell RNA-seq » requiert une première étape de dissociation des cellules de l'épithélium des voies respiratoire cultivées (Figure 101). Cette étape est très critique car les cellules forment des jonctions serrées qu'il peut être difficile de rompre sans induire la mortalité cellulaire. Mon équipe a fait des essais avec plusieurs enzymes et conditions, pour finalement opter pour une incubation avec la protéase XIV à 4°C. Le challenge de la mise en place de ces protocoles est détaillé dans la thèse de Sandra Ruiz-Garcia [539]. Les temps doivent être modulés en fonction de l'épaisseur de l'épithélium, et j'ai participé à la détermination des temps requis pour la dissociation des mTEC.





Figure 102 : Etapes de séparation des cellules dans les gouttelettes

Les cellules sont ensuite séparées par des microfluides permettant d'obtenir des gouttelettes (« droplets ») contenant une cellule, les réactifs pour la lyse cellulaire ainsi qu'une bille sur laquelle sont fixés les barcodes permettant de coder tous les ARN de cette cellule. La transcription reverse est réalisée après rupture des gouttelettes (Figure 102).



3- Séquençage, comptage des transcrits par cellule et normalisation

Figure 103 : Etapes de séquençage transcriptomique

Le séquençage transcriptomique est ensuite réalisé avec comptage des transcrits et normalisation (Figure 103). Les calculs de ces étapes ainsi que les analyses bioinformatiques évoquées ci-après sont détaillés dans la thèse de Marie Deprez [540].



Figure 104 : "Clustering" et identification des types cellulaires et des trajectoires cellulaires

Une fois le séquençage réalisé, les analyses bio-informatiques permettent de regrouper les cellules en « clusters » et d'identifier les types cellulaires auxquels ils correspondent en fonction des gènes exprimés ou non dans ces groupes (Figure 104). Cette étape demande la définition de gènes marqueurs de ces types cellulaires. J'ai pu remarquer, lors de la définition des types cellulaires, notamment pour l'étude comparant les cellules d'épithélium des voies respiratoires cultivées dans 4 milieux différents, que cette étape est très critique puisqu'un seul marqueur ne peut pas être utilisé seul pour la définition d'un

type cellulaire. Il faut, la plupart du temps, regarder plusieurs marqueurs à la fois. Par ailleurs, l'identification de types cellulaires « rares » est également difficile car le regroupement réalisé par les analyses bioinformatiques ne sont pas souvent suffisamment précises pour déterminer un groupe de 2 ou 3 cellules. Il faut alors les annoter manuellement, ce qui demande plus de temps et qui nécessite également de déterminer un seuil de détection *a priori*, car parfois la définition d'un type cellulaire repose sur l'intensité d'expression d'un gène marqueur et pas seulement son absence ou sa présence.

Une fois les types cellulaires définis, l'utilisation d'algorithme, comme Monocle, permet de tracer les trajectoires cellulaires qui peuvent représenter à un instant « t » les étapes de différenciation par lesquelles une cellule est passée pour se transformer d'une cellule immature en cellules différenciée.

Résultats

Chapitre 1 : Caractérisation des isomiR de la famille miR-34/449

Article : Characterizing isomiR variants whithin the microRNA-34/44 family Mercey O, Popa A, <u>Cavard A</u>, Paquet A, Chevalier B, Pons N, Magnone V, Zangari J, Brest P, <u>Zaragosi LE</u>, Ponzio G, Lebrigand K, Barbry P, <u>Marcet B</u>. FEBS Letter (2017) 591(5):693-705.

Le but de cette étude a été de déterminer si les isomiR-34b et 449c de la famille miR-34/449, découverts par notre équipe, ont une fonction dans la multiciliogenèse.

La superfamille des miR-34/449 comprend six miARN homologues (miR-34a, miR-34b/c et miR-449a/b/c) localisés sur trois loci génomiques différents. Nous avons vu précédemment que ces miARN sont des régulateurs clés de la multiciliogenèse (page 83). Ces miARN présentent une redondance génomique et partagent la même région "seed" de fixation sur les 3'-UTR de leurs gènes cibles.

Nous avons vu également que les approches de séquençage à haut débit ont révélé l'existence de plusieurs isoformes de nombreux miARN, appelés 5'- ou 3'-isomiR. Ces séquences diffèrent par une ou plusieurs bases à leur extrémité 5' et/ou 3' par rapport aux miARN canoniques référencés dans miRBase. Les 5'-isomiR présentent un décalage de leur région "seed" de fixation à leur cible et sont donc susceptibles de cibler des transcrits distincts de leurs homologues canoniques.

Nous avons observé que les séquences de hsa-miR-34b-5p et hsa-miR-449c-5p rapportées dans miRBase différaient de celles des autres membres de la famille (hsa-miR-34a, miR-34c-5p et hsa-miR-449-449a/b) par l'addition d'une uridine à l'extrémité 5' de la séquence. La question a été de savoir si ces variations de séquences correspondaient à des isomiRs et si ces isomiRs avaient des propriétés biologiques et fonctionnelles spécifiques. Ce travail avait débuté avant mon arrivée au laboratoire, et j'ai pu contribuer à son achèvement, aboutissant à la publication citée précédemment [535].

Cette étude a permis de prouver l'existence d'isomiR actifs de la famille miR-34/449, bien qu'ils ne partagent que certains effets biologiques communs avec leurs homologues canoniques. Les résultats proposent que ces isomiR représentent un mécanisme additionnel par lequel la machinerie des miARN exerce une régulation fine de la multiciliogenèse. Il resterait à déterminer si ces isomiR répriment également, de manière spécifique, certaines cibles et s'ils sont dotés de fonction biologique qui leur serait propre au cours de la multiciliogenèse, indépendamment de leurs homologues canoniques. Ce chevauchement dans les fonctions des miARN canoniques et isomiR associés rejoint différentes études montrant que certains isomiR ont des fonctions variantes de leur miARN canonique (page 82) [388–391]




Characterizing isomiR variants within the microRNA-34/ 449 family

Olivier Mercey¹, Alexandra Popa¹, Amélie Cavard¹, Agnès Paquet¹, Benoît Chevalier¹, Nicolas Pons¹, Virginie Magnone¹, Joséphine Zangari², Patrick Brest², Laure-Emmanuelle Zaragosi¹, Gilles Ponzio¹, Kevin Lebrigand¹, Pascal Barbry¹ and Brice Marcet¹

1 CNRS, IPMC, Université Côte d'Azur, Sophia-Antipolis, Valbonne, France

2 CNRS, INSERM, IRCAN, FHU-OncoAge, Université Côte d'Azur, Sophia-Antipolis, Valbonne, France

Correspondence

P. Barbry and B. Marcet, IPMC, CNRS UMR7275, 660 Route des Lucioles, 06560 Sophia-Antipolis, Valbonne, France Fax: +33 (0)4 93 95 77 94 Tel: +33 (0)4 93 95 77 90/00/93 E-mail: marcet@ipmc.cnrs.fr (BM) and barbry@ipmc.cnrs.fr (PB)

(Received 16 December 2016, revised 26 January 2017, accepted 8 February 2017, available online 28 February 2017)

doi:10.1002/1873-3468.12595

Edited by Tamas Dalmay

miR-34/449 microRNAs are conserved regulators of multiciliated cell differentiation. Here, we evidence and characterize expression of two isomiR variant sequences from the miR-34/449 family in human airway epithelial cells. These isomiRs differ from their canonical counterparts miR-34b and miR-449c by one supplemental uridine at their 5'-end, leading to a one-base shift in their seed region. Overexpression of canonical miR-34/449 or 5'-isomiR-34/449 induces distinct gene expression profiles and biological effects. However, some target transcripts and functional activities are shared by both canonical microRNAs and isomiRs. Indeed, both repress important targets that result in cell cycle blockage and Notch pathway inhibition. Our findings suggest that 5'-isomiR-34/449 may represent additional mechanisms by which miR-34/449 family finely controls several pathways to drive multiciliogenesis.

Keywords: isomiR; microRNA; miR-34; miR-449; miRBase; multiciliated cell

MicroRNAs (miRNAs or miRs) are endogenous, small noncoding RNAs [1,2], which act as major post-transcriptional regulators of gene expression in multicellular organisms [3], and are involved in specific pathophysiological events [4–6]. Mature miRNAs are short 20–24 nucleotides single-stranded RNAs. A short stretch of 6–8 nucleotides at the 5'-end, termed the 'seed region' [7,8], plays a major role in the interaction with target messenger RNAs (mRNAs), usually in their 3'-untranslated region (3'-UTR). miRNAs regulate the expression of their target transcripts through mechanisms involving control of mRNA stability or translational efficiency [1]. The miRNA/mRNA interaction is driven by complex rules that go far beyond perfect complementarities, making sometimes *in silico* identification of targets inaccurate. Regulation by miRNAs represents a powerful mechanism to accurately fine-tune gene expression of several *a priori* distinct biological processes. The growing interest for miRNAs has led to the creation of a specialized database, miRBase [9], which current release (version 21) gathers information on 35 828 mature miRNA products across 223 species. This database has been instrumental to disseminate useful information about miRNAs.

miRNA genomic clusters are often cotranscribed as related miRNAs [10,11] which share the same seed region and/or belong to functionally related miRNA families [12,13]. A typical example is given by the miR-34/449 superfamily which exhibits extensive

Abbreviations

AGO, Argonaute protein; ALI, air-liquid interface; F-actin, filamentous actin; FUCCI, fluorescence ubiquitin cell cycle indicator; HAECs, human airway epithelial cells; miR-449, miR-449a, miR-449b, and miR-449c; miRNAs or miR, microRNAs; RISC, RNA-induced silencing complex.

FEBS Letters 591 (2017) 693–705 © 2017 The Authors. FEBS Letters published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Federation of European Biochemical Societies. 693 This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. genomic redundancy by encompassing six homologous miRNAs (miR-34a, miR-34b/c, and miR-449a/b/c) located on three distinct genomic loci [14-19]. miR-34b/c and miR-449a/b/c are abundantly expressed in multiciliated cells in which they act as pleiotropic regulators of vertebrate multiciliogenesis, through their action at several cellular levels: arrest of the cell cycle and inhibition of the Notch pathway [15], maturation and docking of basal bodies [17], as well as induction of the apical actin meshwork formation [19]. Mice deficient in either miR-34a, miR-34b/c, and miR-449a/ b/c or in miR-34b/c and miR-449a/b/c exhibit motile cilia impairment together with respiratory and fertility defects, while mice invalidated only for one of these miRNAs exhibit no discernible phenotype [14,16-18,20]. This functional redundancy is likely due to strong sequence homologies between miR-34/449 miR-NAs, which extend further than the seed region.

miRNA sequences may undergo several modifications such as uridylation, adenylation, RNA editing, or methylation that affect their properties and functions [21]. Recent advances in high throughput sequencing technologies have also refined the definition of miRNA variants, named 5'- or 3'-isomiRs, which differ from the canonical miRNAs by one or more bases at the 3'and/or 5'-end. Seldom, the sequence reported in miR-Base accounts for a very small fraction of a given miRNA [22-30]. Although isomiRs have been reported in many datasets, their biological relevance and contribution to the functional repertoire of a specific miRNA gene remain controversial [29,31,32,33,34]. Noisy measurements can hardly account for the high frequency of some isomiRs which are not randomly distributed [35], suggesting these isomiRs have a regulated production and a biological relevance.

The present study started as we pointed out that hsa-miR-34b-5p (miR-34b) and hsa-miR-449c-5p (miR-449c) have distinct seed region according to the sequences reported in miRBase. They differ from the other members of the family (hsa-miR-34a, -34c-5p, -449a, and -449b) by the addition of one uridine ('U') at the 5'-end of the two sequences. Using small RNA sequencing of human airway epithelial cell (HAEC) primary cultures, we show here that miRNA sequences referenced in miRBase for miR-34b or miR-449c actually represent minor variants that we propose to consider as isomiRs (5'-isomiR-34b and 5'-isomiR-449c). On the opposite, the most abundantly expressed sequences related to miR-34b and miR-449c share exactly the same seed region with other canonical members of the miR-34/449 family. Overall, our findings provide evidence that canonical miR-34/449 and 5'-isomiR-34/449 exhibit dramatic changes in the mRNA target recognition and can also display some functional differences/complementarities, as both block cell cycle and Notch pathway, whereas they differently affect actin network reorganization.

Materials and 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 (provided by Pr Castillo, Nice University 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 [15,19].

Ectopic expression of miRNAs and isomiRs

Primary HAEC, A549, or HEK293T cells were grown to 30% confluency on plastic plates or glass coverslip. HsamiR-34b-5p (5'-AGGCAGUGUCAUUAGCUGAUUGU -3') and hsa-miR-449c-5p (5'-AGGCAGUGUAUUG CUAGCGGCUGU-3') custom mimics were designed from the predominant form in small RNA sequencing data (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Cells 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 hsamiR-34b-5p and hsa-miR-449c-5p, Ambion, Life Technologies) and synthetic isomiRs (5'-isomiR-34b and 5'-isomiR-449c, referenced as miR-34b and miR-449c in miRBase, Ambion, Life Technologies) at 10 nm using Lipofectamine RNAi Max Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in OPTIMEM (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Total RNAs and proteins were extracted after 48 h and 72 h after transfection, respectively.

RNA/small RNA sequencing

Total RNAs were isolated from primary undifferentiated, fully differentiated, miR-, and 5'-isomiR-transfected HAEC cultures using QIAcube and miRNeasy kit from QIAGEN according to the manufacturer's instructions. Total RNAs were then quantified using NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and integrity of samples (RIN > 8) was evaluated using RNA nanochips on the Agilent 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). For RNA sequencing, polyA RNAs were purified using dynabeads mRNA purification kit (Invitrogen) and tagmented for 9 min at 95 °C. To test molecular cloning bias, synthetic mature miRNAs or isomiRs (10 pg) were mixed with 1.5 µg of a complex RNA mixture of 3T3 cells just before performing small RNA sequencing. RNA and small RNA libraries were generated using the NEB next small library prep set for SOLiD (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 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 and next generation sequencing information system Mediante [36] and submitted to GEO repository under super series GSE77252 gathering GSE90764 series for small RNA sequencing of undifferentiated and fully differentiated HAECs (n = 3 donors), GSE77249 series for small RNA sequencing of synthetic microRNA transfection, and GSE77251 for transcriptome analysis in HAECs overexpressing canonical miR-34abc/449abc, 5'-isomiR-34b, or 5'-isomiR-449c.

Data analysis

SOLiD data were analyzed with lifescope v2.5.1, using the small RNA pipeline for miRNA libraries and whole transcriptome pipeline for RNA-seq libraries with default parameters. Annotation files used for production of raw count tables correspond to miRBase v18 for small RNAs 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 miR-Base 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.

Data generated from RNA sequencing were analyzed with Bioconductor (http://www.bioconductor.org). Differential expression analyses were performed using the EDGER package V 3.14.0 (Bioconductor). Briefly, dispersion was estimated using the parameters method = 'deviance' and robust = TRUE, and statistical significance was assessed using exact tests. P-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg method which controls the false discovery rate (FDR) [37]. Thousand one hundred and ninety-six genes down-regulated in at least one condition compared to control were selected based on an average expression level log₂ CPM (counts per million) > 3 and a \log_2 FC (fold change) ≤ -0.9 in at least one condition. Log₂ CPM data were centered and scaled per gene. An unsupervised hierarchical clustering was performed with the R package pheatmap using Pearson's correlation distance and complete linkage.

The relative enrichment of sequences in the 3'-UTR in gene lists from GSE77251 and ranked by increasing fold change was identified using SYLAMER [38] version 08-123; online available at www.genomique.info/sylamer.

'MicroCible' is a bioinformatics tool developed in-house to predict miRNA targets (http://www.genomique.info: 8080/merge/index?action=MICIB, [39]) by scanning transcripts sequences for the presence of 'miRNA seed' complementary sequence. This search can be performed for different 'seed' match type, a minimal free energy binding cutoff (deltaG \leq -20 was used for Fig. 2B,C), and the location of the potential targeting site (i.e. 3'UTR or entire transcript).

Quantitative RT-PCR

Quantitative RT-PCR was performed using TaqMan[®] Gene Expression Assay (Life Technologies) on a Lightcycler 480 (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Expression levels of messenger RNAs were calculated using the 2-deltaCT method, using *UBC* as endogenous controls.

Immunocytochemistry

A549 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 0.1 M, 10 min), and permeabilized (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 with anti-paxillin primary antibody (1 : 10 000, 349/Paxillin, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Then, cells were incubated for 1 h 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 (Olympus France, Rungis, France).

Western blot experiments

Primary HAECs were harvested by scraping in Ripa lysis buffer (Thermo Scientific Pierce) and cleared by centrifugation. Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid 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 PVDF membranes and analyzed by immunoblotting with appropriate primary antibodies and HRP-conjugated secondary antibodies (1 : 500, Dako, Agilent Technologies) according to the manufacturer's instructions. Primary antibodies and dilution used were as follows: ARHGAP1 [1 : 500, Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) sc-68918], ARHGDIB [1 : 500, Santa Cruz, sc-523), and Notch1 (1 : 500, Abcam, Ab27526). Immunoreactive bands were detected using immobilon ECL kit (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) on a LAS-3000 imager (Fujifilm France, BOIS D'ARCY, France).

Plasmid constructs and luciferase measurements

Sequence from the wild-type 3'-UTR of *ARHGAP1*, *ARHGDIB*, *RRAS*, and *NOTCH1* was synthesized (gBlocks[®] Gene Fragments, Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) and cloned into psiCheck2 vector (Promega, Madison, WI, USA). HEK293T cells were seeded on 96-well plate at 2.10⁴ cell per well. The next day, psiCheck2 constructions (200 ng) were cotransfected with synthetic microRNA mimics (33 nM) (Ambion, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) into HEK293T cells, and luciferase activity was measured at 48 h post-transfection using the dual reporter luciferase assay kit (Promega), according to the manufacturer's protocol.

Cell cycle analysis

Fluorescence ubiquitin cell cycle indicator (FUCCI)-expressing A549 cell lines were generated and used as previously described [40]. 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 [41]. Replication-defective, self-inactivating retroviral constructs were used to establish a stable A549 FUCCI-2A cell line. The pPRIPu CrUCCI plasmid was obtained from C. Feillet and F. Delaunay. Nonmarked: Early G1, Kusabira-Orange 2 (mKO2) only: G1, mKO2 + Azami-Green 1 (mAG1): Early S, mAG1 only: S/G2/M. mKO2 and mAG1 were excited with 561 nm and 488 nm laser lines, respectively. Fluorescence was collected at 585 nm (585/15 band-pass) for mKO2 and at 530 nm (530/30 band-pass) for Geminin. FUCCI-A549 cells were transfected 24 h after seeding with either miR-Neg, canonical miR-34/449, 5'-isomiR-34b, or 5'-isomiR-449c at 10 nm using Lipofectamine RNAi Max Reagent (Invitrogen) in OPTIMEM (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Cellular fluorescence was then assessed 72 h after transfection by microscopy (LSM 780, Zeiss). Using IMAGEJ software, fluorescent cells were counted positive for one color (corresponding to cell cycle phases) if the fluorescence reached a defined threshold.

Results and Discussion

Identification of 5'-isomiRs of miR-34b and miR-449c

The miR-34/449 family is highly expressed in airway multiciliated cells where it controls multiciliogenesis through regulations of several pathways [15,17–19,42]. We examined the sequences of each miR-34/449

member in small RNA sequencing experiments derived from undifferentiated and fully differentiated HAECs (Fig. 1A). Corresponding GEO references are provided in the Material and Methods section. We detected 5' and 3' variants in both 5p and 3p arms of miR-34/449sequences. As 3' variants encompassed heterogeneous sequences and that mature miR-34/449 of the 5p arm have been functionally established as evolutionary conserved multiciliogenesis regulators [15,17,18], in the present study we focused on 5' variants of the 5p strand of miR-34/449. Thus, we identified two distinct 5' variants in miR-34b and miR-449c sequences (Fig. 1A-C). The most abundant variants account for 92% and 75% of the reads for miR-34b and miR-449c, respectively (Fig. 1A-C). These variants display a seed region that perfectly aligns with the rest of miR-34/449 family (Fig. 1A). The least abundant variants account for 8% and 25% of the reads for miR-34b and miR-449c, respectively (Fig. 1A-C). They exhibit an extra uridine at their 5'-end, which adds one base to their seed region compared to the rest of the family (Fig. 1A). We suspected that such a shift in the seed region could alter the target recognition and the biological properties of these two miRNAs. Intriguingly, miRBase defined the two sequences that contain an additional uridine in the 5'-end as the mature forms of miR-34b and miR-449c. Based on these observations, we reassigned the least abundant forms as 5'-isomiR variants. In the remaining of the present manuscript, we define them as 5'-isomiR-34b and 5'-isomiR-449c. At the same time, the best aligned miRNAs, previously considered as isomiRs by miRBase, should be considered as bona fide canonical miRNA sequences. In line with this statement, we first explored the sequence of these miRNAs in other species. This revealed that the 5'-supplemental base was unique to human for miR-449c. A different situation stands for miR-34b, for which the 5'-supplemental base was also reported in several other species including Mus musculus, Xenopus tropicalis, Danio rerio, and Gallus gallus.

We then reasoned that an incorrect definition of isomiRs observed for the miR-34/449 family may also happen in other miRNA families. We thus reanalyzed small RNA sequencing experiments from 10 other human tissues, where we assessed the relative expression of miRNAs and isomiRs (Study SRP006043). By setting a detection threshold of 20 counts per million, we identified 80 miRNA sequences differing by an alternative 5' shift form in at least 50% of their reads (Table S1).

We excluded that this difference could come from a bias introduced during molecular cloning by designing and synthesizing four 5'-phosphate miRNAs,



Fig. 1. Identification of isomiRs of hsa-miR-34b-5p and hsa-miR-449c-5p. (A) Sequences from every mature variant of the miR-34/449 family are illustrated. Bold letters correspond to the seed region (nucleotide 2–8). The sequences with the canonical seed region are in red. For hsa-miR-34b and hsa-miR-449c, the miRBase reference sequences with the one-base shift seed region (variants 2) are in blue, whereas the variants 1 with the canonical seed region are in red. Small RNA sequencing experiments were performed from primary undifferentiated and fully differentiated HAECs. The counts per million (CPM) for each miR-34/449 sequence obtained in each condition are indicated. Data are representative of three donors (GSE90764). (B) Histogram representing the percent of reads obtained by small RNA deep sequencing for both mature sequence variants of miR-34b and miR-449. (C) The graph displays the percentage of reads showing a perfect match with the reference miRNA sequences from miRBase, relative to the total number of reads. All miRNAs generating at least 30 counts in undifferentiated and fully differentiated HAEC small RNA libraries are shown (three replicates per condition, $R^2 = 0.98$). (D) 5'-phosphate miRNAs, corresponding to the miRBase reference for hsa-miR-34b-5p and hsa-miR-449c-5p and their major variants were sequenced alone in a complex mixture of RNA (GSE77249). The histogram shows the percentage of reads observed for each unique miRNA sequence or for an approximate mix 1 : 1 between canonical miR and isomiR.

corresponding to miR-34b and 5'-isomiR-34b, miR-449c, and 5'-isomiR-449c. Different proportions of these four miRNAs were exogenously added to a complex mixture of RNA, which was then sequenced. All sequences were appropriately identified in every tested condition (Fig. 1D). When the two different variant sequences of the same miRNA were mixed with a 1 : 1 ratio, they were roughly sequenced at the same proportion. We concluded from this test that our initial observations were not due to a preferential cloning.

A variable Drosha/Dicer cleavage has also been reported for some isomiRs [29], and this alteration depends on the different cell types and physiological conditions [21]. We observed similar ratios between a

large number of canonical miRNAs and isomiRs in independent samples, corresponding either to undifferentiated or fully differentiated HAECs (Fig. 1C). This suggests that the state of cellular differentiation has no detectable impact on the production of miR-34/449 isomiRs. Incidentally, the lower abundance of isomiRs compared to canonical miRNA sequences is likely not the result of a weaker stability of variants sequences, as 5'-isomiR-34b and 5'-isomiR-449c sequences start with one uridine, usually associated with more stable sequences [43].

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

The robust expression of miR-34/449 in airway multiciliated epithelial cells (up to 15% of total miRNA counts) [15,17,19] suggests that their 5'-isomiR variants, that account for up to 8% of total miR-34/449 sequences (Fig. 1A), may still alter gene expression. As 5'-isomiRs may target very different sets of transcripts, they can confer additional mRNA regulatory properties [44–46]. We thus examined the impact of the onebase shift in the seed region of 5'-isomiR-34b and 5'isomiR-449c on gene expression. Primary HAECs were transfected with each miRNA member of the miR-34/ 449 family, including 5'-isomiR-34b and 5'-isomiR-449c, and the resulting gene expression profiles were analyzed using RNA sequencing and in silico approaches. Figure 2A shows that 5'-isomiR-34b and 5'-isomiR-449c induced distinct effects on global transcriptome compared with their canonical counterparts and the rest of the canonical members of the family (miR-34a, miR-34c, miR-449a, and miR-449b). Canonical miR-34b and miR-449c were clustered together with the rest of the canonical members of the family. They shared a higher number of predicted targets that were repressed compared to their isomiR counterparts (Fig. 2A,B, Table S2). Among the 306 and 222 predicted target genes and down-regulated by canonical miR-34b and miR-449c, respectively, 156 were inhibited by both miR-34b and miR-449c. Figure 2B also shows that canonical miR-34b and miR-449c which share the same seed region may regulate several different targets. This suggests that the target definition is not entirely based on the seed region, and may also involve sequence outside of the seed region. Among 306 and 188 predicted target genes down-regulated by miR-34b and 5'-isomiR-34b, respectively, 59 were inhibited by both miR-34b and 5'-isomiR-34b. Among 222 and 110 predicted target genes down-regulated by miR-449c and 5'-isomiR-449c, respectively, 34 were inhibited by both miR-449c and 5'-isomiR-449c (Fig. 2B). The number of predicted targets that were repressed after isomiR overexpression was reduced by almost half relative to their canonical counterparts. This result illustrates the impact of a one-base shift in the seed region, and points out to the fact that isomiR variants and canonical miRNAs do not necessarily regulate the same targets.

As currently available target prediction tools probably underestimate the impact of isomiRs upon target gene regulation, we also used Sylamer [38] to computationally identify overrepresented sequences in the 3'-UTRs of down-regulated mRNAs. Figure 2C shows that canonical miR-34b or miR-449c overexpression resulted in detection of enrichments only for the canonical seed matches (2-7, 'GGCAGU'), though they also induced a down-regulation of some 5'-isomiR-34b predicted targets (Fig. 2B) that were not detected using the Sylamer algorithm. Conversely, 5'isomiR-34b overexpression enriched detection for both isomiR seed matches (2-7, 'AGGCAG' corresponding to 3-8 for the canonical seed), and for the canonical seed matches (2-7, 'GGCAGU') but to a lesser extent. Unexpectedly, we failed to detect any enrichment for canonical or isomiR seed matches in response to 5'isomiR-449c overexpression (Fig. 2C). The lower number of target transcripts down-regulated in response to this isomiR precluded their detection using Sylamer. Altogether, these results indicate that 5'-isomiRs do interact with their 'AGGCAG' seed region, and also to some extent with the canonical seed region 'GGCAGU'.

Mature miRNAs and isomiRs target distinct transcripts

Next, we explored the inhibitory effects of canonical miR-34/449 and their isomiR variants on several miR-34/449 targets, including ARHGAP1, ARHGDIB, R-Ras, and Notch1, which we previously described to be involved in MCC differentiation [15,19,47]. After examining their expression level in several RNA sequencing datasets (Fig 2), these targets were validated using quantitative RT-PCR, western blot, and luciferase reporter assay in primary HAEC cultures, A549 cells, and/or HEK293 cells (Figs 3-4). Figure 3 shows that canonical miR-34b and miR-449c induced similar effects on these miR-34/449 targets compared to other canonical miR-34/449 members. On the opposite, 5'-isomiR-34b and 5'-isomiR-449c, i.e. the sequences referenced in miRBase, exhibited much weaker effects on targets related to small GTPase pathway (ARHGAP1, ARHGDIB, and R-Ras)



Fig. 2. Overexpression of canonical miRNAs or isomiRs induces distinct gene expression patterns. (A) Heatmap of gene expression of the 1196 down-regulated genes ($\log_2 FC \le -0.9$ and $\log_2 CPM > 3$) between proliferating HAECs overexpressing each of the eight canonical miRs or isomiRs of the miR-34/449 family compared to a control miRNA (miR-Neg). Pearson's correlation distance was used both for genes and samples, and pairwise average-linkage was used as clustering method. (B) Predicted target genes either for canonical miR-34b, miR-449c, 5'-isomiR-34b, or 5'-isomiR-449c were selected (see Materials and Methods). Venn diagrams show the number of predicted gene targets for each canonical miRNA or isomiR that were down-regulated ($\log_2 FC \le -0.9$ and $\log_2 CPM > 3$) following 48-h overexpression of canonical miR-34b (blue circle), miR-449c (magenta circle) versus 5'-isomiR-34b (red circle) or 5'-isomiR-449c (red circle), as indicated upon each circle. The intersection of two circles indicates the number of predicted targets commonly down-regulated in both conditions as indicated. (C) Individual miRNA mimics for miR-34b, miR-449c, 5'-isomiR-34b, or 5'-isomiR-449c were transfected (10 nm, 72 h) in proliferating HAECs to examine target recognition induced by either canonical miRs or isomiR variants using RNA sequencing data (GSE77251) analyzed with Sylamer [38]. The graphs illustrate the enrichment landscape plots for the presence of seed complementary hexamers in the 3'-UTRs of down- or up-regulated transcripts following transfection of individual miR mimics as indicated. Canonical miR-34b or miR-449c sites are represented with the lines and 5'-isomiR-34b or 5'-isomiR-449c sites are represented with blue lines. Gray lines served as negative controls in addition to all random 7-mers. The *x*-axis represents the ranked gene lists ordered by increasing fold change.



Fig. 3. Specific targeting for canonical miRNAs and isomiRs. (A–C) Proliferating HAECs were transfected for 48 h with either canonical miR-34/449, 5'-isomiR-34/449, 5'-isomiR-34/449, 5'-isomiR-34/449, 5'-isomiR-34/449, or negative control miR-Neg, as indicated on the figure. The effect of canonical miR-34/449 or 5'-isomiR-34/449 overexpression on transcript (A) or protein (B, C) expression levels of ARHGAP1, ARHGDIB, Notch1, and R-Ras, using real-time RT-PCR and western blot, were compared to miR-Neg. Transcript expression levels were normalized using *ubiquitin C* gene (*UBC*). Blots are representative of 3–6 independent experiments. (C) The histogram illustrates the quantification of protein level of ARHGAP1, ARHGDIB, Notch1, and R-Ras in response to canonical miR-34/449, 5'-isomiR-34b, and 5'-isomiR-449c as normalized fold changes compared to miR-Neg. Protein expression levels were normalized with an antibody against HSP60 as a loading control. Data are means \pm SD from three to six donors (***, *P* < 0.001; **, *P* < 0.05, ns, not significant, Student's *t*-test).

(Figs 3-4). 5'-isomiRs had no significant effect on ARHGDIB, while a lesser robust inhibitory effect was noticed on ARHGAP1 and RRAS compared to their canonical counterparts. Both 5'-isomiR-34b and 5'-isomiR-449c induced similar inhibitory effects either on RRAS transcript level, RRAS protein level, or 3'-UTR-RRAS luciferase activity reporter assay (Figs 3-4). Conversely, canonical miR-34/449 induced twofold higher inhibitory effects on RRAS protein level and luciferase reporter assay than on RRAS transcript level. These results may suggest that canonical miR-34/449 exert an inhibitory effect on RRAS protein expression without systematically inducing mRNA degradation. By analyzing the RRAS 3'-UTR using the miRNA target prediction tool 'microCible', we observed that it contains three sites for canonical miR-

34/449 plus another site that is shared by both canonical miR-34/449 and isomiR-34/449. These results may suggest that the site shared by both canonical miR-34/449 and 5'-isomiR-34/449 might be mainly involved in mRNA degradation, whereas the three other canonical sites might rather be involved in translation inhibition. We also observed a weaker effect of canonical miR-449c compared to canonical miR-34b on RRAS transcript level. In addition, as shown in Fig. 3A, we observed a significant difference between canonical miR-449c and 5'-isomiR-449c on their inhibitory effects on RRAS transcript level. Conversely, no significant difference was observed between canonical miR-34b and 5'-isomiR-34b on RRAS transcript level. These observations suggest again that some differences between sequences of canonical miR-34b and miR-449c outside the seed



Fig. 4. Specific interaction between either 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 SD from five 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 SD from three independent experiments; ***, *P* < 0.001; **, *P* < 0.05, ns, not significant, Student's *t*-test.

region (see Fig. 1A) may lead to some different properties of inhibition and targeting. The same observation may also apply for 5'-isomiR-34b and 5'-isomiR-449c.

On the contrary, 5'-isomiR-34b and 5'-isomiR-449c exerted similar inhibitory effects on the Notch pathway receptor Notch1 than their canonical counterparts (Figs 3-4). A dose-response relationship using luciferase reporter assay also indicated that Notch1 was similarly repressed by either canonical miR-34b or 5'isomiR-34b at any tested concentrations (Fig. 4B). These results indicate that 5'-isomiR-34/449 were less efficient than miR-34/449 to silence the expression of several well-validated targets. Nevertheless, we found that Notch1, a key target that must be repressed by canonical miR-34/449 to trigger multiciliogenesis [15], was one of the targets to be still repressed by isomiR -34/449. That is in line with models proposing that isomiRs may act cooperatively with their canonical miR-NAs to target the same mRNAs or common signaling pathways to control the same biological functions [30].

Several studies already indicated a putative association between isomiRs and Argonautes (AGO) protein complexes [30,48,49]. As overexpression of 5'-isomiR-34/449 induced significant effects on many targets including Notch1, isomiRs are clearly loaded in AGO protein complexes. The similar dose–response relationships observed for miRs and isomiRs on Notch1 repression suggest an equivalent loading into the RNA-induced silencing complex (RISC).

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

The precise determination of the roles played by isomiRs is hampered by the limited tools available for modulating specifically the levels of isomiRs at a onenucleotide accuracy and measuring their effects [29], together with the overlapping and redundant nature of most miRNAs [50]. Importantly, we have previously shown that miR-34/449 control multiciliogenesis by repressing cell cycle and Notch pathway [15]. They also control actin network reorganization and focal adhesion formation in airway epithelial cells by repressing small GTPase components such as R-Ras,



Fig. 5. Functional differences between canonical miR-34/449 and 5'-isomiR-34/449. (A) The bargraph 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 three independent experiments. (B) The histogram represents the quantification of focal adhesion foci per cell in response to overexpression of miR-Neg in gray 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 SD from three to six 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 72 h with either control miRNA (miR-Neg), canonical miR-34b, canonical miR-449c, 5'-isomiR-34b, or 5'-isomiR-34b, or 5'-isomiR-34bc.

ARHGAP1, or ARHGDIB [47]. We therefore wondered whether the weaker abundance in 5'-isomiRs relative to their canonical counterparts may contribute to the overall biological effects by affecting additional targets associated with a common pathway, such as the cell cycle or the Notch pathway. miR-34/449 expression was increased by 1000 times during multiciliogenesis, representing up to 15% of the total of expressed miRNAs [15]. Besides, 5'-isomiR-34b and 5'isomiR-449c represent up to 8% of the total of miR-34/449 sequences in fully differentiated HAECs (Fig. 1C). This huge level of expression implies that the small proportion of 5'-isomiR-34/449 present in the cells may already be sufficient to exert some biological functions. Hence, we examined whether 5'-isomiRs may share similar biological effects with canonical miR-34/449. However, the strong sequence homology between canonical and isomiRs of miR-34/ 449 miRNAs impeded to experimentally test whether 5'-isomiR-34/449 may also functionally control multiciliogenesis by directly repressing Notch pathway. We therefore focused our attention on two other relevant pathways, namely cell cycle and focal adhesion formation. To address this issue, 5'-isomiRs and canonical miR-34/449 were overexpressed in proliferating FUCCI-A549, a human lung epithelial cell line (see Materials and Methods), on which we measured the effects on cell cycle (Fig. 5A) and on focal adhesion formation (Fig. 5B,C). Canonical and isomiR sequences of miR-34/449 strongly reduced the number of cycling cells (Fig. 5A), indicating that they exert similar effects on cell cycle arrest. A different situation was observed for the formation of focal adhesion, which was observed with all canonical sequences of miR-34/449, as previously shown [19] (Fig. 5), but not with 5'-isomiR-34b and 5'-isomiR-449c. These results are consistent with previous observations indicating that the small GTPase components RRAS, ARHG-DIB, and ARHGAP1, previously described to control actin network reorganization [19], were not or weakly repressed by isomiRs. The absence or decrease of inhibitory effects of isomiRs on small GTPase targets may thus 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.

More generally, the overlapping targeting of targets and the high correlation between isomiRs and their canonical miRNAs may emphasize the impact of a given miRNA family on specific biological phenotypes. 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 [15,51]. In this context, 5'-isomiR-34/449 could act as additional mechanisms to strengthen miRNA-induced silencing effect on important target genes.

In conclusion, our work reports an incorrect annotation in miRBase for several miRNA sequences, such as hsa-miR-449c-5p and hsa-miR-34b-5p, which actually correspond to isomiR variants with distinct functional effects. As most of commercial miR mimics currently used for functional studies are primarily based on information provided in miRBase, our study highlights the importance of careful examination of genuine mature canonical miRNA sequences. These differing sequences may profoundly affect the interpretation of many results currently available in the literature. Through the specific example of miR-34/449 family, our study also suggests that isomiRs variants can share biological function and/or have distinct roles from their canonical homologs. Finally, our findings highlight how isomiRs may bring additional mechanisms by which miRNA machinery may exert a finetune regulation of a complex biological function.

Acknowledgements

This work was supported by CNRS, Inserm, the French Government (Agence Nationale de Recherche, 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 (Asthmatreat, ANR-12-BSV1-0023-02), Vaincre la Mucoviscidose, FRM (DEQ20130 326464), and Ligue contre le cancer. Data from this work are the object of a CNRS patent PCT/FR2010/000539. Sequencing was performed by UCA GenomiX Platform of the University Côte d'Azur.

Author's contributions

OM performed and analyzed experiments and contributed to draft manuscript. AP, AP and KL performed bioinformatics analyses which were managed by KL. RNA sequencing experiments were carried out by VM, NP, and L-EZ. AC and BC contributed to qPCR, western blotting and luciferase assay experiments. PB and JZ generated FUCCI-A549 cells. GP participated to cell cycle experiments. BM designed, planned, and analyzed experiments. BM and PB coordinated and supervised the project, and obtained funding. BM and PB analyzed and interpreted data and wrote the paper. All authors commented on the manuscript.

References

- 1 Yates LA, Norbury CJ and Gilbert RJ (2013) The long and short of microRNA. *Cell* **153**, 516–519.
- 2 Kim VN, Han J and Siomi MC (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 126– 139.
- 3 Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75**, 843–854.
- 4 Mattes J, Yang M and Foster PS (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**, 8–12.
- 5 Giovannini-Chami L, Grandvaux N, Zaragosi LE, Robbe-Sermesant K, Marcet B, Cardinaud B, Coraux C, Berthiaume Y, Waldmann R, Mari B *et al.* (2011) Impact of microRNA in normal and pathological respiratory epithelia. *Methods Mol Biol* 741, 171–191.
- 6 Ebrahimi A and Sadroddiny E (2015) MicroRNAs in lung diseases: recent findings and their

pathophysiological implications. *Pulm Pharmacol Ther* **34**, 55–63.

- 7 Brennecke J, Stark A, Russell RB and Cohen SM (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* **3**, e85.
- 8 Agarwal V, Bell GW, Nam JW and Bartel DP (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* 4, e05005.
- 9 Kozomara A and Griffiths-Jones S (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 42, D68–D73.
- 10 Janga SC and Vallabhaneni S (2011) MicroRNAs as post-transcriptional machines and their interplay with cellular networks. *Adv Exp Med Biol* **722**, 59–74.
- 11 Peters J and Robson JE (2008) Imprinted noncoding RNAs. *Mamm Genome* **19**, 493–502.
- 12 Schmitt MJ, Margue C, Behrmann I and Kreis S (2013) MiRNA-29: a microRNA family with tumorsuppressing and immune-modulating properties. *Curr Mol Med* 13, 572–585.
- 13 Wong KY, Yu L and Chim CS (2011) DNA methylation of tumor suppressor miRNA genes: a lesson from the miR-34 family. *Epigenomics* 3, 83–92.
- 14 Bao J, Li D, Wang L, Wu J, Hu Y, Wang Z, Chen Y, Cao X, Jiang C, Yan W *et al.* (2012) MicroRNA-449 and microRNA-34b/c function redundantly in murine testes by targeting E2F transcription factorretinoblastoma protein (E2F-pRb) pathway. *J Biol Chem* 287, 21686–21698.
- 15 Marcet B, Chevalier B, Luxardi G, Coraux C, Zaragosi LE, 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**, 693–699.
- 16 Concepcion CP, Han YC, Mu P, Bonetti C, Yao E, D'Andrea A, Vidigal JA, Maughan WP, Ogrodowski P and Ventura A (2012) Intact p53-dependent responses in miR-34-deficient mice. *PLoS Genet* 8, e1002797.
- 17 Song R, Walentek P, Sponer N, Klimke A, Lee JS, 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.
- 18 Wu J, Bao J, Kim M, Yuan S, Tang C, Zheng H, Mastick GS, Xu C and Yan W (2014) 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.
- 19 Chevalier B, Adamiok A, Mercey O, Revinski DR, Zaragosi LE, Pasini A, Kodjabachian L, Barbry P and Marcet B (2015) miR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways. *Nat Commun* 6, 8386.
- 20 Choi YJ, Lin CP, Ho JJ, He X, Okada N, Bu P, Zhong Y, Kim SY, Bennett MJ, Chen C *et al.* (2011) miR-34

miRNAs provide a barrier for somatic cell reprogramming. *Nat Cell Biol* **13**, 1353–1360.

- 21 Ha M and Kim VN (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 509–524.
- 22 Pantano L, Estivill X and Marti E (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**, e34.
- 23 Lee LW, Zhang S, Etheridge A, Ma L, Martin D, Galas D and Wang K (2010) Complexity of the microRNA repertoire revealed by next-generation sequencing. *RNA* 16, 2170–2180.
- 24 Llorens F, Hummel M, Pantano L, Pastor X, Vivancos A, Castillo E, Mattlin H, Ferrer A, Ingham M, Noguera M et al. (2013) Microarray and deep sequencing cross-platform analysis of the mirRNome and isomiR variation in response to epidermal growth factor. BMC Genom 14, 371.
- 25 Guo L, Li H, Liang T, Lu J, Yang Q, Ge Q and Lu Z (2012) Consistent isomiR expression patterns and 3' addition events in miRNA gene clusters and families implicate functional and evolutionary relationships. *Mol Biol Rep* **39**, 6699–6706.
- 26 Guo L, Zhang H, Zhao Y, Yang S and Chen F (2014) Selected isomiR expression profiles via arm switching? *Gene* 533, 149–155.
- 27 Guo L, Zhao Y, Yang S, Zhang H and Chen F (2014) A genome-wide screen for non-template nucleotides and isomiR repertoires in miRNAs indicates dynamic and versatile microRNAome. *Mol Biol Rep* 41, 6649–6658.
- 28 Tan GC, Chan E, Molnar A, Sarkar R, Alexieva D, Isa IM, Robinson S, Zhang S, Ellis P, Langford CF *et al.* (2014) 5' isomiR variation is of functional and evolutionary importance. *Nucleic Acids Res* 42, 9424– 9435.
- 29 Neilsen CT, Goodall GJ and Bracken CP (2012) IsomiRs-the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. *Trends Genet* 28, 544–549.
- 30 Cloonan N, Wani S, Xu Q, Gu J, Lea K, Heater S, Barbacioru C, Steptoe AL, Martin HC, Nourbakhsh E *et al.* (2011) MicroRNAs and their isomiRs function cooperatively to target common biological pathways. *Genome Biol* 12, R126.
- 31 Reese TA, Xia J, Johnson LS, Zhou X, Zhang W and Virgin HW (2010) Identification of novel microRNAlike molecules generated from herpesvirus and host tRNA transcripts. *J Virol* 84, 10344–10353.
- 32 Sdassi N, Silveri L, Laubier J, Tilly G, Costa J, Layani S, Vilotte JL and Le Provost F (2009) Identification and characterization of new miRNAs cloned from normal mouse mammary gland. *BMC Genom* 10, 149.
- 33 Ruby JG, Jan C, Player C, Axtell MJ, Lee W, Nusbaum C, Ge H and Bartel DP (2006) Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional

microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans. Cell* **127**, 1193–1207.

- 34 Ruby JG, Stark A, Johnston WK, Kellis M, Bartel DP and Lai EC (2007) Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of Drosophila microRNAs. *Genome Res* 17, 1850–1864.
- 35 Ebhardt HA, Tsang HH, Dai DC, Liu Y, Bostan B and Fahlman RP (2009) Meta-analysis of small RNAsequencing errors reveals ubiquitous posttranscriptional RNA modifications. *Nucleic Acids Res* 37, 2461–2470.
- 36 Le Brigand K and Barbry P (2007) Mediante: a webbased microarray data manager. *Bioinformatics* 23, 1304–1306.
- 37 Robinson MD, McCarthy DJ and Smyth GK (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140.
- 38 van Dongen S, Abreu-Goodger C and Enright AJ (2008) Detecting microRNA binding and siRNA offtarget effects from expression data. *Nat Methods* 5, 1023–1025.
- 39 Pottier N, Maurin T, Chevalier B, Puissegur MP, Lebrigand K, Robbe-Sermesant K, Bertero T, Lino Cardenas CL, Courcot E and Rios G (2009) Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts: implication in epithelial-mesenchymal interactions. *PLoS One* 4, e6718.
- 40 Lassalle S, Zangari J, Popa A, Ilie M., Hofman V, Long E, Patey M, Tissier F, Belleannee G, Trouette H *et al.* (2016) MicroRNA-375/SEC23A as biomarkers of the in vitro efficacy of vandetanib. *Oncotarget* 7, 30461–30478.
- 41 Zielke N and Edgar BA (2015) FUCCI sensors: powerful new tools for analysis of cell proliferation. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **4**, 469–487.
- 42 Walentek P, Quigley IK, Sun DI, Sajjan UK, Kintner C and Harland RM (2016) Ciliary transcription factors and miRNAs precisely regulate Cp110 levels required for ciliary adhesions and ciliogenesis. *Elife* 5, e17557.
- 43 Guo Y, Liu J, Elfenbein SJ, Ma Y, Zhong M, Qiu C, Ding Y and Lu J (2015) Characterization of the mammalian miRNA turnover landscape. *Nucleic Acids Res* 43, 2326–2341.
- 44 Fukunaga R, Han BW, Hung JH, Xu J, Weng Z and Zamore PD (2012) Dicer partner proteins tune the

length of mature miRNAs in flies and mammals. *Cell* **151**, 533–546.

- 45 Humphreys DT, Hynes CJ, Patel HR, Wei GH, Cannon L, Fatkin D, Suter CM, Clancy JL and Preiss T (2012) Complexity of murine cardiomyocyte miRNA biogenesis, sequence variant expression and function. *PLoS One* 7, e30933.
- 46 Manzano M, Forte E, Raja AN, Schipma MJ and Gottwein E (2015) Divergent target recognition by coexpressed 5'-isomiRs of miR-142-3p and selective viral mimicry. *RNA* 21, 1606–1620.
- 47 Mercey O, Kodjabachian L, Barbry P and Marcet B (2016) MicroRNAs as key regulators of GTPasemediated apical actin reorganization in multiciliated epithelia. *Small GTPases* 7, 54–58.
- 48 Llorens F, Banez-Coronel M, Pantano L, del Rio JA, Ferrer I, Estivill X and Marti E (2013) A highly expressed miR-101 isomiR is a functional silencing small RNA. *BMC Genom* 14, 104.
- 49 Azuma-Mukai A, Oguri H, Mituyama T, Qian ZR, Asai K, Siomi H and Siomi MC (2008) Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 7964–7969.
- 50 Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Abbott AL, Lau NC, Hellman AB, McGonagle SM, Bartel DP, Ambros VR and Horvitz HR (2007) Most *Caenorhabditis elegans* microRNAs are individually not essential for development or viability. *PLoS Genet* 3, e215.
- 51 Marcet B, Chevalier B, Coraux C, Kodjabachian L and Barbry P (2011) MicroRNA-based silencing of Delta/ Notch signaling promotes multiple cilia formation. *Cell Cycle* 10, 2858–2864.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

Table S1. miRNA expression and sequence distribu-tion in ten tissues (Study SRP006043).

Table S2. First sheet: Gene expression profiling obtained in RNA sequencing after 72-h overexpression of individual miR mimics (negative control miR-Neg, canonical miR-34a/b/c or miR-449a/b/c, 5'-isomiR-34b or 5'-isomiR-34bc) in proliferating primary HAECs (GSE77251) and analyzed using the EDGER package V 3.14.0 (see Materials and Methods).

Chapitre 2 : Caractérisation des gènes du locus des miR-34b/c *C11orf88, LAYN* et *BTG4* pendant la régénération *in vitro* de l'épithélium des voies respiratoires

Article : Characterization of the miR-34b/c locus genes C11orf88, BTG4 and LAYN during airway epithelium regeneration. (En préparation)

<u>Amélie Cavard</u>¹, Sophie Abélanet¹, Magali Plaisant¹, Sandra Ruiz-Garcia¹, Marie Deprez¹, Olivier Mercey², Kévin Lebrigand¹, Gilles Ponzio¹, <u>Pascal Barbry</u>^{1†}, <u>Laure-Emmanuelle</u> <u>Zaragosi¹</u>, [†], <u>Brice Marcet</u>^{1, †}

¹Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, Sophia-Antipolis, France. ² Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure, Paris, France.

Le but de cette étude a été de caractériser le rôle des gènes *C11orf88*, *LAYN* et *BTG4*, situés sur le locus 11q23 où sont présents les miR-34b/c, dans la multiciliogenèse.

Nous avons vu dans l'introduction que les miR-34b/c et les miR-449 impliqués dans la multiciliogenèse étaient localisés sur 2 loci génomiques différents (page 86). Les miR-449a/b/c sont localisés dans le deuxième intron de *CDC20B* sur le locus 5q11. Ce dernier est impliqué dans le désengagement des centrioles formés au sein des deutérosomes (page 95) [197]. A ses côtés, se trouve *MCIDAS* qui joue également un rôle dans la multiciliogenèse, en activant l'expression de *FOXJ1, CCNO* et *DEUP1* ainsi que lui-même en coopération avec GemC1 et E2F4/5 (page 90) [242]. Le locus 5q11 contient finalement *CCNO* (page 98) dont l'expression est nécessaire à la formation des deutérosomes et l'amplification des centrioles par cette voie (page 54) [445]. Il est intéressant de noter que *MCIDAS, CCNO* et *CDC20B* sont activés en même temps comme une boucle d'auto-activation du locus par lui-même. De plus, il est intriguant que plusieurs gènes localisés sur un même locus partage un rôle dans un même processus qu'est la multiciliogenèse, ce qui nous a conduits à définir le locus 5q11 comme un locus multiciliaire [197]. Par analogie, nous nous sommes demandé si la même situation existe pour le locus des miR-34b/c (11q23) où se localisent trois gènes proximaux : *C110rf88, LAYN* et *BTG4*.

C11orf88 n'a pas été décrit dans la littérature. En revanche, LAYN a été décrit comme un récepteur à l'acide hyaluronique localisé en apical dans l'épithélium des voies respiratoires. Il signaliserait à travers la voie ROCK/Rho pour inhiber l'expression transcriptionnelle et protéique de la E-cadherine [541]. Ce gène serait également un effecteur en aval de TP53, ce dernier permettant la différenciation des cellules sécrétrices en cellules multiciliées [409]. BTG4 a été décrit comme un régulateur négatif du cycle cellulaire [542], et son expression a été détectée dans le pharynx, la trachée, l'oviducte et les testicules, à savoir des tissus présentant des cellules multiciliées, et pas dans d'autres tissus [543]. *BTG4* partagerait également un promoteur bidirectionnel avec miR-34b/c, qui est directement activé par TP53 [404]. Afin de déterminer si le locus 11q23 pouvait jouer un rôle dans la multiciliogenèse, j'ai étudié l'expression transcriptomique et protéique de ces trois gènes dans un modèle de régénération de l'épithélium humain (HAEC) et murin (mTEC) des voies respiratoires.

Characterization of the miR34b/c locus genes *C11orf88, BTG4* and *LAYN* during airway epithelium regeneration

Amélie Cavard¹, Sophie Abelanet¹, Magali Plaisant¹, Sandra Ruiz Garcia¹, Marie Deprez¹, Olivier Mercey², Kévin Lebrigand¹, Gilles Ponzio¹, Pascal Barbry¹⁺, Laure-Emmanuelle Zaragosi^{1,+}, Brice Marcet^{1,+}

¹Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, Sophia-Antipolis, France. ² Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure, Paris, France.

⁺ Correspondence should be addressed to : <u>marcet@ipmc.cnrs.fr</u> ; <u>zaragosi@ipmc.cnrs.fr</u> ; <u>barbry@ipmc.cnrs.fr</u>

IPMC-CNRS, UMR-7275, 660 Route des Lucioles, 06560 Sophia-Antipolis, Valbonne, France. Phone : 00-33-(0)4-93-95-77-90 Fax : 00-33-(0)4-93-95-77-94

Abstract

The airways are lined by a pseudostratified epithelium mainly constituted by basal cells, mucus-secreting cells and multiciliated cells which function together to remove particles and debris from the respiratory tract. Defects in cilia function have been associated with ciliopathies that affect many organs, including brain and airway epithelium. The transcriptome of multiciliatedcells has been extensively studied, but the function of many of the identified genes is unknown. Several multiciliogenesis players including microRNAs miR-449a/b/c, their host gene CDC20B, but also MCIDAS and CCNO are together located in the same short genomic region (5q11 in human). MicroRNAs miR-34b/c are miR-449 homologous genes that also control multiciliogenesis but located in a distinct genomic region (11q23). By analogy, we show that BTG4, C11orf88 and LAYN, three proximal genes of the miR-34b/c locus (11q23), represent putative additional players of multiciliogenesis. By using several experimental approaches including single-cell RNA-sequencing and high resolution microscopy imaging from primary culture models of human respiratory epithelial cells, mouse tracheal epithelial cells or mouse brain ependymal cells, we showed that these 3 candidates were expressed in multiciliated cells. More particularly, C11orf88 was hugely and exclusively expressed in both immature multiciliated cells called deuterosomal cells as well as in mature multiciated cells. C11orf88 was first detected in primary cilia in deuterosomal multiciliated cells before motile cilia appear. Then, C11orf88 was enriched at the tip of growing motile cilia but throughout of mature motile cilia. LAYN was absent in primary cilia in both models, but found expressed in the apical membrane in human airway multiciated cells whereas it was localized throughout motile cilia in murine tracheal epithelial cells. The silencing of LAYN using siRNA approach strongly impaired human airway multiciliated cell formation. Altogether, our data suggest that these 3 miR-34b/c locus genes are novel regulators of multiciliogenesis.

Introduction

Cilia are traditionally classified as motile or primary. Primary cilia are non-motile, solitary structures that are present in many cell types. They are involved in sensory functions as well as in developmental processes. Motile cilia are restricted to specific populations of welldifferentiated cells, including epithelial cells in the airway epithelium, efferent ducts and oviducts, as well as ependymal cells in the brain ventricles (Spassky & Meunier, 2017). Airway epithelium is a pseudostratified epithelium mainly composed of basal, goblet and multiciliated cells (MCCs), which harbor hundreds of motile cilia at their apical surface. Motile cilia beat in a coordinated manner to orchestrate fluid flow known as mucociliary clearance involved in the evacuation from airways of inhaled particles trapped in mucus (Meunier & Azimzadeh, 2016; Ruiz García et al, 2019). In chronic respiratory diseases, chronic infections and inflammations lead to destruction and remodeling of the epithelium, characterized by basal and/or goblet cell hyperplasia associated with a progressive loss of MCCs and a subsequent impair of mucociliary clearance (Coraux et al, 2005). The physiological importance of MCCs is highlighted by the ever growing number of human disorders associated with motile cilia defects (Bachmann-Gagescu, 2014). Abnormally viscous mucus and reduced ciliary motility result in mucociliary clearance disorders in several diseases such as cystic fibrosis and primary ciliary dyskinesia (Zhou-Suckow et al, 2017). Generating a suitable number of motile cilia or flagella is essential for proper function. Since the last decade, numerous studies have begun to unravel the complex mechanisms underlying the airway epithelium regeneration and the MCC differentiation (a process called multiciliogenesis), which is a prerequisite to develop new therapeutic strategies. The formation of MCCs requires the production of numerous motile cilia through a complex process called multiciliogenesis (Spassky & Meunier, 2017; Brooks & Wallingford, 2014). Each cilium sits atop a modified centriole, called a basal body (BB). After they exit from the cell cycle, maturing MCCs face the challenge of producing dozens to hundreds of centrioles in a limited time window. In vertebrate MCCs, bulk centriole biogenesis is mostly achieved through an acentriolar structure named the deuterosome, although canonical amplification from parental centrioles also occurs (Meunier & Azimzadeh, 2016; Spassky & Meunier, 2017; Brooks & Wallingford, 2014). In mammalian MCCs, the deuterosome was described as a spherical mass of fibers organized into an inner dense region and an outer, more delicate, corona (Anderson & Brenner, 1971). Once centriole multiplication is over, neosynthesized centrioles must disengage from deuterosomes and parental centrioles, convert into BBs and migrate apically to dock at the plasma membrane to initiate cilium elongation (Meunier & Azimzadeh, 2016; Spassky & Meunier, 2017; Brooks & Wallingford, 2014). The protein DEUP1 (Deuterosome Assembly Protein 1) governs deuterosome assembly to mediate large-scale de novo centriole biogenesis (Zhao *et al*, 2013). In a recent work, we have also demonstrated that CDC20B protein associates to deuterosomes, and is required for the production of centrioles and cilia in human, mouse and *Xenopus* MCCs through an interaction with PLK1, a kinase known to coordinate centriole disengagement with the protease Separase in mitotic cells (Revinski *et al*, 2018). Recently, using single-cell RNA sequencing approaches, we identified and characterized a discrete population of immature MCCs that we named 'deuterosomal' cells (Ruiz García *et al*, 2019). This subpopulation is clearly distinct from mature MCCs and expresses highly specific markers involved in deuterosome formation such as DEUP1, CDC20B, PLK4 or CCNO (Ruiz García *et al*, 2019).

In previous works we have also established miR-34/449 microRNAs (miRNAs), a class of small single-stranded and non-coding regulatory RNAs, as new key regulators of vertebrate multiciliogenesis (Marcet *et al*, 2011a, 2011b). Due to their high sequence homology, miR-34 and miR-449 members have been encompassed to the same miRNA family called miR-34/449. This miRNA superfamilly, largely conserved across vertebrates, is composed by miR-449a/b/c localized in the same locus (5q11 in human), miR-34b/c are localized at another locus (11q23 in human), whereas miR-34a is separately localized in a third locus (1p36 in human) (Marcet *et al*, 2011a, 2011b). MiR-34b/c and miR-449a/b/c are abundantly expressed in MCCs in which they control different steps of multiciliogenesis such as cell cycle arrest, inhibition of the Notch pathway, maturation and docking of basal bodies and reorganization of the apical actin network formation (Marcet *et al*, 2011a, 2011b; Chevalier *et al*, 2015; Mercey *et al*, 2015, 2016, 2017).

The miR-449a/b/c members are located in the second intron of the host gene *CDC20B* (*cell division cycle 20B*) on the same genomic locus (5q11 in human). Intriguingly, *MCIDAS* (multiciliate differentiation and DNA synthesis associated cell cycle protein also known as Multicilin) and *CCNO* (cyclin O) are two other proximal genes located in the *CDC20B/miR-449* genomic locus (5q11 in human) that have been demonstrated to be key actors of multiciliogenesis and deuterosome formation (Stubbs *et al*, 2012; Arbi *et al*, 2016; Funk *et al*,

2015). It is intriguing that the product of several genes in the same locus share a role in the same biological process, namely multiciliogenesis. Collectively, these observations led us to propose that the 5q11 locus act as a "multiciliary locus" where all the members play a key role in multiciliogenesis (Revinski *et al*, 2018).

The three proximal genes of the miR-34b/c locus are poorly described. *C11orf88*, of unknown function, has not yet been described in the literature. LAYN has been described as a receptor of hyaluronan (Murata *et al*, 2013; Altman *et al*, 2019), and to signal through Rho/ROCK to inhibit E-cadherin gene and protein expression in presence of particular hyaluronan generated by cigarette exposure (Forteza *et al*, 2012). Moreover, miR-34 family members are direct transcriptionnal targets of p53 (He *et al*, 2007), and *LAYN* has been showed as a downstream effector of p53 (Rovillain *et al*, 2011). *BTG4* is a negative regulator of the cell cycle (auer et al 2005) which has been detected in pharynx, trachea, oviduct, and testis (tissues that contain MCCs) in mice and its expression is reduced by aging (Mano *et al*, 2015). *BTG4* share a bidirectional promoter with miR-34b/c, which can be directly activated by p53 (Toyota *et al*, 2008).

By analogy to the *miR-449* locus, our present study aimed at determining whether the same situation exist for the *miR-34b/c* locus(11q23 in human). In human, *miR-34b/c* genes are surrounded by three proximal genes *C11orf88*, *LAYN* and *BTG4*. The role of these three genes in multiciliogenesis has not yet been described, therefore we propose to investigate their involvement during MCC differentiation.

Methods

Human samples

Inferior nasal turbinates were collected from patients with nasal obstruction (surgical intervention provided by Dr L. Castillo, Nice University Hospital, France) in Ca²⁺/Mg²⁺- free HBSS supplemented with 25 mM HEPES, 200 U/mL penicillin, 200 µg streptomycin, 50 µg/mL gentamicin sulfate, and 2,5 µg/mL amphotericin B (all reagent from Gibco). This procedure has been performed according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, after approval by the institutional review board "Comité de Protection des Personnes Sud Méditerranée V" (06/06/2015). All patients gave their written consent.

Culture of HAECs (Human Airway Epithelial Cells)

Nasal turbinates collected were washed few times with cold supplemented HBSS, and immersed in HBSS with 0.1% protease WIV from Streptomyces griseus (Sigma) overnight at 4°C for epithelial digestion. Gentle agitation allowed to collect detached cells in inactivation buffer (DMEM supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg streptomycin, 50 μg/mL gentamicin sulfate, and 2,5 μg/mL amphotericin B). After a centrifugation at 150g for 5min, cells were resuspended in supplemented DMEM, tritured through a 21G-needle, plated (~20 000 cells per cm²) on 75 cm²-flasks coated with rat-tail collagen I (Sigma) and incubated in a humidified atmosphere of 5% CO2 at 37°C. 24h after, the medium was replaced by Bronchial Epithelium Basal Medium (BEBM™, Lonza) supplemented with BEGM SingleQuot[™] Kit supplements (Lonza). After 4 to 5 days of culture, cells reached 70% confluence. They were detached using trypsin-EDTA 0,05% (Gibco) for 5 to 15 min, collected in inactivation buffer, centrifuged at 150g for 5 min and resuspended in BEGM medium supplemented with 5% FBS. Cells were seeded on human placenta collagen IV-coated Transwell[®] permeable supports (6,5 mm diameter; 0,4 µm pore size; Corning) in the apical part with a density of ~30 000 cells per transwell[®] and with medium in the basal part. Medium was replaced 24h after seeding by BEGM[™] medium without FBS, and once the cells have reached confluence (~5 days after seeding), the medium was removed from the apical side of the transwell[®] and the basal medium, replaced by Pneumacult-ALI™ (Stemcell Technologies) to create Air-liquid interface (ALI) cultures as previously described (Marcet et al., 2011; Revinski et al., 2018; Ruiz-Garcia et al., 2019). This day corresponded to the proliferating step at day 0 (ALIO). Culture medium was changed every two days until ALI6 and every 3-4 days after. We analyzed HAEC differentiation at different time points including ALI0, ALI7 that represents the the polarization step at day 7, the early multiciliogenesis step at day 14 (ALI14) and the late multiciliogenesis step at day 20 (ALI20).

Animals

All experiments were performed following the Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

mTECs (mouse Tracheal Epithelial Cells)

Each Trachea was dissected from 12 weeks-old mice (Charles River) and placed in cold DMEM:F12 medium (1:1) supplemented with 15 mM HEPES, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 50 μg/mL gentamycin sulfate, and 2,5 μg/mL amphotericin B. Each trachea was clear under a binocular microscope to remove as much conjunctive tissue as possible and was opened longitudinally. Tracheas were then immersed overnight at 4°C in supplemented DMEM:F12 containing 0,15% protease XIV from Streptomyces Griseus. After incubation, tubes with the tracheas were agitated by reversing 5 times and let 10 min to reach room temperature. Tubes were reversed 10 times, FBS was added to a final concentration of 10%, and tubes were reversed 20 times again. Tracheas were transferred in a tube with supplemented DMEM-F12 containing 10% FBS, agitated 20 times and the operation was repeated 1 time in another tube. After discarding the tracheas, all the tubes were centrifuged at 500g for 10 min at 4°C. The pellet was resuspended in supplemented DMEM:F12 with 10% FBS and the cells were plated on regular cell culture plates and incubated in a humidified atmosphere of 5% C02 at 37°C for 4 hours to allow attachment of putative contaminating fibroblast. The cells in suspension were collected and centrifuged at 400g for 5 min and were resuspended in DMEM-F12 containing BEGM Singlequot[™] kit supplements and 5% FBS. Cells were then plated apically on rat-tail collagen I-coated Transwells[®] with medium in the basal side at ~30 000 cells per Transwell[®]. Medium was changed 48h after, and every other day until confluency. Confluency was detected through measure of the transepithelial electrical resistance (with EVOM2, World Precision Instruments). When the resistance had reached a minimum of 1000 ohms/cm², the apical medium was removed, and the basal medium was changed by Pneumacult-ALI[™] medium (StemCell Technologies) to create Air-Liquid interface (ALI) culture. This day corresponded to the proliferating step at day 0 (ALI0). Medium was then changed every ~2 days. We analyzed mTEC differentiation at different time points (which were different from HAECs) including ALI0, ALI2 that represents the the polarization step at day 2, the early multiciliogenesis step at day 7 (ALI7) and the late multiciliogenesis step at day 15 (ALI15).

Ependymal cell cultures

For the mouse ependymal cell cultures, the brains were dissected from PO-P2 mice, dissociated and cultured as previously described (Delgehyr *et al*, 2015). Briefly, the mice were killed by decapitation. The brains were dissected in Hank's solution (10% HBSS, 5% HEPES, 5% sodium bicarbonate and 1% penicillin/streptomycin (P/S) in pure water) and the telencephalon were manually cut into pieces, followed by enzymatic digestion (DMEM GlutaMAX, 3% papain (Worthington 3126), 1.5% 10 mg.ml⁻¹DNAse and 2.4% 12 mg.ml⁻¹ cystein) for 45 min at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator. The digestion was stopped by the addition of a solution of trypsin inhibitors (Leibovitz's L15 medium, 10% 1 mg ml⁻¹ ovomucoid and 2% 10 mg ml⁻¹ DNAse). The cells were then washed in L15 medium and resuspended in DMEM GlutaMAX supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% P/S in a poly-l-lysine-coated flask. The ependymal progenitors were allowed to proliferate for 4–5 d, until confluence was reached, before being incubated overnight with shaking (250 r.p.m.). Cells were grown on 12-mm glass coverslips and fixed for 10 min in either 4% PFA at room temperature or 100% ice-cold methanol at -20°C. The cells were fixed on differentiation day 10. The samples were pre-blocked in PBS with 0.2% Triton X-100 and 10% FBS before incubation with the primary and secondary antibodies. The cells were counterstained with DAPI (10 μ g/ml; Sigma) and mounted in Fluoromount (SouthernBiotech).

Single-cell RNA-seq (sc-RNA-seq)

To perform single-cell analysis, the cells were incubated, at different days of ALI culture, with 0.1% protease type XIV *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich) in supplemented HBSS for 4 hours at 4°C. Then, cells were gently detached from the Transwell[®] by pipetting and transferred in a microtube. Cells were incubated at room temperature for 10 min with 50 units of DNase I (EN0523 Thermo Fisher Scientific) per 250µL directly added in the tube. Cells were

centrifuged at 150g for 5 min and resuspended in 500µL of supplemented HBSS containing 10% FBS, centrifuged again at 150g for 5 min and resuspended in 500 µL HBSS with 10% FBS and dissociated mechanically 4 times through a 26G syringe. Finally, cell suspensions were filtered through a 40µm porosity FlowmiTM Cell Strainer (Bel-Art), centrifuged at 150 for 5 min and resuspended in 500µL of HBSS. Cell concentration was measured with ScepterTM 2.0 Cell Counter (Millipore) and CountessTM automated cell counter (Thermo Fisher Scientific). Cell viability was checked with CountessTM automated cell counter (Thermo Fisher Scientific). All steps except the DNase I incubation were performed on ice. Cell concentration was adjusted to 300 cells/µL in HBSS for the cell capture by 10X genomics device, in order to capture 1500 cells for HAECs and 5000 cells for mTECs.

RNA interference

HAEC were transfected with siRNA (20nM final concentration) before seeding (60 000 cells per Transwell[®]) using Lipofectamine RNAi Max Reagent (Invitrogen) in OPTIMEM (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The cells were then harvested as in normal conditions.

Quantitative RT-PCR

Quantitative RT-PCR was performed using SYBR Green Gene expression assay on a Lightcycler 480 (Roche) according to manufacturer's instructions. Expression levels of messenger RNAs were calculated using the 2-deltaCT method, using UBC, TBP or 36B4 as endogenous controls.

Immunostainings

Transwells[®] were fixed in 4% concentrated paraformaldehyde for 20 min at 4°C. After 2 rincing with PBS, cells were permeabilized with 0,5 Triton X-100 in PBS for 10 at room temperature. Then Transwells[®] were blocked with 3% BSA in PBS for 30 min at RT. Cells were incubated with primary antibodies, diluted at the required concentration in 3% BSA in PBS (see table 1), at RT for 1 hour or at 4°C overnight. After 3 washes of 5 min with PBS, incubation with secondary (Alexa Fluor, Thermo Fisher Scientific), diluted at 1/500 in 3% BSA in PBS, was carried out during 45 min at RT and protected from light. After 3 washes in PBS, Transwells[®] membrane were cut with razor blade and mounter with Fluoromount-G[™] mounting medium with DAPI (Thermo Fisher Scientific 00-4959-52). Images were acquired using the Olympus Fv10i or Leica

Sp5 or Leica SP8 confocal imaging systems. Mouse ependymal cells were stained using procedures as previously described by Mercey and colleagues (Mercey et al., 2019 & 2020, Al Jord 2018).

	Dilution	Espèce	Fournisseur	Référence
LAYN	1/200	Rabbit	Sigma-Aldrich	HPA-040087
C11orf88	1/100	Goat	Santa cruz	SC-270467
Acetylated	1/1000	Mouse	Sigma-Aldrich	Clone 6-11B-1
Tubulin				

Table 1 : primary antibodies used for immunofluorescence experiments

SP8 confocal acquisitions

All the samples were mounted in Fluoromount-G mounting medium with DAPI. Confocal images were acquired using a Leica SP8 STED 3X (Leica Microsystems, Nanterre), at 700Hz through a 63x/1.4 NA Oil objective using the LAS X software (Leica Microsystems, Nanterre). Confocal images were obtained by a 405, 488 and 561 nm laser excitation respectively. All images have a 72-nm pixel size and all the images were deconvolved using Huygens Professional (version 18.10, Scientific Volume Imaging, The Netherlands, <u>http://svi.nl</u>), using the CMLE algorithm, with respectively SNR:20 with 40 iterations.

Stimulated emission depletion (*STED*) *microscopy* All the samples were mounted in Abberrior Mount Solid Antifade (Abberior GmbH, Göttingen). Super resolution imaging (STED) was performed using a Leica SP8 STED 3X (Leica Microsystems, Nanterre), at 700Hz through a 93x/1.3 NA Glyc objective using the LAS X software (Leica Microsystems, Nanterre). High resolution images were obtained using STED microscopy with a 561 and 633nm excitations and the depletion at 775nm for both fluorophores (20-30% of its power). Images obtained in STED had a 17-nm pixel size and all the images were deconvolved using Huygens Professional (version 18.10, Scientific Volume Imaging, The Netherlands, <u>http://svi.nl</u>), using the CMLE algorithm, with respectively SNR:100 with 5 iterations.

Western Blot experiments

Cells were collected by scrapping in Ripa lysis Buffer (Thermo Scientific Pierce), ultrasonicated and cleared by centrifugation. Protein concentration was determined using the BCA assay (Thermo Fisher Scientific) and arroung 25µg of protein were resolved on SDS polyacrylamide gels using Bolt SDS-PAGE Gel System following manufacturer's instructions. Proteins were transferred to PVDF membranes; membranes were blocked with 5% milk in TBS-Tween buffer for 1 hour. Incubation with primary antibodies (LAYN 1 : 500, Santa Cruz sc377389), diluted at the required concentration in 5% milk in TBS-Tween buffer (See table), was carried out at 4°C overnight. After 3 washes with TBS-Tween buffer during 10 min at RT, membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibodies, diluted at the required concentration, at RT for 45 min. After 3 washes, immunoreactive bands were detected using immobilon ECL kit (Merck Millipore) on Fusion-FX imager.

Results & Discussion

C11orf88, LAYN and BTG4 are expressed during mouse and human airway epithelium regeneration

To determine the role of the three genes of the 11q23 human locus, we analyzed their expression using RT-qPCR, RNA-sequencing and single-cell RNA sequencing approaches at different stages of differentiation in both HAECs and mTECs.

In HAECs (Fig. 1A/C) as well as in mTECs (Fig. 1B/D), FOXJ1 (a well known marker of MCCs) and CDC20B (a marker of deuterosomal cells) expression was increased by up to 300 times at ALI15. The expression of *C11orf88* (as well as *C11orf88* murine ortholog 4833427G06Rik) was increased more than 200 times, in parallel with the one of *CDC20B*.

In previous study, sc-RNA-seq analysis allowed us to determine the cell population composing the airway epithelium of HAEC *in vitro* (Garciá *et al*, 2019). Using these analysis, we determined that the MCC population of *FOXJ1*+-cells was further split in two discrete clusters: (1) the largest one is positive for mature MCC genes such as DNAH5, and corresponds to terminally differentiated MCCs; (2) the second one is positive for deuterosomal immature MCCs that specifically expresses several molecules that are important for the biosynthesis of hundreds of basal bodies from which motile cilia elongate including DEUP1 or CDC20B (Fig. 2A). Importantly, using scRNA-Seq we observed that C11orf88 was hugely and specifically expressed in FOXJ1-positive MCCs including in CDC20B-positive deuterosomal cells in both species (Fig. 2B). In mTECs, sc-RNA-seq realized at ALI3 the population of deuterosomal cells is largest than the one of mature MCCs as represented by the expression of Deup1 (marker of deuterosomal cells and Foxj1 (marker of both immature and mature cells) (Figure 3). In this model, *C11orf88* is also highly and specifically expressed in Foxj1-positive MCCs (Figure 3). Supplemental Figure 1 show that C11orf88 transcript expression is also concentrated in MCC of newborn pig *in vitro* and *in vivo* (Supplemental figure 1).

In HAECs, BTG4 and LAYN exhibited the same pattern of expression characterized by a stable expression at early differentiation, followed by a decrease at ALI10, and an increase until fulldifferentiation. The expression of *BTG4* was increased more than two times at the end of the differentiation (Fig. 1A). In mTECs (Fig. 1B/D), *LAYN* and *BTG4* expression was increased

during MCC differentiation. In both species, RNA-sequencing revealed that *BTG4* was weakly expressed compared to the three other genes, and that C11orf88 was the higher expressed at the end of the differentiation (Fig. 1C/D). Analysis on sc-RNA-seq reveal that only few cells expressed BTG4 at a weak level in HAEC. However, these few cells mostly represented MCCs (Fig. 2/3). In HAECs, the expression of *LAYN* is quite ubiquitous - which is consistent with a continuous transcript expression during the differentiation (Fig. 2) - with higher levels in suprabasal cells, than MCCs and intermediated states between these two populations. In mTECs (Fig.3), *Btg4* and *Layn* genes were also expressed at a higher level in MCCs. Only *C11orf88* is detected in deuterosomal cells. Altogether, these observations suggest that these three genes may be involved in MCC differentiation.

C11orf88 and LAYN proteins are localized in MCCs in both human and mouse models

Immunostainings were used to further investigate the expression of the three genes at the protein level in regenerating HAECs and mTECs (Fig. 4-9), but also in a third model corresponding to the mouse ependymal cells isolated from brain ventricles (Fig. 7).

At the beginning of airway epithelium differentiation, *C11orf88* (or its murine ortholog 4833427G06Rik) was not detected in the primary cilium in both HAECs at ALI14 , and in mTECs at ALI2 (Fig. 4A/B). However, on the contrary to HAECs in which we failed to detect *C11orf88* in primary cilium, it was found expressed in a punctate manner in the primary cilium in mTECs at ALI7 (Fig. 4B). No primary cilium was then observed in fully-differentiated mTECs at ALI27 (Fig. 4B). In mTEC cultures, cells differentiate relatively synchronously and the timing of deuterosome formation can occur nearly at the same time in all deuterosomal cells. At the opposite, in HAEC cultures, cells differentiate in an asynchronous manner, making difficult finding a time that coincide with deuterosome formation in the discrete deuterosomal cell population. In that context, we could not exclude that *C11orf88* may be transiently expressed in primary cilium in immature human airway MCCs at an early step of differentiation.

Figure 5 and 6 show that *C11orf88* was only detected in motile cilia in MCCs in both species (Fig. 5 and 6). At early steps of MCC differentiation (ALI14 for HAECs, ALI7 for mTECs and 5 days of differentiation in mouse ependymal cells), *C11orf88* was mainly enriched at the tip of the cilia. On the other hand, *C11orf88* was localized all along the motile cilia in MCCs from fully-differentiated airway epithelium (from ALI20 in HAECs and from ALI14 in mTECs) (Fig. 5-

7). Super resolution imaging using STED microscopy shows that C11orf88 was expressed with a punctate distribution all along the cilia of fully-differentiated airway epithelium MCCs in both species (Fig. 5/6). This punctate pattern of the C11orf88 murine ortholog in primary cilia in mTECs are quite intriguing but may suggest a putative role in primary cilium before multiciliogenesis. In a previous study, a temporal analysis of airway epithelial cell differentiation, has shown that cells with primary cilia acquire markers of motile ciliogenesis, suggesting that motile ciliated cells originate from primary ciliated cells (Jain et al, 2010). Whereas motile ciliogenesis requires Foxj1, primary ciliogenesis does not, and the expression of Foxj1 was associated with a loss of primary cilia, just before the appearance of motile cilia (Jain et al, 2010). Primary cilia were not found in well-differentiated airway epithelial cells. The authors have shown that after injury, primary cilia appear in the luminal layer of epithelium and in basal cells. The transient nature of primary cilia, together with the temporal and spatial patterns of expression in the development and repair of airway epithelium, suggest a critical role of primary cilia in determining outcomes during airway epithelial cell differentiation (Jain et al, 2010). Here, we showed that C11orf88 was exclusively expressed in MCCs, but not in other cells that present a primary cilium, and that C11orf88 murine ortholog was transiently expressed in primary cilia in mTECs at an early step of differentiation. Accordingly, our results suggest that *C11orf88* or its murine ortholog may play a specific role in primary cilium only in immature MCCs before motile cilia can occur.

In a former study, the authors identified the sentan (SNTN) protein as the first molecular component of the apical structure of vertebrate tracheal and oviductal motile cilia (Kubo *et al*, 2008). SNTN is also the first protein to be identified as linking ciliary microtubules to the ciliary membrane in mammalian tissues. SNTN localized exclusively between the ciliary membrane and the peripheral singlet microtubules at the distal narrowed portion of cilia, suggesting that SNTN is a molecular component of the linker structure that bridges the ciliary membrane and the peripheral singlet microtubules (Kubo *et al*, 2008).

In our study, the punctate pattern of *C11orf88* in motile cilia may evoke a pattern-like IntraFlagellar Transport (IFT) involved in the transport of cilia components during building and maintenance of cilia. *C11orf88* may be a component of trains, or cargo of this transport, or may be carried by IFT along the cilia to play a role in the axoneme. The enrichment of C11orf88 at the tip of the cilia at early steps of MCC differentiation could either suggest a role in the assembly of the microtubules doublets during the elongation of axonem, or a role in the control of the cilia length or in the formation of the ciliary cap at the tip.

In HAECs, *LAYN* was not localized in the motile cilia of fully-differentiated MCCs at ALI20, but was rather detected in the cytoplasm of maturing MCCs (Fig. 8), as revealed by higher magnification images using super resolution STED microscopy (Fig. 8). In mTECs, LAYN was absent of primary cilia at ALI7 (Fig. 9), but present in the motile cilia of MCCs at ALI7, intermediate state of differentiation of the epithelium and at ALI27, mature state of differentiation (Fig. 9). STED images also confirmed the localization of LAYN in the motile cilia of MCCs. The distribution of *LAYN* was also punctate along the cilia (Fig. 9). The distinct expression and localization of *LAYN* in mouse and human airway epithelium could suggest different roles in both species. In human, its transcript expression enriched in suprabasal cells rather than in MCCs and its protein localization in the cytoplasm of immature MCCs excluded a direct role of *LAYN* in the motile cilia function. However, an apical surface localization of *LAYN* in airway epithelial cells has already been reported by Forteza and colleagues in human tracheo-bronchial epithelium in ALI cultures (Forteza *et al*, 2012).

Inhibition of LAYN at early human airway epithelium regeneration was sufficient to alter MCC differentiation

In order to determine the role of *LAYN* in HAECs, we have inhibited its expression using siRNA approaches. At ALIO, ~4 days after transfection, the transcript expression of *LAYN* was decreased compared to control cells as revealed with RT-qPCR (Fig. 10A). Its expression was also decreased at the protein levels as shown with western blot experiments (Fig. 10B). At ALI14, an intermediate state of differentiation, when the MCCs appear and the expression of *FOXJ1* (a MCC marker) increased, the expression of this gene was decreased in the cells transfected with specific siRNA against *LAYN* transcripts, compared to the control. We observed that the inhibition of *LAYN* expression at the beginning of the airway epithelium differentiation was sufficient to decrease the expression of *FOXJ1* at ALI14 (Fig. 10C). At ALI20, we performed immunostainings to determine the percentage of MCCs in the different conditions. We stained MCCs with acetylated-tubulin, and we observed that the percentage of MCCs was significantly lower in the condition transfected with siRNA against *LAYN* transcripts. We conclude that the inhibition of *LAYN* expression at early stage of

differentiation was sufficient to affect the formation of MCCs (Fig. 10D/E). In their study, Forteza and colleagues also performed silencing of *LAYN* in ALI culture using lentivirus expressing small interference RNA, and obtained 60% of *LAYN* knockdown (Forteza *et al*, 2012). However, they only investigated the effect of this knockdown on E-cadherin expression and the ability of cigarette exposure to disturb E-cadherin expression, localization and epithelial permeability. They described that cigarette exposure decreased airway epithelium permeability through binding of hyaluronan on *LAYN*, but did not report any effect of *LAYN* knockdown on airway epithelium differentiation. Howerver, they described that the signal of hyaluronan binding on *LAYN* act through RhoA/ROCK signalling. In a previous work, we reported that miR-34/449 controlled apical actin network reorganization by modulating small GTPase pathways, including RhoA (Chevalier *et al*, 2015). Compelling evidence such as a cytoplasm localization of *LAYN* in MCCs, the inhibition of MCC differentiation in response to *LAYN* silencing and the interaction of *LAYN* with through RhoA/ROCK signal could suggest a putative role of LAYN in the remodeling of apical cytoskeleton required for basal body anchoring in MCCs.

The weak expression of BTG4 in the human and murine airway epithelium makes difficult investigations of this gene's function. However, even weak, its expression that increase with MCC appearance and is concentrated in these cells, and could reveal a role in multiciliogenesis. Also this investigation brought our attention on its cousin *BTG3* which has a concentrated expression in human deuterosomal cells (Supplemental figure 2). The role of the BTG family as negative regulators of the cell cycle (Auer *et al*, 2005) and the use of cell cycle actor for the amplification of centrioles in MCCs reported in our recent study (Ruiz García *et al*, 2019) of airway epithelial cell populations in single-cell RNA-seq suggest a putative role of the BTG family, maybe a compensatory one between BTG4 and BTG3, in the amplification of centrioles in MCCs.

Conclusion

In conclusion, our study demonstrate that *C11orf88*, LAYN and BTG4 are expressed in human and mouse MCC models *in vitro*. We have demonstrated that, in human and mouse, *C11orf88* is localized in motile cilia of MCCs, and enriched at the tip of the cilia in developing epithelium, and in a punctate manner in mature epithelium. In human airway epithelium, we have demonstrated that *LAYN* is localized in the cytoplasm of MCCs, whereas in mice, *LAYN* is localized in the motile cilia of MCCs. Finally, we have demonstrated that early inhibition of *LAYN* expression is sufficient to affect multiciliogenesis. Our data indicate that, as previously observed for miR-449 genomic locus, the miR-34b/c locus encompasses genes involved in MCC differentiation and may share a role in multiciliogenesis. Collectively, our observations led us to propose the miR-34b/c locus as a second "multiciliary locus" where the members may play a key role in multiciliogenesis.

Legends

Figure 1 : 11q23 locus members are differentially expressed during airway differentiation in vitro in HAECs and in mTECs

- (A) In HAEC, transcript levels of LAYN, C11orf88 and BTG4 were measured by RT-qPCR in parallel with CDC20B, a marker of deuterosomal cells (immature MCCs). Transcript levels were normalized using UBC gene (n=3 independent experiments). (B) In mTEC, transcript levels of LAYN, C11orf88 and BTG4 were measured by RT-qPCR in parallel with FOXJ1, a marker of both mature and immature multiciliated cells. Transcript levels were normalized using TBP gene (n=3 independent experiments). (C) Heatmap representing transcriptionnal expression of LAYN, C11orf88, BTG4 and FOXJ1 during HAEC differentiation. (D) Heatmap representing transcriptionnal expression of LAYN, C11orf88, BTG4 and FOXJ1 during mTEC differentiation (Nemajerova et al, 2016).
- Figure 2 : 11q23 locus member transcript expression is enriched in airway MCCs of human airway epithelium
- t-SNE realized with single-cell RNA sequencing data obtained with HAEC at ALI22. Each point correspond to a cell, and RNA-expression of *LAYN*, *C11orf88* and *BTG4*, compared with the one of *FOXJ1* in each cell is represented using a heatmap manner.
- Figure 3 : 11q23 locus member transcript expression is enriched in airway MCCs in murine tracheal epithelium
- t-SNE realized with single-cell RNA sequencing data obtained with mTEC at ALI10. Each point correspond to a unique cell, and RNA-expression of *LAYN*, *C11orf88* and *BTG4*, compared with the one of *FOXJ1* in each individual cell is represented in a heatmap manner.
- Figure 4 : C11orf88 is expressed in primary cilia only in mTECs at an advanced state of differentiation
- (A) Immunostaining realized on HAEC at ALI 14 with antibodies against Acetylated-tubulin (Actub), a marker of cilia in red, and *C11orf88* in green. (B) Immunostainings performed on mTEC at ALI2, ALI5 and ALI7 with antibodies against Acetylated-tubulin (Ac-tub) in red, and *C11orf88* in green.
- Figure 5 : C11orf88 is expressed in motile cilia of MCCs throughout the differentiation in HAECs
- Immunostainings carried out on HAEC at ALI 14 and ALI20 with antibodies against Acetylatedtubulin (Ac-tub), a marker of cilia in red, and *C11orf88* in green. High resolution images obtained in STED are also presented.
- Figure 6 : C11orf88 is expressed in motile cilia of MCCs throughout the differentiation in mTECs
- Immunostainings performed on mTEC at ALI2, ALI5, ALI7 and ALI27 with antibodies against Acetylated-tubulin (Ac-tub), a marker of cilia in red, and *C11orf88* in green. High resolution images obtained in STED are also presented.

Figure 7 : C11orf88 is expressed in motile cilia of MCCs in mouse ependymal cells

Immunostainings performed on mouse ependymal cells expressing Cen2-GFP (green) at D5 with antibodies against GT335, a marker of cilia in red, and C11orf88 in pink.

Figure 8 : LAYN is expressed at the apical surfacein the cytoplasm of maturing MCCs in HAECs Immunostainings carried out on HAECs at ALI20 with antibodies against Acetylated-tubulin

(Ac-tub), a marker of cilia in red, and *LAYN* in green. High resolution images obtained in STED are also presented.

Figure 9 : LAYN is expressed only in motile cilia of MCCs in mTECs throughout the differentiation

Immunostainings realized on HAEC at ALI7 and ALI27 with antibodies against Acetylatedtubulin (Ac-tub), a marker of cilia in red, and *LAYN* in green. High resolution images obtained in STED are also presented.

Figure 10 : Early LAYN expression is necessary for multiciliated cell differentiation during HAECs regeneration in vitro

- (A) HAEC were transfected with siCTRL or siLAYN at seeding, LAYN expression was measured at ALIO by RT-qPCR. (B) LAYN expression was measured at ALIO by Western blot. HPS60 expression serves as control. (C) FOXJ1 expression was measured at ALI14 by RT-qPCR. (D) Percentage of cells positive for Acetylated-tubulin (Ac-tub+) was determined on stainings at ALI20. (E) Stainings performed at ALI20 : Acetylated tubulin (green) , LAYN (red). Data are mean ± s.d. from five independent experiments (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; Student's t-test).
- Supplemental Figure 1 : C11orf88 transcript expression is enriched in airway MCCs of newborn pig in vitro and in vivo
- t-SNE realized with single-cell RNA sequencing data obtained with mTEC at ALI10. Each point correspond to a unique cell, and RNA-expression of *LAYN*, *C11orf88* and *BTG4*, compared with the one of *FOXJ1* in each individual cell is represented in a heatmap manner.
- Supplemental Figure 2 : *BTG3 transcript expression is concentrated in human deuterosomal cells.* T-SNE realized with Single-cell RNA-seq data obtained with HAEC at ALI22 of *BTG3*, *BTG4* and *CDC20B*, a marker of deuterosomal cells. Each point correspond to a cell, and *BTG3*, *BTG4* and *CDC20B* expression in each cell is represented in a heatmap manner.
- Altman R, Bedi A, Manjoo A, Niazi F, Shaw P & Mease P (2019) Anti-Inflammatory Effects of Intra-Articular Hyaluronic Acid: A Systematic Review. *Cartilage* **10**: 43–52 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29429372 [Accessed July 5, 2019]
- Anderson RGW & Brenner RM (1971) The formation of basal bodies (centrioles) in the rhesus monkey oviduct. *J. Cell Biol.* **50:** 10–34
- Arbi M, Pefani D, Kyrousi C, Lalioti M, Kalogeropoulou A, Papanastasiou AD, Taraviras S & Lygerou Z (2016) GemC1 controls multiciliogenesis in the airway epithelium. *EMBO Rep.* 17: 400–413 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26882546 [Accessed March 27, 2020]
- Auer RL, Starczynski J, McElwaine S, Bertoni F, Newland AC, Fegan CD & Cotter FE (2005) Identification of a potential role for POU2AF1 and BTG4 in the deletion of 11q23 in chronic lymphocytic leukemia. *Genes. Chromosomes Cancer* **43**: 1–10 Available at: http://doi.wiley.com/10.1002/gcc.20159 [Accessed July 5, 2019]
- Bachmann-Gagescu R (2014) [Genetic complexity of ciliopathies and novel genes identification]. *Med. Sci. (Paris).* **30:** 1011–23 Available at: http://www.medecinesciences.org/10.1051/medsci/20143011016 [Accessed July 1, 2019]
- Brooks ER & Wallingford JB (2014) Multiciliated Cells. *Curr. Biol.* **24:** R973–R982 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25291643 [Accessed July 3, 2019]
- Chevalier B, Adamiok A, Mercey O, Revinski DR, Zaragosi LE, Pasini A, Kodjabachian L, Barbry P & Marcet B (2015) MiR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways. *Nat. Commun.* **6**:
- Coraux C, Hajj R, Lesimple P & Puchelle E (2005) Réparation et régénération de l'épithélium

respiratoire. *médecine/sciences* **21**: 1063–1069 Available at:

http://www.medecinesciences.org/10.1051/medsci/200521121063 [Accessed July 1, 2019]

Delgehyr N, Meunier A, Faucourt M, Bosch Grau M, Strehl L, Janke C & Spassky N (2015) Ependymal cell differentiation, from monociliated to multiciliated cells. *Methods Cell Biol.* **127:** 19–35 Available at:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X15000059 [Accessed July 1, 2019]

- Forteza RM, Casalino-Matsuda SM, Falcon NS, Valencia Gattas M & Monzon ME (2012)
 Hyaluronan and layilin mediate loss of airway epithelial barrier function induced by cigarette smoke by decreasing E-cadherin. J. Biol. Chem. 287: 42288–98 Available at: http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M112.387795 [Accessed July 5, 2019]
- Funk MC, Bera AN, Menchen T, Kuales G, Thriene K, Lienkamp SS, Dengjel J, Omran H, Frank M & Arnold SJ (2015) Cyclin O (Ccno) functions during deuterosome-mediated centriole amplification of multiciliated cells. *EMBO J.* **34**: 1078–89 Available at: http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.15252/embj.201490805 [Accessed July 3, 2019]
- Garciá SR, Deprez M, Lebrigand K, Cavard A, Paquet A, Arguel MJ, Magnone V, Truchi M, Caballero I, Leroy S, Marquette CH, Marcet B, Barbry P & Zaragosi LE (2019) Novel dynamics of human mucociliary differentiation revealed by single-cell RNA sequencing of nasal epithelial cultures. *Dev.* **146**:
- He L, He X, Lim LP, De Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA & Hannon GJ (2007) A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* **447**: 1130–1134
- Jain R, Pan J, Driscoll JA, Wisner JW, Huang T, Gunsten SP, You Y & Brody SL (2010) Temporal relationship between primary and motile ciliogenesis in airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **43**: 731–739
- Kubo A, Yuba-Kubo A, Tsukita S, Tsukita S & Amagai M (2008) Sentan: A novel specific component of the apical structure of vertebrate motile cilia. *Mol. Biol. Cell* 19: 5338–5346
- Mano H, Nakatani S, Kimira Y, Mano M, Sekiguchi Y, Im R-H, Shimizu J & Wada M (2015) Agerelated decrease of IF5/BTG4 in oral and respiratory cavities in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79:** 960–8 Available at:

http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09168451.2015.1008976 [Accessed July 5, 2019]

- Marcet B, Chevalier B, Coraux C, Kodjabachian L & Barbry P (2011a) MicroRNA-based silencing of Delta/Notch signaling promotes multiple cilia formation. *Cell Cycle* 10: 2858–2864 Available at: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.10.17.17011 [Accessed July 1, 2019]
- Marcet B, Chevalier B, Luxardi G, Coraux C, Zaragosi L-E, Cibois M, Robbe-Sermesant K, Jolly T, Cardinaud B, Moreilhon C, Giovannini-Chami L, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Waldmann R, Kodjabachian L & Barbry P (2011b) Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat. Cell Biol.* **13**: 693–9 Available at: http://www.nature.com/articles/ncb2241 [Accessed July 1, 2019]
- Mercey O, Chevalier B, Kodjabachian L, Barbry P & Marcet B (2015) [MicroRNAs pull the strings of motile cilia]. *Med. Sci. (Paris).* **31:** 1078–80 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26672659 [Accessed April 13, 2020]

- Mercey O, Kodjabachian L, Barbry P & Marcet B (2016) MicroRNAs as key regulators of GTPase-mediated apical actin reorganization in multiciliated epithelia. *Small GTPases* **7**: 54–58
- Mercey O, Popa A, Cavard A, Paquet A, Chevalier B, Pons N, Magnone V, Zangari J, Brest P, Zaragosi L-E, Ponzio G, Lebrigand K, Barbry P & Marcet B (2017) Characterizing isomiR variants within the microRNA-34/449 family. *FEBS Lett.* **591**: 693–705 Available at: http://doi.wiley.com/10.1002/1873-3468.12595 [Accessed June 27, 2019]
- Meunier A & Azimzadeh J (2016) Multiciliated Cells in Animals. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8:** a028233 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27580630 [Accessed July 3, 2019]
- Murata M, Yudoh K, Shimizu H, Beppu M, Nakamura H, Kato T & Masuko K (2013) Layilin, a talin-binding hyaluronan receptor, is expressed in human articular chondrocytes and synoviocytes and is down-regulated by interleukin-1β. *Mod. Rheumatol.* **23**: 478–88 Available at: http://link.springer.com/10.1007/s10165-012-0686-x [Accessed July 5, 2019]
- Nemajerova A, Kramer D, Siller SS, Herr C, Shomroni O, Pena T, Gallinas Suazo C, Glaser K, Wildung M, Steffen H, Sriraman A, Oberle F, Wienken M, Hennion M, Vidal R, Royen B, Alevra M, Schild D, Bals R, Dönitz J, et al (2016) TAp73 is a central transcriptional regulator of airway multiciliogenesis. *Genes Dev.* 30: 1300–12 Available at: http://genesdev.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gad.279836.116 [Accessed July 3, 2019]
- Revinski DR, Zaragosi L-E, Boutin C, Ruiz-Garcia S, Deprez M, Thomé V, Rosnet O, Gay A-S, Mercey O, Paquet A, Pons N, Ponzio G, Marcet B, Kodjabachian L & Barbry P (2018)
 CDC20B is required for deuterosome-mediated centriole production in multiciliated cells. *Nat. Commun.* 9: 4668 Available at: http://www.nature.com/articles/s41467-018-06768-z [Accessed July 5, 2019]
- Rovillain E, Mansfield L, Lord CJ, Ashworth A & Jat PS (2011) An RNA interference screen for identifying downstream effectors of the p53 and pRB tumour suppressor pathways involved in senescence. *BMC Genomics* 12: 355 Available at: http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-12-355 [Accessed July 5, 2019]
- Ruiz García S, Deprez M, Lebrigand K, Cavard A, Paquet A, Arguel M-J, Magnone V, Truchi M, Caballero I, Leroy S, Marquette C-H, Marcet B, Barbry P & Zaragosi L-E (2019) Novel dynamics of human mucociliary differentiation revealed by single-cell RNA sequencing of nasal epithelial cultures. *Development* **146**:
- Spassky N & Meunier A (2017) The development and functions of multiciliated epithelia. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 18: 423–436 Available at: http://www.nature.com/articles/nrm.2017.21 [Accessed July 3, 2019]
- Stubbs JL, Vladar EK, Axelrod JD & Kintner C (2012) Multicilin promotes centriole assembly and ciliogenesis during multiciliate cell differentiation. *Nat. Cell Biol.* **14:** 140–7 Available at: http://www.nature.com/articles/ncb2406 [Accessed July 3, 2019]
- Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y & Tokino T (2008) Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res.* 68: 4123–32 Available at: http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-08-0325 [Accessed July 5, 2019]
- Zhao H, Zhu L, Zhu Y, Cao J, Li S, Huang Q, Xu T, Huang X, Yan X & Zhu X (2013) The Cep63 paralogue Deup1 enables massive de novo centriole biogenesis for vertebrate
multiciliogenesis. *Nat. Cell Biol.* **15:** 1434–44 Available at: http://www.nature.com/articles/ncb2880 [Accessed July 5, 2019] Zhou-Suckow Z, Duerr J, Hagner M, Agrawal R & Mall MA (2017) Airway mucus,

inflammation and remodeling: emerging links in the pathogenesis of chronic lung diseases. *Cell Tissue Res.* **367:** 537–550 Available at:

http://link.springer.com/10.1007/s00441-016-2562-z [Accessed July 5, 2019]



Figure 1











mTEC

ALI27

ALI27 STED







ALI7

ALI7

ALI27



ALI27 STED







Figure 9

mTEC



In vivo (tracheal cells from 4 newbord pigs)



Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2

Chapitre 3 : Identification de nouvelles dynamiques de différenciation cellulaire pendant la régénération de l'épithélium des voies respiratoires humaines par Single-cell RNA-seq

Article 1 : Novel dynamics of human mucociliary differentiation revealed by Single-cell RNA-sequencing of nasal epithelial cultures.

Ruiz-Garcia S, Deprez M, Lebrigand K, <u>Cavard A</u>, Paquet A, Arguel MJ, Magnone V, Truchi M, Caballero I, Leroy S, Marquette CH, <u>Marcet B</u>, Barbry P, <u>Zaraqosi LE</u>. Development (2019) 146(20).

Article 2 : Regeneration of airway epithelial cells to study rare cell states in cystic fibrosis. Barbry P, <u>*Cavard A*</u>, Chanson M, Jaffe AB, Plasschaert LW. Journal of Cystic Fibrosis (2019) S1569-1993(19)30894-X

Le but de cette étude a été d'identifier les populations cellulaires composant l'épithélium des voies respiratoires et les dynamiques de différenciation entre ces populations.

L'épithélium des voies respiratoires agit comme une barrière protectrice contre les infections et détériorations grâce à la clairance mucociliaire (page 16), mécanisme assuré par les cellules à mucus (page 7) et cellules multiciliées (page 11), dont les proportions doivent se maintenir à l'équilibre pour une clairance optimale. A la suite d'agressions extérieures, par des agents nocifs inhalés ou des infections, l'épithélium des voies respiratoires peut être endommagé et sa fonction de défense altérée. Dans un organisme sain, l'épithélium des voies respiratoires est capable d'entamer un processus de régénération pour revenir à un état homéostatique et recouvrir sa composition initiale. Dans un organisme atteint de maladies respiratoires chroniques, comme la BPCO (page 106), l'asthme (page 103) ou la mucoviscidose (page 108), les dommages et inflammations chroniques conduisent à un processus de régénération défectueux et un remodelage de l'épithélium des voies respiratoires associé à une hyperplasie des cellules à mucus et une perte des cellules multiciliées, aggravant les conditions pathologiques de l'organisme atteint.

Il devient dans ce cas urgent de fournir une caractérisation détaillée et d'améliorer la compréhension des événements moléculaires et cellulaires conduisant à une régénération fonctionnelle, pour comprendre les événements à l'origine du remodelage de l'épithélium

des voies respiratoires et anticiper ainsi le développement de meilleures approches pour traiter les maladies.

Différentes études ont d'ores et déjà déchiffré des pans de ces processus, la plupart ayant été réalisées en utilisant le modèle souris, qui permet l'utilisation de traçage *in vivo* des lignages cellulaires et la possibilité d'induire des blessures dans l'épithélium des voies respiratoires. Ces études ont fourni un schéma relativement complet des trajectoires cellulaires et des processus régulateurs impliqués dans la régénération et le remodelage de l'épithélium des voies respiratoires. Cependant, elles présentent quelques limites intrinsèques. En effet, les techniques de lignage cellulaire génétique requièrent une sélection *a priori* des marqueurs de type cellulaire qui contraignent et orientent l'étude aux cellules exprimant ces gènes. De plus, les différences de composition cellulaire et de structures entre l'humain et la souris impliquent une transposition prudente des résultats obtenus chez l'un ou l'autre de ces modèles d'étude.

L'avènement de la technologie du « Single-cell RNA-seq » (page 119), utilisée dans notre étude, outrepasse ces limites et permet une étude non biaisée des systèmes hétérogènes, des trajectoires cellulaires et des voies de signalisation qui les commandent. En conséquence, la première publication a pour but de fournir une description détaillée du processus de régénération des voies respiratoires extra-thoraciques, en identifiant les populations cellulaires distinctes, en déduisant leur relation de lignage et en déterminant les mécanismes moléculaires régulateurs correspondants, grâce aux données transcriptomiques obtenues par « single-cell RNA-seq » à partir du modèle de culture en Interface Air-Liquide (page 42) de HAEC (page 42) et de mTEC (page 43) à différents temps de la régénération de l'épithélium des voies respiratoires [544]. Ces temps ont été choisis par rapport aux étapes connues les plus représentatives de la régénération des voies respiratoires, à savoir : la prolifération, la polarisation, la spécification (identité) et la différenciation terminale. La deuxième publication est une revue ayant pour but de décrire brièvement les différentes étapes de la différenciation des HAEC et de faire valoir deux populations cellulaires récemment décrites qui semblent pertinentes pour la mucoviscidose, à savoir les ionocytes pulmonaires et les cellules deutérosomales [523]. Cette revue est basée sur le symposium « Cystic Fibrosis Model System » présenté au 16^{ème} ECFS Basic Science Conference à Dubrovnik en Croatie en Mars 2019, incluant les résultats de la première publication.

Ma contribution personnelle au premier article a été de réaliser les expériences de différenciation et d'analyse « Single-cell RNA-seq » du modèle mTEC. J'ai participé à la rédaction du deuxième article avec Pascal Barbry.

A travers ces études, les types cellulaires centraux impliqués dans la régénération de l'épithélium des voies respiratoires ont pu être identifiés. Les trajectoires cellulaires conduisant à la différenciation complète de l'épithélium des voies respiratoires *in vitro* ont également pu être déterminées, de nouvelles populations et de nouveaux interactants moléculaires révélés. Ces jeux de données ouvrent de nouvelles perspectives dans l'analyse du rôle des cellules et des molécules de signalisation dans la régénération de l'épithélium des voies respiratoires normales. Ils ont permis ainsi d'établir une trajectoire de différenciation des cellules avec les acteurs principaux des voies de signalisation impliqués dans chaque type cellulaire. Cette étude rapporte également les précautions qu'il faut prendre pour transposer les résultats obtenus chez la souris à l'humain, ainsi que d'un milieu de culture à l'autre, comme le rapporte la comparaison entre les deux milieux utilisés pour cette étude.

The Company of Biologists

TECHNIQUES AND RESOURCES

HUMAN DEVELOPMENT ARTICLE

Novel dynamics of human mucociliary differentiation revealed by single-cell RNA sequencing of nasal epithelial cultures

Sandra Ruiz García^{1,*}, Marie Deprez^{1,*}, Kevin Lebrigand¹, Amélie Cavard¹, Agnès Paquet¹, Marie-Jeanne Arguel¹, Virginie Magnone¹, Marin Truchi¹, Ignacio Caballero², Sylvie Leroy^{1,3}, Charles-Hugo Marquette³, Brice Marcet¹, Pascal Barbry^{1,‡} and Laure-Emmanuelle Zaragosi^{1,‡}

ABSTRACT

The upper airway epithelium, which is mainly composed of multiciliated, goblet, club and basal cells, ensures proper mucociliary function and can regenerate in response to assaults. In chronic airway diseases, defective repair leads to tissue remodeling. Delineating key drivers of differentiation dynamics can help understand how normal or pathological regeneration occurs. Using single-cell transcriptomics and lineage inference, we have unraveled trajectories from basal to luminal cells, providing novel markers for specific populations. We report that: (1) a precursor subgroup of multiciliated cells, which we have entitled deuterosomal cells, is defined by specific markers, such as DEUP1, FOXN4, YPEL1, HES6 and CDC20B; (2) goblet cells can be precursors of multiciliated cells, thus explaining the presence of hybrid cells that co-express markers of goblet and multiciliated cells; and (3) a repertoire of molecules involved in the regeneration process, such as keratins or components of the Notch, Wnt or BMP/TGF β pathways, can be identified. Confirmation of our results on fresh human and pig airway samples, and on mouse tracheal cells, extend and confirm our conclusions regarding the molecular and cellular choreography at work during mucociliary epithelial differentiation.

KEY WORDS: Airway epithelium, Single-cell RNA-seq, Differentiation, Multiciliated cells, Club cells, Goblet cells, Basal cells, Deuterosome, Keratins, Pathways

INTRODUCTION

The airway epithelium makes an efficient line of defense against inhaled substances. It is mainly composed of multiciliated cells (MCCs), goblet cells (GCs), club cells (CCs) and basal cells (BCs) (Gras et al., 2013; Kotton and Morrisey, 2014). Decreased numbers of MCCs and increased number of GCs hallmark many chronic respiratory diseases, during which frequent injuries, repair defects, tissue remodeling and altered mucociliary clearance occur (Cohn, 2006; Curran and Cohn, 2010; Merigo et al., 2002). Characteristics contributing to efficient airway regeneration after injuries have been extensively investigated in

Received 7 March 2019; Accepted 18 September 2019

mouse, establishing mouse BCs as the main airway stem cells, with self-renewal capacities and the ability to differentiate into MCCs, CCs and GCs (Cole et al., 2010; Kotton and Morrisey, 2014; Rock et al., 2009). BCs are abundant in upper mouse airways but absent from lower airways (Hogan et al., 2014). Human BCs populate the whole airways, and their abundance also decreases in smaller airways (Boers et al., 1998). A direct differentiation of BCs into MCCs has been reported after injury (Pardo-Saganta et al., 2015a), but the current consensus is that BCs can differentiate first into CCs (Watson et al., 2015), i.e. club/ secretory or Clara cells. CCs are widespread in the whole mouse airways. They are less abundant in human, being nearly absent from upper airways but enriched in terminal and respiratory bronchioles (Boers et al., 1999). CCs are luminally located, show a characteristic columnar shape and contribute to xenobiotic metabolism through the production of anti-microbial and antiinflammatory peptides (Wang et al., 2003; Jones et al., 1983), such as the secretoglobin SCGB1A1. CCs can give rise to MCCs, as detected by the expression of transcription factor FOXJ1 (Rawlins et al., 2009; Watson et al., 2015) and to GCs, as detected by the expression of mucin MUC5AC (Chen et al., 2009; Kotton and Morrisey, 2014).

Distinct molecular mechanisms regulate cell fate decisions in airway epithelium lineages. Notch signaling plays a pivotal role during commitment of BCs: activation leads to CC/GC lineages, while inhibition leads to MCC lineages (Morimoto et al., 2010; Pardo-Saganta et al., 2015b; Rock et al., 2011; Tsao et al., 2009). We have shown that Notch pathway inhibition by the miR-34/449 families of microRNAs is required for MCC differentiation (Marcet et al., 2011a,b; Mercey et al., 2017). In vivo lineagetracing studies have some limitations: observations in animal models do not necessarily transfer to human; use of drastic forms of injuries may not completely reveal physiological tissue turnover; and strategies of specific genetic cell labeling (usually Krt5 for BCs and Scgb1a1 for CCs) are not necessarily comprehensive and do not necessarily provide a full picture of the airway epithelial cell hierarchies. In human, in which lineage tracing is impossible, cell lineage hierarchies in homeostatic bronchi have been indirectly inferred by assessing somatic mitochondrial mutations (Teixeira et al., 2013); however, in vitro approaches are still necessary to study cell lineage during epithelial regeneration.

Single-cell RNA-sequencing has emerged as a powerful approach to measure cell lineage hierarchies (Fletcher et al., 2017; Karamitros et al., 2018; Pal et al., 2017), by capturing cells at different levels of differentiation (Plass et al., 2018). After a first study that delineated lineage hierarchies of mouse alveolar cells (Treutlein et al., 2014), several atlases of the airways have recently been released in mouse (Montoro et al., 2018) and human (Ordovas-

¹Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, Sophia-Antipolis 06560, France. ²ISP, INRA, Université Tours, Nouzilly 37380, France. ³Université Côte d'Azur, CHU de Nice, Pulmonology Department, Nice 06000, France. *These authors contributed equally to this work

[‡]Author for correspondence (barbry@ipmc.cnrs.fr; zaragosi@ipmc.cnrs.fr)

D P.B., 0000-0001-9632-6483; L.-E.Z., 0000-0001-6747-7928

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Montanes et al., 2018; Plasschaert et al., 2018; Vieira Braga et al., 2019), providing a first panorama of human airway cell diversity and lineages that we are extending here, after analyzing single-cell RNA-seq data in fresh human airway epithelial tissues and throughout an experiment in 3D *in vitro* regeneration of human airway epithelium. The resulting cell trajectory roadmap of human airways identifies novel cell populations and offers new insights into molecular mechanisms taking place during the mucociliary epithelium regeneration.

RESULTS

Reconstruction of cell lineage in regenerating airway epithelium by single-cell RNA-seq

We have analyzed single-cell transcriptomes at successive stages during *in vitro* 3D differentiation of human airway epithelial cells (HAECs) (Fig. 1A,B). This *in vitro* model faithfully recapitulated cell population compositions found in native airway tissues, as shown by a comparison between single-cell (sc) RNA-seq of epithelial cells dissociated from nasal brushing samples or from



Fig. 1. Characterization of multiciliated and goblet cell lineages during airway epithelium regeneration using single-cell RNA-Seq. (A) Model of upper airway epithelium, based on six major types of epithelial cells, with consensus lineage hierarchy. (B) scRNA-seq experimental design. Regenerating airway epithelia were dissociated on successive days (7, 12 and 28) after a transition to an air-liquid interface (ALI). (C) t-SNE plots of the scRNA-seq expression data highlighting the main cell types observed at ALI 7 (3426 cells), ALI 12 (2785 cells) and ALI 28 (3615 cells) (gray, unassigned cells). (D) Relative abundance of the six main cell types at each time point. (E) Aggregate t-SNE plot of gene expression in 9826 cells. (F) Inference of goblet and multiciliated cell lineages by Monocle 2, based on an aggregate of the entire experiment. Color code is the same as in C. Inset shows pseudotime picturing using a white-to-gray gradient along the differentiation trajectory. (G) Distribution of the six main cell types in the pseudotime along the two branches of the trajectory from F (bottom, goblet cell branch). (H) Heatmap representing the smoothened temporal expression pattern of a representative list of cell type-specific markers, with branch representations as in G. Cells were ordered by branch, then cluster emergence, then pseudotime.

Development (2019) 146, dev177428. doi:10.1242/dev.177428

fresh nasal turbinates and scRNA-seq of HAECs at a late time point of *in vitro* air-liquid interface differentiation (3D cells) (Fig. S1). Most of our results were obtained with HAECs that were differentiated in Pneumacult media (StemCell Technologies), which allows the production of multiciliated cells and goblet cells. Additional experiments were also performed with HAECs differentiated in BEGM (Lonza), which rather favors the production of multiciliated cells. Cell identity was inferred from the expression of specific marker genes, such as KRT5 and TP63 for basal cells (BCs), SCGB1A1 for club cells (CCs), MUC5AC for goblet cells (GCs), and FOXJ1 for multiciliated cells (MCCs). These cell types were robustly found in all samples at various proportions (Fig. S1A-C). We also confirmed that cell type proportions inferred from scRNA-seq were correlated with cell type proportions inferred from protein measurements by performing immunostaining of selected population markers (Fig. S1D,E). Cell dissociation did not produce a major impact on gene expression with the exception of FOS and FOSB (Fig. S2). Molecular function enrichment with Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen) showed that 'cell death and survival' and 'cellular growth and proliferation' were the only molecular functions that were regulated with P<0.001 (Fig. S2C).

Single-cell transcriptomes of HAECs differentiated in Pneumacult medium were analyzed at three time points [after transition to an air-liquid interface (ALI) 7, ALI 12 and ALI 28] (Fig. 1B), which are representative of the proliferation, polarization and specification steps of regeneration (Chevalier et al., 2015). This experiment was complemented by six additional time points of HAECs differentiated in BEGM medium (ALI 2, ALI 4, ALI 7, ALI 12, ALI 17 and ALI 22). In the first approach, each time point was analyzed independently. We carried out 10 random selections of cells, corresponding to subgroups containing 90% of the initial number of cells. The resulting gene expression submatrices were then iteratively clustered (10 times with varying parameters), and a census was applied to define the most robust cell types. We then studied the variations of these populations during the entire time course. Cells clustered in six main populations in Pneumacult: (1) cycling (MKI67+) BCs; (2) non-cycling (MKI67-) BCs (KRT5+/ TP63+); (3) supraBCs (KRT5+/TP63-/KRT13+/KRT4+); (4) CCs (SCGB1A1+); (5) GCs (MUC5AC+); and (6) MCCs (FOXJ1+)(Fig. 1C; Table S1). Cell population proportions evolved during the time course, with a global reduction in BCs and CCs, an initial detection of supraBCs at ALI 7, followed by an increase of the proportion of this cell population at ALI 28, and an initial detection of GCs and MCCs at ALI 28 (Fig. 1D). In BEGM, cells clustered in seven cell populations (Fig. S3A, B and Table S2). We did not detect CCs and GCs using this culture condition, but found instead a cell population that we termed 'Club-like cells', given their high gene expression similarity with CCs, except for SCGB1A1, which was not detected (Fig. S4). Additional cell types were found in these samples: KRT5- supraBCs (TP63-/KRT13+/KRT4+) and two cell populations that we termed as 'undefined intermediates 1' and 'undefined intermediates 2' because their gene expression profiles did not allow unambiguous classification. Inter-donor variability was assessed by analyzing ALI cultures from independent donors in both BEGM and Pneumacult media. Very similar cell population distributions were found across donors and differences between the two cell culture media were maintained in all samples (Fig. S5). An aggregated t-SNE graph for all cells at all time points for each medium condition was plotted (Pneumacult, Fig. 1E; BEGM, Fig. S3C). Cell trajectories and transitions from one cell population to another were deduced from a trajectory inference analysis using Monocle 2, followed by differential expression analysis between

consecutive cell states in pseudotime using Seurat. Fig. S6 shows the position of all cells within pseudotime and trajectories colorcoded according to their experimental time point of origin. In BEGM, a unique cell trajectory was found (Fig. S3D), starting with cycling and non-cycling BCs at its beginning, followed by KRT5+ and then KRT5- supraBCs cells, with MCCs at its end. Despite the absence of SCGB1A1 expression in secretory-like cells (SCGB1A1 - /BPIFA1 + /KRT8 +), these cells were ordered in the pseudotime before MCCs, as expected for canonical CCs (Fig. S3D-F). A more complex trajectory was observed with Pneumacult, in which Monocle 2 detected a bifurcation into two distinct branches after the SC stage: a larger branch leading to FOXJ1+ MCCs, and a smaller one leading to MUC5AC+ GCs (Fig. 1F,G). A closer examination of pseudotime ordering and differential gene expression (Fig. 1H) revealed that some MUC5AC+ cells were found on the MCC branch, after the GC bifurcation and that some FOXJ1+ cells retained expression of MUC5AC. Altogether, our findings confirm CCs as precursors of both MCCs and GCs. They also suggest that GCs can also act as MCC precursors in airway epithelial regeneration.

Goblet cells can be differentiation intermediates for multiciliated cells

We further tested the hypothesis that some GCs correspond to MCC precursors. In clustering analyses, either from fresh tissues or from in vitro samples, GC and CC populations displayed very similar gene expression profiles, being discriminated by higher MUC5AC and MUC5B expression levels in GCs (Table S1). In Pneumacult, 24 of the 54 top genes for GCs were also associated with CCs (Fig. 2A), including SCGB1A1. Expression of MUC5AC and MUC5B was stronger in GCs (Fig. 2B). A direct assessment of differential gene expression between cells located at the two ends of the GC branch confirmed the high similarity of gene expression existing between CCs and GCs (Fig. 2C; Table S3A,B). GCs differed from CCs by higher levels of mucins (MUC1, MUC4, MUC5B and MUC5AC), secretoglobins (SCGB1B1 and SCGB3A1), PLUNC antimicrobial factors (BPIFA1 and BPIFB1) and SLPI, the secretory leukocyte protease inhibitor (Fig. 2C). These properties led us to consider GCs as 'hyperactive' CCs and led to the prediction that these cells could also function as MCC precursors. This point was tested by quantifying the expression of MUC5AC and FOXJ1, and by measuring the percentage of doublelabeled cells. Detecting cells simultaneously expressing MUC5AC and FOXJ1 would suggest the existence of a transitory state between GCs and MCCs. Fig. 2D,G,J indeed shows that 8.9% of GCs and MCCs simultaneously express MUC5AC and FOXJ1. It also shows the existence of CCs/MCCs expressing both SCGB1A1 and FOXJ1, which correspond to a more conventional type of precursor for MCCs (Fig. 2M). The presence of *MUC5AC+/FOXJ1*+ and *SCBG1A1+/FOXJ1*+ cells was not restricted to a cell culture differentiation model, and these transitionary cells were also detected in fresh biopsies from human homeostatic bronchi (Fig. 2E,H,K,N) and newborn pig trachea (Fig. 2F,I,L,O).

Hybrid cells were also detected by qRT-PCR in a fully independent HAEC culture, after isolation of the cells using C1 technology (Fluidigm) and quantification of gene expression with a Biomark (Fluidigm). Cells isolated with the C1 were visually inspected, and these experimental settings ensured the absence of cell doublets. Four cells out of 74 expressed GC-specific genes (namely *MUC5AC*, *MUC5B* and *TFF3*), together with MCC-specific genes (*FOXJ1*), and more specifically, immature



Fig. 2. Goblet cells as differentiation intermediates for multiciliated cells. (A) Venn diagram illustrating the closeness of the best marker genes for club and goblet cells deduced from scRNA-seq of cells differentiated in Pneumacult medium (ALI 28). (B) Violin plots of normalized expression of *SCGB1A1*, *MUC5AC* and *MUC5B*, three markers of club and goblet cells. (C) Heatmap of the most differentially expressed genes between groups of suprabasal, club and goblet cells at key points in the pseudotime (before branching, start of the GC branch and end of the GC branch). Cells are ordered by pseudotime. Bars on the top of the heatmap indicate cell type and pseudotime. (D-F) t-SNE plots of expression from scRNA-seq of ALI 28 (D), bronchial biopsy cells (E) and newborn pig tracheal cells (F). (G-I) Highlights of gene expression for *FOXJ1*+ cells (blue), *MUC5AC*+ cells (green) and *FOXJ1+/MUC5AC*+ cells (pink) in the same samples as in D-F. (J-L) Relationships between normalized expression of *MUC5AC* and *FOXJ1* in the three same samples. (M-O) Highlights of gene expressions for *FOXJ1*+ cells (pink). (P) Immunodetection of cells co-expressing markers of multiciliated cells (acetylated tubulin) and of goblet cells (MUC5AC) (left) or of club cells (SCGB1A1) (right). Scale bars: 50 µm. (Q) Representation by a t-SNE plot (scRNA-seq of cells differentiated in Pneumacult medium at ALI 28) of the RNA velocity residuals colored according to estimates of the positive (red) and negative (blue) residuals for a multiciliated cell marker (*MUC5B*) and a club cell marker (*SCGB1A1*).

MCC genes (*PLK4*, *MYB* and *CDC20B*) (Revinski et al., 2018) (Fig. S7A,B). This result was confirmed after re-analyzing a recently published dataset (Plasschaert et al., 2018) (Fig. S7C,D). A further confirmation came from the detection at the protein level of cells that were simultaneously labeled for MUC5AC and acetylated tubulin, a specific protein marker of the cilia (Fig. 2P). A final point

came after a survey of our data with two additional algorithms: 'RNA velocity' (La Manno et al., 2018) and Palantir (Setty et al., 2019). RNA velocity can predict the fate of individual cells over a timescale of hours by distinguishing the expression of spliced and unspliced forms of transcripts. We analyzed with RNA velocity the behavior of *CEP41*, *SCGB1A1* and *MUC5B*, in which *CEP41* is an early marker of multiciliated cells differentiation. RNA velocity calculates a residual value of each gene, which indicates expected upregulation when it is positive and expected downregulation when it is negative. Positive residuals were found for transcripts of CEP41 in the GC population, predicting an upregulation of CEP41 over the following hours. A different picture was observed for the transcripts of SCGB1A1 and MUC5B, in which negative residuals were found in the GC and CC populations, indicating an expected downregulation of the corresponding transcripts over the following hours (Fig. 2Q). We then explored the same dataset with Palantir, another algorithm that models cell trajectory, with which we confirmed the presence of GCs on the MCC branch (Fig. S7E). The score for differentiation potential was highest for cycling basal cells. A high score was also found in the MCC branch in a region containing both CCs and GCs, before the gap separating them from MCCs (Fig. S7F), further suggesting a high probability to differentiate into at least two distinct trajectories. Estimation of gene expression trends showed an upregulation and then a downregulation of both MUC5AC and MUC5B along the pseudotime in cells committed to the MCC lineage (Fig. S7G). Finally, computing branch probabilities of randomly selected GCs on the MCC branch showed that some of them have between 24.7% and 49.7% chance of following the MCC trajectory (Fig. S7H). Altogether, these data indicate that GCs can act as precursors for MCCs in normal in vitro and in homeostatic in vivo airway regeneration.

Refining cell clustering identifies six additional clusters, including a discrete population of pre-MCC 'deuterosomal' cells

To gain further insight into the diversity of cell populations composing the airway epithelium and the transitionary cell populations occurring during the regeneration, we considered additional clusters that could be derived from our sub-clustering analysis, by accepting less discriminations between them than between the six previously identified clusters. This deeper analysis led to the identification of 12 clusters, instead of six (Fig. 3A; Fig. S8A and Table S4). The non-cycling BC population was split into two clusters that we termed BC1 and BC2. The major difference between these two clusters was the higher level of expression of genes associated with cell migration: FN1, VIM, SPARC and TAGLN in the BC2 cluster. Analysis of enriched canonical pathways with Ingenuity Pathway Analysis showed enrichment for integrin, actin cytoskeleton and Rho GTPase signaling, as well as the pathway 'regulation of actin-based motility' in BC2 compared with BC1, suggesting an increased migratory activity in BC2 (Fig. S9). The supraBC and CC populations could also be further split into three new populations of supraBC and three new populations of CCs (Fig. 3A; Fig. S8A). Each of them displayed its own distinct gene set enrichment (Fig. S9). The CC2 subpopulation displayed a strong enrichment score for the feature 'immune cell migration, invasion and chemotaxis', and a strong positive enrichment for canonical pathways such as 'neuroinflammation signaling' and 'dendritic cell maturation'. This was explained by an increased gene expression of targets for pro-inflammatory molecules such as TNF, IFNG, NFkB, IL1A/B, IL2 or IL6, as well as decreased gene expression for targets for the anti-inflammatory PPARG pathway (Fig. S9). This may confer to this subpopulation of CCs a unique relationship with the immune response. This subpopulation was confirmed in nasal and bronchial epithelia in a subset of healthy subjects from a Human Cell Atlas cohort (data not shown).

The MCC group of FOXJ1+ cells was further split in two discrete clusters: (1) the largest one is positive for mature MCC genes such as DNAH5, and corresponds to terminally differentiated MCCs; (2) the second one specifically expresses several molecules that are important for the biosynthesis of hundreds of basal bodies from which motile cilia elongate. Among them is DEUP1, a hallmark of massive centriole amplification at deuterosomes (Fig. 3B). We named these cells 'deuterosomal' cells. This subpopulation is clearly distinct from mature MCCs (Fig. 3B) and expresses highly specific markers such as PLK4, CCNO and CEP78 (Fig. S10A and Table S5A-C). Existence of deuterosomal cells was confirmed in mouse tracheal epithelial cells (MTECs) dissociated at ALI 3, in newborn pig trachea and in human bronchial biopsy tissue (Fig. 3C; Fig. S10B,C). All samples, even under homeostatic conditions, displayed deuterosomal cells that clustered independently of mature MCCs. In adult mouse trachea, we detected Deup1+ cells by immunohistochemistry that were clearly distinct from mature MCCs (multiple centrioles but no cilia). MCCs were devoid of Deup1 protein (Fig. S10D). Deuterosomal cells expressed unique gene markers, but also genes found in MCCs and cycling BCs (Fig. 3D). Our analysis found 149 specific genes, and 33 and 244 genes shared with cycling BCs and mature MCCs, respectively (Fig. 3E; Table S5). Among the 33 genes in common with cycling BCs, we noticed the re-expression of several cell cycle-related genes, which are required for the massive amplification of centrioles that takes place (Al Jord et al., 2017; Revinski et al., 2018). The most specific genes are displayed in Fig. 3E. This analysis not only confirms the known expression of CDK1 in deuterosomal cells (Al Jord et al., 2017), it also highlights the expression in deuterosomal cells of genes coding for centromere proteins (CENPF, CENPU and CENPW), securin (PTTG1), a core subunit of the condensing complex (SMC4) and cyclin-dependent kinase regulatory subunits (CKS1B and CKS2). We confirmed the deuterosomal-specific expression of CDC20B, the miR-449 host gene that we have recently shown to be a key regulator of centriole amplification by deuterosomes (Revinski et al., 2018). Incidentally, a splice variant of this gene was detected, including a novel exon near the location of the miR-449 family (Fig. 3B; Fig. S11A). This short CDC20B isoform was also detectable in mouse RNA-seq data (Fig. S11B). Comparison of transcript abundance in several samples, including the Pneumacult ALI 28 and the human bronchial biopsy tissue, showed higher levels for short CDC20B (Fig. S11C,D), which likely corresponds to the major source of miR-449 in deuterosomal cells. A list of novel markers of deuterosomal cells that are specifically expressed in this cell population is provided in Table S5. Some of these genes have never been described before in the context of centriole amplification, such as the yippee-like factor YPEL1 or the Notch pathway-related hairy-enhancer-of-split family of transcription factors HES6 (Fig. S10A-C). Gene set enrichment of the deuterosomal population-specific genes (Fig. 3F) showed enrichments for 'cilium assembly' and 'centrosome maturation', but also cell-cycle mechanism-related terms such as 'resolution of sister chromatid cohesion', 'regulation of AURKA', 'PLK1 activity' and 'CDH1 autodegradation'. 'Mitochondrial membrane part' was also among the enriched terms, suggesting an increase in mitochondria numbers at this stage. This signature perfectly delineates the events occurring at this MCC differentiation stage and provides an extensive repertoire of specific cell-cycle related genes that are re-expressed at the deuterosomal stage. The pool of deuterosomal cells was consistently larger than recently described rare cell populations such as ionocytes (Montoro et al., 2018; Plasschaert et al., 2018), which we also identified (Fig. S8C).



Fig. 3. Deuterosomal cells form a discrete multiciliated cell intermediate population with a centriole amplification signature. (A) Subclusterization of scRNA-seq from cells differentiated in Pneumacult medium (ALI 28) into 12 cell types, deduced from intra-heterogeneity analysis of the six initial clusters. (B) Illustration of the specific expression of *DEUP1* and *short CDC20B* in the deuterosomal cell population (low to high expression, gray to red). (C) Identification of the cluster of deuterosomal cells in scRNA-seq data from a biopsy of human bronchi, newborn pig trachea and mouse primary culture (MTEC, ALI 3, stage of higher centriole amplification). Light blue, deuterosomal cells; dark blue, multiciliated cells. (D) Venn diagram showing that overlaps exist between top gene markers of deuterosomal cells (light blue) and those of proliferative (pink) or multiciliated cells (dark blue). (E) Dot plot of marker genes for the deuterosomal cell population. Color gradient (gray to red) and dot size indicate for each cluster the mean marker expression and the percentage of cells expressing the marker, respectively. (F) Enriched gene sets in deuterosomal cell marker genes.

Establishing a keratin switch pattern during airway regeneration

A rich repertoire of keratins is expressed in different epithelial cells, depending of cell type, period of embryonic development, stage of histological differentiation, cellular growth environment, disease state, etc. We screened our scRNA-seq data for expression of different keratins, besides *KRT5* and *KRT14*, which are bona fide BC markers in the airways and lung, but also in bladder (Colopy et al., 2014), prostate (Hudson et al., 2001) and mammary gland (Jumppanen et al., 2007), or for KRT8, which is clearly associated with luminal cell types (Rock et al., 2009). A recent study performed on mouse and human models of in vitro regeneration identified KRT4 and KRT13 in a subpopulation reminiscent of our supraBCs, as it emerges between BCs and CCs (Plasschaert et al., 2018). Our repertoire of KRT expression during airway regeneration was based on pseudotime ordering in our Pneumacult ALI 28 dataset. Our analysis confirmed the presence of KRT5 and KRT14 in BCs, of KRT4 and KRT13 in supraBCs, and the expression of KRT8 in luminal cell types (CCs, GCs and MCCs) (Fig. 4A,E). Unlike recent data obtained by Plasschaert et al. under similar conditions (Plasschaert et al., 2018), who showed parallel RNA expression of *KRT13* and *KRT4*, we consistently noticed that expression profiles of KRT13 and KRT4 were slightly de-correlated, with KRT13 detected at earlier pseudotimes than KRT4. This was confirmed at the protein level by a quantification of immunostainings of the proportion of KRT5+/KRT13+ and KRT5+/KRT4+ double-positive cells (Fig. 4B). Fig. 4C shows that there were more KRT5+/KRT13+ (7.4%) than KRT5+/KRT4+ (4.9%) double-positive cells, consistent with an earlier expression of KRT13 compared with KRT4. A similar observation was made in the newborn pig trachea, in which we also found a very clear shift, with 16.8% and 11.2% of KRT5+/KRT13+ and KRT5+/KRT4+ double-positive cells, respectively (Fig. 4D). Our results show that KRT4 and KRT13 are not strictly expressed at the same time during airway regeneration and their expression delineates subtle differences in cell subpopulations. In homeostatic nasal epithelium, we noticed an even greater uncoupling of KRT4 and KRT13 expression at RNA and protein levels. In scRNA-seq, KRT13 was highest in cycling BCs, then in BCs and supraBCs. KRT4 was highest in CCs, then in supraBCs and cycling BCs (Fig. S12A). Immunostaining on nasal turbinate epithelium confirmed that KRT13 was predominantly found at a basal position, and KRT4 at a luminal position (Fig. S12C). Hence, KRT4 and KRT13 cell-type specificity might differ according to the homeostatic or regenerative status. Additional keratins, such as KRT16 and *KRT23* displayed a specific supraBC expression (Fig. 4E). We also identified additional keratins that were more specifically associated with differentiated cell types: KRT7 and KRT19 were strongly enriched in CCs, but their expression completely dropped in MCCs, while KRT8 was still expressed (Fig. 4E). Expression patterns for these cell type-specific keratins were confirmed by immunohistochemistry on sections of ALI culture and nasal epithelium (Fig. 4F; Fig. S12B,D). Altogether, our data indicate that the keratin repertoire can be sufficiently specific to reconstruct cell trajectories during airway regeneration.

Establishing a combinatorial repertoire of signaling pathways during airway regeneration

We have finally analyzed the cell specificity of expression of important signaling pathways in order to determine mutual influences between distinct cells that could play a role in airway regeneration. Our investigation was focused on the Notch, BMP/TGF β and Wnt pathways. For each different component, we classified them as ligands, receptors, or targets. The expression profiles are shown as heatmaps, with cells being sorted by their subgroups.

Notch pathway

BCs express the ligands DLL1, JAG1 and JAG2, as well as the receptor NOTCH1, as expected (Plasschaert et al., 2018; Rock

et al., 2009). In this population, no target gene expression was detected, suggesting an inactive pathway. BCs also express LFNG, which is known to inhibit JAG1 signaling via NOTCH1 (Yang et al., 2004). SupraBCs cells express NOTCH1, JAG1 and JAG2, and show clear activation of the Notch pathway by expression of the target genes HEY1, HES2 and HES4. NOTCH3 expression is turned on and is specific to this population. In CCs/GCs, NOTCH2 is the major receptor to be detected and signal activation remains, as evidenced by the expression of HEY1 and HES4. CCs/GCs also express the non-canonical Notch ligand NTN1. In deuterosomal cells/MCCs, a clear shift is observed. Expression of NOTCH2, NOTCH3, HEY1 and HES4 is reduced, and NOTCH4 is specifically expressed. As previously described, JAG2 (Plasschaert et al., 2018), which is present in BCs then absent in supraBCs and CCs/BCs, is re-expressed in the MCC compartment. We have found the same behavior for DLL1 and the non-canonical ligand DNER. Thus, MCC express some Notch ligands. Strikingly, a major inhibitory signature dominates in MCCs, with the expression of CIR1 and SAP30, two transcriptional corepressors, and of DYRK1A, an inhibitor of the NICD. HES6, the expression of which is not regulated by Notch signaling but has been identified as a Notch pathway inhibitor (Bae et al., 2000), is highly enriched in deuterosomal cells (Figs 5A and 3E). We have confirmed at the protein level an enrichment of SAP30 in MCCs (Fig. S13A).

Wnt pathway

The Wnt target genes SNAI2 and TCF4, which are indicators of an active pathway, are mainly enriched in the BC population, especially in BC2 for SNAI2. We have confirmed enrichment of SNAI2 in BCs at the protein level (Fig. S13B). In the BC population, WNT10A and LRP1 are strongly enriched, and several SOX family members (SOX2 and SOX21) are underrepresented, especially in the cycling BCs, suggesting an activation of the pathway in this compartment. In the MCC population, the situation is more complex. Despite the slight expression of TCF4 together with positive regulators of the pathway, such as WNT9A, FZD6, APPL2, CSNK1G1 (a casein kinase component that can act as an activator or inhibitor of the pathway; Cruciat, 2014), no SNAI2 expression is detected, and known repressors of the Wnt pathway are also overrepresented. Indeed, MCCs express significant levels of the transcriptional repressors SOX2 and SOX21, and display strong enrichment for the reptin components RUVBL1 and RUVBL2 (Fig. 5B).

BMP/TGFβ

BMP ligands, such as *BMP2* and *BMP7*, are enriched in the BC population, while *BMP3* and *BMP4* are both enriched in the CC/GC populations. We did not find any specific cell population expression for BMP receptors. Specific expression of *FST* (follistatin) and *FKBP1A* (also known as *FKBP12*), two BMP inhibitors, was found in BCs, which was confirmed for FST in BCs at the protein level (Fig. S13C,D). Regarding the TGF β pathway, a clear signal of activation is detected in the deuterosomal/MCC population, with specific expression of the target genes *SERPINE1* (PAI-1), *CTGF*, *ATF3*, *TGFBR3* and *IRF7*, consistent with the previous finding that TFG β pathway regulates motile cilia length by affecting the transition zone of the cilium (Tözser et al., 2015). We did not detect TGF β ligands in the MCC population but rather found them expressed in BCs (TGFB1) and supraBCs (TGFB3).

We have confirmed the main distribution of the three pathway components in samples differentiated with the BEGM medium



Fig. 4. Keratin signature switch during airway regeneration. (A) Plot of normalized gene expression of keratins according to pseudotime from scRNA-seq of cells differentiated in Pneumacult medium (ALI 28). (B) Double immunofluorescence staining for KRT5 and KRT13, KRT4 or KRT8. White arrowheads indicate doubly labeled cells (KRT5+/KRT13+, KRT5+/KRT4+, KRT5+/KRT8+). Nuclei are shown in blue (DAPI). (C) Quantification of double-positive cells from B. ***P*<0.01 (Wilcoxon test). The black line inside each box represents the median. The vertical size of the boxes are the interquartile range, or IQR. Whiskers indicate 1.5×IQR for the box at the extreme left, or most extreme values in the other two boxes. (D) tSNEs of scRNA-seq data from pig tracheal epithelial cells. *KRT5*+ cells are shown in emerald green, *KRT13*+ cells are shown in red, *KRT4*+ cells are shown in yellow-green and double-positive cells are shown in black. The indicated percentage corresponds to double-positive cells. (E) Heatmap for scRNA-seq data from Pneumacult ALI28 showing gene expression for keratins. (F) Immunohistochemistry for KRT5, KRT7 and acetylated tubulin or SCGB1A1 on sections of Pneumacult fully differentiated *in vitro* epithelium. Arrows indicate KRT7+ luminal non-multiciliated cells. Scale bars: 20 μm.



Fig. 5. Single-cell expression of signaling pathway components during airway regeneration. (A) Heatmap of the genes related to the Notch pathway with cells ordered by clusters. (B) Heatmap of the genes related to the Wnt pathway with cells ordered by cluster. (C) Heatmap of the genes related to the BMP/TGFβ pathway with cells ordered by cluster. (D) Violin plots for selected genes in the bronchial biopsy and nasal turbinate samples. (E) Summary of the major partners involved in specific cell types for the three pathways.

(Fig. S14) and in two fresh tissue samples (human bronchial biopsy and nasal turbinate) for which a selection of genes is shown in Fig. 5D. Collectively, our data provide for the first time a detailed account of Notch, Wnt and BMP signaling pathways at work during airway regeneration, with receptors and ligands specifically expressed at each cell stage.

DISCUSSION

We have established here a comprehensive single-cell atlas throughout the entire time course of human nasal airway differentiation in vitro. We quantified the proportion and identity of each cell population at carefully chosen time points after the establishment of the air liquid interface. We provide the first comparison between the most widely used culture media in the 3D culture of airway epithelial cells, BEGM (with which the majority of studies have been performed), and a more recently available commercial medium, Pneumacult. In the BEGM medium, we have performed analyses at earlier time points, i.e. ALI 2 and ALI 4. These time points allowed us to measure the extent of cell proliferation during in vitro regeneration. Cycling BCs accounted for ~40% of total cells at ALI 2 and ALI 4, and this number dropped to 5% at ALI 7. These early time points also showed that supraBCs appeared early under these conditions, being already detected at ALI 4. With BEGM, we never detected any GCs (MUC5AC+) or 'canonical' CCs (SCGB1A1+), even after long periods of time and using several dozens of cultures from distinct donors (Figs S1, S3, S4; data not shown). However, we found a cell population that we have termed 'club-like'. These 'club-like' cells express a gene pattern very similar to that of canonical CCs, and they can differentiate into MCCs. Interestingly, GCs were detected in BEGM medium after IL13 treatment (Laoukili et al., 2001; data not shown). Future work should investigate whether club-like cells first evolve into canonical CCs and then GCs upon IL13 treatment.

In Pneumacult, but also in freshly dissociated human bronchial biopsy tissue and newborn pig trachea, we have detected hybrid cells expressing both MUC5AC and FOXJ1. This finding is consistent with our lineage inference, as RNA velocity and Palantir analyses consistently defined GCs as possible precursors of multiciliated cells. Other groups have previously detected cells expressing both markers, in a context of GC hyper/metaplasia induced by Sendai virus infection or after IL13 treatment and in asthma (Gomperts et al., 2007; Turner et al., 2011; Tyner et al., 2006; Vieira Braga et al., 2019). These findings led some of them to hypothesize a transdifferentiation of MCCs into GCs. However, no convincing data support this conclusion and none of these data show a difference in the number of these hybrid cells between control and treated conditions. For example, Turner and colleagues (Turner et al., 2011) postulated this after performing in vitro lentiviral transduction of HAECs with a vector containing a Cre recombinase under the control of the FOXJ1 promoter. However, no control demonstrated the absence of leakage of the FOXJ1 promoter and these findings were not confirmed by Rajagopal's group who showed no GCs arising from MCCs in a context of OVA-induced mucous metaplasia in mouse airways, using in vivo lineage tracing with Foxi1-cre mice (Pardo-Saganta et al., 2013). Our contribution to resolve this conundrum is by showing that these hybrid cells do exist in the absence of I-13 stimulation and in healthy subjects. We therefore suggest that their expression profiles place them more straightforwardly as alternative precursors of MCCs than as transdifferentiated MCCs.

As our work was performed on either cultured or fresh cells from nasal or lung airways derived from three distinct animal species, the generalization of some of our conclusions to mouse, human and pig airways is probably justified. This is probably the case for the general mechanisms of MCC and GC differentiations. At the same time, we are also aware of the important gradients of gene expression that exist between different compartments, as already documented between nose and bronchi (Giovannini-Chami et al., 2018). Future work will have to address the origins of these spatial

idiosyncrasies. Our study was also not intended to characterize rare cell types such as pulmonary neuroendocrine, brush cells or ionocytes, which have recently been described elsewhere. We confirm the detection of cells displaying high levels of expression of CFTR, ASCL3 and FOXI1, corresponding to pulmonary ionocytes (Montoro et al., 2018; Plasschaert et al., 2018). Our investigation was more focused on the main cell types that compose the epithelium, and their underlying mechanisms of differentiation. Three subtypes of BCs were identified, including a group of cycling BCs, and a group of BCs expressing higher levels of genes involved in extracellular matrix connection and actin-based motility. This latter group is reminiscent of that described by Coraux et al. who showed that airway BCs undergo changes in the cytoskeleton organization and acquire mesenchymal cell-associated vimentin as well as various matrix metalloproteinases necessary for migration above the denuded basement membrane in response to injury (Coraux et al., 2008). This BC subtype is probably specific to regeneration and should not be detected in homeostatic samples. Accordingly, few such cells were found in nasal and bronchial epithelial samples from 12 healthy subjects of the Human Cell Atlas (data not shown).

The specificity of the secretory compartment comes from one club cell subpopulation that displayed an immune-related gene signature. So far, diversity within the club cell compartment is thought to be established after expression of different members of the secretoblogin family (Reynolds et al., 2002) or via an appropriate activation level of the Notch pathway (Guha et al., 2014). We propose that diversity within this cell compartment should also include specialized functions related to the interaction between the epithelium and immune cells. Additional experiments, including protein labeling on fresh tissue sections from several levels of the airways, have now to be performed in order to confirm this diversity and identify the spatial distribution of these subpopulations.

Our study has also provided a first extensive gene signature of the deuterosomal population, which plays a key role during MCC differentiation. This population comprises three to four times fewer cells than the MCC population, suggesting that each cell transits quickly through this stage. In line with what has been shown recently by our group and others (Al Jord et al., 2017; Revinski et al., 2018; Vladar et al., 2018), cell cycle-related genes become reexpressed in this population of non-cycling cells. We have confirmed the very specific expression of CDC20B, a key player of centriole amplification (Revinski et al., 2018), and have identified, both in human and mouse, a novel isoform of this transcript that displays higher expression than the annotated long isoform. As the pre-mRNA corresponding to this short isoform comprises the *miR-449*-encoding intron, we suggest that this isoform should indeed be the major source of miR-449 in deuterosomal cells. The alternative splicing that is responsible for this alternative isoform might represent an optimization of gene expression regulation to efficiently increase miR-449 levels.

We also characterized the distribution of important signaling pathways. We started with the Notch pathway as it is a major regulator of the mucociliary differentiation. We have confirmed the distribution of ligands and receptors described by others (Mori et al., 2015; Pardo-Saganta et al., 2015b; Plasschaert et al., 2018; Rock et al., 2011). Absence of *HES4* expression, the most representative target gene in our model, confirmed the absence of Notch activation in BCs and MCCs. BCs rather express *NOTCH1* and NOTCH ligands. However, no clear Notch pathway activation can be detected within this cell population even in a patchy manner as

might be expected from Notch lateral inhibition. This absence of activation might result from the weak NOTCH1 expression or the expression of Notch inhibitors such as the ligand LFNG or casein kinase II subunit beta (CSNK2B) (Cheng et al., 2014; Wang et al., 2014). Inhibition of the Notch pathway in MCCs at the end of multiciliogenesis has been widely documented. Here, the specific expression of several Notch transcriptional inhibitors at the deuterosomal stage suggest a novel mechanism for this inactivation. This is the case for HES6, an inhibitory HES acting through HES1 binding (Bae et al., 2000; Nam et al., 2016), DYRK1A, an inhibitor of Notch intracellular domain transcriptional activity (Fernandez-Martinez et al., 2009), as well as CIR1 and SAP30, which are transcriptional repressors of the Notch/CSL transcriptional complex (Hsieh et al., 1999). On the other hand, CCs must undergo clear Notch activation to maintain cell identity and differentiate into GCs (Pardo-Saganta et al., 2015b; Rock et al., 2011; Tsao et al., 2009). However, the onset of activation of this signal has not been widely studied. Mori and colleagues have described NOTCH3 expression in TP63-negative cells in a parabasal position of the epithelium, which likely correspond to the cells that we and others have termed supraBCs (Mori et al., 2015). We have confirmed that the NOTCH3 transcript is absent from BCs and becomes upregulated in supraBCs. We went further by showing that HES4 becomes expressed at this cell stage, confirming that Notch pathway activation starts at the supraBC stage. We emphasize here the importance of this intermediate cell population for establishing Notch activation and subsequent differentiation, even though it has not been well characterized so far.

The Wnt/β-catenin pathway has been less extensively studied in the context of airway epithelium differentiation (Brechbuhl et al., 2011; Malleske et al., 2018; Schmid et al., 2017; Smith et al., 2012; Zemke et al., 2009). Crosstalk with Notch has been suggested in non-airway studies: in hair follicle precortex. B-catenin stimulates Notch signaling by inducing Jag1 transcription (Estrach et al., 2006). In the airway epithelium, β -catenin signaling is required at 'specification', i.e. early stages of GC and MCC differentiation, but was detrimental at later stages (Malleske et al., 2018). Ordovas-Montanes et al. have recently shown that Wnt is also related to inflammatory-induced epithelial remodeling. In nasal polyps, an imbalance between Wnt and Notch signaling favors Wnt signaling and GCs at the expense of MCCs (Ordovas-Montanes et al., 2018). In airway smooth muscle cells, WNT5A is associated with remodeling in a context of airway hyperresponsiveness (Koopmans et al., 2016). In HAECs from individuals with chronic obstructive pulmonary disease, WNT4 upregulation increases IL8 and CXCL8 gene expression (Durham et al., 2013). Interestingly, WNT5A and WNT4 were specifically expressed by the subpopulation of CCs related to immune response. This finding further reinforces the hypothesis of a role for this CC population in the inflammation-induced airway remodeling.

Based on expression of the target genes *TCF4* and *SNAI2*, activation of the Wnt pathway is confined to the BC population. *SNAI2* enrichment in the basal cell compartment had already been noticed by Rock and colleagues upon sorting of basal cells from mouse trachea (Rock et al., 2009). This population also strongly and specifically expresses the ligand *WNT10A*, suggesting an autocrine regulatory loop. WNT10A is also BC specific in other epithelia, such as the mammary epithelium (Ji et al., 2011). In fallopian organoids, Wnt has been shown to be essential for stemness (Kessler et al., 2015) and for self-renewal, but not for proliferation, in basal-like breast cancer cells (DiMeo et al., 2009). Thus, autocrine

WNT10A signaling may also regulate self-renewal in the BC compartment of the airway epithelium. In contrast, we have observed in MCCs a specific expression of the two ATP-dependent DNA helicases from the Reptin family that act as Wnt signaling repressors (Bauer et al., 2000; Weiske and Huber, 2005). Additional investigations should certainly be carried out to characterize more precisely the role of Wnt/ β -catenin during airway epithelial regeneration.

Regarding the TGF β /BMP pathway, our data strongly suggest inhibition of this pathway in the BC compartment. As this signaling is considered to be a brake for proliferation, our findings are consistent with a previous report showing maintenance of a proliferative potential of this progenitor population by dual SMAD inhibition (Mou et al., 2016).

Conclusions

We provide several novel insights in the dynamics of airway differentiation by positioning goblet cells as possible precursors of multiciliated cells: this illustrates how cells carrying specialized function, i.e. club and goblet cells, can still constitute differentiation intermediates for other specialized cells, i.e. multiciliated cells. We also identify subpopulations of basal, suprabasal, club and multiciliated cells. Our dataset also provides extensive characterization of the deuterosomal cell population, an intermediate state before the formation of multiciliated cells. After establishing a comprehensive repertoire of keratin expression, we show that monitoring 'keratin switch' during differentiation could be self-sufficient to establish the different cell identities. Our improved characterization of the different signaling pathway components detects putative Notch repressors that probably contribute to Notch signal shutdown at the deuterosomal stage, and details Wnt pathway activity within the basal cell compartment.

MATERIALS AND METHODS

Human airway epithelial cell culture

Human airway epithelial cell (HAEC) cultures were derived from nasal mucosa of inferior turbinates. After excision, nasal inferior turbinates were immediately immersed in $Ca^{2+}/Mg^{2+}\mbox{-free}$ HBSS supplemented with 25 mM HEPES, 200 U/ml penicillin, 200 $\mu g/ml$ streptomycin, 50 $\mu g/ml$ gentamicin sulfate and 2.5 µg/ml amphotericin B (all reagents from Gibco). After repeated washes with ice-cold supplemented HBSS, tissues were digested with 0.1% Protease XIV from Streptomyces griseus (Sigma-Aldrich) overnight at 4°C. After incubation, fetal calf serum (FCS) was added to a final concentration of 10%, and nasal epithelial cells were detached from the stroma by gentle agitation. Cell suspensions were further dissociated by trituration through a 21 G needle and then centrifuged at 150 g for 5 min. The pellet was resuspended in supplemented HBSS containing 10% FCS and centrifuged again. The second cell pellet was then suspended in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco) containing 10% FCS and cells were plated (20,000 cells per cm²) on 75 cm² flasks coated with rat-tail collagen I (Sigma-Aldrich). Cells were incubated in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Culture medium was replaced with bronchial epithelium basal medium (BEBM, Lonza) supplemented with BEGM SingleQuot Kit Supplements (Lonza) on the following day and was then changed every other day. After 4 to 5 days of culture, after reaching about 70% confluence, cells were detached with trypsin-EDTA 0.05% (Gibco) for 5 min and seeded on Transwell permeable supports (6.5 mm diameter; 0.4 µm pore size; Corning) in BEGM medium at a density of 30,000 cells per Transwell. Once the cells have reached confluence (typically after 5 days), they were induced to differentiate at the air-liquid interface by removing medium at the apical side of the Transwell, and by replacing medium at the basal side with either DMEM:BEBM (1:1) supplemented with BEGM SingleQuot Kit Supplements or with Pneumacult-ALI (StemCell Technologies), as indicated in the figure legends. Culture medium was changed every other day.

Mouse tracheal epithelial cell culture

Mouse tracheal epithelial cell (MTEC) cultures were established from the tracheas of 12-week-old C57BL/6 mice. After dissection, tracheas were placed in ice-cold DMEM:F-12 medium (1:1) supplemented with 15 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml gentamicin sulfate and 2.5 µg/ml amphotericin B. Each trachea was processed under a binocular microscope to remove as much conjunctive tissue as possible with small forceps and was opened longitudinally with small dissecting scissors. Tracheas were then placed in supplemented DMEM:F-12 containing 0.15% protease XIV from S. griseus. After overnight incubation at 4°C, FCS was added to a final concentration of 10%, and tracheal epithelial cells were detached by gentle agitation. Cells were centrifuged at 400 g for 10 min and resuspended in supplemented DMEM:F-12 containing 10% FCS. Cells were plated on regular cell culture plates and maintained in a humidified atmosphere of 5% CO2 at 37°C for 4 h to allow attachment of putative contaminating fibroblast. Medium-containing cells in suspension were further centrifuged at 400 g for 5 min and cells were resuspended in supplemented DMEM:F-12 containing BEGM Singlequot kit supplements and 5% FCS. Cells were plated on rat tail collagen I-coated Transwell. Typically, five tracheas resulted in 12 Transwells. Medium was changed every other day. Airliquid interface culture was conducted once transepithelial electrical resistance had reached a minimum of 1000 Ω/cm^2 (measured with EVOM2, World Precision Instruments). Air-liquid interface culture was obtained by removing medium at the apical side of the Transwell and by replacing medium at the basal side with Pneumacult-ALI medium (StemCell Technologies).

HAEC and MTEC dissociation for single-cell RNA-seq

Single-cell analysis was performed at the indicated days of culture at the airliquid interface. To obtain a single-cell suspension, cells were incubated with 0.1% protease type XIV from S. griseus (Sigma-Aldrich) in supplemented HBSS for 4 h at 4°C. Cells were gently detached from Transwells by pipetting and then transferred to a microtube. Fifty units of DNase I (EN0523 Thermo Fisher Scientific) per 250 µl were directly added and cells were further incubated at room temperature for 10 min. Cells were centrifuged (150 g for 5 min) and resuspended in 500 μ l supplemented HBSS containing 10% FCS, centrifuged again (150 g for 5 min) and resuspended in 500 µl HBSS before being mechanically dissociated through a 26 G syringe (four times). Finally, cell suspensions were filtered through a 40 µm porosity Flowmi Cell Strainer (Bel-Art), centrifuged (150 g for 5 min) and resuspended in 500 µl of ice-cold HBSS. Cell concentration measurements were performed with a Scepter 2.0 Cell Counter (Millipore) and Countess automated cell counter (Thermo Fisher Scientific). Cell viability was checked with a Countess automated cell counter (Thermo Fisher Scientific). All steps except the DNAse I incubation were performed on ice. For cell capture using the 10× genomics device, the cell concentration was adjusted to 300 cells/µl in HBSS, aiming to capture 1500 cells for HAECs and 5000 cells for MTECs.

Turbinate epithelial cell dissociation

To obtain a single-cell suspension directly from turbinates, the whole turbinate from a 30-year-old female donor was incubated with 0.1% protease type XIV from S. griseus (Sigma-Aldrich) in supplemented HBSS at 4°C overnight. Epithelial cells were gently detached from the turbinate by washing with HBSS by pipetting up and down, and then transferred to a 50 ml Falcon tube. Cells were centrifuged (150 g for 5 min at 4°C) and after removing the supernatant the cells were resuspended in 1 ml of HBSS. Fifty units of DNase I (EN0523 Thermo Fisher Scientific) per 250 µl were directly added and cells were further incubated at room temperature for 10 min. Cells were centrifuged (150 g for 5 min at 4°C) and resuspended in 1 ml supplemented HBSS containing 10% FCS, centrifuged again (150 g for 5 min at 4°C) and resuspended in 500 µl HBSS before being mechanically dissociated through a 26 G syringe (four times). Finally, cell suspensions were filtered through a 40 µm porosity Flowmi Cell Strainer (Bel-Art), centrifuged (150 g for 5 min) and resuspended in 500 μ l of ice-cold HBSS. Cell concentration measurements were performed using a Scepter 2.0 Cell Counter (Millipore) and Countess automated cell counter (Thermo Fisher Scientific). Cell viability was checked with a Countess

automated cell counter (Thermo Fisher Scientific). All steps, except the DNAse I incubation, were performed on ice. For the cell capture using the $10\times$ genomics device, the cell concentration was adjusted to 500 cells/µl in HBSS aiming to capture 5000 cells.

Anesthetic procedure

Intranasal anesthesia is performed with topical application (gauze) of 5% lidocaine (anesthetic) plus naphazoline (vasoconstrictor) solution (0.2 mg/ml). Laryngeal and endobronchial anesthesia is performed with topical application of 2% lidocaine through the working channel of a 4.9 mm outer diameter bronchoscope.

Nasal brushing

Brushing was performed with a 2 mm cytology brush (Medi-Globe) in the inferior turbinate zone of a 56-year-old healthy male donor.

Bronchial biopsy

Bronchial biopsy was performed at the spur between the left upper lobe and the left lower lobe with a 1.8 mm-diameter Flexibite biopsy forceps (Medi-Globe) passed through the working channel of the bronchoscope (WCB) on a 59-year-old male donor.

Dissociation of nasal brushing

The brush was soaked in a 5 ml Eppendorf containing 1 ml of dissociation buffer, which was composed of HypoThermosol (BioLife Solutions), 10 mg/ml protease from Bacillus Licheniformis (Sigma-Aldrich, P5380) and 0.5 mM EDTA (Adam et al., 2017). The tube was shaken vigorously and centrifuged for 2 min at 150 g. The brush was removed, cells pipetted up and down five times and then incubated cells on ice for 30 min, with gentle trituration with 21 G needles five times every 5 min. Protease was inactivated by adding 200 µl of HBSS/2% BSA. Cells were centrifuged (400 g for 5 min at 4°C). Supernatant was discarded leaving 10 µl of residual liquid on the pellet. Cells were resuspended in 500 µl of wash buffer (HBSS/0.05% BSA) and 2.25 ml of ammonium chloride 0.8% was added to perform red blood cell lysis. After a 10 min incubation, 2 ml of wash buffer was added and cells were centrifuged (400 g for 5 min at 4°C). Supernatant was discarded leaving 10 µl of residual liquid on the pellet, cells were resuspended in 1 ml of wash buffer and centrifuged (400 g for 5 min at 4°C). Supernatant was discarded leaving 10 µl of residual liquid on the pellet, cells were resuspended in 1 ml of wash buffer and passed through a 40 µm porosity Flowmi[™] Cell Strainer (Bel-Art) then centrifuged (400 g for 5 min at 4°C). Supernatant was discarded, leaving 10 µl of residual liquid on the pellet. Cells were resuspended in 100 µl of wash buffer. Cell counts and viability were performed with a Countess automated cell counter (Thermo Fisher Scientific). For cell capture using the 10× genomics device, the cell concentration was adjusted to 500 cells/µl in HBSS, aiming to capture 5000 cells. All steps were performed on ice.

Dissociation of bronchial biopsy

The biopsy tissue was soaked in 1 ml dissociation buffer, which was composed of DPBS, 10 mg/ml protease from *Bacillus licheniformis* (Sigma-Aldrich, P5380) and 0.5 mM EDTA. After 1 h, the biopsy was finely minced with a scalpel and returned to the dissociation buffer. From this point, the dissociation procedure is the same as the one described in the 'dissociation of nasal brushing' section, with an incubation time increased to 1 h, and omitting the red blood cell lysis procedure. For cell capture using the 10× genomics device, the cell concentration was adjusted to 300 cells/µl in HBSS, aiming to capture 5000 cells. All steps were performed on ice.

Pig tracheal epithelial cell dissociation

To obtain a single-cell suspension from newborn pig trachea, whole clean tracheas were incubated with 0.1% protease type XIV from *S. griseus* (Sigma-Aldrich) in supplemented HBSS at 4°C overnight. Epithelial cells were gently detached from the turbinate by washing with HBSS and pipetting up and down, then transferring to a 50 ml Falcon tube. Cells were centrifuged (150 *g* for 5 min at 4°C) and after removing the supernatant the cells were resuspended in 1 ml of HBSS and 50 units of DNase I (EN0523, Thermo Fisher Scientific) per 250 μ l were directly added. The cells were then

further incubated at room temperature for 10 min. Cells were centrifuged (150 *g* for 5 min at 4°C) and resuspended in 1 ml supplemented HBSS containing 10% FCS, centrifuged again (150 *g* for 5 min at 4°C) and resuspended in 500 μ l HBSS before being mechanically dissociated through a 26 G syringe (four times). Finally, cell suspensions were filtered through a 40 μ m porosity Flowmi Cell Strainer (Bel-Art), centrifuged (150 *g* for 5 min) and resuspended in 500 μ l of ice-cold HBSS. Cell concentration measurements were performed using a Scepter 2.0 Cell Counter (Millipore) and a Countess automated cell counter (Thermo Fisher Scientific). Cell viability was checked with a Countess automated cell counter (Thermo Fisher Scientific). All steps except the DNAse I incubation were performed on ice. For cell capture using the 10× genomics device, the cell concentration was adjusted to 500 cells/ μ l in HBSS, aiming to capture 5000 cells.

Single-cell RNA-seq

We followed the manufacturer's protocol (Chromium Single Cell 3' Reagent Kit, v2 Chemistry) to obtain single cell 3' libraries for Illumina sequencing. Libraries were sequenced with a NextSeq 500/550 High Output v2 kit (75 cycles) that allows up to 91 cycles of paired-end sequencing: read 1 had a length of 26 bases that included the cell barcode and the UMI; read 2 had a length of 57 bases that contained the cDNA insert; index reads for sample index of eight bases. Cell Ranger Single-Cell Software Suite v1.3 was used to perform sample demultiplexing, barcode processing and single-cell 3' gene counting using standard default parameters and human build hg19, pig build sus scrofa 11.1 and mouse build mm10. All single-cell datasets that we generated, and the corresponding quality metrics are displayed in Table S6 and were deposited on the Gene Expression Omnibus portal under the series number GSE121600.

Single-cell quantitative PCR

HAECs were dissociated as described above, then single cells were separated using a C1 Single-cell AutoPrep system (Fluidigm), followed by quantitative PCR on the Biomark system (Fluidigm) using SsoFast evaGreen Supermix (Biorad) and the primers described in Table S7.

RNA-seq on dissociated and non-dissociated HAECs

Two Transwells from fully differentiated HAECs from two distinct donors were each dissociated as described above. After the final resuspension, cells were centrifuged and resuspended in 800 μ l Qiazol (Qiagen). Nondissociated cells from two Transwells were also lyzed in 800 μ l Qiazol. RNAs were extracted with the miRNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Two micrograms from each RNA was used in RNA-seq library construction with the Truseq stranded total RNA kit (Illumina). Sequencing was performed with a NextSeq 500/550 High Output v2 kit (75 cycles). Reads were aligned against hg19 human build using STAR aligner. Low expressed genes were filtered out, then paired differential analysis was performed with DESeq2, comparing dissociated versus nondissociated samples from cultures generated from two different donors. *P*-values were adjusted for multiple testing using the false discovery rate (FDR). Top differentially expressed genes were selected using the following cutoffs: FDR<0.001 and an absolute log2FC>1.5.

Cytospins

Fully differentiated HAECs were dissociated by incubation with 0.1% protease type XIV from *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich) in HBSS (Hanks' balanced salts) overnight at 4°C. Cells were gently detached from the Transwells by pipetting and then transferred to a microtube. Cells were then cytocentrifuged at 72 g for 10 min onto SuperFrost Plus slides using a Shandon Cytospin 4 cytocentrifuge. Cytospin slides were fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde at room temperature or with methanol for 10 min at -20° C for further immunostaining.

Tissue processing for embedding

Nasal turbinates were fixed in paraformaldehyde 4% at 4°C or with methanol at -20° C (for the following antibodies: KRT7, KRT19, DEUP1, centrin 2, HES6) overnight then extensively rinsed with phosphate-buffered saline (PBS). Fixed tissues where then prepared for paraffin embedding or

cryo-embedding for cryostat sectioning. For cryoprotection, tissues were soaked in a 15% sucrose solution until saturation of the tissue followed by saturation in a 30% sucrose solution. Tissue was embedded in optimal cutting temperature (OCT) medium (Thermo Fisher Scientific) at room temperature and then submerged in isopentane previously tempered at -80° C. Fully differentiated air-liquid cell cultures were embedded in paraffin using a similar protocol with a shorter time for paraformaldehyde 4% fixation (15 min at room temperature). Each Transwell was cut with a razor blade before embedding. Cutting of frozen tissues was performed with a cryostat Leica CM3050 S. Cutting of paraffin-embedded sections was performed using a rotary microtome MICROM HM 340E (Thermo Fisher Scientific).

Immunostaining

Samples were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 10 min. Cells were blocked with 3% BSA in PBS for 30 min. The incubation with primary antibodies was carried out at 4°C overnight. Cells were blocked with 3% BSA in PBS for 30 min. The incubation with primary antibodies was carried out at 4°C overnight. Primary antibodies were as follows: mouse monoclonal anti-KRT4 (1:50, Santa Cruz Biotechnology, sc-52321 for Fig. 4 or 1:250 Proteintech 16572-1-AP for Fig. S11A), rabbit polyclonal anti-KRT5 (1:2000, Biolegend, BLE905501), mouse monoclonal anti-KRT7 (1:100, Dako, M7018), mouse monoclonal anti-KRT8 (1:50, Santa Cruz Biotechnology, sc-58737), mouse monoclonal anti-KRT13 (1:200, Sigma-Aldrich clone KS-1A3), rabbit polyclonal anti-KRT19 (1:250, Proteintech, 10712-1-AP), rabbit polyclonal anti-DEUP1 (1:500, Proteintech, 24579-1-AP), rabbit polyclonal anti-CC10 (SCGB1A1) (1:500, Millipore, 07-623), mouse monoclonal anti-acetylated tubulin (1:500, Sigma-Aldrich clone 6-11B-1), mouse monoclonal anti-MUC5AC (1:250, Abnova clone 45M1), mouse monoclonal anti-SNAI2 (1:50, Santa Cruz Biotechnology, sc-166476), rabbit polyclonal anti-SAP30 (1:200, Proteintech, 27679-AP), goat polyclonal anti-FST (1:200, R&D Systems, AF-669) mouse monoclonal anti-centrin 2 (1/250e, clone 20H5, Sigma-Aldrich, 04-1624) and mouse monoclonal anti-FOXJ1 (1:200, eBiosciences, 14-9965-80).

Secondary antibodies used were: Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (1:500; Thermo Fisher Scientific, A-11008), Alexa Fluor 647 goat anti-mouse (1:500; Thermo Fisher Scientific, A-21235), Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG1 (1:500, Fisher Scientific, A-21121), Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG2a (1:500, Fisher Scientific, A-21135), Alexa Fluor 647 goat anti-mouse IgG2b (1:500, Fisher Scientific, A-21242) and Alexa Fluor 488 donkey anti-goat (1:500; Thermo Fisher Scientific, A-11055). Incubation with secondary antibodies was carried out for 1 h at room temperature. Nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

When necessary, acetylated tubulin, Muc5AC and KRT5 antibodies were directly coupled to CF 594, 488 and 488 respectively, using the Mix-n-Stain kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Coupled primary antibodies were applied for 2 h at room temperature after secondary antibodies had been extensively washed and after a 30 min blocking stage in 3% normal rabbit or mouse serum in PBS. MTEC immunostaining was directly performed on Transwell membranes using a similar protocol. For mounting on slides, Transwell membranes were cut with a razor blade and mounted with ProLong Gold medium (Thermo Fisher Scientific). Images were acquired using the Olympus Fv10i or Leica sp5 confocal imaging systems.

Time course sample analysis

Preprocessing

For each sample, cells with levels in the top 5% or bottom 5% of distribution for the following quality metrics: number of expressed features, dropout percentage and library size (total UMI count) were filtered out. Additionally, cells with a percentage of mitochondrial genes >top 5% were also removed. Quality metrics were computed using the scatter package (2.3.0) (McCarthy et al., 2017). Only genes detected (1 UMI) in at least five cells were kept for analysis.

Normalization

The scran package (Lun et al., 2016 preprint) was used to calculate cellbased scale factors and normalize cells for differences in count distribution. Each sample was normalized separately twice, first in an unsupervised manner, then after grouping cells of similar gene expression based on our robust clustering results.

Clustering robustness

In order to best determine the key steps in the differentiation process, a customized method was implemented to analyze clustering robustness to dataset perturbation. For all possible numbers of clusters (from 2 to 9), multiple subsets of the studied datasets were created (10 subsets with 10% of the cells randomly removed each time) and clustering was performed multiple times on each subset with changing settings of the seed parameter. The result of those clusterings were stored in a $(n \text{ cells})^2$ stability matrix, containing for each pair of cells 1 or 0 depending on whether the cells are clustered together (1) or not (0). This stability matrix was then transformed in a Euclidean distance matrix between cells and then divided into the used k number of clusters k using hierarchical clustering (hclust with 'average' method). To identify the optimal number of clusters, a visual inspection of the elbow plot of the average intra-stability (mean stability within each cluster) and the average inter-stability (mean stability between each cluster) was carried out. Cells with a stability metric less than 70% were labeled as 'unassigned', owing to the high clustering variability between each round of clustering, then removed from further analysis of the time course data. Cell clustering was performed using SIMLR (package version 1.4.1) (Wang et al., 2017). Heatmaps for the clustering of each dataset are shown in Table S8.

Differential analysis

To further analyze the robustness of each step of the differentiation process, we tested the robustness of the cell type marker gene identification through differential gene expression analysis. Differential expression analysis was performed using edgeR (package version 3.22) (Robinson et al., 2010). In a one versus all differential analysis, a pool of 100 cells from one cluster were analyzed against an equal mixture of cells from all other clusters. In a one versus one differential analysis, pools of cells of the same size were compared. Those differential analysis were performed multiple times (10 times) on different pool of cells and the DEG identified were compared between each pool of cells using the rank-rank hypergeometric overlap algorithm (Plaisier et al., 2010). This approach was too stringent and only identified highly expressed marker genes that are less sensitive to dropout events. Thus, the Seurat FindAllMarkers function based on a non-parametric Wilcoxon rank sum test was used to identify cell type marker genes.

Time points aggregation

 $10\times$ datasets generated during the time course were aggregated using MNN correction (Haghverdi et al., 2018) from the scran package.

Trajectory inference

Trajectory inference was performed using monocle 2 (package version 2.8) (Qiu et al., 2017). Cell ordering was based on highly variable genes (~200-500 genes) selected by their expression dispersion. Monocle analysis on the aggregated time points was carried out on raw counts after library size correction (downsampling). Branch building was performed using BEAM analysis from Monocle, and corresponding differential analysis was carried out after a cross comparison of a group of cells along the pseudotime (before branching, after branching and at the branch end) using Seurat 1 versus 1 differential analysis.

Cell type projection

To compare cell types identified in distinct samples, cells were projected from one dataset onto the other using scmap R package version 1.1, scmapCluster function (Kiselev et al., 2018).

Data visualization

All graphs were generated using R (ggplot2). Heatmaps were obtained using pheatmap (no clustering used, genes ordered by their expression in pseudotime or in cluster, cells ordered by pseudotime or cluster). Heatmaps show smoothed gene expression values: for each gene, normalized gene expression values were first transformed into z-scores, then averaged across 10 neighboring cells in the chosen ordering (pseudotime only or pseudotime in clusters). Single gene representation: for the sake of clarity, only cells with expression levels above the top 50 percentiles for that gene are represented.

Individual sample analysis

Each sample of our study was reanalyzed with less stringent parameters to identify rare or transitory cell types or gene expression events

Preprocessing, normalization and clustering

Individual dataset analysis was performed using Seurat standard analysis pipeline. Briefly, cells were first filtered based on number of expressed features, dropout percentage, library size and mitochondrial gene percentage. Thresholds were selected by visually inspecting violin plots in order to remove the most extreme outliers. Genes expressing fewer than five UMI across all cells were removed from further analysis. Cell-level normalization was performed using the median UMI counts as a scaling factor. Highly variable genes were selected for following analyses based on their expression level and variance. PCA analysis was performed on those genes, the number of PCs to use was chosen upon visual inspection of the PC variance elbowplot (~10 to 20 PCs depending on the dataset). Clustering was first performed with default parameters and then by increasing the resolution parameter above 0.5 to identify small clusters (but with the knowledgeable risk of splitting big clusters due to high gene expression variability). Differential analysis was again performed using Seurat FindAllMarkers and FindMarkers functions based on non-parametric Wilcoxon rank sum test. Gene Set Enrichment analysis was performed using fgsea R package with the following gene sets reactome.db (R package) and GO cellular component (Broad Institute GSEA MSigDB) genesets. Molecular function enrichment analysis was performed using Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen).

Cell type annotation

Based on the time course experiment analysis and associated top ~15 marker genes identified, a score was computed to associate cell types to each cluster. The scoring method is based on Macosko et al. cell cycle phase assignment (Macosko et al., 2015). For each cell it measures the mean expression of the top marker genes for each possible cell type, which results in a matrix c cell types per *n* cells. Then it calculates a *z*-score of the mean expression for each cell; the top resulting score gives the matching cell type.

Velocity

RNA velocity was calculate using latest release of velocyto pipeline (velocyto.org/) using standard parameters: GTF file used for Cell Ranger analysis and the possorted_genome_bam.bam, Cell Ranger output alignment file. From the loom file that contains a count table of spliced and unspliced transcripts, the gene.relative.velocity.estimates function was used on cell type marker genes. The resulting expression pattern of unspliced-spliced phase portraits shows the induction or repression of those marker genes from one cell type to the next. We used velocyto package version 0.5 (La Manno et al., 2018).

Trajectory inference using Palantir algorithm

Palantir analysis was used as an integrated function of the Scanpy workflow (Wolf et al., 2018). The filtered raw count matrix was loaded into Scanpy, along with the cell type annotation (Scanpy v1.4, Python 3.7); each cell was normalized to the total count over all genes (without log transform) before running Palantir (Setty et al., 2019). The first 14 principal components were used to compute the diffusion map. The corresponding t-SNE embedding was obtained using the first two diffusion components. A start cell was randomly selected among the cycling basal cell cluster to infer trajectories and the associated terminal states. In the process, each cell of the dataset was associated with a probability to differentiate into each of the terminal states identified. Associated with the identified trajectory, Palantir allowed the associated gene trends to be studied using MAGIC (van Dijk et al., 2018) correction of the count matrix.

Plasscheart et al. dataset

Plasscheart et al.'s data (Plasschaert et al., 2018) were downloaded as processed data along with visualization coordinates and were used without further manipulation. (kleintools.hms.harvard.edu/tools/springViewer_1_6_ dev.html?datasets/reference_HBECs/reference_HBECs).

Acknowledgements

We are grateful to the UCAGenomiX platform for fruitful discussions and technical help with single-cell RNA-sequencing and to the IPMC imaging platform for fruitful discussions and technical help with imaging.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: P.B., L.-E.Z.; Methodology: L.-E.Z.; Software: M.D., K.L.; Validation: B.M., P.B., L.-E.Z.; Formal analysis: B.M., P.B., L.-E.Z.; Investigation: S.R.G., M.D., A.C., M.J.A., V.M., I.C., C.-H.M., L.-E.Z.; Resources: S.R.G, M.D., M.-J.A., V.M., I.C., S.L., C.-H.M.; Data curation: S.R.G., M.D., K.L., A.P., M.T., L.-E.Z.; Writing - original draft: L.-E.Z.; Writing - review & editing: S.L., C.-H.M., B.M., P.B.; Visualization: M.D.; Supervision: P.B., L.-E.Z.; Project administration: P.B.; Funding acquisition: P.B.

Funding

This project was funded by grants to P.B. from the Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20180339158), the Labex Signalife (ANR-11-LABX-0028-01), the Association Vaincre la Mucoviscidose (RF20180502280) and the Chan Zuckerberg Initiative (Silicon Valley Community Foundation, 2017-175159-5022). The UCAGenomiX platform, a partner of the National Infrastructure France Génomique, is supported by the Commissariat aux Grands Investissements (ANR-10-INBS-09-03 and ANR-10-INBS-09-02) and Canceropôle PACA. Deposited in PMC for immediate release.

Data availability

All datasets generated during this study have been deposited in GEO under the series number GSE121600. Links to the UCSC cell browser for data visualization are genomique.info/cellbrowser/Differentiation/Pneumacult/ and genomique.info/cellbrowser/Differentiation/BEGM/

Supplementary information

Supplementary information available online at http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.177428.supplemental

References

- Adam, M., Potter, A. S. and Potter, S. S. (2017). Psychrophilic proteases dramatically reduce single-cell RNA-seq artifacts: a molecular atlas of kidney development. *Development* 144, 3625-3632. doi:10.1242/dev.151142
- Al Jord, A., Shihavuddin, A., Servignat d'Aout, R., Faucourt, M., Genovesio, A., Karaiskou, A., Sobczak-Thépot, J., Spassky, N. and Meunier, A. (2017). Calibrated mitotic oscillator drives motile ciliogenesis. *Science* 358, 803-806. doi:10.1126/science.aan8311
- Bae, S., Bessho, Y., Hojo, M. and Kageyama, R. (2000). The bHLH gene Hes6, an inhibitor of Hes1, promotes neuronal differentiation. *Development* 127, 2933-2943.
- Bauer, A., Chauvet, S., Huber, O., Usseglio, F., Rothbächer, U., Aragnol, D., Kemler, R. and Pradel, J. (2000). Pontin52 and Reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity. *EMBO J.* **19**, 6121-6130. doi:10. 1093/emboj/19.22.6121
- Boers, J. E., Ambergen, A. W. and Thunnissen, F. B. (1998). Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **157**, 2000-2006. doi:10.1164/ajrccm.157.6. 9707011
- Boers, J. E., Ambergen, A. W. and Thunissen, F. B. J. M. (1999). Number and proliferation of Clara cells in normal human airway epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**, 1585-1591. doi:10.1164/ajrccm.159.5.9806044
- Brechbuhl, H. M., Ghosh, M., Smith, M. K., Smith, R. W., Li, B., Hicks, D. A., Cole, B. B., Reynolds, P. R. and Reynolds, S. D. (2011). B-catenin dosage is a critical determinant of tracheal basal cell fate determination. *Am. J. Pathol.* **179**, 367-379. doi:10.1016/j.ajpath.2011.03.016
- Chen, G., Korfhagen, T. R., Xu, Y., Kitzmiller, J., Wert, S. E., Maeda, Y., Gregorieff, A., Clevers, H. and Whitsett, J. A. (2009). SPDEF is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production. J. Clin. Invest. 119, 2914-2924. doi:10.1172/ JCI39731
- Cheng, P., Kumar, V., Liu, H., Youn, J.-I., Fishman, M., Sherman, S. and Gabrilovich, D. (2014). Effects of Notch signaling on regulation of myeloid cell differentiation in cancer. *Cancer Res.* **74**, 141-152. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1686
- Chevalier, B., Adamiok, A., Mercey, O., Revinski, D. R., Zaragosi, L.-E., Pasini, A., Kodjabachian, L., Barbry, P. and Marcet, B. (2015). miR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways. *Nat. Commun.* 6, 8386-8400. doi:10.1038/ncomms9386

Cohn, L. (2006). Mucus in chronic airway diseases: Sorting out the sticky details. J. Clin. Invest. 116. 306-308. doi:10.1172/JCI27690

- Cole, B. B., Smith, R. W., Jenkins, K. M., Graham, B. B., Reynolds, P. R. and Reynolds, S. D. (2010). Tracheal basal cells: a facultative progenitor cell pool. *Am. J. Pathol.* **177**, 362-376. doi:10.2353/ajpath.2010.090870
- Colopy, S. A., Bjorling, D. E., Mulligan, W. A. and Bushman, W. (2014). A population of progenitor cells in the basal and intermediate layers of the murine bladder urothelium contributes to urothelial development and regeneration. *Dev. Dyn.* 243, 988-998. doi:10.1002/dvdy.24143
- Coraux, C., Roux, J., Jolly, T. and Birembaut, P. (2008). Epithelial cellextracellular matrix interactions and stem cells in airway epithelial regeneration. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 5, 689-694. doi:10.1513/pats.200801-010AW
- Cruciat, C.-M. (2014). Casein kinase 1 and Wnt/β-catenin signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **31**, 46-55. doi:10.1016/j.ceb.2014.08.003
- Curran, D. R. and Cohn, L. (2010). Advances in mucous cell metaplasia: a plug for mucus as a therapeutic focus in chronic airway disease. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 42, 268-275. doi:10.1165/rcmb.2009-0151TR
- DiMeo, T. A., Anderson, K., Phadke, P., Feng, C., Perou, C. M., Naber, S., Kuperwasser, C. and Kuperwasser, C. (2009). A Novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelialmesenchymal transition in basal-like breast cancer. *Cancer Res.* 69, 5364-5373. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4135
- Durham, A. L., McLaren, A., Hayes, B. P., Caramori, G., Clayton, C. L., Barnes, P. J., Chung, K. F. and Adcock, I. M. (2013). Regulation of Wnt4 in chronic obstructive pulmonary disease. *FASEB J.* 27, 2367-2381. doi:10.1096/fj.12-217083
- Estrach, S., Ambler, C. A., Lo Celso, C. L., Hozumi, K. and Watt, F. M. (2006). Jagged 1 is a β-catenin target gene required for ectopic hair follicle formation in adult epidermis. *Development* **133**, 4427-4438. doi:10.1242/dev.02644
- Fernandez-Martinez, J., Vela, E. M., Tora-Ponsioen, M., Ocaña, O. H., Nieto, M. A. and Galceran, J. (2009). Attenuation of Notch signalling by the Downsyndrome-associated kinase DYRK1A. J. Cell Sci. 122, 1574-1583. doi:10.1242/ jcs.044354
- Fletcher, R. B., Das, D., Gadye, L., Street, K. N., Baudhuin, A., Wagner, A., Cole, M. B., Flores, Q., Choi, Y. G., Yosef, N. et al. (2017). Deconstructing olfactory stem cell trajectories at single-cell resolution. *Cell Stem Cell* 20, 817-830.e8. doi:10.1016/j.stem.2017.04.003
- Giovannini-Chami, L., Paquet, A., Sanfiorenzo, C., Pons, N., Cazareth, J., Magnone, V., Lebrigand, K., Chevalier, B., Vallauri, A., Julia, V. et al. (2018). The "one airway, one disease" concept in light of Th2 inflammation. *Eur. Respir. J.* 52, 1800437-1800454. doi:10.1183/13993003.00437-2018
- Gomperts, B. N., Kim, L. J., Flaherty, S. A. and Hackett, B. P. (2007). IL-13 regulates cilia loss and foxj1 expression in human airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **37**, 339-346. doi:10.1165/rcmb.2006-04000C
- Gras, D., Chanez, P., Vachier, I., Petit, A. and Bourdin, A. (2013). Bronchial epithelium as a target for innovative treatments in asthma. *Pharmacol. Ther.* 140, 290-305. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.07.008
- Guha, A., Vasconcelos, M., Zhao, R., Gower, A. C., Rajagopal, J. and Cardoso,
 W. V. (2014). Analysis of notch signaling-dependent gene expression in developing airways reveals diversity of Clara cells. *PLoS ONE* 9, e88848. doi:10.1371/journal.pone.0088848
- Haghverdi, L., Lun, A. T. L., Morgan, M. D. and Marioni, J. C. (2018). Batch effects in single-cell RNA-sequencing data are corrected by matching mutual nearest neighbors. *Nat. Biotechnol.* 36, 421-427. doi:10.1038/nbt.4091
- 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. doi:10. 1016/j.stem.2014.07.012
- Hsieh, J. J.-D., Zhou, S., Chen, L., Young, D. B. and Hayward, S. D. (1999). CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 23-28. doi:10.1073/pnas.96.1.23
- Hudson, D. L., Guy, A. T., Fry, P., O'Hare, M. J., Watt, F. M. and Masters, J. R. W. (2001). Epithelial cell differentiation pathways in the human prostate: identification of intermediate phenotypes by keratin expression. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 271-278. doi:10.1177/002215540104900214
- Ji, H., Goode, R. J. A., Vaillant, F., Mathivanan, S., Kapp, E. A., Mathias, R. A., Lindeman, G. J., Visvader, J. E. and Simpson, R. J. (2011). Proteomic profiling of secretome and adherent plasma membranes from distinct mammary epithelial cell subpopulations. *Proteomics* **11**, 4029-4039. doi:10.1002/pmic.201100102
- Jones, K. G., Holland, J. F., Foureman, G. L., Bend, J. R. and Fouts, J. R. (1983). Xenobiotic metabolism in Clara cells and alveolar type II cells isolated from lungs of rats treated with beta-naphthoflavone. J. Pharmacol. Exp. Ther. 225, 316-319.
- Jumppanen, M., Gruvberger-Saal, S., Kauraniemi, P., Tanner, M., Bendahl, P.-O., Lundin, M., Krogh, M., Kataja, P., Borg, A., Fernö, M. et al. (2007). Basallike phenotype is not associated with patient survival in estrogen-receptornegative breast cancers. *Breast Cancer Res.* 9, R16. doi:10.1186/bcr1649
- Karamitros, D., Stoilova, B., Aboukhalil, Z., Hamey, F., Reinisch, A., Samitsch, M., Quek, L., Otto, G., Repapi, E., Doondeea, J. et al. (2018). Single-cell

analysis reveals the continuum of human lympho-myeloid progenitor cells. *Nat. Immunol.* **19**, 85-97. doi:10.1038/s41590-017-0001-2

- Kessler, M., Hoffmann, K., Brinkmann, V., Thieck, O., Jackisch, S., Toelle, B., Berger, H., Mollenkopf, H.-J., Mangler, M., Sehouli, J. et al. (2015). The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids. *Nat. Commun.* 6, 8989. doi:10.1038/ncomms9989
- Kiselev, V. Y., Yiu, A. and Hemberg, M. (2018). scmap: projection of single-cell RNAseq data across data sets. *Nat. Methods* 15, 359-362. doi:10.1038/nmeth.4644
- Koopmans, T., Kumawat, K., Halayko, A. J. and Gosens, R. (2016). Regulation of actin dynamics by WNT-5A: implications for human airway smooth muscle contraction. Sci. Rep. 6, 30676. doi:10.1038/srep30676
- Kotton, D. N. and Morrisey, E. E. (2014). Lung regeneration: mechanisms, applications and emerging stem cell populations. *Nat. Med.* 20, 822-832. doi:10. 1038/nm.3642
- La Manno, G., Soldatov, R., Zeisel, A., Braun, E., Hochgerner, H., Petukhov, V., Lidschreiber, K., Kastriti, M. E., Lönnerberg, P., Furlan, A. et al. (2018). RNA velocity of single cells. *Nature* 560, 494-498. doi:10.1038/s41586-018-0414-6
- Laoukili, J., Perret, E., Willems, T., Minty, A., Parthoens, E., Houcine, O., Coste, A., Jorissen, M., Marano, F., Caput, D. et al. (2001). IL-13 alters mucociliary differentiation and ciliary beating of human respiratory epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **108**, 1817-1824. doi:10.1172/JCI200113557
- Lun, A. T. L., McCarthy, D. J. and Marioni, J. C. (2016). A step-by-step workflow for low-level analysis of single-cell RNA-seq data with Bioconductor. *F1000 Res.* 5, 2122. doi:10.12688/f1000research.9501.2
- Macosko, E. Z., Basu, A., Satija, R., Nemesh, J., Shekhar, K., Goldman, M., Tirosh, I., Bialas, A. R., Kamitaki, N., Martersteck, E. M. et al. (2015). Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell* **161**, 1202-1214. doi:10.1016/j.cell.2015.05.002
- Malleske, D. T., Hayes, D., Lallier, S. W., Hill, C. L. and Reynolds, S. D. (2018). Regulation of human airway epithelial tissue stem cell differentiation by β-catenin, P300, and CBP. *Stem Cells* **36**, 1905-1916. doi:10.1002/stem.2906
- Marcet, B., Chevalier, B., Luxardi, G., Coraux, C., Zaragosi, L.-E. E., Cibois, M., Robbe-Sermesant, K., Jolly, T., Cardinaud, B., Moreilhon, C. et al. (2011a). Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat. Cell Biol.* **13**, 693-699. doi:10.1038/ncb2241
- Marcet, B., Chevalier, B., Coraux, C., Kodjabachian, L. and Barbry, P. (2011b). MicroRNA-based silencing of Delta/Notch signaling promotes multiple cilia formation. *Cell Cycle* **10**, 2858-2864. doi:10.4161/cc.10.17.17011
- McCarthy, D. J., Campbell, K. R., Lun, A. T. L. and Wills, Q. F. (2017). Scater: preprocessing, quality control, normalization and visualization of single-cell RNA-seq data in R. *Bioinformatics* 33, btw777. doi:10.1093/bioinformatics/btw777
- Mercey, O., Popa, A., Cavard, A., Paquet, A., Chevalier, B., Pons, N., Magnone, V., Zangari, J., Brest, P., Zaragosi, L.-E. et al. (2017). Characterizing isomiR variants within the microRNA-34/449 family. *FEBS Lett.* 591, 693-705. doi:10. 1002/1873-3468.12595
- Merigo, F., Benati, D., Piacentini, G., Boner, A. and Sbarbati, A. (2002). The ultrastructure of nasal mucosa in children with asthma. *Ultrastruct. Pathol.* 26, 293-298. doi:10.1080/01913120290104566
- Montoro, D. T., Haber, A. L., Biton, M., Vinarsky, V., Lin, B., Birket, S. E., Yuan, F., Chen, S., Leung, H. M., Villoria, J. et al. (2018). A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature* 560, 319-324. doi:10. 1038/s41586-018-0393-7
- Mori, M., Mahoney, J. E., Stupnikov, M. R., Paez-Cortez, J. R., Szymaniak, A. D., Varelas, X., Herrick, D. B., Schwob, J., Zhang, H. and Cardoso, W. V. (2015). Notch3-Jagged signaling controls the pool of undifferentiated airway progenitors. Development 142, 258-267. doi:10.1242/dev.116855
- Morimoto, M., Liu, Z., Cheng, H.-T., Winters, N., Bader, D. and Kopan, R. (2010). Canonical Notch signaling in the developing lung is required for determination of arterial smooth muscle cells and selection of Clara versus ciliated cell fate. J. Cell Sci. 123, 213-224. doi:10.1242/jcs.058669
- Mou, H., Vinarsky, V., Tata, P. R., Brazauskas, K., Choi, S. H., Crooke, A. K., Zhang, B., Solomon, G. M., Turner, B., Bihler, H. et al. (2016). Dual SMAD signaling inhibition enables long-term expansion of diverse epithelial basal cells. *Cell Stem Cell* **19**, 217-231. doi:10.1016/j.stem.2016.05.012
- Nam, S. M., Kim, Y. N., Kim, J. W., Kyeong, D. S., Lee, S. H., Son, Y., Shin, J. H., Kim, J., Yi, S. S., Yoon, Y. S. et al. (2016). Hairy and Enhancer of Split 6 (Hes6) deficiency in mouse impairs neuroblast differentiation in dentate gyrus without affecting cell proliferation and integration into mature neurons. *Cell. Mol. Neurobiol.* **36**, 57-67. doi:10.1007/s10571-015-0220-8
- Ordovas-Montanes, J., Dwyer, D. F., Nyquist, S. K., Buchheit, K. M., Vukovic, M., Deb, C., Wadsworth, M. H., Hughes, T. K., Kazer, S. W., Yoshimoto, E. et al. (2018). Allergic inflammatory memory in human respiratory epithelial progenitor cells. *Nature* 560, 649-654. doi:10.1038/s41586-018-0449-8
- Pal, B., Chen, Y., Vaillant, F., Jamieson, P., Gordon, L., Rios, A. C., Wilcox, S., Fu, N., Liu, K. H., Jackling, F. C. et al. (2017). Construction of developmental lineage relationships in the mouse mammary gland by single-cell RNA profiling. *Nat. Commun.* 8, 1627. doi:10.1038/s41467-017-01560-x
- Pardo-Saganta, A., Law, B. M., Gonzalez-Celeiro, M., Vinarsky, V. and Rajagopal, J. (2013). Ciliated cells of pseudostratified airway epithelium do not

become mucous cells after ovalbumin challenge. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 48, 364-373. doi:10.1165/rcmb.2012-0146OC

- Pardo-Saganta, A., Law, B. M., Tata, P. R., Villoria, J., Saez, B., Mou, H., Zhao, R. and Rajagopal, J. (2015a). Injury induces direct lineage segregation of functionally distinct airway basal stem/progenitor cell subpopulations. *Cell Stem Cell* 16, 184-197. doi:10.1016/i.stem.2015.01.002
- Pardo-Saganta, A., Tata, P. R., Law, B. M., Saez, B., Chow, R. D.-W., Prabhu, M., Gridley, T. and Rajagopal, J. (2015b). Parent stem cells can serve as niches for their daughter cells. *Nature* 523, 597-601. doi:10.1038/nature14553
- Plaisier, S. B., Taschereau, R., Wong, J. A. and Graeber, T. G. (2010). Rank–rank hypergeometric overlap: identification of statistically significant overlap between gene-expression signatures. *Nucleic Acids Res.* 38, e169-e169. doi:10.1093/nar/ gkg636
- Plass, M., Solana, J., Wolf, F. A., Ayoub, S., Misios, A., Glažar, P., Obermayer, B., Theis, F. J., Kocks, C. and Rajewsky, N. (2018). Cell type atlas and lineage tree of a whole complex animal by single-cell transcriptomics. *Science* 360, eaaq1723-eaaq1735. doi:10.1126/science.aaq1723
- Plasschaert, L. W., Žilionis, R., Choo-wing, R., Savova, V., Knehr, J., Roma, G., Klein, A. M. and Jaffe, A. B. (2018). A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature* 560, 377-381. doi:10.1038/ s41586-018-0394-6
- Qiu, X., Mao, Q., Tang, Y., Wang, L., Chawla, R., Pliner, H. A. and Trapnell, C. (2017). Reversed graph embedding resolves complex single-cell trajectories. *Nat. Methods* 14, 979-982. doi:10.1038/nmeth.4402
- Rawlins, E. L., Okubo, T., Xue, Y., Brass, D. M., Auten, R. L., Hasegawa, H., Wang, F. and Hogan, B. L. M. (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, 525-534. doi:10.1016/j.stem.2009.04.002
- Revinski, D. R., Zaragosi, L.-E., Boutin, C., Ruiz-Garcia, S., Deprez, M., Thomé, V., Rosnet, O., Gay, A.-S., Mercey, O., Paquet, A. et al. (2018). CDC20B is required for deuterosome-mediated centriole production in multiciliated cells. *Nat. Commun.* 9, 4668-4683. doi:10.1038/s41467-018-06768-z
- Reynolds, S. D., Reynolds, P. R., Pryhuber, G. S., Finder, J. D. and Stripp, B. R. (2002). Secretoglobins SCGB3A1 and SCGB3A2 define secretory cell subsets in mouse and human airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 1498-1509. doi:10.1164/rccm.200204-285OC
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J. and Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139-140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616
- 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. doi:10.1073/pnas.0906850106
- Rock, J. R., Gao, X., Xue, Y., Randell, S. H., Kong, Y.-Y. and Hogan, B. L. M. (2011). Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell Stem Cell* 8, 639-648. doi:10.1016/j.stem.2011.04.003
- Schmid, A., Sailland, J., Novak, L., Baumlin, N., Fregien, N. and Salathe, M. (2017). Modulation of Wnt signaling is essential for the differentiation of ciliated epithelial cells in human airways. *FEBS Lett.* **591**, 3493-3506. doi:10.1002/1873-3468.12851
- Setty, M., Kiseliovas, V., Levine, J., Gayoso, A., Mazutis, L. and Pe'er, D. (2019). Characterization of cell fate probabilities in single-cell data with Palantir. *Nat. Biotechnol.* 37, 451-460. doi:10.1038/s41587-019-0068-4
- Smith, M. K., Koch, P. J. and Reynolds, S. D. (2012). Direct and indirect roles for βcatenin in facultative basal progenitor cell differentiation. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 302, 580-594. doi:10.1152/ajplung.00095.2011
- Teixeira, V. H., Nadarajan, P., Graham, T. A., Pipinikas, C. P., Brown, J. M., Falzon, M., Nye, E., Poulsom, R., Lawrence, D., Wright, N. A. et al. (2013). Stochastic homeostasis in human airway epithelium is achieved by neutral competition of basal cell progenitors. *eLife* 2, e00966. doi:10.7554/eLife.00966
- Tözser, J., Earwood, R., Kato, A., Brown, J., Tanaka, K., Didier, R., Megraw, T. L., Blum, M. and Kato, Y. (2015). TGF-β signaling regulates the differentiation of motile cilia. *Cell Rep.* **11**, 1000-1007. doi:10.1016/j.celrep.2015.04.025
- Treutlein, B., Brownfield, D. G., Wu, A. R., Neff, N. F., Mantalas, G. L., Espinoza, F. H., Desai, T. J., Krasnow, M. A. and Quake, S. R. (2014). Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-seq. *Nature* 509, 371-375. doi:10.1038/nature13173
- Tsao, P.-N., Vasconcelos, M., Izvolsky, K. I., Qian, J., Lu, J. and Cardoso, W. V. (2009). Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways. *Development* **136**, 2297-2307. doi:10.1242/dev.034884
- Turner, J., Roger, J., Fitau, J., Combe, D., Giddings, J., Van Heeke, G. and Jones, C. E. (2011). Goblet cells are derived from a FOXJ1-expressing progenitor in a human airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44, 276-284. doi:10. 1165/rcmb.2009-0304OC
- Tyner, J. W., Kim, E. Y., Ide, K., Pelletier, M. R., Roswit, W. T., Morton, J. D., Battaile, J. T., Patel, A. C., Patterson, G. A., Castro, M. et al. (2006). Blocking airway mucous cell metaplasia by inhibiting EGFR antiapoptosis and IL-13 transdifferentiation signals. J. Clin. Invest. **116**, 309-321. doi:10.1172/JCl25167
- van Dijk, D., Sharma, R., Nainys, J., Yim, K., Kathail, P., Carr, A. J., Burdziak, C., Moon, K. R., Chaffer, C. L., Pattabiraman, D. et al. (2018). Recovering gene

interactions from single-cell data using data diffusion. *Cell* **174**, 716-729.e27. doi:10.1016/j.cell.2018.05.061

- Vieira Braga, F. A., Kar, G., Berg, M., Carpaij, O. A., Polanski, K., Simon, L. M., Brouwer, S., Gomes, T., Hesse, L., Jiang, J. et al. (2019). A cellular census of human lungs identifies novel cell states in health and in asthma. *Nat. Med.* 25, 1153-1163. doi:10.1038/s41591-019-0468-5
- Vladar, E. K., Stratton, M. B., Saal, M. L., Salazar-De Simone, G., Wang, X., Wolgemuth, D., Stearns, T. and Axelrod, J. D. (2018). Cyclin-dependent kinase control of motile ciliogenesis. *eLife* 7, e36375. doi:10.7554/eLife.36375
- Wang, S.-Z., Rosenberger, C. L., Bao, Y.-X., Stark, J. M. and Harrod, K. S. (2003). Clara cell secretory protein modulates lung inflammatory and immune responses to respiratory syncytial virus infection. *J. Immunol.* **171**, 1051-1060. doi:10.4049/ jimmunol.171.2.1051
- Wang, X., Gupta, P., Fairbanks, J. and Hansen, D. (2014). Protein kinase CK2 both promotes robust proliferation and inhibits the proliferative fate in the C. elegans germ line. *Dev. Biol.* **392**, 26-41. doi:10.1016/j.ydbio.2014.05.002
- Wang, B., Zhu, J., Pierson, E., Ramazzotti, D. and Batzoglou, S. (2017). Visualization and analysis of single-cell RNA-seq data by kernel-based similarity learning. *Nat. Methods* 14, 414-416. doi:10.1038/nmeth.4207

- Watson, J. K., Rulands, S., Wilkinson, A. C., Wuidart, A., Ousset, M., Van Keymeulen, A., Göttgens, B., Blanpain, C. C., Simons, B. D., Rawlins, E. L. et al. (2015). Clonal dynamics reveal two distinct populations of basal cells in slow-turnover ainway epithelium. *Cell Rep.* **12**, 90-101. doi:10.1016/j.celrep.2015. 06.011
- Weiske, J. and Huber, O. (2005). The histidine triad protein Hint1 interacts with Pontin and Reptin and inhibits TCF-β-catenin-mediated transcription. J. Cell Sci. 118, 3117-3129. doi:10.1242/jcs.02437
- Wolf, F. A., Angerer, P. and Theis, F. J. (2018). SCANPY: large-scale single-cell gene expression data analysis. *Genome Biol.* **19**, 15-20. doi:10.1186/s13059-017-1382-0
- Yang, L.-T., Nichols, J. T., Yao, C., Maniley, J. O., Robey, E. A. and Weinmaster, G. (2004). Fringe glycosyltransferases differentially modulate Notch1 proteolysis induced by Delta1 and Jagged1. *Mol. Biol. Cell* 16, 927-942. doi:10.1091/mbc. e04-07-0614
- Zemke, A. C., Teisanu, R. M., Giangreco, A., Drake, J. A., Brockway, B. L., Reynolds, S. D. and Stripp, B. R. (2009). β-Catenin is not necessary for maintenance or repair of the bronchiolar epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 41, 535-543. doi:10.1165/rcmb.2008-0407OC

Summary: Single-cell RNAseq data in fresh human airway epithelial tissues and air liquid cultures identifies novel cell populations and offers new insights into the molecular mechanisms occurring during mucociliary epithelium regeneration.

Funding details

S.No.	Funder name	Funder ID	Grant ID
1	Fondation pour la Recherche Médicale	http://dx.doi.org/10.13039/501100002915	DEQ20180339158
2	Labex	http://dx.doi.org/10.13039/501100004100	ANR-11-LABX-0028-01
3	France Génomique		ANR-10-INBS-09-03 ANR-10-INBS-09-02
4	Association Vaincre la Mucoviscidose	http://dx.doi.org/10.13039/501100006342	RF20180502280
5	Silicon Valley Community Foundation	http://dx.doi.org/10.13039/100000923	2017-175159-5022





(A) t-SNE representing the distinct cell populations identified in each sample. (B) Dot plot of the main cell population marker genes. Dot size describe the percentage of cells expressing the respective marker genes and the average expression level of that gene based on UMI counts are shown by color intensity. (C) Relative abundance of cell types in each sample. (D) Scatter plot of the percentage of cells expressing the selected marker genes for basal, goblet and multiciliated cells at the transcript (dotted line) and protein level (full line). (E) Immunostaining of the selected marker genes for basal, secretory, goblet and multiciliated in cytospin for each sample. Scale bar: 50 µm.



Fig. S2. Effect of cell dissociation on HAEC gene expression

(A) RNA-seq experimental design. Regenerating airway epithelia was dissociated at 28 days after a transition to an air-liquid interface. Dissociated and non-dissociated cultures from 2 donors were subjected to RNA-seq. (B) Volcano plot showing differential gene expression of dissociated vs. non-dissociated cell cultures. (C) Identification, with Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen) of the molecular functions most significantly affected by dissociation, based on an analysis of 300 differential expressed genes (FDR<0.01 and abs(log2FC)>1).


Fig. S3. Characterization of MCC cell lineages during airway epithelium regeneration using single cell RNA-Seq in BEGM medium

(A) t-SNE representing the distinct cell populations identified at each time points. (B) Relative abundance of cell types at each time point. (C) t-SNE plot of the aggregate of all cells from each time point. (D) Representation of the cell lineages inferred by Monocle 2 occurring during the upper airway epithelium regeneration (aggregate of all time points). Pseudotime evolution along the differentiation trajectory shown by white to grey gradient. (E) Distribution of the defined cell types in pseudotime. (F) Heatmap representing the smoothed temporal expression pattern of indicated cell type specific marker genes on MCC trajectory. Cells were ordered by cluster appearance in pseudotime.



KRT7 SCGB1A1

BEGM

Pneumacult









Fig. S4. Comparison of fully differentiated epithelia cell population between Pneumacult and BEGM media

(A) Sankey Network of the mapping of Pneumacult cells onto BEGM cells. (B) Sankey Network of the mapping of BEGM cells onto Pneumacult cells. (C) *SCGB1A1* expression in single-cell analysis of ALI cultures arising from 5 donors, either differentiated in BEGM medium, or in Pneumacult medium. (D) Cell proportions identified from single-cell RNAseq analysis in cells from the same donor differentiated in BEGM (Day 31) and Pneumacult (Day 26) media. (E) Immonostaining for SCGB1A1 of cells from the same donor differentiated in BEGM (Day 31) and Pneumacult (Day 26). ALI cultures were dissociated and cytospinned for better visualization. KRT7 was also stained as marker of apical/luminal cells.



Fig. S5: Cell population distribution from single-cell RNAseq analysis of 8 ALI cultures from 7 independent donors, in BEGM or Pneumacult medium, at several time points. Undefined intermediates have only been identified in one ALI culture.



Fig. S6. Trajectory and pseudotime reconstructions color coded by isolation time-point in BEGM and Pneumacult media (aggregate of all time points).



Fig. S7. Validation of Goblet cells markers in multiciliated cells in doublet free single cell transcriptomic datasets

(A) Heatmap colored by Z-score from C1 Biomark experiment in PneumaCult media, co-expression of Goblet and Multiciliated cell markers in single cells (red cluster). (B) C1[™] Single-Cell Preamp IFC (10– 17 µm) imaging, Red arrowheads show cells expressing both cell type markers (*FOXJ1* and *MUC5AC*), one cell per chamber, green cells=living cells, red cells=dead cells. (C) SPRING representations of Plasschaert *et al.* dataset colored by cell type. (D) SPRING representations of Plasschaert *et al.* dataset colored. Left panel colored by *FOXJ1*+ cells (blue), *MUC5AC*+ cells (green), co-expressing *FOXJ1* and *MUC5AC* cells (pink). Center panel displays a scatter plot of normalized expression of *MUC5AC* and *FOXJ1* in cells (dot) colored by *FOXJ1*+ cells (blue), *MUC5AC*+ cells (green), co-expressing FOXJ1 and MUC5AC cells (pink). Right panel colored by *FOXJ1*+ cells (blue), *SCGB1A1*+ cells (green), co-expressing *FOXJ1* and *MUC5AC* cells (pink). Right panel colored by *FOXJ1*+ cells (blue), *SCGB1A1*+ cells (green), co-expressing *FOXJ1* and *SCGB1A1* cells (pink). (E) t-SNE representation of the Pneumacult ALI 28 dataset after analysis by Palantir, colored by cell type. (F) t-SNE representation of the Pneumacult ALI 28 dataset after analysis by Palantir, colored by pseudotime (left panel) or differentiation potential (right panel). (G) Gene expression trends for MUC5AC and MUC5B for basal, goblet, and multiciliated cells, computed by Palantir. (H) Branch probabilities for 3 selected goblet cells. Left panel : t-SNE representation of the Pneumacult ALI 28 dataset after analysis by Palantir. (H) Branch probabilities for 3 selected goblet cells. Left panel : t-SNE representation of the Pneumacult ALI 28 dataset after analysis by Palantir, showing the 3 selected goblet cells. Right panel: branch probabilities for the 3 selected cells.





(A) Dendrogram of cell types identified through robust and high-resolution clustering of scRNA-seq data from Pneumacult ALI 28 sample. Numbers indicate percentage of each cluster. (B) Correlation matrix of cell type identified in Pneumacult sample. (C) t-SNE representation of scRNA-seq data from human nasal brushing (left), nasal turbinate (center), bronchial biopsy (right). (D) t-SNE representation of scRNA-seq data from pig trachea (left) and mouse culture (right).



Fig. S9. Pathway enrichment comparison between basal, suprabasal and secretory cell subtypes

Identification, with Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen) of the enriched canonical pathways, upstream regulators and disease and functions in each of the basal and secretory subpopulations, based on an analysis of 300 differential expressed genes (FDR<0.01 and log2FC>0.6 for BCs and SCs, and log2FC>0.4 for supraBCs). C: cycling basal cells.



Fig. S10. Robustness of Deuterosomal cells marker genes

(A-C) t-SNE representation of Deuterosomal cell population marker genes expression (lowly to highly expressed, grey to red) in (A) Biopsy of human trachea, (B) Newborn pig trachea, (C) MTECs ALI 3. (D) Immunohistochemistry on a section of adult mouse trachea showing acetylated tubulin, Deup1 and Centrin 2 expression. Scale bar : $10 \mu m$.



Fig. S11. Identification of short CDC20B, a novel isoform of a deuterosomal cell population marker gene.

(A) Integrated Genome Viewer (hg19) view of the *CDC20B* gene with coverage and read alignment from bulk RNA-seq of well-differentiated HAECs and single-cell RNAseq of ALI 14 differentiated HAECs from the dataset GSE103518. (B) Genome Viewer (mm10) view of the *Cdc20b* gene with coverage from bulk RNA-seq of ALI 7 differentiated MTECs from the dataset GSE75715. (C) UCSC Genome browser (hg19) view of the CDC20B gene with coverage from read alignment from bulk RNA-seq of ALI28 differentiated HAECs. The alternative 3rd exon is shown in orange. (D) Violin plots for CDC20B and short CDC20B abundance in the Pneumacult ALI28 and the bronchial biopsies samples. (E) Alternative human short CDC20B sequence identified with 5' race cloning.



Fig. S12. Keratin expression in nasal airway epithelium

(A) Violin plots for KRT13 and KRT4 expression in epithelial cells freshly isolated from a nasal turbinate. (B) Immunohistochemistry for KRT5, KRT7 and Acetylated Tubulin or SCGB1A1 on sections of Pneumacult-fully differentiated *in vitro* epithelium, as in Fig. 4F, with split channels. (C) Immunohistochemistry for KRT5, KRT4 and KRT13 in sections of nasal turbinates. (D) Immunohistochemistry for KRT5, KRT7, KRT8 and KRT19 in sections of nasal turbinates. Cilia are labeled with acetylated tubulin when noted. Scale bars: 20 μm.



Fig. S13. Validation of expression of signaling pathways components

(A) Immunocytochemistry for SAP30 and FOXJ1 on dissociated Pneumacult-fully differentiated cells.
(B) Immunocytochemistry for SNAI2 and KRT5 on dissociated epithelial cells from a nasal brushing. (C) Immunocytochemistry for FST and KRT5 on dissociated Pneumacult-fully differentiated cells. (D) Immunocytochemistry for FST and KRT5 on sections of Pneumacult-fully differentiated cells. Scale bars: 20 μm.





(A) Heatmap of the genes related to the NOTCH pathway. (B) Heatmap of the genes related to the BMP/TGF β pathway. (C) Heatmap of the genes related to the Wnt pathway. For all heatmaps, cells were ordered by cluster, obtained from the dataset of BEGM-differentiated cells (ALI 22).

UCSC Cell browser links for data visualization:

http://caire.ipmc.cnrs.fr/cellbrowser/Differentiation/Pneumacult/ http://caire.ipmc.cnrs.fr/cellbrowser/Differentiation/BEGM/

Table S1. Robust cell type markers in the Pneumacult ALI28 sample

Click here to Download Table S1

Table S2. Robust cell type markers in the BEGM ALI22 sample

Click here to Download Table S2

Table S3. Differential Gene expression of club/goblet after branching vs. before branching and differential gene expression of End vs. Beginning of GC branch (2 tabs)

Click here to Download Table S3

Table S4. Detailed cell type markers in the Pneumacult ALI28 sampleClick here to Download Table S4

Table S5. Differential Gene expression of Deuterosomal vs. all other clusters, or of deuterosomal vs.Click here to Download Table S5

Table S6. Summary of all the single-cell RNA-seq datasets of the study and comparison with quality

 metrics from other published airway single-cell datasets

Click here to Download Table S6

Gene	Sequence of forward primer	Sequence of reverse primer
AKAP14	AGATTGTGGAAGAGGAGCGAAACCC	TACCATGCTGGAGTGGTCGGC
CCDC40	CATCCCACGGAGTCTTAGGC	TGGATCCTGTCAATCTGCCC
CDC20B	CGGCTGAGAAATATGCTTGG	ATAAACACGCCCCAGTCTTG
DNAI1	AACGACGGCTGTCCCTAAAG	AGCCTACAAAACGCTCCCTC
FOXJ1	TGGATCACGGACAACTTCTG	GAGGCACTTTGATGAAGCAC
IDAS	TTTCAGAGACACGGTGGATG	TGGTGATATGTCGCAAGGAG
KRT5	AGGAATGCAGACTCAGTGGAG	CAGAGGAAACACTGCTTGTGAC
MUC16	GTCAAGCCAGGCAGCACAAGG	GGGATGTGCCTGCTGGACTGC
MUC5AC	CCAAATACGCCAACAAGACC	ATTCCATGGGTGTCAGCTTG
MUC5B	TGCAACCGTCCCGGCTTCG	GTTGTGTTGCACACGCACACCG
MYB	ATGATGAAGACCCTGAGAAGGAAA	AACAGGTGCACTGTCTCCATGA
NEK10	GCAAGAAATCACCATCAGGGAC	GGCTGGAAGCTGTTGTTTGC
PLK4	TCCAACACAGGCACCAATC	GAGATGTCTGTTCCAGAAGCTG
RFX2	GCGACCACATCCTCTACCAG	AGTTACGGATGGCCTGTGTC
RFX3	AGCCAACATCATCAACAGTTTTT	TGCAGTGACTTGATATCCTCAAA
ROPN1L	CTCGCATCCCCTTCAAGACG	TCTTCCTGGCGTCTATATTTTCC
SCGB1A1	AGAGACGGGCCAGAGCATCCC	GGCAGATCTCTGCAGAAGCGGAGC
SPRR3	TCTGCACAGCAGGTCCAGCATC	AGGCTGGCTGGGTTGTTTCACC
TFF3	GGAGTACGTGGGCCTGTCTGC	AGCCCCGGTTGTTGCACTCC

Table S7: Primers used in the Biomark qRT-PCR

Table S8: Heatmaps for clustering of each dataset

Click here to Download Table S8

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Cystic Fibrosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcf

Regeneration of airway epithelial cells to study rare cell states in cystic fibrosis^{*}

Pascal Barbry^{a,1,2}, Amélie Cavard^{a,1}, Marc Chanson^{b,1,2,*}, Aron B. Jaffe^{c,1,2}, Lindsey W. Plasschaert^{c,1}

^a Université Côte d'Azur and CNRS, Sophia Antipolis, France

^b Departments of Gynecology & Obstetric and Cell Physiology & Metabolism, Faculty of Medicine at the University of Geneva, Switzerland

ABSTRACT

^c Respiratory Diseases, Novartis Institutes for BioMedical Research, Cambridge, USA

ARTICLE INFO

Article history: Received 11 July 2019 Revised 13 September 2019 Accepted 16 September 2019 Available online 31 October 2019

Keywords: Cellular models RNA-seq Repair Airway epithelium Cystic fibrosis

Background

Different reparative strategies involving basal stem cells play a central role in airway epithelium regeneration. Characterized by a relatively slow turnover, the pseudostratified airway epithelium can be rapidly reconstituted after episodes of infection, inflammation or injury that are commonly observed in respiratory diseases, including CF [1,2]. The airway epithelium is not only constituted of basal cells (BCs), club/secretory cells (SCs), goblet cells (GCs) and multiciliated cells (MCCs), but also of less frequent cell types including ionocytes, neuroendocrine, tuft, and intermediate progenitor cells like deuterosomal cells (Fig. 1). These cell types/states, which all arise from self-renewing and multipotent BCs, contribute to tissue homeostasis and function of the airway epithelium [3–9].

Lineage tracing in mouse models subjected to different airway epithelial injuries has established the dynamics and plasticity of

¹ Authors are listed in alphabetical order.

mouse AEC differentiation during tissue repair. It is becoming clear that improper tissue repair may contribute to destructive chronic lung diseases [10]. In this context, several lines of evidence point to an intrinsic defect in the repair process of the CF airway epithelium. Increased BC proliferation was observed on lung sections from CF patients [11], on CF airway epithelial regeneration in a humanized nude mouse xenograft model [12] and in primary cultures of human CF AECs after mechanical injury [13]. CFTR-deficient airway epithelial cell lines [14] and primary cultures of human CF AECs [15] undergoing repair after injury showed delay in the kinetics of wound closure, which could be partially rescued with CFTR modulators [16,17]. It is thought that, in the absence of exogenous inflammation, the regenerated CF epithelium is remodeled, exhibits basal cell hyperplasia, and shows a delay in ciliated cell differentiation.

Pathological remodeling of the airway epithelium is commonly observed in cystic fibrosis (CF). Thus, tis-

sue repair is critical to restore integrity and maintenance of the epithelial barrier function. Epithelial

repair is a multi-step process initiated by progenitor cell migration into the injured area, proliferation,

and re-differentiation into all of the cell types that contribute to the function of a normal airway ep-

ithelium. Recent technological advances applied to relevant animal and cell injury models have helped in understanding the complexity of progenitor cell differentiation. This short review will introduce the cur-

rent knowledge of the mechanisms regulating airway epithelial cell (AEC) regeneration and repair, with a

© 2019 European Cystic Fibrosis Society. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

focus on the specification of two rare cell types/states: ionocytes and deuterosomal cells.

The combination of relevant animal and cell models (CF pigs, CF human AEC primary cultures) and new powerful methods of single-cell gene expression are likely to shed new lights on the impact of CFTR deficiency on the deregulated mechanisms during regeneration and repair of the CF airway epithelium. The aim of this short review is to briefly describe the different steps of AEC differentiation and emphasize two recently described populations of cells that are relevant for CF, namely pulmonary ionocytes and deuterosomal cells. This review was based on the symposium session "CF Model Systems" presented at the 16th ECFS Basic Science Conference, Dubrovnik, Croatia, 27 to 30 March 2019.

1569-1993/© 2019 European Cystic Fibrosis Society. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.







 $^{^{\}star}$ This paper is part of a Supplement supported by The European Cystic Fibrosis Society (ECFS).

^{*} Corresponding author at: University of Geneva, Medical School Center / PHYME, 1 Michel-Servet, 1211 Geneva, Switzerland.

E-mail address: marc.chanson@unige.ch (M. Chanson).

 $^{^{2}\,}$ Authors contributed equally to this work.





Fig. 2. Main steps of the airway epithelium regeneration and their regulation.

Cell lineage in regenerating AECs

The task of maintaining and repairing the airway epithelium falls mainly on BCs (Figs. 1 and 2). Basal cells are a heterogeneous population of cells expressing TRP63 (transformation related protein 63) and KRT5 (cytokeratin 5), a subset of which express KRT14. The Yes-associated protein (YAP) is critical for BC maintenance by interacting with TRP63; YAP overexpression has been shown to enhance proliferation, BC self-renewal, and to block terminal AEC differentiation [18,19]. YAP interacts with Smad proteins of the BMP (bone morphogenetic protein) and TGF- β signaling pathways, which are known to regulate the expression of genes involved in proliferation and development [20–22].

Upon injury, which exposes BCs to the luminal surface, receptors for growth factors are unmasked, triggering their activation and initiating their migration and proliferation [23]. This phase of newly proliferating and migrating cells, or blastema (containing suprabasal and early progenitor cells), is paralleled by cell differentiation and lineage decisions (Figs. 1 and 2]. Some BCs appear to function as classic multipotent stem cells, while others are thought to be progenitors already committed to a ciliated or secretory fate [5,6]. Several key signaling pathways regulate the continuous transition between proliferation and differentiation. First, AEC proliferation self-perpetuates until closure of the wound; wound closure triggers signals to stop proliferation via mechanisms that involve Notch and PPAR γ signaling [24]. The expression of Notch3 in some daughter cells coincides with the generation of early progenitors [25,26], while early differentiation is dependent on Notch1 and Notch2 signaling to give rise to SCs [27-29]. Although Notch signaling appeared unaltered between CF and non-CF repairing AECs, deficient PPARy signaling was shown in CF cells, which in turn may affect the fine-tuning mechanisms coordinating the transition between proliferation and differentiation within the blastema [30]. Of note, a hyper-proliferative state has been described in CF HAECs [11–13]. Gene ontology analysis of RNA-seq datasets predicted defects in cell cycle regulation and cytoskeleton remodeling of repairing CF HAECs (MC, unpublished). These results suggest that, upon injury, there is a delay in BC cell cycle exit, which could lead to an accumulation of intermediate progenitors within the blastema, slowing down the differentiation process. Alternatively, a defect in cell cycle regulation may change the balance between symmetrical and asymmetrical division [6], thus affecting late differentiation.

It is now clearly established that SCs can act as facultative progenitors to give rise to GCs and MCCs [31]. According to Watson and collaborators, SCs are short-lived and give rise to the dominant MCC population in well-differentiated airway epithelia [6]. Late differentiation to MCCs is achieved through cell division arrest and Notch pathway inhibition in response to increased expression of miR-34/449 [32]. Of note, attenuation of BMP activity seems also necessary for the specification of MCCs [20]. The differentiation of other cell types, including mucous cells, ionocytes, and deuterosomal cells, is also influenced by the Notch/BMP/PPAR γ interplay [7,9,33]. Because ionocytes are highly enriched in CFTR [7,8] and deuterosomal cells represent an immature population of MCCs [33], they may well contribute to the intrinsic remodeling of the CF airway epithelium.

Ionocytes

The levels and distribution of CFTR expression and activity across the airway epithelium have been investigated by numerous laboratories. However, a detailed understanding remains incomplete at least in part due to a lack of 'gold standard' reagents for detecting CFTR. This large body of work has led to the general view that CFTR is expressed at low levels in ciliated cells [34], although early studies using *in situ* hybridization identified rare, CFTR-high expressing cells in both the airway surface epithelium and the submucosal gland ducts [35].

Recently, single-cell RNA-seq profiling of primary mouse and human AECs uncovered a rare population of CFTR-high expressing cells, accounting for approximately 1% of the epithelium [7,8]. These cells also uniquely expressed the *Foxi1* transcription factor, multiple subunits of the vacuolar ATPase (V-ATPase) proton pump, as well as other ion channels. This expression signature is found in ionocytes in teleost fish gills and skin [36] and *Xenopus* larval skin [37,38], as well as in intercalated cells in the mammalian kidney, forkhead-related (FORE) cells in the inner ear, and clear cells in the epididymis [39], and therefore were termed "pulmonary ionocytes".

Despite their paucity, pulmonary ionocytes expressed approximately 54% of the *Cftr* transcripts in the mouse trachea [8]. Furthermore, functional studies measuring channel activity with Ussing chambers found that ionocytes accounted for 60% of the mean channel current in primary human AEC cultures [7]. Together, these data indicate that pulmonary ionocytes are a major source for CFTR activity. Lineage tracing in mice indicates that BCs can give rise to pulmonary ionocytes [8], and immunofluorescence analysis identified Krt5⁺Foxi1⁺ cells in mouse tracheae [7], suggesting that this differentiation occurs without an intermediate state (Fig. 1). Differentiated air-liquid interface cultures derived from human airway BCs also contain pulmonary ionocytes, and FOXI1 overexpression is sufficient to drive the ionocyte transcriptional program in this system [7].

The identification and characterization of the pulmonary ionocyte raises intriguing new possibilities for CF therapy. Identifying the signaling pathways that drive ionocyte production may lead to strategies for increasing the pool of ionocytes, and ultimately CFTR activity, for patients with partial loss of function *CFTR* mutations. Alternatively, gene therapy approaches, either gene transfer or gene editing strategies, may need to focus on targeting the ionocytes, or the pool of basal progenitors that will give rise to ionocytes. Finally, previous studies in *Xenopus* have demonstrated a defect in ciliogenesis in ionocyte-depleted embryos [37]. These data suggest a role for ionocytes in airway remodeling and necessitate careful assessment of their abundance in diseased tissues.

Deuterosomal cells

Multiciliogenesis, the complex process leading to the formation of mature MCCs, involves early E2F-driven transcriptional events, in possible partnership with several geminin-related factors, such as GMNC and MCIDAS, resulting in the expression of MYB, FOXJ1, RFX2, and RFX3, which collectively regulate the expression of a large body of effectors contributing to the formation of multiple motile cilia. A key step of this process corresponds to the massive biogenesis of centrioles in a limited time window, which mostly occurs through an acentriolar structure named the deuterosome.

Single-cell RNA-sequencing has recently been used to reveal lineage hierarchies in the airway epithelium. Data analysis has revealed the expression of many molecules involved in early steps of multiciliogenesis in a specific group of cells, intermediate between secretory and MCCs (Fig. 1). This specific population, entitled deuterosomal cells [33], expresses FOXJ1 but differs from mature MCCs by a unique expression pattern with transcripts that are also expressed in cycling BCs. Specific markers include *DEUP1*, which expresses a key component of deuterosomes, but also FOXN4, PLK4, CCNO and CEP78. This population is also characterized by a re-expression of cell cycle markers, such as CDK1, *CKS1-2, PTTG1, CENPF, CENPU, CENPW*, probably in line with their requirement for the biosynthesis of hundreds centrioles.

Deuterosomal cells express specifically CDC20B, the host gene of miR-449abc, which was recently shown as a key regulator of centriole amplification [33]. CDC20B is required for centriole release and subsequent cilia production in mouse and Xenopus multiciliated cells. It interacts with PLK1, a kinase known to coordinate centriole disengagement with the protease Separase in mitotic cells. Strikingly, over-expression of Separase rescues centriole disengagement and cilia production in CDC20B-deficient MCCs. This work revealed the shaping of deuterosome-mediated centriole production in vertebrate multiciliated cells, by adaptation of canonical and recently evolved cell cycle-related molecules. Detailed analysis of CDC20B revealed the existence of an alternatively spliced isoform, which is more highly expressed and likely corresponding to the major source of miR-449abc [32,40,41]. Gene set enrichment of the deuterosomal population suggests an association with processes such as cilium assembly, centrosome maturation and cell-cycle mechanisms. Genes involved in mitochondrial membrane constitution are also enriched, suggesting an increased number of mitochondria in these cells.

Inhibition of the Notch pathway is a key step in multiciliogenesis (Fig. 2). Single cell analysis shows that this pathway, still active in suprabasal cells, undergoes a clear shift in deuterosomal cells, which is illustrated by a reduction in expression of *NOTCH2*, *NOTCH3*, *HEY1* and *HES4* [9]. This major inhibitory signature is enhanced by the expression of *CIR1* and *SAP30*, two known transcriptional co-repressors, and of *DYRK1A*, an inhibitor of the intracellular domain of Notch. *HES6*, an inhibitor of Notch pathway, is also enriched in deuterosomal cells. Finally, miR-449abc, which is known to alter the Notch pathway [32], is upregulated in deuterosomal cells. Another characteristic of these cells is the activation of the TFG- β pathway, with an increased expression of target genes such as *SERPINE1*, *CTGF*, *ATF3*, *TGFBR3* or *IRF7* [9]. This is consistent with the known role of TGF- β signaling in the regulation of cilia length [42].

Future directions

Single-cell experiments have highlighted novel cell states, pulmonary ionocytes and precursors of MCCs in human AECs. Many questions remain to be addressed: 1) what is the abundance and distribution of the pulmonary ionocyte throughout the respiratory tract and is it altered in CF? 2) Does the ionocyte play regionspecific roles in CFTR-mediated lung homeostasis, as for example, in the ducts of the submucosal glands? 3) Does FOXI1 regulate CFTR expression in other tissues? 4) Are the deuterosomal cells altered during constant renewal of MCCs in the injured CF airway epithelium, in which massive multiplication of centrioles has to take place? 5) What is the contribution of other rare cell types/states (e.g., pulmonary neuroendocrine cells, tuft cells, mucous ciliated cells) to the homeostasis of the normal and CF airway epithelium? It is still unknown whether lung remodeling in CF is intrinsic to the CFTR defect, a consequence of the CF environment or both. There is evidence that a proinflammatory environment affects differently the regeneration of the CF and non-CF airway epithelium [43,44]. Future experiments using advanced profiling technologies, detailed histological analysis, and careful functional studies will be crucial for answering these and other questions, which will help to inform the next wave of CF therapeutic development.

Summary

Our review focusses on the different steps of AEC differentiation and the recent description of ionocytes and deuterosomal cells. Meta-omics approaches offer unpreceded opportunities to gain understanding of the integrative metabolic characteristics of the host and its environment, especially in the context of CF and the lung microbiota. Integrative and predictive analysis of omics data are still in their infancy but the near future is expected to witness major advances in our understanding of the mechanisms of airway epithelial repair in physiological and pathological conditions.

Declaration of Competing Interest

PB, AC, and MC do not have any conflicts of interest relevant to this publication. ABJ and LWP are employees of Novartis Institutes of BioMedical Research. ABJ is a stockholder in Novartis.

Acknowledgement

This work was supported by Vaincre la Mucoviscidose (to MC and PB, ABCF2 and the Swiss National Science Foundation (310030-172909) to MC, FRM (DEQ20180339158), the Chan Zuckerberg Initiative (Silicon Valley Foundation, 2017-175159 - 5022) and France Génomique (ANR-10-INBS-09-03, ANR-10-INBS-09-02) to PB.

References

- Randell SH. Airway epithelial stem cells and the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc 2006;3:718–25.
- [2] Beers MF, Morrissey EE. The three R's of lung health and disease: repair, remodelling, and regeneration. J Clin Invest 2011;121:2065-73.
- [3] Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:12771–5.
- [4] Hogan BL, Barkauskas CE, Chapman HA, Epstein JA, Jain R, Hsia CC, et al. Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function. Cell Stem Cell 2014;15:123–38.
- [5] Pardo-Saganta A, Law BM, Tata PR, Villoria J, Saez B, Mou H, Zhao R, Rajagopal J. Injury induces direct lineage segregation of functionally distinct airway basal stem/progenitor cell subpopulations. Cell Stem Cell 2015;16:184–97.
- [6] Watson JK, Rulands S, Wilkinson AC, Wuidart A, Ousset M, Van Keymeulen A, et al. Clonal dynamics reveal two distinct populations of basal cells in slow– turnover airway epithelium. Cell Rep 2015;12:90–101.

- [7] Plasschaert LW, Žilionis R, Choo-Wing R, Savova V, Knehr J, Roma G, Klein AM, Jaffe AB. A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. Nature 2018;560:377–81.
- [8] Montoro DT, Haber AL, Biton M, Vinarsky V, Lin B, Birket SE, Yuan F, Chen S, Leung HM, et al. A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. Nature 2018;560:319–24.
- [9] Ruiz Garcia S, Deprez M, Lebrigand K, Paquet A, Cavard A, Arguel M-J, et al. bioRxiv. 2018; 10.1101/451807.
- [10] McQualter JL. Endogenous lung stem cells for lung regeneration. Expert Opin Biol Ther 2019;19:539–46.
- [11] Voynow JA, Fischer BM, Roberts BC, Proia AD. Basal-like cells constitute the proliferating cell population in cystic fibrosis airways. Am J Respir Crit Care Med 2005;172:1013–18.
- [12] Hajj R, Lesimple P, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Puchelle E, Coraux C. Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. J Pathol 2007;211:340–50.
- [13] Crespin S, Bacchetta M, Bou Saab J, Tantilipikorn P, Bellec J, et al. Cx26 regulates proliferation of repairing basal airway epithelial cells. Int J Biochem Cell Biol 2014;52:152–60.
- [14] Schiller KR, Maniak PJ, O'Grady SM. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair. Am J Physiol Cell Physiol 2010;299:C912–21.
- [15] Adam D, Roux-Delrieu J, Luczka E, Bonnomet A, Lesage J, Mérol JC, et al. Cystic fibrosis airway epithelium remodelling: involvement of inflammation. J Pathol 2015;235:408–19.
- [16] Trinh NT, Bardou O, Privé A, Maillé E, Adam D, Lingée S, et al. Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue. Eur Respir J 2012;40:1390–400.
- [17] Adam D, Bilodeau C, Sognigbé L, É Maillé, Ruffin M, Brochiero E. CFTR rescue with VX-809 and VX-770 favors the repair of primary airway epithelial cell cultures from patients with class II mutations in the presence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts. J Cyst Fibros 2018;17:705–14.
- [18] Mahoney JE, Mori M, Szymaniak AD, Varelas X, Cardoso WV. The hippo pathway effector Yap controls patterning and differentiation of airway epithelial progenitors. Dev Cell 2014;30:137–50.
- [19] Zhao R, Fallon TR, Saladi SV, Pardo-Saganta A, Villoria J, Mou H, et al. Yap tunes airway epithelial size and architecture by regulating the identity, maintenance, and self-renewal of stem cells. Dev Cell 2014;30:151–65.
- [20] Cibois M, Luxardi G, Chevalier B, Thomé V, Mercey O, Zaragosi L-E, et al. BMP signalling controls the construction of vertebrate mucociliary epithelia. Development 2015;142:2352–63.
- [21] Mou H, Vinarsky V, Tata PR, Brazauskas K, Choi SH, Crooke AK, et al. Dual SMAD signaling inhibition enables long-term expansion of diverse epithelial basal cells. Cell Stem Cell 2016;19:217–31.
- [22] Tadokoro T, Gao X, Hong CC, Hotten D, Hogan BLM. BMP signaling and cellular dynamics during regeneration of airway epithelium from basal progenitors. Development 2016;143:764–73.
- [23] Vermeer PD, Einwalter LA, Moninger TO, Rokhlina T, Kern JA, Zabner J, Welsh MJ. Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. Nature 2003;422:322–6.
- [24] Chanson M, Watanabe M, O'Shaughnessy EM, Zoso A, Martin PE. Connexin communication compartments and wound repair in epithelial tissue. Int J Mol Sci 2018;3:19.
- [25] Pan JH, Adair-Kirk TL, Patel AC, Huang T, Yozamp NS, Xu J, et al. Myb permits multilineage airway epithelial cell differentiation. Stem Cells 2014;32:3245–56.
- [26] Mori M, Mahoney JE, Stupnikov MR, Paez-Cortez JR, Szymaniak AD, Varelas X, et al. Notch3-Jagged signaling controls the pool of undifferentiated airway progenitors. Development 2015;142:258–67.
- [27] Rock JR, Gao X, Xue Y, Randell SH, Kong YY, Hogan BL. Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. Cell Stem Cell 2011;8:639–48.
- [28] Morimoto M, Nishinakamura R, Saga Y, Kopan R. Different assemblies of Notch receptors coordinate the distribution of the major bronchial Clara, ciliated and neuroendocrine cells. Development 2012;139:4365–73.
- [29] Danahay H, Pessotti AD, Coote J, Montgomery BE, Xia D, Wilson A, et al. Notch2 is required for inflammatory cytokine-driven goblet cell metaplasia in the lung. Cell Rep 2015;10:239–52.
- [30] Bou Saab J, Bacchetta M, Chanson M. Ineffective correction of PPARγ signaling in cystic fibrosis airway epithelial cells undergoing repair. Int J Biochem Cell Biol 2016;78:361–9.
- [31] Wansleeben C, Barkauskas CE, Rock JR, Hogan BLM. Stem Cells of the adult lung: their development and role in homeostasis, regeneration and disease. WIRES Dev Biol 2013;2:131–48.
- [32] Marcet B, Chevalier B, Luxardi G, Coraux C, Zaragosi LE, Cibois M, et al. Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. Nat Cell Biol 2011;13:693–9.
- [33] Revinski DR, Zaragosi LE, Boutin C, Ruiz-Garcia S, Deprez M, Thomé V, et al. CDC20B is required for deuterosome-mediated centriole production in multiciliated cells. Nat Commun 2018;9:4668.
- [34] Kreda SM, Mall M, Mengos A, Rochelle L, Yankaskas J, Riordan JR, Boucher RC. Characterization of wild-type and deltaF508 cystic fibrosis transmembrane regulator in human respiratory epithelia. Mol Biol Cell 2005;16:2154–67.
- [35] Engelhardt J, Yankaskas JR, Ernst SA, Yang Y, Marino CR, Boucher RC, et al. Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. Nat. Genet. 1992;2:240–8.
- [36] Conte FP. Origin and differentiation of ionocytes in gill epithelium of teleost fish. Int Rev Cell Mol Biol 2012;299:1–25.

- [37] 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.
- [38] Quigley IK, Stubbs JL, Kintner C. Specification of ion transport cells in the Xeno*pus* larval skin. Development 2011;138:705–14.
- [39] Vidarsson H, Westergren R, Heglind M, Blomqvist SR, Breton S, Enerbäck S. The forkhead transcription factor Foxi1 is a master regulator of vacuolar H-AT-Pase proton pump subunits in the inner ear, kidney and epididymis. PLoS One 2009;4:e4471.
- [40] Chevalier B, Adamiok A, Mercey O, Revinski DR, Zaragosi LE, Pasini A, et al. miR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways. Nat Commun 2015;6:8386.
- [41] Mercey O, Kodjabachian L, Barbry P, Marcet B. MicroRNAs as key regulators of GTPase-mediated apical actin reorganization in multiciliated epithelia. Small GTPases 2016;7:54-8.
- [42] Tözser J, Earwood R, Kato A, Brown J, Tanaka K, Didier R, et al. TGF- β signaling
- [74] Fosser J, Larwood K, Kato A, Diowi J, Tataka K, Diuler K, et al. 167-9 Signaling regulates the differentiation of motile cilia. Cell Rep 2015;11:1000-7.
 [43] Fischer BM, Wong JK, Degan S, Kummarapurugu AB, Zheng S, Haridass P, Voynow JA. Increased expression of senescence markers in cystic fibrosis air-
- (44) Adam D, Roux-Delrieu J, Luczka E, Bonnomet A, Lesage J, Mérol JC, Polette M, Abély M, Coraux C. Cystic fibrosis airway epithelium remodelling: involvement of inflammation. J Pathol 2015;235:408–19.

Chapitre 4 : Influence du milieu de culture sur les dynamiques de différenciation pendant la régénération *in vitro* de l'épithélium des voies respiratoires humaines

Article : Influence of cell culture media on differentiation dynamics during in vitro regeneration of the human airway epithelium. (En préparation)

<u>Cavard A¹</u>, Girard C¹, Plaisant M, Arguel MJ, Lebrigand K, Abélanet S, Ruiz-Garcia S, Ponzio G, Gras D, Barbry P*, <u>Marcet B*</u>, <u>Zaragosi LE*</u>.

Contexte de l'étude

Le but de cette étude a été de déterminer l'influence du milieu de culture sur la composition de l'épithélium des voies respiratoires obtenus pendant la régénération *in vitro*.

La régénération *in vitro* d'épithélium des voies respiratoires à l'Interface Air/Liquide (ALI) (page 42) est un système largement utilisé pour réaliser des études fonctionnelles en biologie cellulaire et moléculaire, en pharmacologie, ou encore pour des études physiopathologiques relatives aux maladies chroniques respiratoires comme l'asthme (page 103), la BPCO (page 106) ou la mucoviscidose (page 108). Notre équipe a montré que la composition de l'épithélium varie en fonction de la localisation anatomique de l'épithélium des voies respiratoires, avec des différences entre l'épithélium nasal et trachéo-bronchique [29].

Etant donné les différences importantes qui existent dans les conditions expérimentales de cultures ALI utilisées à travers les nombreuses études dans la littérature, il est nécessaire de définir avec précision l'impact de ces différents protocoles expérimentaux sur la composition finale des épithéliums ainsi reconstitués. A l'heure actuelle, quatre milieux de culture distincts sont classiquement utilisés dans la littérature pour étudier la régénération de l'épithélium des voies respiratoires chez l'humain. Les différents milieux de cultures ont soit des formulations brevetées (milieux BEGM™ et Pneumacult™) soit ce sont des milieux définis ou semi-définis (milieu "Half&Half" et "Clancy"). A ce jour, aucune étude n'a comparé en détails, l'impact de ces quatre milieux de culture BEGM™, Pneumacult™, "Half&Half" et "Clancy" sur la composition cellulaire d'un épithélium des voies respiratoires en culture ALI, par des analyses en "Single-Cell RNA-seq" (page 119). Ainsi, pour évaluer l'impact de ces milieux de cultures sur la composition de l'épithélium des voies respiratoires, nous avons analysé par cette méthode, les cellules épithéliales obtenues après étapes de prolifération en immersion, et après différenciation ALI. Plus particulièrement, nous avons utilisé une approche de "cell hashing" qui nous a permis de multiplexer les cellules de toutes les conditions expérimentales dans un seul puits du "Chromium cell partionning device" afin de réduire l'effet "batch" et d'assurer des conditions expérimentales de "Single-cell RNA-seq" identiques pour la comparaison de conditions de cultures cellulaires différentes.

Notre étude révèle premièrement l'impact des milieux de culture dès l'étape de prolifération sur la composition cellulaire et l'expression transcriptomique. Deuxièmement, notre étude montre qu'il existe de fortes similarités entre les cellules cultivées en conditions Pneumacult™ et "Half&Half", que ce soit dans les étapes de prolifération ou dans les étapes de différenciation. Troisièmement, nous avons noté des particularités concernant les cellules cultivées en milieu BEGM™ et "Clancy" aussi bien dans les étapes de prolifération que de différenciation. Ces différences observées en "Single-Cell RNA-seq" ont été validées par des observations morphologiques des épithéliums différenciés. Une comparaison avec les données de notre équipes obtenues pour le projet "Human Cell Atlas" a également été réalisée pour évaluer la pertinence de chaque milieu de culture par rapport à des conditions *in vivo* [29]. Des différenciation la proportion plus élevée de cellules multiciliées et cellules à mucus dans la différenciation *in vitro* comparée aux échantillons *in vivo*, et la présence de cellules à mucus MUC5B-positives dans l'épithélium des voies respiratoires *in vivo*.

Cette étude révèle ainsi les différences existantes entre l'épithélium des voies respiratoires obtenus *in vitro* après culture dans différents milieux de culture et dans les échantillons *in vivo*. L'impact des milieux de culture dès les étapes de prolifération appuie l'importance à accorder au choix du milieu de culture en fonction des questions biologiques à résoudre.

Influence of cell culture media on differentiation dynamics during *in vitro r*egeneration of the human airway epithelium

Amélie Cavard*, Cédric Girard*, Magali Plaisant, Kevin Lebrigand, Marie-Jeanne Arguel, Sandra Ruiz Garcia, Gilles Ponzio, Delphine Gras, Sophie Abelanet, Pascal Barbry, Brice Marcet⁺, Laure-Emmanuelle Zaragosi⁺

Affiliations

1 Université C te d'Azur, CNRS, IPMC, Sophia-Antipolis, 06560, France

* Contributed equally

+ Contributed equally

Corresponding authors: barbry@ipmc.cnrs.fr, zaragosi@ipmc.cnrs.fr, marcet@ipmc.cnrs.fr

Abstract

The human airway epithelium has been extensively investigated in vitro through the use of cell cultures of freshly isolated basal cells. When cells are exposed to an air-liquid interface (ALI), a well-differentiated epithelium develops, made of multiciliated, goblet, club and basal cells. This cell culture system has been used as a convenient and reliable surrogate in thousands of functional studies in pharmacology, cell biology, molecular biology. It remains that huge variations in the composition of culture media exist between commercial cell culture media with proprietary formulations (e.g. BEGM[™] and Pneumacult[™]), and defined or semi-defined media ("Wu medium", "Clancy medium"). These variations result in specific characteristics, which make one specific medium more particularly relevant for short circuit measurements, airway differentiation... No study has yet evaluated in depth the impact of cell culture media on cell type distribution at a single-cell RNAseq level. This work presents an analysis of cell type distributions and compositions after ALI differentiation in 4 distinct media: BEGM[™], Pneumacult[™], Half & Half and "Clancy" medium. Cells were first analyzed at the proliferation stage and after full differentiation. Our study reveals the high similarities existing between cells differentiated in Pneumacult-ALITM or Half & Half, and the high specificities of cells differentiated in BEGMTM or in Clancy medium. A careful comparison of our data with a human airway cell atlas was finally used to evaluate the relevance of each cell culture medium relative to reproduce the *in vivo* situation.

Introduction

The mammalian airways are lined by a mucociliary epithelium, from the nose to the lungs. The surface epithelium is composed of several cell types such as basal, club, goblet and multiciliated cells (MCCs), as well as rare cell types (ionocytes, pulmonary neuroendocrine and tuft cells). The cell composition of the epithelium varies according to the macro-anatomical location, with the highest differences found between the nasal and the tracheobronchial epithelia [1]. Within the tracheobronchial airways, cellular distribution is relatively stable, with modifications occurring in the most distal bronchi [1-3]. The airway epithelium is frequently challenged by inhalation of pollutants, microorganisms and viruses, which induce alteration of its integrity. Specific repair mechanisms allow it to be fully restored so that normal physiological function can be re-established. In chronic lung diseases, such as cystic fibrosis, asthma or chronic obstructive pulmonary disease, frequent injuries and chronic inflammation induce a remodeling of the epithelium, often associated with a progressive loss of MCCs and an increased content of goblet cells. Studying the regeneration of the epithelium in normal or pathological conditions has become necessary to identify mechanisms regulating the physiological regeneration and pathological remodeling of the airway epithelium. The development of 3D cell cultures at the Air-Liquid Interface (ALI) of nasal or bronchial epithelial cells has allowed many mechanistic studies. These cultures have been confirmed as convenient surrogates of in vivo epithelium [4– 7]. Moreover, ALI cultures have been used to confirm and describe further the common scheme of lineage relationships during airway regeneration [4,8] (Fig. 1A). Last but not least, it was used by the Food and Drug Administration Results as a surrogate to reasonably predict clinical

response to Kalydeco for rare CFTR mutations which have such small CF patient populations that direct clinical trial studies are not feasible [9].

Considering the huge differences existing in cell culture conditions across the many studies using ALI cultures, it is important to define exactly the impact of the different experimental setups in term of cellular composition. We investigate in the present study the impact of 4 distinct proliferation and differentiation media on the epithelial structure and cellular composition of the 3D reconstructed epithelia. Two of them correspond to commercially available and widely used media (Pneumacult[™] and BEGM[™]), one is Half & Half, which has been recently described by Susan Reynold's group as producing less biases compared to other media [10], the last one is the medium used by Clancy's group to perform electrophysiological investigations [11].

Results

In order to evaluate the impact of cell culture media on cell composition of fully differentiated, ALI-regenerated airway epithelium, we used primary cells that were freshly dissociated from human bronchi. After one amplification step in Pneumacult-Ex-Plus[™] medium, cells were split in 4 and seeded on Transwells[®] in 4 distinct proliferation media: (1) Pneumacult-Ex-Plus[™], (2) "Wu medium", (3) BEGM[™], (4) "Clancy medium". Once the cells have reached confluence, differentiation was induced by removing the medium in the apical chamber, and by placing differentiation-specific media in the basal chamber. The differentiation media were (1) Pneumacult-ALI[™], (2) Half & Half, (3) BEGM-ALI[™], (4) Clancy. Single-cell RNA-seq (scRNA-seq) was performed at 3 time-points: at the initial seeding on Transwells[®] (LLO for Liquid-Liquid 0), at the onset of the air-liquid interface (ALIO) and at full differentiation (ALI28 and ALI22 for an independent cell culture). The experimental procedure is schematically described in Fig. 1B.



Fig.1. Overview of the experimental strategy. (A) Model of upper airway epithelium, based on six major types of epithelial cells, with consensus lineage hierarchy. (B) scRNA-seq experimental design. Airway epithelial regeneration was performed in 4 distinct cell culture media, were dissociated during proliferation on flasks (LLO), at the onset of differentiation, at the transition to an air-liquid interface (ALIO) and at full differentiation (ALI28).

Identification of cell types during initial cell amplification

Our first scRNA-seq data point was analyzed on cells immediately after the amplification step, to check the different cell identities that were present on filters just before the shift to one of

our 4 distinct proliferation conditions. A total of 1374 cells were analyzed, in which we found a majority of cycling basal cells (Fig. 2A). Interestingly, additional cell types were identified. After an automatic clustering with Seurat, we defined four separate clusters which were individually annotated on the basis of selected gene markers. Besides the identification of basal and cycling basal cells, this led to the identification of KRT13+ suprabasal cells as well as club cells. Suprabasal cells were defined as being positive for KRT5 but negative for TP63 (Figure 1B). These cells were KRT13-positive, and comprised some proliferative cells, based on MKI67 expression (Fig. 2B), in agreement with our previous findings [1,4]. A small fraction of club cells was also detected, identified by the robust expression of SCGB1A1. No proliferation was detected among club cells, as evidenced by the absence of MKI67 expression (Figure 2B). On the contrary, HES4, a Notch pathway-target genes was clearly upregulated in club cells, and slightly upregulated in suprabasal cells. In an independent analysis performed on a separate donor, no club cell was detected (Supplemental Fig. 1) and a KRT13+, TP63+, non-proliferative basal cell fraction was detected. This latter point indicates that KRT13 is not exclusively expressed by suprabasal cells (Supplemental Fig. 1).



Fig.2. Distribution of cell types during cell amplification on plastic. (A) UMAP representation of 1374 cells analyzed at the time of Transwell[®] seeding. **(B)** Expression level of a selected set of gene markers.

Identification of cell types at the onset of differentiation

The second time point of our experiment was chosen at 5 days of proliferation on permeable filters in the 4 separate media. We performed at that time scRNA-seq experiments to evaluate the cell composition at this starting point of differentiation. We reasoned that differences in regeneration might very well stem during this proliferation step. Strikingly, cell composition in Pneumacult-Ex-Plus[™] and Wu medium were highly similar. There were more basal cells in the

Wu medium, at the expense of suprabasal cells (Fig. 3A and 3B). The BEGM[™] medium generated a smaller fraction of proliferative cells, which is consistent with the lower cell densities observed in this medium, in spite of reaching confluency. Indeed, contact inhibition appeared higher in BEGMTM (data not shown). Club cells (*SCGB1A1*+) were observed in every condition except BEGM[™]. Given the absence of proliferation in these cells, club cells emerge very probably from differentiation during the expansion process. By performing differential gene expression analysis between the 4 conditions, we noticed an unexpected expression of the goblet cell-specific transcription factor SPDEF in Pneumacult-Ex-Plus[™] and Wu medium, in all 4 cell types that are present at this stage (Fig. 3E). SPDEF was not detected in either BEGMTM nor Clancy medium (Fig. 3E). To confirm this finding, we set up cultures on 4 independent batches of nasal epithelial primary cells, from 4 distinct healthy donors, either in BEGM[™] or in Pneumacult-Ex-Plus[™]. Quantitative PCR analysis confirmed strong upregulation of *SPDEF* in all 4 donors (Fig. 3D). In the BEGM[™] condition, we found a cell population that did not match with any cell type usually found in vivo, which we named "undefined". These cells are negative for all basal cell markers, and positive for SQSTM1, GADD45A, KLF10 and PP1R15A.



Fig.3. Impact of distinct proliferation media on cell type composition and cell expression at ALIO. (A) UMAPs for each proliferation medium. (B) Quantification of each cell type for each proliferation medium. (C) Expression of SPDEF by each cell type, in each proliferation medium.
(D) SPDEF expression (qPCR) for 4 independent nasal cell cultures, at proliferation, on flasks, in either BEGM[™] or Pneumacult-Ex-Plus[™].

Impact of cell culture media on epithelial morphology

After 28 days of differentiation, Transwells[®] were fixed for histological analysis and immunostainings. Hematoxylin/Eosin staining on Transwell[®] sections revealed high differences in tissue structures. Pneumacult-ALITM and Half & Half media generated thick epithelia with an apical side covered with cilia (Fig. 4A). BEGM-ALITM and Clancy media generated much thinner epithelia, with an extreme situation for Clancy medium (Fig. 4A). Immunostaining for *MUC5AC*, a goblet-specific mucin and acetylated alpha-tubulin, for cilia labeling, confirmed high multiciliated cell (MCC) content in both Pneumacult-ALITM and Half & Half media (Fig. 4B). *MUC5AC* staining suggested similar goblet cell content in all media (Fig. 4B). Orthogonal views of confocal images confirmed the differences in tissue thickness (Fig. 4B).



Fig.4. General characterization of epithelial regeneration in 4 distinct cell culture media. (A) Hematoxylin/Eosin staining of sections of paraffin-embedded Transwells[®]. **(B)** Immunostaining of Transwells[®] for MUC5AC and acetylated alpha-tubulin.

Cell type identification on fully differentiated cultures

The third time point of our experiment was chosen at the same time of 28 days of proliferation on permeable filters at which we performed scRNA-seq on cells dissociated from the same cultures. We analyzed 2093 cells for Pneumacult-ALI[™], 874 for Half & Half, 1041 for BEGM-ALI[™] and 1135 for Clancy. We used cell hashing to pool all cells within one well of the Chromium cell-partitioning device, which reduces batch effects and allows comparison of data from the 4 separate conditions, in order to ensure identical experimental conditions during the single-cell analysis. Cell types were determined based on expression of known marker genes (Fig. 5A and 5B). Basal, suprabasal and club cells were determined as mentioned above. As in our previous studies [1,4], club-like cells were identified as cells with an overall gene expression profile that is very similar to that of club cells, at the exception of SCGB1A1, which is not detected in club-like cells. We termed some cells "suprabasal/club intermediates" as they did not express KRT5, but expressed low but detectable SCGB1A1 and SCGB3A1. They differed from club-like and club cells but probably represent a cell state which forms a continuum with these two cell types. Two separate classes of goblet cells were found: some were only positive for MUC5B, other were both positive for MUC5B and MUC5AC. Of note, MUC5AC, probably because of being a very long transcript, is generally poorly detected in scRNA-seq, leading to an underestimation of MUC5AC+ cells. MCCs cells were identified as FOXJ1+, PIFO+, DNAH5+ and deuterosomal cells, which are cells amplifying centrioles, were FOXJ1+, DNAH5-, CDC20B+ and DEUP1+. Heatmaps in Fig. 5B show the expression, in Pneumacult-ALI[™] and Half & Half media, of the most common gene markers that are used in the literature.

Impact of cell culture media on cell type distribution

In agreement with histological and immunostaining data, Pneumacult-ALI[™] and Half & Half cultures displayed highly similar profiles (Fig. 5A-C). They both yielded about 27% of MCCs and deuterosomal cells were identified, being clearly distinct from MCC. MCCs represented 2.3% and 3.6% of all cells in Pneumacult -ALI[™] and Half & Half, respectively (Fig. 5C). In Pneumacult, only *MUC5B*-positive cells were detected, at a frequency of 15.2%, whereas in Half & Half, both *MUC5B*+ and *MUC5B-AC*+ positive were found, each at a frequency of 4.3%. BEGM-ALI[™] and Clancy media cultures displayed very different profiles. BEGM-ALI[™] yielded 5.2% MCCs, whereas no MCCs were detected in Clancy medium. Both these media yielded high fractions of *MUC5B*+ and *MUC5B/AC*+ goblet cells. This high fraction in BEGM -ALI[™] is surprising given our previous studies in which we did not detect any goblet cells in nasal cells cultured in BEGM -ALI[™] [4]. Two methodological variations might explain this discrepancy: our previous study used nasal basal cells and a cell amplification step in BEGM -ALITM, as opposed to this one using bronchial cells and a cell amplification step in Pneumacult-Ex-Plus[™]. As shown in Fig. 3C-D, Pneumacult-Ex Plus[™] triggered the expression of SPDEF, which might render cells more permissive to a goblet fate in BEGM -ALI[™] medium. In BEGM -ALI[™] we found an undefined population, in agreement with our previous works. This population is probably an intermediate state with no marker being sufficiently specific to assign a cell type. Future cell lineage inference hierarchies will be necessary to place these cells within a differentiation trajectory. Of note, in Clancy medium, basal cells appeared split into 2 clusters. The main difference within these 2 clusters is the expression of CDH6 in only one of them. So far, CDH6 has never been described or even detected in airway cells. However, a very recent study suggest that DNA
methylation levels at *CDH6* might influence the risk of asthma [12]. Data was obtained from a separate donor, in similar conditions yielded similar results (Supplemental Fig. 3).

Comparison of in vitro data with a human airway cell atlas

To evaluate how *in vitro* differentiation relates to *in vivo* airway content, we next compared the data obtained here with our previous single-cell airway atlas ([1], https://www.genomique.eu/cellbrowser/HCA/?ds=HCA_airway_epithelium_grch38). A direct comparison can be difficult for several reasons: (1) in our airway atlas, we could not discriminate between club and goblet cells, they were placed under the term "secretory cells"; (2), then we captured some submucosal glands in some of the biopsies, leading to a high serous (LTF+) cell content in nasal samples; (3) finally, sampling, handling and dissociation methods may induce significant biases in the analyses. Despite these difficulties, some general conclusions can be drawn. Overall, we found that the basal cell content seemed comparable between in vitro and in vivo situations; in vitro differentiation yielded more MCCs and goblet cells compared to in vivo samples. Interestingly, all in vitro conditions yielded some MUC5B+only cells, which, in vivo, are mainly found in submucosal glands. In vivo, these cells are negative for *SCGB1A1*, which was the case in vitro for BEGM -ALI[™] and Clancy (Supplementary Fig. 2), but not for Pneumacult-ALI[™] and Half & Half, in which most *MUC5B*+ cells expressed SCGB1A1. KRT13 profiles are also interesting to compare. In Pneumacult-ALI[™], Half & Half and Clancy media, KRT13+ are found within the basal cell compartment (Fig. 5B), as it is much more restricted to suprabasal cells in BEGM-ALITM, as it is *in vivo*, mainly in nasal samples.



Fig.5. Cell type proportion in each cell culture medium at ALI28. (A) UMAP for each culture condition. (B) Heatmap of the main gene markers for cell type definition, shown for Pneumacult-

ALITM and Half & Half media. (C) Quantification of cell type distribution in each cell culture condition. (D) Cell type distribution in airway biopsies from [1].

Notch pathway distribution varies according to the differentiation media

To gain insights into putative functional differences induced by the medium composition, we focused on the Notch pathway. This signaling pathway plays a pivotal role during commitment of basal cells: activation leads to club and goblet lineages, while inhibition leads to differentiation towards MCCs [13–16]. For the sake of clarity, we will only present the data of one target gene (*HES4*) and one receptor (*NOTCH2*). As expected, *HES4* levels were found to be higher in suprabasal, club, club-like and goblet cells for all media. Levels were lower in basal, deuterosomal and MCCs. However, the amplitude of this dynamics seems to be higher in BEGM-ALITM medium. The *NOTCH2* receptor has been reported to be specific of club and goblet cells [4,13], which was the case here in Pneumacult-ALITM and Clancy media. Surprisingly, we found *NOTCH2* expression in basal and deuterosomal cells in Half & Half, and even in cycling basal and MCCs in BEGM-ALITM.



Fig.6. Medium-dependent Notch pathway activation. Expression of HES4 (left) and NOTCH2 (right) per cell type, per differentiation medium, on the ALI28 sample.

Supplemental Figures



Supp. Fig. 1. Distribution of cell types during cell amplification on plastic. (A) UMAP representation of 662 cells analyzed at the time of Transwell[®] seeding. *(B)* Expression level of a selected set of gene markers.



Supp. Fig. 2. Heatmap of the main gene markers for cell type definition, for BEGM-ALITM and Clancy media.



Supp. Fig. 3. Cell type proportion in each cell culture medium at ALI22 - Donor 2. (A) UMAP for each culture condition. *(B)* Heatmap of the main gene markers for cell type definition, shown for Pneumacult-ALI[™] and Half & Half media. *(C)* Quantification of cell type distribution in each cell culture condition.

Methods

Human samples

HAECs (Human Airway Epithelial Cells)

Human Bronchial Epithelial Cells (HBEC) were obtained from human transplant donor lungs deemed unsuitable for transplantation and donated to medical research. The ethics committees of the institutions involved approved this study (CERC-SFCTCV-2018-5-6-9-8-32-DjXa). Cells were isolated from bronchial rings of 2 healthy donors, both non-smokers and with no chronic disease according to the family. One donor was a 62-year old woman, and the other one was a 34-year old man.

Primary human bronchial epithelial cells were isolated by protease digestion of human airways. Briefly, after surgical removal specimens were rinsed in phosphate-buffered saline without Ca²⁺ and Mg²⁺ (PBS ^{-/-}) to completely remove blood and mucus plugs. The epithelium on intact segments of trachea and bronchi was then dissociated with pronase (0,1%) in Pneumacult-Ex-Plus[™] medium (Stemcell Technologies) at 4°C for 16 hours. After digestion, the tracheal/bronchial tube was rinsed with PBS ^{-/-} and dissociated cell clumps were strained through a 70-µm nylon mesh (Becton Dickinson). Cells were recovered and suspended in Pneumacult-Ex-Plus[™] medium (StemCell Technologies) and then plated on collagen I-coated 75 cm² flask. After 5 days of proliferation, after cells have reached about 80% confluence, cells were detached using trypsin-EDTA 0,05% (Gibco) for 5 in 2 times, collected in inactivation buffer, centrifuged at 150 g for 5 min and resuspended in 10 mL HBSS with 0,04% BSA. Cells were filtered through a 15 µm cell strainer (Pluriselect) to remove clumps and centrifuged. Cells were counted with Countess[™] automated cell counter (Thermo Fisher Scientific). One part of the cells was used to capture 1000 cells by the Chromium device (10X genomics) to perform single-cell RNA-seq experiment. The rest of the cells were split in 4, centrifuged and resuspended in 4 distinct proliferation media: (1) Pneumacult Ex-Plus[™] Medium (Stemcell Technologies), (2) Wu Medium (Table 1), (3) BEGM[™] (Lonza, Bronchial Epithelial Growth Medium, prepared as indicated by the manufacturer, but omitting gentamycin) and (4) Clancy medium (Table 2). Cells were seeded on human placenta collagen IV-coated Transwell® permeable supports (6.5 mm diameter; 0.4 µm pore size; Corning) in the apical part with a density of ~50 000 cells per Transwell[®] and with medium in the basal part. The remaining cells were used to perform Single-cell RNA-seq (scRNA-seq) for the step named "LLO" for "Liquid-Liquid Day 0" (see below). Medium was replaced 48h after seeding, and once the cells have reached confluence (~5 days after seeding), the medium was removed from the apical side of the Transwell[®] and the basal medium, replaced by differentiation media: (1) Pneumacult[™]-ALI (StemCell Technologies), (2) Half & Half (3) BEGM[™] -ALI medium, (4) Clancy medium (Table 2). BEGM[™]-ALI was prepared by adding BEGM[™] singlequots (Lonza) to BEBM[™]:DMEM (50:50) but omitting gentamycin and replacing retinoic acid so as to obtain a final concentration of 30 nM (Sigma Aldrich reference R2625). Half & Half medium was Wu medium: Pneumacult-ALI medium (50:50) with all Pneumacult-ALI supplements but omitting the 100x supplement [10]. The day the air-liquid interface is applied, and media are replaced by differentiation media is named "ALIO" for "Air-Liquid O". Cells from each proliferation condition are dissociated (see below) to perform a scRNA-seq analysis. Culture medium was changed every two days. Cells

were harvested at fully-differentiated state, either at ALI22 or ALI28 depending on the experiment, and as indicated in the figures.

Product	Supplier Reference		Final concentration
Hepes	Gibco		15 mM
MgCl2	Sigma	M1028	0.3 mM
MgSO4	Sigma	M3409	0.4 mM
CaCl2	Alfa Aesar (fisher)	J62905-AP	1.05 mM
Bovine pit extract	Sigma	P1476	15 μg/mL
Alltrans retinoic acid	Sigma	R2625	30 nM
Insulin	Sigma	16634	5 μg/mL
Transferrin	Sigma	T0665	5 μg/mL
EGF	Corning (Fisher)	354052	10 ng/mL
Cholera toxin	Sigma	C8052	20 ng/mL
BSA	Sigma		5 mg/mL
Dexamethasone	Sigma	D4902	0.5 μM

 Table 1: Composition of Wu medium [11,17]

Table 2: Composition of Clancy medium [11]

Product	Supplier	Reference	Final concentration
---------	----------	-----------	---------------------

Hepes	Gibco		15 mM
Ultroser-G	Pall		0.02
Fetal Clone II	Hyclone	SH 30066-03	0.02
Bovine Brain extract	Lonza	CC-4092	0.0
Alltrans retinoic acid	Sigma	R2625	10 nM
Insulin	Sigma	16634	2.5 μg/mL
Transferrin	Sigma	T0665	5 μg/mL
Hydrocortisone	Sigma	H0396	20 nM
Triiodothyronine	Sigma	T6397	500 nM
Epinephrine	Sigma	E4250	1.5 μM
Phosphoethanolamine	Sigma	P0503	250 nM
Ethanolamine	Sigma	E0135	250 nM

Cell dissociation for single-cell RNA-seq

To perform single-cell analysis from cells harvested in Transwell[®], the cells were incubated, either with trypsin-EDTA for 15 min at 37°C (ALIO time point) or with 0.1% protease type XIV *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich) in supplemented HBSS for 4 hours at 4°C for the ALI22 and ALI28 time points. Then, cells were gently detached from the Transwell[®] by pipetting and transferred in a microtube. Cells were centrifuged at 150 g for 5 min and resuspended in 500 μL

of supplemented HBSS containing 2% BSA, centrifuged again at 150 g for 5 min and resuspended in 500 µL HBSS with 10% FBS and dissociated mechanically 4 times through a 26G syringe. Finally, cell suspensions were filtered through a 40 µm porosity FlowmiTM Cell Strainer (Bel-Art), centrifuged at 150 for 5 min and resuspended in 500 µL of HBSS. Cell concentration and viability were measured with a CountessTM automated cell counter (Thermo Fisher Scientific), after incubation with NucGreen to detect dead cells (Thermofisher scientific). All steps, except trypsin incubation were performed on ice. For LLO, cell concentration was adjusted to 300 cells/µL in HBSS for the cell capture by 10X genomics device, in order to capture 1750 cells. For ALIO and ALI22/28, cell hashing was performed (see below).

Cell Hashing for single-cell RNA-seq

Cell concentration of each cell suspension (4 conditions per time point) was determined, and 500 000 cells of each were centrifuged and resuspended in 100 μ L of HBSS containing 2% BSA. Each cell suspension was then incubated with 0.5 μ g of a distinct hashtag antibody (TotalSeqTM-A0251, A0252, A0253 and A0254, BioLegend). Each cell suspension was washed twice with HBSS, and cell concentration was measured again. Cells from each of the 4 conditions were pooled in order to obtain a final cell suspension containing identical cell concentration of each condition. We aimed at reaching a total concentration of 700 cells/mL in HBSS for the cell capture by 10X genomics Chromium, in order to capture 10 000 cells i.e. 2500 cells per condition.

Single-cell RNA-seq

We followed the manufacturer's protocol (Chromium[™] Single Cell 3' Reagent Kit, v2 Chemistry) to obtain single cell 3' libraries for Illumina sequencing. Libraries were sequenced with a NextSeq 500/550 High Output v2 kit (75 cycles) that allows up to 91 cycles of paired-end sequencing: Read 1 had a length of 26 bases that included the cell barcode and the UMI; Read 2 had a length of 57 bases that contained the cDNA insert; Index reads for sample index of 8 bases. Cell Ranger Single-Cell Software Suite v1.3 was used to perform sample demultiplexing, barcode processing and single-cell 3' gene counting using standards default parameters and human build hg 38.

Single-cell data analysis

Preprocessing, normalization and clustering. Individual dataset analysis was performed using Seurat standard analysis pipeline [18]. Briefly, cells were first filtered based on number of expressed features, dropout percentage, library size and mitochondrial gene percentage. Thresholds were selected by visually inspecting violin plots in order to remove the most extreme outliers. Genes expressing less than 5 UMI across all cells were removed from further analysis. Cell-level normalization was performed using the median UMI counts as scaling factor. Highly variable genes were selected for following analysis based on their expression level and variance. PCA analysis was performed on those hvgs, the number of PCs to use was chosen upon visual inspection of the PC variance elbowplot (~10 to 20 PCs depending on the dataset). Clustering was first performed with default parameter and then increasing the resolution parameter above 0.5 to identify small clusters (but with the knowledgeable risk of splitting big cluster due to high gene expression variability). Differential analysis was again performed using Seurat FindAllMarkers and FindMarkers functions based on non-parametric Wilcoxon rank sum test.

Cell Type Annotation. Based on the time course experiment analysis and associated top ~15 marker genes identified, a score was computed to associate cell types to each cluster. Scoring method is based on Macosko. *et al.* cell cycle phase assignment [19]. For each cell it measures the mean expression of the top marker genes for each possible cell type, which results in a matrix c cell types per n cells. Then it performs a z-score of those mean expression for each cell, the top resulting score gives the matching cell type.

Immunostainings

Transwells[®] were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min at 4°C. After 2 PBS washes, cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 10 min at room temperature. Then, Transwells[®] were blocked with 3% BSA in PBS for 30 min at RT. Cells were incubated with primary antibodies, diluted at the required concentration in 3% BSA in PBS (see table 1), at RT for 1 hour or at 4°C overnight. After 3 washes of 5 min with PBS, incubation with secondary (Alexa Fluor, Thermo Fisher Scientific), diluted at 1/500 in 3% BSA in PBS, was carried out during 45 min at RT and protected from light. After 3 washes in PBS, Transwells[®] membrane were cut with razor blade and mounter with Fluoromount-G[™] mounting medium with DAPI (Thermofisher Scientific 00-4959-52). Images were acquired using the Olympus Fv10i or Leica Sp5 or Sp8 confocal imaging systems.

Paraffin embedding and H&E staining

Fully differentiated ALI cell cultures were fixed in paraformaldehyde 4% at room temperature for 15 min then extensively rinsed with phosphate-buffered saline (PBS). They were then embedded in paraffin (15 min at room temperature). Each Transwell[®] was cut with a razor blade before embedding. Cutting of paraffin sections was performed in a rotary microtome MICROM HM 340E (Thermo Fisher Scientific).

SP8 confocal acquisitions

All the samples were mounted in Fluoromount-G mounting medium with DAPI. Confocal images were acquired using a Leica SP8 STED 3X (Leica Microsystems, Nanterre), at 700Hz through a 63x/1.4 NA Oil objective using the LAS X software (Leica Microsystems, Nanterre). Confocal images were obtained by a 405, 488 and 561 nm laser excitation respectively.

Gene expression analysis by real-time qPCR

RNAs were extracted from proliferating basal cells with the miRNeasy micro kit (Qiagen)and then retro-transcribed with the RT High-capacity kit (Thermofisher Scientific). Quantitative PCR was performed using LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master mix and Light Cycler 480 real-time PCR machine (Roche Applied Science). Expression levels of transcripts were evaluated using the comparative CT method (2-deltaCT). Transcript levels of POLR2A and RPL13 were used for sample normalization. Primers for SPDEF were as follow: 5'- GTCTGACTTCCTCCCAGCAC - 3' and 5'- CTTGGAGGACTGGGTCTGTG - 3'. Results are log2-transformed fold changes of normalized 2-deltaCT.

Discussion and conclusions

Our study is the first to analyze, at the single-cell level, the effect of 4 distinct cell culture media for ALI differentiation of bronchial epithelial cells. All media allowed the detection of all major cell types present in the airway epithelium. We have also noticed the presence of very few rare cells such as ionocytes, brush and pulmonary neuroendocrine cells. They were found in too little proportions to allow a comparison between media. Future investigations analyzing higher cell numbers should identify better these cells. Leung et al. have very recently published a comparative study between Pneumacult-ALI[™] and BEGM[™] [20]. Their findings, in terms of MCC, goblet cell content and epithelial thickness, were very similar to ours. By using single-cell analysis and extending our study to 4 culture media, we extend this study and some of our previous work [4]. Here, we have shown that 2 cell culture media, Pneumacult-ALI[™] and Half & Half, are potent inducers of the multiciliated lineage. Half & Half contains half Pneumacult-ALI[™] medium, minus the 100x supplement, which has a proprietary composition. We assumed that this supplement includes retinoic acid. The other half of this medium is composed of "Wu" medium which itself contains retinoic acid. According to the authors who have set-up this medium, it was supposed to create conditions that are more similar to *in vivo* conditions [10]. However, except for some subtle differences, we found, in 2 separate donors, that cell identities and distributions were highly similar between Pneumacult-ALI[™] and Half & Half. On the contrary, the BEGM -ALI[™] medium yielded much less multiciliated cells, and the Clancy medium generated none. Thus, the choice of the culture condition should be conditioned by the study to be performed. For multiciliated cell biology, Pneumacult-ALI[™] and Half & Half should be largely preferred as the MCC content was much higher in these conditions, with a neat deuterosomal cell cluster. However, if studying secretory cells, BEGM-ALI[™] and Clancy media should be considered. Whether targeting nasal or bronchial epithelium should also be considered. Noteworthy, a major difference that we observed in this study compared to our previous one [4], is the high goblet cell content that we found in the BEGM -ALI[™] condition. Given our finding that Pneumacult-Ex-Plus[™] medium induces *SPDEF* expression in basal cells, it is worth exploring further the effect of the environment during cell proliferation on differentiation trajectory. It is very probable that exposure to different cues at the proliferation stage could skew cell fates at the differentiation stage. Additional studies performing proliferation in distinct media, and then differentiation in a common medium, BEGM-ALI[™] for instance, would be useful to identify a putative memory of basal cells.

References

1. Deprez M, Zaragosi L-E, Truchi M, Garcia SR, Arguel M-J, Lebrigand K, et al. A single-cell atlas of the human healthy airways. bioRxiv. Cold Spring Harbor Laboratory; 2019;2019.12.21.884759.

2. Zepp JA, Morrisey EE. Cellular crosstalk in the development and regeneration of the respiratory system. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. Springer US; 2019; Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41580-019-0141-3

3. Kotton DN, Morrisey EE. Lung regeneration: mechanisms, applications and emerging stem cell populations. Nat Med [Internet]. 2014;20:822–32. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nm.3642

4. Ruiz García S, Deprez M, Lebrigand K, Cavard A, Paquet A, Arguel M-J, et al. Novel dynamics

of human mucociliary differentiation revealed by single-cell RNA sequencing of nasal epithelial cultures. Development [Internet]. 2019;177428:dev.177428. Available from: http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.177428

5. Greaney AM, Adams TS, Brickman Raredon MS, Gubbins E, Schupp JC, Engler AJ, et al. Platform Effects on Regeneration by Pulmonary Basal Cells as Evaluated by Single-Cell RNA Sequencing. Cell Rep [Internet]. ElsevierCompany.; 2020;30:4250-4265.e6. Available from: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.004

6. Gras D, Chanez P, Vachier I, Petit A, Bourdin A. Bronchial epithelium as a target for innovative treatments in asthma. Pharmacol Ther [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;140:290–305. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.07.008

7. Carlini F, Picard C, Garulli C, Piquemal D, Roubertoux P, Chiaroni J, et al. Bronchial Epithelial Cells from Asthmatic Patients Display Less Functional HLA-G Isoform Expression. Front Immunol [Internet]. 2017 [cited 2019 Mar 23];8:6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28303134

8. Zaragosi LE, Deprez M, Barbry P. Using single-cell RNA sequencing to unravel cell lineage relationships in the respiratory tract. 2020;1–10.

9. Durmowicz AG, Lim R, Rogers H, Rosebraugh CJ, Chowdhury BA. The U.S. food and drug administration's experience with ivacaftor in cystic fibrosis: Establishing efficacy using in vitro data in lieu of a clinical trial. Ann Am Thorac Soc. 2018;15:1–2.

 Malleske DT, Hayes D, Lallier SW, Hill CL, Reynolds SD. Regulation of Human Airway Epithelial Tissue Stem Cell Differentiation by β-Catenin, P300, and CBP. Stem Cells [Internet].
 2018 [cited 2018 Oct 15];36:1905–16. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30171668

11. Brewington JJ, Filbrandt ET, LaRosa FJ, Moncivaiz JD, Ostmann AJ, Strecker LM, et al. Brushed nasal epithelial cells are a surrogate for bronchial epithelial CFTR studies. JCI Insight [Internet]. 2018;3. Available from: https://insight.jci.org/articles/view/99385 12. Lin PI, Shu H, Mersha TB. Comparing DNA methylation profiles across different tissues associated with the diagnosis of pediatric asthma. Sci Rep. 2020;10:1–12.

13. Morimoto M, Nishinakamura R, Saga Y, Kopan R. Different assemblies of Notch receptors coordinate the distribution of the major bronchial Clara, ciliated and neuroendocrine cells. Development [Internet]. 2012 [cited 2014 Jan 23];139:4365–73. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3509731&tool=pmcentrez&render type=abstract

14. Pardo-Saganta A, Law BMM, Tata PRR, Villoria J, Saez B, Mou H, et al. Injury Induces Direct Lineage Segregation of Functionally Distinct Airway Basal Stem/Progenitor Cell Subpopulations.
Cell Stem Cell [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;16:184–97. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S193459091500003X

15. Rock JR, Gao X, Xue Y, Randell SH, Kong Y-Y, Hogan BLM. Notch-Dependent Differentiation of Adult Airway Basal Stem Cells. Cell Stem Cell [Internet]. 2011 [cited 2015 Apr 18];8:639–48. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590911001688

16. Tsao P-NN, Vasconcelos M, Izvolsky KI, Qian J, Lu J, Cardoso W V. Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways. Development [Internet]. 2009/06/09. The Company of Biologists Limited; 2009 [cited 2015 Jun 12];136:2297–307. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&lis t_uids=19502490

17. Wu R. Culture of Normal Human Airway Epithelial Cells and Measurement of Mucin Synthesis and Secretion. Asthma [Internet]. New Jersey: Humana Press; 2003. p. 31–9. Available from: http://link.springer.com/10.1385/1-59259-072-1:31

18. Satija R, Farrell JA, Gennert D, Schier AF, Regev A. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. Nat Biotechnol. 2015;33:495–502.

19. Macosko EZ, Basu A, Satija R, Nemesh J, Shekhar K, Goldman M, et al. Highly Parallel

Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. Cell [Internet]. 2015 [cited 2018 Jan 25];161:1202–14. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26000488

20. Leung C, Wadsworth SJ, Yang SJ, Dorscheid DR. Structural and functional variations in human bronchial epithelial cells cultured in air liquid interface using different growth media. Am J Physiol Cell Mol Physiol [Internet]. 2020;21:ajplung.00190.2019. Available from: https://www.golder.com/insights/block-caving-a-viable-alternative/ Chapitre 5 : Rôle de la voie Sonic Hedgehog pendant la régénération *in vitro* de l'épithélium des voies respiratoires humaines en culture ALI

Résultats additionnels

I. Contexte / Avant-propos

Des travaux antérieurs du laboratoire avait montré que les signaux Notch (page 68) et BMP (page 70) jouaient un rôle clé durant la multiciliogenèse [196,228,338]. Ces voies peuvent interagir avec d'autres signaux tels que la voie Hedgehog (Hh) (page 76) pour contrôler une grande variété de processus au cours du développement ou lors de la tumorigenèse [352]. Chez les vertébrés, le signal Hh est décrit dans la formation du cil primaire (page 31) [545], tandis que son rôle dans l'amplification centriolaire et la multiciliogénèse (page 49) reste inexploré. Le but de cette étude a donc été de caractériser le rôle de la voie Hh dans la régénération de l'épithélium des voies respiratoires.

II. Introduction

Pendant l'embryogenèse, le développement précoce et peu de temps après l'ensemencement des cultures épithéliales des voies respiratoires, les cellules des voies respiratoires possèdent un cil primaire unique [255,546]. Le ligand Sonic Hedgehog (SHH) joue un rôle de morphogène afin de guider le développement du poumon, et de réguler la ramification pulmonaire et la différenciation du mésenchyme [549,550]. SHH est le ligand le mieux étudié de la voie Hh chez les vertébrés. Il se lie à sa cellule cible *via* un récepteur appelé Patched 1 (PTCH1). En l'absence de SHH, Ptch1 inhibe le récepteur couplé à la protéine G Smoothened (Smo), un autre récepteur situé en aval de la voie. La signalisation canonique de Hh commence par la liaison de SHH à Ptch1 qui induit une inactivation de Ptch1. En conséquence, il se produit une levée de répression de Smo qui déclenche la cascade de signalisation et permet à Smo de se localiser et de s'accumuler dans le cil primaire. Cette cascade aboutit à l'activation de facteurs de transcription : GLI1-2-3, qui migrent du cil au noyau pour contrôler l'expression des gènes cibles de la voie Hh [352,551].

Une fois le développement terminé, l'épithélium des voies respiratoires continue de produire du SHH [552,553]. Il est présent sur la face basolatérale des épithéliums, et active la signalisation *via* les cils primaires présents à la surface des cellules mésenchymateuses, afin de freiner leur prolifération. Cette voie paracrine régule l'expression de GLI1 dans le

mésenchyme. SHH est également présent sur la face apicale des épithéliums dans la fine couche de liquide recouvrant la surface épithéliale [554,555]. En revanche, les cellules épithéliales matures des voies respiratoires et notamment les cellules multiciliées (page 11), sont dépourvues de cils primaires [546]. Au fur et à mesure que l'épithélium des voies respiratoires se polarise et se différencie, les cils primaires se résorbent et disparaissent complètement dans les cellules multiciliées en cours de maturation, pour laisser place au développement de centaines de cils motiles (page 32) à leur surface apicale [255,546].

Ces observations soulèvent la question de savoir si SHH possède des récepteurs à la surface apicale des cellules des voies respiratoires et quelle pourrait être leur fonction. Il a déjà été montré précédemment que les cils motiles des épithéliums des voies respiratoires effectuent, non seulement un travail mécanique, mais possèdent aussi des fonctions sensorielles comme les cils primaires [556]. Ces informations nous ont amenés à émettre l'hypothèse que les cils motiles pourraient participer à la voie de signalisation Hh ou que cette voie participerait au contrôle de la différenciation de l'épithélium des voies respiratoires et des cellules multiciliées. Pour tester ces hypothèses, nous avons étudié cette voie dans nos modèles de cultures d'épithélium des voies respiratoires humaines (page 42).

III. Résultats

Les matériels et méthodes utilisés pour cette étude correspondent à ceux détaillés dans les différents articles précédemment présentés. Ainsi j'ai seulement détaillé dans cette partie, les concentrations de certains produits non utilisés dans ces autres études.

III.1 – Etude de l'expression des gènes de la voie Hh dans l'épithélium des voies respiratoires

Nous avons tout d'abord montré, à l'aide d'analyses par Western Blot à différents stades de différenciation des HAEC en culture ALI, que les protéines SHH et le récepteur Smo étaient exprimés tout au long de la différenciation de ALIO à ALI21 (Figure 105A). L'expression protéique SHH augmente au cours de la différenciation, tandis que celle de Smo augmente entre ALIO et ALI10, puis diminue entre ALI10 et ALI21. Nos résultats sont en accord avec ceux de l'équipe de Dormoy, bien qu'ils observent une augmentation continue de Smo jusqu'à la fin du processus de différenciation (page 76) [354].



Figure 105 : Expression protéique du ligand SHH et du récepteur Smo dans les HAEC en culture ALI en cours de différenciation en Western Blot (A) et immunoflurescence (B)

En réalisant des expériences d'immunofluorescence sur des HAEC à des stades différenciés, nous avons pu observer que SHH et Smo étaient exprimés dans les cils motiles des cellules multiciliées (Figure 105B). Nos résultats concernant la localisation de Smo dans les cils sont en accord avec ceux récemment obtenus de l'équipe de Dormoy et de Welsh (page 76) [353,354]. En revanche, la localisation de SHH ne fait pas autant consensus, puisque 3 conclusions s'affrontent. L'équipe de Welsh a montré que SHH était localisé dans le cytoplasme des cellules multiciliées dans l'épithélium des voies respiratoires d'origine bronchiques[353], ce qui diffère de la localisation ciliaire que nous observons. Cependant, notre étude ayant été réalisée dans les cellules épithéliales des voies respiratoires d'origine nasales, cette différence pourrait être imputée à l'origine anatomique des cellules utilisées dans les deux études. Néanmoins, l'étude de l'équipe de Dormoy [354], qui observe SHH dans les cellules basales, a également été réalisée sur des cellules provenant d'échantillons nasaux, mais les cultures ont été réalisées dans un milieu de différenciation différent du nôtre (Pneumacult[™] versus BEGM[™]); la composition différente des milieux pourrait expliquer la différence de résultats. L'utilisation de deux milieux de culture pourrait avoir un impact sur l'expression d'un même gène, ce qui est cohérent avec notre étude sur l'influence des milieux sur la dynamique de différenciation des épithéliums des voies respiratoires (page 129). Il faut préciser aussi que ces trois études ont utilisé des anticorps dirigés contre SHH différents. Le gène SHH produit une protéine SHH capable de s'autocliver et de générer un peptide N-terminal actif. C'est ce dernier qui se fixe sur Ptch1 pour lever l'inhibition de ce dernier sur Smo [545], mais les trois anticorps utilisés sont dirigés contre cette partie N-

terminale, ainsi la différence ne saurait provenir de ce fait. Des investigations plus approfondies sont nécessaires pour élucider ces différences obtenues.

Dans des analyses transcriptomiques de HAEC à ALI15, nous avons observé que les facteurs de transcription effecteurs de la voie Hh avaient des niveaux d'expression différents. En effet, GLI1 et GLI2 sont très faiblement exprimés. En revanche, GLI3, est très fortement exprimé (Figure 106). La très faible expression de GLI1 est cohérente avec les deux autres études [353,354]. Néanmoins, l'équipe de Dormoy a montré que la protéine GLI1 était toutefois présente en utilisant une approche par immunofluorescence [354].



Figure 106 : Expression des transcrits des GLI dans les HAEC en culture ALI (ALI15)

III.2 – Effet de l'inhibition de la voie Hh sur la différenciation de l'épithélium des voies respiratoires

Pour déterminer le rôle de la voie Hedgehog dans la multiciliogenèse, nous avons réalisé des traitements chroniques au long de la différenciation des HAEC en culture ALI avec la cyclopamine (CPM, 10µM diluée dans le milieu de culture à chaque changement de milieu à partir de ALI3) un inhibiteur pharmacologique de la voie Hh. En observant l'expression transcriptomique de ces cellules à ALI15 (correspondant au début de la différenciation des cellules multiciliées), nous avons pu remarquer que l'inhibition chronique de la voie Hh par la CPM inhibe fortement et significativement l'expression de FOXJ1 (page 93) et MCIDAS (page 90) (N=3), deux acteurs de la multiciliogenèse (Figure 107A). Nous avons également pu noter par immunofluorescence à ALI21 (étape terminale de la différenciation des cellules multiciliées) que le nombre de cellules multiciliées était significativement diminué par le traitement chronique par la CPM (Figure 107B&C). Ces marquages révèlent que l'inhibition de la voie Hh altère la multiciliogenèse et ce, avant l'étape de l'amplification des centrioles, comme en témoigne la diminution de la centrine-2, marqueur des centrioles.



Figure 107 : Effets de l'inhibition pharmacologique de la voie Hh par la cyclopamine (CPM, 10 μM) au cours de la différenciation des HAEC en culture ALI

Toutefois, une concentration de 10 μ M de CPM n'était pas la condition optimale pour inhiber le plus spécifiquement possible la voie Hh, et nous aurions dû étudier par la suite la relation dose-effet avec des concentrations de 300 nM à 10 μ M. Nous avons par ailleurs réalisé à nouveau ces expériences avec un autre inhibiteur pharmacologique plus spécifique de la voie Hh : le MRT-92 [557] à 300 nM. Nous avons observé une reproduction des résultats obtenus avec la CPM : l'inhibition de la voie Hh par le MRT-92 diminue l'expression transcriptomique de FOXJ1 et MCIDAS (N=1) (Figure 108A), et diminue significativement le nombre de cellules multiciliées (N=3) en fin de différenciation (Figure 108B&C).



Figure 108 : Effets de l'inhibition pharmacologique de la voie Hh par le MRT-92 au cours de la différenciation des HAEC en culture ALI

En parallèle des inhibitions pharmacologiques, nous avons également réalisé des inhibitions précoces de la voie Hh par une approche d'ARN interférence en utilisant des siARN dirigés contre l'expression de Smo. Nous avons pu remarquer une légère diminution de cette expression à ALI5 (Figure 109A). En parallèle, nous avons constaté une diminution du nombre de cellules multiciliées à ALI21 (Figure 109B). Cette donnée confirme les résultats obtenus par l'inhibition pharmacologique.



Figure 109 : Effets de l'inhibition de la voie Hh par ARN interférence au cours de la différenciation des HAEC en culture ALI

Ces résultats semblent indiquer que la voie de signalisation Hh est nécessaire à la multiciliogenèse pendant la différenciation de l'épithélium des voies respiratoires, bien que des investigations supplémentaires soient requises pour évaluer la significativité des résultats. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'équipe de Dormoy en 2020 [354]. En utilisant un anticorps bloquant le ligand SHH tout au long de la différenciation, cette équipe a pu observer, comme ce fut notre cas, une diminution du nombre de cellules multiciliées et de l'expression de FOXJ1.

III.3 – Effet de la suractivation de la voie Hh sur la différenciation de l'épithélium des voies respiratoires

Pour déterminer s'il était possible d'induire plus fortement la multiciliogenèse en suractivant la voie Hh, nous avons utilisé des traitements chroniques des HAEC en culture ALI avec le ligand SHH (200 ng/mL dans le milieu de culture à chaque changement à partir de ALI3). Les observations faites par immunofluorescence à ALI21 (Figure 110A&B) montrent que la suractivation de la voie Hh n'aurait pas d'effet sur la multiciliogenèse. Selon notre

hypothèse, la voie Hh serait déjà active dans les HAEC en culture ALI, et une suractivation supplémentaire n'aurait pas d'effet notable. Il est également possible d'envisager que la voie Hh agirait sur des acteurs qui ne permettent pas d'augmenter le nombre de cellules multiciliées. L'étude de l'équipe de Dormoy à propos les effets de la voie Hh sur la différenciation de l'épithélium des voies respiratoires en culture ALI ne présente pas de données concernant cette suractivation. L'équipe de Welsh, en revanche, a pu observer les effets de la suractivation de la voie Hh sur les cellules de l'épithélium des voies respiratoires en torsqu'elles sont déjà différenciées [353]. Cette suractivation de la voie Hh augmente, en effet, la fréquence du battement ciliaire en diminuant les niveaux d'AMP cyclique dans les cellules multiciliées. Nous n'avons cependant pas mesuré cet effet sur nos cultures, et ne pouvons donc pas conclure sur ce point.



Figure 110 : Effets de la suractivation de la voie Hh au cours de la différenciation des HAEC en culture ALI

III.4 – Effet de la modulation de la voie Hh sur l'expression des facteurs de transcription GLI

Dans notre étude, les inhibitions pharmacologiques ou la suractivation de la voie Hh ne semblent pas avoir d'effet sur l'expression transcriptomique des facteurs de transcription GLI, qui sont les effecteurs de la voie Hh, ni sur celle de PTCH1 dont l'expression est régulée par la voie Hh lorsqu'elle est active, en boucle de rétroaction négative (Figure 111A, B, C). Bien qu'elles aient été réalisées avec des molécules différentes, ces observations ont été obtenues de manière indépendante, et laissent supposer que la modulation de la voie Hh n'affecte pas la transcription des facteurs de transcription GLI.



Figure 111 : Effets des inhibitions pharmacologiques et de la suractivation de la voie Hh sur l'expression transcriptomique des GLI au cours de la différenciation des HAEC en culture ALI

Ces expériences sont toutefois en contradiction avec les conclusions de l'équipe de Dormoy. En effet, après inhibition de la voie Hh par un anticorps bloquant, ils notent une diminution de l'expression de GLI2 et de la balance GLI2/GLI3 qui sont des marqueurs de l'activité de la voie Hh [354]. Ils concluent ainsi que c'est la voie canonique de Hh qui est impliquée dans la différenciation des cellules de l'épithélium des voies respiratoires en cellules multiciliées.

Néanmoins, l'équipe de Welsh rapporte, comme notre étude, que la voie Hedgehog canonique ne serait pas impliquée dans le battement des cils motiles et ce, suite à plusieurs constatations. Contrairement à la situation dans les cils primaires, 1) PTCH1 est présent dans les cils en même temps que Smo ; 2) GLI1 est très faiblement exprimé ; 3) l'activation de la voie Hh ne fait pas sortir PTCH1 du cil ; 4) les expressions des transcrits de PTCH1 et des GLI ne sont pas affectées par la modulation de la voie Hedgehog (ce qui est en accord avec nos observations) ; 5) l'activité des GLI, mesurée grâce à un test luciférase, n'est pas non plus affectée par la modulation de la voie Hh. Ces informations ont conduit l'équipe de Welsh à analyser la voie Hh non canonique impliquant G α i et l'Adénylate Cyclase 5/6 (AC5/6), et ont déterminé que, dans les cellules multiciliées, elle pouvait réguler la concentration d'AMP cyclique et moduler la fréquence des battements ciliaires.

III.3 – GLIS3 un acteur de la voie Hh non canonique impliqué dans la multiciliogenèse ?

De notre côté, l'analyse de l'expression des gènes de la famille des facteurs de transcription GLI dans les données de séquençages transcriptomiques de cellules uniques (page 119) a permis d'attirer notre attention sur le facteur de transcription GLIS3, dont l'expression se concentre dans la population des cellules multiciliées (Figure 112A). L'expression de ce facteur de transcription est aussi élevée que celle du facteur de

transcription GLI3 (Figure 112B), et elle augmente fortement au cours de la différenciation (Figure 112C). Des observations en immunofluorescence ont également révélé que son expression protéique se localise dans les cils motiles des cellules multiciliées (Figure 112D).



Figure 112 : Expression transcriptomique et protéique du facteur de transcription GLIS3 au cours de la différenciation des HAEC en culture ALI

Par ailleurs, l'analyse de l'expression transcriptomique de GLIS3 à ALI15 semble montrer qu'elle est affectée par l'inhibition de la voie Hh (Figure 113A), par les agents pharmacologiques et les siARN (Figure 113B). De manière intrigante, nous montrons que l'expression transcriptomique de GLIS3 semble aussi affectée par la suractivation de la voie Hh par le ligand SHH (Figure 113A). Cependant ces expériences devront être reproduites pour déterminer si ces effets sont significatifs.



Figure 113 : Effets de la modulation de la voie Hh sur l'expression transcriptomique de GLIS3 au cours de la différenciation des HAEC en culture ALI

Néanmoins, dans notre modèle de culture de HAEC en ALI cultivées en milieu BEGM[™], si les modulations de la voie Hh n'affectent pas l'expression transcriptionnelle des facteurs de transcriptions GLI, effecteurs de la voie canonique, ces derniers résultats pourraient indiquer que la voie Hh exerce sa signalisation *via* une voie non canonique impliquant le facteur de transcription GLIS3.

GLIS3 fait partie de la famille des Gli-similar (GLIS) dont les membres (GLIS1, GLIS2 et GLIS3) sont localisés dans le cil primaire [558]. Après modification post-traductionnelle, ils migrent du cil vers le noyau pour exercer leur activité transcriptionnelle. L'expression de GLIS3 a été rapportée dans l'utérus, le cerveau et les poumons (à savoir des tissus contenant des épithéliums multiciliés). GLIS3 interagit avec un membre de la voie Hedgehog : SUFU ; ce dernier stabilise les niveaux protéiques de GLIS3, il interagit avec GLI2 et GLI3, les stabilise et stimule leur rôle d'activateur ou de répresseur. Ces informations suggèrent un « crosstalk », un croisement entre la voie Hedgehog et le facteur de transcription GLIS3. GLIS3 interagit également avec TAZ, un membre de la signalisation Hippo impliqué dans la régulation de plusieurs autres voies, dont la voie PCP qui contrôle la Polarité Cellulaire Planaire [558]. Cette voie étant fortement impliquée dans le remodelage du cytosquelette nécessaire à la formation des cellules multiciliées, cette information suggère que si la voie Hh « signale » bien *via* GLIS3, sa régulation pourrait réguler la voie de signalisation PCP pour permettre la formation des cellules multiciliées.

IV. Conclusion

Nos résultats, en accord avec les résultats de deux articles récents [353,354], ont mis en avant l'implication de la voie Hh dans l'épithélium des voies respiratoires. D'un côté, elle aurait une implication dans la multiciliogenèse comme rapportée par l'équipe de Dormoy [354] et la nôtre, et d'un autre côté, selon les résultats de l'équipe de Welsh, elle aurait une implication dans la fréquence du battement ciliaire des cellules multiciliées [353]. Cependant ces études soulèvent de nombreuses questions notamment concernant la localisation cellulaire des membres de la voie Hh, et particulièrement de SHH lui-même, mais aussi sur l'implication d'une voie canonique ou non-canonique de Hh. Des trois études, l'équipe de Dormoy est la seule à observer que les modulations de la voie Hh influe sur la transcription des facteurs de transcription GLI, impliqués dans la voie canonique. L'équipe de Welsh montre que la voie Hh passe par l'activation du Gαi et de l'AC5/6, c'est-à-dire une voie noncanonique. Notre équipe fait la lumière sur l'implication potentielle du facteur de transcription GLIS3 en interaction avec la voie Hh. Bien que l'utilisation de cellules d'origine anatomiques différentes (bronches ou nez), et de milieux de culture différents (Pneumacult[™] ou BEGM[™]) puisse expliquer certaines différences concernant la potentielle implication de la voie Hh canonique et non-canonique dans l'épithélium des voies respiratoires, les observations *in vivo* de l'équipe de Dormoy sur des tissus bronchiques de patients atteints de BPCO montrent une relocalisation des facteurs de transcriptions GLI [354] et suggèrent dans ce contexte une implication de la voie Hh canonique.

Nos résultats présentés ici ont été réalisés entre 2016 et 2017. Ils ont occupé plus d'un an et demi de mon travail de thèse, et ont d'ailleurs été récompensés par le premier prix du poster lors du Colloque Cilia de 2017 (Cavard et al., Cilia Colloque, Nice 2017, http://univ-cotedazur.fr/events/cfc2017). Cependant, cette étude a été fortement perturbée en 2017 lorsque les problèmes de différenciation des cultures HAEC en ALI en milieu BEGM[™], évoqués dans la partie « Méthodologie » (page 116), sont apparus et nous ont conduits à changer de milieu de différenciation. Ces deux milieux induisent certaines différences dans le mécanisme de différenciation de nos modèles (page 129) [28]. De ce fait, nous avons rencontré par la suite des problèmes de reproductibilité expérimentale qui nous ont fortement freiné pour finaliser et publier dans les temps nos histoires de la voie Hh sur la différenciation des cellules multiciliées, étude qui n'avait alors pas de précédent dans la littérature. La publication de l'équipe de Welsh parue tout début 2018, puis celle de l'équipe de Dormoy fin 2019 nous ont considérablement court-circuités. Néanmoins la publication de ces deux études [353,354] ont apporté la confirmation que nos hypothèses, inédites, de travail et nos résultats étaient robustes.

Résultats additionnels & Discussion

En 2011, une étude pionnière réalisée au sein de notre laboratoire a démontré que les miR-34/449 contrôlent la multiciliogenèse en réprimant directement la voie Notch (page 83) [196,228]. Cette étude établissait ainsi pour la première fois un lien fonctionnel entre des miARN et la biogenèse des cils motiles. Ces résultats ont été par la suite confirmés par deux études de fort impact montrant que des souris invalidées pour miR-34/449 présentent des défauts de multiciliogenèse [289,406]. Notre équipe a ensuite mis en évidence une boucle de régulation négative réciproque entre les miR-34/449 et la voie Notch [286,287,534], ce qui permet l'accumulation de miR-34/449 dans les cellules multiciliées engagées dans leur voie de différenciation, offrant ainsi la possibilité à ces miARN de contrôler d'autres cibles à des étapes plus tardives de la multiciliogenèse. De cette manière, les miR-34/449 contrôlent aussi la réorganisation apicale du cytosquelette d'actine au cours de la multciliogenèse, étape nécessaire à l'ancrage des corps basaux, en modulant la voie de signalisation des petites GTPases par un mécanisme conservé et indépendant de la voie Notch [286,287,534]. En accord avec ces résultats, l'équipe de Song a montré que les miR-34/449 régulent aussi l'expression de CP110, une protéine centriolaire dont l'inhibition est nécessaire à la maturation des corps basaux [289,559]. L'ensemble de ces résutats a ainsi positionné les miR-34/449 comme « chefs d'orchestre » capables de contrôler plusieurs étapes successives de la multiciliogenèse, telles que leur capacité à bloquer le cycle cellulaire, permettre l'amplification des corps basaux et réorganiser le cytosquelette d'actine pour aboutir à l'élongation des cils motiles chez les vertébrés [286,287,534].

A la suite de ces découvertes, lors de mon arrivée au laboratoire, l'équipe étudiait deux variants isomiR de la famille miR-34/449 qu'elle venait d'identifier. C'est dans ce contexte qu'une première partie de ma thèse a consisté, en participant à ce travail, à approfondir les connaissances sur les mécanismes d'action des miR-34/449 et à caractériser le mode d'action de ces isomiR (page 122) [535].

I. Les 5'-isomiR-34b et 5'-isomiR-449c

Savoir si chacun des miARN d'une même famille possède une contribution précise dans une fonction donnée est essentiel pour éclaircir les mécanismes évolutifs ayant abouti à l'existence de ces différents membres. Chez l'humain, malgré la très forte homologie des six miARN de la famille miR-34/449, de légères différences peuvent être soulignées, 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 miR-34 révèle la présence de deux uridines en milieu de séquence pour les miR-449, inexistantes chez les miR-34. Cette différence est conservée chez tous les vertébrés.

Nous avons identifié et caractérisé deux variants isomiR de la famille miR-34/449 : les 5'-isomiR-449c et 5'-isomiR-34b, dont les impacts transcriptionnels leur suggèrent des cibles spécifiques [395]. Ces impacts distincts ajouteraient un niveau de complexité additionnel au mécanisme d'action et de régulation des miARN. Néanmoins, leur rôle fonctionnel restait à déterminer. Cependant, le manque d'outils disponibles pour réaliser de telles études complique leur mise en place. En effet, il n'existe à ce jour pas de sondes oligonucléotidiques, ni d'antagomiR ou de morpholinos capables de distinguer les miR canoniques des isomiR, étant donné qu'ils ne diffèrent que d'une seule base. Le seul outil possible serait des oligonucléotides protecteurs des 3'-UTR ou « Target Site Blockers », à condition que le miR canonique et l'isomiR possèdent un site cible différent [560].

A l'heure actuelle, la seule explication concernant la genèse des isomiR serait un défaut de clivage par les nucléases Drosha et Dicer. En effet, aucune enzyme capable d'ajouter ou de supprimer un nucléotide à l'extrémité 5' d'un miARN n'a été découverte ; par ailleurs cette extrémité est protégée dans la poche au sein d'AGO2 (page 82) [561]. Il serait possible qu'un encombrement stérique dû à la fixation d'autres protéines sur les séquences avoisinantes empêcherait un bon positionnement du microprocesseur, induisant une coupure imprécise (Figure 114) [560].



Figure 114 : Hypothèse de l'encombrement stérique de la région de fixation de microprocesseur par plusieurs protéines (adapté du manuscrit de thèse d'Olivier Mercey)

Cette coupure aléatoire n'irait pas dans le sens d'un rôle physiologique des 5'-isomiR, mais suggèrerait plutôt que leur ciblage de transcrit soit également aléatoire. Cela expliquerait pourquoi les isomiR ont un nombre de cible plus restreint. Cependant, nous avons suggéré le ciblage spécifique de la Moésine par le 5'-isomiR-34b (Figure 115). L'utilisation d'oligonucléotides protecteurs du site de fixation de ce 5'-isomiR, permettrait de déterminer si ce ciblage a un impact fonctionnel, en observant la formation de points focaux d'adhésion, phénomène dans lequel la Moésine joue un rôle déterminant [560,562,563].



Figure 115 : La moésine (MSN) semble être une cible spécifique des 5'isomiR-34b

Dans cette étude, il faut également prendre en compte que la quantification des isomiR par le séquençage haut-débit peut ne pas être le reflet de son niveau d'expression. En effet, si l'ajout d'une base apporte de la stabilité à ce miARN, le nombre de lectures observées à un instant « *t* » sera plus important que s'il était moins stable. Bloquer la transcription par l'actinomycine D permettrait de déterminer la stabilité des miARN canoniques et isomiR, pour estimer correctement les proportions de chaque variant [560].



Figure 116 : Modèle illustrant le rôle des miR-34/449 au cours de la multiciliogenèse (Mercey et al, 2015)

La figure ci-dessus (Figure 116) représente un schéma récapitulatif des différents résultats du laboratoire à propos du rôle des miR-34/449 dans la multiciliogenèse. Ce

processus est initié par l'acquisition de l'identité multiciliée (phase de spécification). A la suite de l'inhibition des voies BMP (page 70) et Notch (page 68), les progéniteurs des cellules multiciliées expriment miR-449a/b/c, 5'-isomiR449c, CDC20B (page 95), MCIDAS (page 90) et CCNO (page 98), membres du locus 5q11, ainsi que les miR-34b/c localisés sur le locus 11q23 ainsi que 5'-isomiR-34b. L'expression des miR-34/449 et des 5'-isomiR-34/449 permet de bloquer le cycle cellulaire et la voie Notch pour promouvoir l'entrée en différenciation. Puis, une double boucle de régulation négative entre miR-34/449 et la voie Notch amplifie l'expression des miR-34/449 et des membres du locus 5q11. L'expression accrue des miR-34/449 favorise la réorganisation apicale du cytosquelette d'actine par l'activation de la voie RhoA et la répression de R-Ras. La répression de R-Ras par les formes canoniques des miR-34/449 permet une relocalisation apicale de la filamine A (FLNA) qui joue un rôle dans la mise en place et la stabilité du cytosquelette apical d'actine. Les miR-34/449 participent parallèlement à la maturation et l'ancrage des centrioles en corps basaux au niveau du cytosquelette d'actine sous la membrane apicale, notamment en réprimant la protéines CP110. Enfin, l'assemblage de l'axonème et l'élongation des cils motiles s'opère sous le contrôle de l'expression des facteurs de transcription FOXJ1 (page 93) et RFX (page 94).

II. Les loci 5q11 et 11q23 : deux loci « multiciliaires » ?

II.1 – Rôle du locus 5q11 humain dans la multiciliogenèse

Le cluster miR-449a/b/c est inclus dans le second intron du gène *CDC20B*, situé dans le locus génomique humain 5q11. Plus récemment, le laboratoire a montré que 1) *CDC20B*, gène hôte des miR-449 conservé du xénope à l'humain et jusqu'alors de fonction inconnue, est spécifiquement exprimé dans les cellules multiciliées des vertébrés, et que 2) la protéine CDC20B s'associe au deutérosome (page 54), où elle est requise pour le désengagement des centrioles néo-formés, étape indispensable pour la maturation des corps basaux et la production des cils motiles [197]. Ces résultats révèlent que les miR-449 et *CDC20B* possèdent une complémentarité fonctionnelle dans la multiciliogenèse. Un phénomène semblable 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 [564]. 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 été décrits comme acteurs clés de la multiciliogenèse : la multiciline (page 90) qui agirait comme facteur de transcription [421–

423] et la cycline O (CCNO) (page 98), une protéine impliquée, comme CDC20B, dans la formation du deutérosome et l'amplification centriolaire [537]. Des mutations affectant *MCIDAS* et *CCNO* ont été caractérisée chez plusieurs patients souffrant de troubles de la clairance mucociliaire associée à une réduction de la production des cils motiles (un nouveau type de dyskinésie ciliaire nommée RGCM pour « Reduction of Generation of Motile Cilia) (page 102) [443,444]. Une délétion du locus 5q11 a également été associée à une agénésie trachéale, une anomalie rare humaine des voies respiratoires [565]. Collectivement, ces données établissent clairement le locus 5q11 comme un facteur déterminant de l'identité multiciliée et sont une belle illustration du rôle complémentaire que peuvent jouer plusieurs gènes d'un même locus sur une même fonction biologique. Cela nous a conduits à émettre l'hypothèse de l'existence d'un locus « multiciliaire », englobant CDC20B, miR-449a/b/c, MCIDAS et CCNO [197], permettant une expression coordonnée de plusieurs facteurs clés de la multiciliogenèse, à travers des mécanismes qui restent à élucider.

II.2 - Rôle du locus 11q23 humain dans la multiciliogenèse

Nous avons émis l'hypothèse que les gènes du locus des miR-34b/c (*BTG4, LAYN* et *C11orf88*), pourraient, comme ceux du locus 5q11, participer à la multiciliogenèse.

Les régions génomiques codant pour les miR-34/449 sont situés dans trois loci distincts. Chez l'humain, les miR-449a/b/c sont situés dans un même locus sur le chromosome 5 (5q11). Les membres miR-34b/c sont localisés dans le locus 11q23 sur le chromosome 11 (11q23) (Figure 117), et miR-34a est situé sur le chromosome 1 (1p36).



Figure 117 : Membres des loci 5q11 et 11q23 humains
En plus du rôle complémentaire des membres du locus 5q11 dont font partie les miR-449, notre équipe a montré que les miR-34b/c contrôlent également les différentes étapes de la multiciliogenèse, chez les vertébrés [196,228,286,287,534,535]. Comme nous l'avons vu précédemment, l'implication des gènes et miARN du locus 5q11 (CDC20B/miR-449a/b/c, MCIDAS et CCNO), ainsi que celle des miR-34b/c situés sur le locus 11q23 au cours de la multiciliogenèse ont déjà été documentés, notamment par notre équipe. En revanche, aucune étude n'avait encore été réalisée concernant le rôle dans la multiciliogenèse des gènes du locus 11q23 situés proches des miR-34b/c, tels que *BTG4, C11orf88* et *LAYN*.

Par analogie avec le locus 5q11 des miR-449, une deuxième partie de mon travail de thèse a consisté à savoir si une situation similaire pouvait avoir lieu pour les gènes proches de la position génomique des miR-34b/c (locus 11q23) (page 124).

Comme pour le locus 5q11, les gènes du locus 11q23 sont également hautement conservés chez les vertébrés (Figure 118), bien que chez la souris, une transposition de *BTG4* entre *C11orf88* et LAYN puisse être observée, ainsi qu'une inversion du sens de lecture entre *LAYN/C11orf88* et *BTG4*, et une inversion du sens de *BTG4* et une duplication de *LAYN* sur les chromosomes 5 et 15 chez le poisson zèbre.



Figure 118 : Conservation du locus 11q23 chez les vertébrés (Genomicus v98.01)

J'ai focalisé mon étude sur les 3 gènes proximaux les plus proches des miR-34b/c situés sur le locus 11q23 : *BTG4*, *C11orf88* et *LAYN*.

II.2.A – C11orf88

N.B : l'orthologue murin de C11orf88 humain est identifié comme 48332706Rik et l'orthologue chez le poisson zèbre comme C5H11orf88. Par commodité, nous garderons la dénomination humaine C11orf88 dans le document même lorsque les résultats dans les autres espèces seront évoqués. Nous avons montré chez l'humain et la souris que l'expression transcriptomique de *C11orf88* est fortement induite pendant la différenciation des HAEC en culture ALI, et que cette expression est restreinte aux cellules multiciliées. De plus, l'expression protéique de *C11orf88* est localisée dans les cils motiles de ces cellules, de manière ponctiforme le long de l'axonème chez l'humain et la souris. L'expression protéique de *C11orf88* aussi est détectée de manière ponctiforme dans les cils primaires à une étape avancée de la différenciation.

Par ailleurs, en collaboration avec l'équipe du Dr Fürthauer (iBV, Nice), nous avons observé que *C11orf88* chez le poisson zèbre (page 39) est fortement exprimé dans les tissus contenant des cellules multiciliées (placodes olfactives (« nasal pits ») et pronéphros) au court du développement embryonnaire de cet organisme (Figure 119).



Embryon de poisson zèbre

Figure 119 : Localisation de C11orf88 dans les placodes olfactives et le pronéphros de l'embryon de poisson zèbre

Pour déterminer le rôle fonctionnel de C11orf88 dans la différenciation des cellules de l'épithélium des voies respiratoires, j'ai mis en place des protocoles d'infections lentivirales de shARN dans les mTEC, puisqu'une approche classique par siARN est inefficace dans nos modèles (page 116). J'ai utilisé plusieurs concentrations (0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 et 3 .10⁶ UI diluées dans le milieu de culture contenant les cellules à ensemencer) des deux lentivirus shARN à tester (shC11orf88 et shCTRL fournis par Sigma).

Nous avons d'abord testé la spécificité d'action des lentivirus sur les mTEC en vérifiant le niveau d'expression de C11orf88 en réponse à chacune des concentrations de shARN utilisées. Notre première observation a été que peu importe la concentration utilisée, le shCTRL, tout comme le shC11orf88, affectent drastiquement d'un facteur 2,5 à 5 le niveau d'expression de *C11orf88* par rapport à la condition non infectée. Toutefois, pour des concentrations faibles de 0,25 et 0,5 .10⁶ UI, le shC11orf88 induit une inhibition d'environ un facteur 2 de plus que le shCTRL (Figure 120). Ces observations nous ont d'abord suggéré que

l'infection lentivirale peut altérer de manière non spécifique l'expression de *C11orf88* en affectant la différenciation des mTEC. Néanmoins, il est également possible que le shC11orf88 bloque de manière spécifique l'expression de *C11orf88* et que seuls les shCTRL altèrent de manière non spécifique l'expression de *C11orf88* (Figure 120). Pour tester ces hypothèses, nous avons étudié le niveau d'expression de *FOXJ1* (page 93), gène marqueur de la différenciation des cellules multiciliées. Dans ce cas, nous avons pu observer que le shC11orf88, non seulement ne bloque pas l'expression de FOXJ1, mais il induirait même une légère augmentation (jusqu'à 2,5 fois dans la condition 1 .10⁶ UI) de son expression (Figure 120). En revanche, nous avons à nouveau observé une forte inhibition du niveau d'expression de FOXJ1 dans les conditions shCTRL (Figure). Ces résultats nous ont donc suggéré que les shC11orf88 auraient bien une inhibition spécifique sur l'expression de *FOXJ1*, tandis que les shC11orf88 auraient bien une inhibition spécifique sur l'expression de leur gène cible sans affecter celle de *FOXJ1* (Figure 120).



Figure 120 : Effets de l'infection lentivirale de shCTRL ou shC11orf88 à différentes concentrations sur l'expression de FOXJ1 et C11orf88, dans les mTEC à ALI15

De manière intrigante, une observation du nombre de cellules multiciliées en immunofluorescence nous montre que dans les conditions infectées aux concentrations de 0,25 et 0,5 .10⁶ UI de shCTRL, le nombre de cellules multiciliées ne semble ni affecté par la diminution de l'expression de FOXJ1 par rapport aux conditions non infectées ; ni dans la condition 0,5 .10⁶ UI de shC11orf88 par rapport au shCTRL (Figure 121). En revanche, l'utilisation d'une concentration de shC11orf88 de 1 .10⁶UI a révélé une augmentation drastique du nombre de cellules multiciliées par rapport au shCTRL (Figure 122). Cette observation coïncide avec une augmentation de l'expression de FOXJ1 induite par shC110RF88 (Figure 120). Néanmoins, les marquages de C11orf88 en immunofluorescence

montrent que son expression protéique ne semble pas affectée par les shC11orf88, et augmente en parallèle avec l'augmentation du nombre de cellules multiciliées (Figure 122). Une quantification par Western Blot ou test ELISA serait nécessaire pour vérifier l'influence des shC11orf88 sur l'expression protéique de C11orf88.



mTEC ALI15

Figure 121 : Effet de l'infection lentivirale de shCTRL sur la différenciation des cellules multiciliées dans les mTEC à ALI15



mTEC ALI15

Figure 122 : Effet de l'infection lentivirale de shC11orf88 sur la différenciation des cellules multiciliées dans les mTEC à ALI15

Tirer une conclusion définitive de la spécificité d'action des shC11orf88 et du rôle fonctionnel probable de C11orf88 dans la multiciliogenèse a été rendu impossible du fait que les shCTRL fournis par Sigma, étant les seuls proposés et disponibles commercialement, semblent affecter l'expression de gènes de manière non spécifique. Pour cette raison, quoique nous sommes confiants sur les effets observés en réponse au shC11orf88, nous ne pouvons, en l'état et en l'absence de shCTRL, intégrer l'ensemble de ces données fonctionnelles dans un article.

Nos résultats sont toutefois confortés par deux expérimentations indépendantes d'inhibition de l'expression de *C11orf88* par l'utilisation d'oligonucléotides antisens « morpholinos » réalisés chez l'embryon de poisson zèbre en collaboration avec l'équipe du Dr Fürthauer (iBV, Nice), et qui nous montrent également que l'inhibition de *C11orf88* à deux stades de développement différents conduit à une différenciation plus précoce caractérisée par une augmentation du nombre de cellules multiciliées dans le pronéphros associée à une dilatation tubulaire (Figure 123).



Pronéphros poisson zèbre

Figure 123 : Effets des morpholinos C11orf88 (Mo C11orf88) sur le développement du pronéphros du poisson zèbre

Nos équipes respectives mettent actuellement au point la technique d'inhibition d'expression génique par CRISPR-cas9 dans les modèles de HAEC en culture ALI et du poisson zèbre. Ces techniques nous permettront d'inhiber l'expression génique de *C11orf88* de manière plus « rigoureuse » et de conclure quant à son rôle dans la multiciliogenèse dans ces deux modèles. Cette technique pourra ensuite être adaptée au mTEC en culture ALI pour valider le rôle de C11orf88 dans un troisième modèle.

La localisation ponctiforme de C11orf88 dans les cils motiles ainsi que son enrichissement à l'apex des cils, suggèrent que C11orf88 pourrait être un composant transporté par l'IFT (page 35) et impliqué dans l'assemblage du cil, et/ou le contrôle de la longueur de ce dernier. Pour déterminer si la localisation ponctiforme est bien en relation avec l'IFT, il serait possible de réaliser une inhibition de ce transport dans les mTEC suivi de nouveaux marquages par immunofluorescence de cette protéine pour observer les effets sur la localisation d'expression de C11orf88. Par ailleurs, j'ai construit un vecteur d'expression de C11orf88 couplé à des motifs MYC. J'ai ensuite réalisé des tests de nucléofection de ce plasmide dans des HAEC différenciées en culture ALI, dans le but de surexprimer ce C11orf88 tagué. Ces expériences permettront, lorsqu'elles seront au point, de réaliser des immunofluorescences de MYC pour déterminer si la localisation de C11orf88 est retrouvée dans ce cas. Elles permettront également de réaliser des immunoprécipitations de MYC-C11orf88 pour déterminer les partenaires de C11orf88 par analyses Western Blot et d'analyses en spectrométrie de masse. Le CRISPR-cas9 actuellement mis au point au laboratoire, pourrait être une autre méthode pour permettre la surexpression de C11orf88 couplé à des motifs MYC pour réaliser ces dernières expériences, si les expériences de nucléofections s'avèrent non concluantes.

Par ailleurs, une analyse de la séquence protéique de C11orf88 n'a pas révélé de domaine protéique suggérant une fonction, bien que 13 sites de phosphorylation par des protéines kinases soient retrouvés. La seule relation retrouvée nous a été donnée par le site « protein model portal » proposant sur la base de données de comparaison structurale de protéines « Modbase », une homologie de séquence de 21% entre C11orf88 et la structure 4F61 correspondant à un domaine « tubulin-stathmin-like-complex » (Figure 124).



Tubulin:Stathmin-like domain complex 4F61

Figure 124 : Structure 3D du domaine « Tubulin-stathmin-like complex » 4F61 (Protein Data Bank)

Les protéines de la famille stathmine sont bien décrites pour interagir avec la tubuline et réguler négativement l'assemblage des microtubules [566]. Une molécule de stathmine, forme un complexe avec deux molécules de tubuline; cette interaction est affaiblie après phosphorylation de la stathmine. Cette potentielle homologie de structure entre C11orf88 et des « Tubulin-stathmin-like complex » pourrait suggérer une fonction de contrôle de l'assemblage ou du désassemblage de l'axonème des cils (page 29). Il serait intéressant de tester par co-immunocprécipitations si C11orf88 est capable d'interagir avec les protéines de la famille des stathmines ou avec des tubulines

Dans l'épithélium des voies respiratoires murines cultivées en ALI, il a été montré que les cellules sortant du cycle cellulaire portent un cil primaire présent jusque dans les étapes de formation des corps basaux. Ce cil primaire est ensuite résorbé lorsque les cellules multiciliées immatures commencent à exprimer *FOXJ1* (page 93) [546], afin de leur permettre d'amplifier leur centrioles, que leur corps basaux s'ancrent à la membrane apicale, et que leurs cils motiles se forment (Figure 125).



Figure 125 : Relation entre cil primaire et cils motiles pendant la multiciliogenèse des mTEC en culture ALI (adapté de Jain et al, 2010)

L'hypothèse serait que FOXJ1 régule un programme de résorption du cil primaire [546]. Si C11orf88 avait une fonction dans l'assemblage et le désassemblage du cil, il serait possible d'imaginer que l'apparition de C11orf88 dans les cils primaires à ALI7 dans les mTEC, soit en rapport avec le désassemblage de ce cil primaire induit par FOXJ1. L'absence de C11orf88 dans les cils primaires en début de différenciation pourrait alors être corrélée avec l'absence d'expression de FOXJ1. Cette hypothèse placerait alors FOXJ1 en amont de C11orf88, ce qui ne correspond pas aux données observées en réponse aux shC11orf88 dans les mTEC (Figure 120).

La longueur d'un cil dépend de la balance entre l'assemblage / la polymérisation et le désassemblage / la dépolymérisation des tubulines de l'axonème à l'apex du cil [567]. Le nombre de train IFT le long d'un cil est le même qu'il soit court ou long. Dans un cil court, la vitesse à laquelle un train arrive à l'apex avec les composants de l'axonème est plus rapide que la vitesse de désassemblage. Ainsi la balance est déséquilibrée en faveur de l'assemblage et l'axonème du cil court s'allonge. De plus, les trains IFT sont chargé de plus de tubulines pendant l'assemblage que la maintenance, ce qui déséquilibre d'avantage la balance. Le désassemblage serait déterminé par des molécules « senseur » de la longueur du cil qui activeraient l'activité de dépolymérisation de l'axonème [567,568]. Ces observations ont conduit à l'hypothèse que C110rf88 contrôlerait l'assemblage et le désassemblage du cil en étant un senseur de sa longueur, et pourrait moduler les activités de la polymérisation et dépolymérisation de l'axonème. Ainsi au début de l'activation de l'expression de *FOXJ1*, *C110rf88* s'exprimerait et se localiserait dans les cils primaires pour activer leur désassemblage, afin que la différenciation des cellules multiciliées s'amorce. Puis, dès que la biogenèse des cils motiles s'initie, C110rf88 contrôlerait leur élongation.

Une observation qualitative des cils motiles des cellules multiciliées obtenues après infections lentivirales de shCTRL ou shC11orf88, nous montre que, bien que le nombre de cellules multiciliées soit plus élevé lorsque l'expression de *C11orf88* est inhibée, les cils semblent plus courts que dans la condition contrôle. Ceci suggère que C11orf88 a un rôle d'assemblage dans les cils motiles des cellules multiciliées. Si nous parvenons à confirmer cette observation, il serait possible d'imaginer que l'augmentation du nombre de cellules multiciliées observée soit une réponse de l'épithélium à la longueur trop courte des cils produits par les cellules multiciliées. Nous avons vu que l'inhibition de l'expression de *C11orf88* conduit à une augmentation de l'expression de *FOXJ1*. Il pourrait exister un signal qui informe de la longueur des cils dans les cellules multiciliées, tel que la voie FGF [569] et qu'une altération de l'élongation ciliaire puisse conduire en retour à une augmentation de l'expression de l'expression de gènes de la multiciliogenèse comme *FOXJ1* afin de compenser le défaut.



Figure 126 : Observation par immunofluorescence des cils des cellules multiciliées après infection lentivirale de shCTRL et shC11orf88 dans les mTEC en culture ALI

Ces différentes observations suggèrent que C11orf88 serait localisée dans les cils motiles des cellules multiciliées et dans les cils primaires des cellules multiciliées immatures pour jouer un rôle dans le contrôle de la longueur ciliaire et influer sur l'assemblage ou le désassemblage des cils.

Nos analyses de RNA-seq ont révélé que C11orf88 existe sous deux isoformes (169 et 196 acides aminés) dans nos modèles, par la présence d'un exon supplémentaire dans une des deux isoformes (C11-201 ; Figure 127). Il serait intéressant de déterminer si ces deux isoformes ont des fonctions distinctes. J'ai construit les plasmides permettant la surexpression de chacune de ces isoformes que j'ai ensuite transfecté dans une lignée cellulaire n'exprimant par de *C11orf88* endogène (Figure 127). Il serait nécessaire de pouvoir réaliser des nucléofections dans nos cultures de HAEC ou de mTEC afin de déterminer si ces deux isoformes se localisent différemment dans les cellules multiciliées, et si l'assemblage et le désassemblage des cils motiles ou des cils primaires sont affectés par la surexpression de l'une ou de l'autre isoformes de C11orf88. La surexpression de ces variants dans une lignée cellulaire présentant des cils primaires, pourrait déjà permettre de valider une de ces hypothèses.



Figure 127 : Isoformes de C11orf88 visualisés sur Ensembl (transcrits) ou en Western Blot (protéines)

II.2.B – LAYN

La Layiline (codée par LAYN) est un récepteur membranaire de l'acide hyaluronique capable de transduire les signaux de la matrice extracellulaire vers le cytosquelette d'actine via l'interaction avec différents partenaires de liaison intracellulaire, et ainsi être impliquée dans la modulation des structures corticales des cellules, notamment dans les voies respiratoires [541,570,571]. Nous avons montré chez l'humain que l'expression des transcrits de LAYN diminue en début de différenciation des HAEC en culture ALI, puis augmente en fin de différenciation. Les transcrits de LAYN s'accumulent dans les populations suprabasales (page 6) et multiciliées (page 11) comme nous l'ont révélé les analyses en « Single-cell RNA-seq » (page 119). De plus, nous avons pu voir que l'expression protéique de LAYN était essentiellement concentrée dans le cytoplasme, enrichie à la surface apicale de cellules multiciliées en formation. Enfin, du fait que la layiline soit exprimée précocement dans les cellules épithéliales respiratoires, nous avons pu utiliser une approche d'interférence ARN (siARN) afin d'inhiber son expression. Nous avons ainsi montré que son inhibition précoce affecte considérablement la différenciation des cellules multiciliées (page 124). Plusieurs essais d'infections lentivirales de shARN pour diminuer l'expression de LAYN se sont avérés non concluants. Il n'était pas possible de mettre les cellules en Interface Air/Liquide (page 42) car la résistance transépithéliale n'atteignait jamais les 1000 ohms, témoignant que les cellules n'étaient pas en mesure de former les jonctions cellulaires, ou n'arrivaient pas à proliférer. Ces résultats témoignent de l'importance de l'expression de LAYN dès l'étape de prolifération cellulaire pendant la régénération de l'épithélium des voies respiratoires. Toutefois, ils ne correspondent pas à ceux obtenus chez l'humain avec les technologies des siARN, ce qui pourrait être expliqué par les différences d'expression des transcrits et de la protéine LAYN entre l'humain et la souris, ou de la force d'inhibition induite par la siARN ou les shARN. Chez l'humain, une étude a montré que LAYN est un récepteur à l'acide hyaluronique exerçant une activité répressive de l'E-cadherine via la voie de la petite GTPase RhoA/ROCK (page 58) en cas de fixation de formes particulières d'acide hyaluronique générées par la fumée de cigarette [541]. Son expression apicale dans l'épithélium des voies respiratoires humaines avait ainsi été déjà démontrée. Nous avons montré dans une étude précédente que les miR-34/449 contrôle le remodelage du cytosquelette d'actine en modulant la voie de signalisation des petites GTPases, incluant RhoA (page 83) [286]. La localisation cellulaire de LAYN dans les cellules multiciliées, le blocage de la multiciliogenèse en réponse à son inhibition, et son implication avec la voie RhoA/ROCK pourrait suggérer un rôle dans le remodelage du cytosquelette d'actine lors de la multiciliogenèse. En outre, il a été montré que l'acide hyaluronique lui-même interagit avec le récepteur de la motilité médiée par l'acide hyaluronique (RHAMM ou CD168) qui s'exprime au sommet des cellules épithéliales des voies respiratoires ciliées. Fonctionnellement, l'acide hyaluronique, en se liant à RHAMM, stimule les battements ciliaires. Ainsi, l'acide hyaluronique joue un rôle pivot dans la défense des voies aériennes en stimulant la clairance mucociliaire [572]. Une autre étude a évalué les capacités lubrifiantes et les fonctions protectrices de l'acide hyaluronique, un composant structurel des tissus interstitiels et conjonctifs, dans des modèles in vitro de transport de mucus des voies respiratoires par le battement ciliaire [573]. Tout comme le récepteur de l'acide hyaluronique RHAMM, qui est exprimé à l'apex des cils motiles et interagit avec son ligand afin de contrôler le battement ciliaire [572], nous pourrions suggérer que LAYN agissent dans les cellules multiciliées au sein des cils motiles (page 32) comme un récepteur additionnel de l'acide hyaluronique pour contrôle le battement ciliaire. Il serait intéressant de tester dans les mTEC (page 43), l'hypothèse selon laquelle LAYN ou RHAMM puisse interagir dans les cils motiles avec C11orf88. Des expériences de Duolink (utilisation, lors de techniques d'immunofluorescences, d'anticorps secondaire couplés à des oligonucléotides différents, dont la proximité permet une réaction de ligation et d'amplification visible par des sondes fluorescentes formant un signal spécifique à l'endroit de la ligation) permettant de mettre en évidence la proximité de LAYN, RHAMM et C11orf88 notamment, permettraient de valider cette hypothèse.

11.2.C – BTG4

BTG4 fait partie de la famille BTG/Tob qui régule le cycle cellulaire dans de nombreux types cellulaires [574]. Nous avons montré que l'expression transcriptomique de *BTG4*, bien qu'elle soit faible dans l'épithélium des voies respiratoires humaines, augmente de deux fois pendant la différenciation *in vitro*, et que les cellules l'exprimant semblent concentrées dans la population des cellules multiciliées. Chez la souris, l'expression de *BTG4* augmente clairement pendant la multiciliogenèse et est concentrée dans les cellules multiciliées (page 124). *BTG4* partage une forte homologie avec *BTG3* dont l'expression est fortement enrichie dans les cellules deutérosomales chez l'humain. Ces cellules sont des cellules multiciliées

immatures dans lesquelles l'amplification centriolaire génère des centaines de corps basaux. Il est connu que ce processus utilise de manière détournée certains acteurs du cycle cellulaires comme entre autres CDK1 (page 50) [253]. Ces données suggèrent que BTG3 pourrait être un autre acteur du cycle cellulaire utilisé pour l'amplification centriolaire dans les cellules deutérosomales et compenserait la faible expression de BTG4. Chez la souris, un premier essai d'infection lentivirale nous a montré que, bien que l'expression de ces gènes soit affectée par le shCTRL, les expressions de *BTG4*, mais aussi de *FOXJ1* (page 93) et *CDC20B* (page 95), deux acteurs de la multiciliogenèse, sont diminuées d'environ 90% par le shBTG4, par rapport au shCTRL (Figure 128). Ces résultats suggèrent que BTG4 aurait bien un rôle dans la multiciliogenèse chez la souris, mais devront être confirmés par le CRISPR-Cas9.



Figure 128 : Effets de l'inhibition de BTG4 par infection lentivirale de shCTRL ou shBTG4 sur l'expression de BTG4 et de FOXJ1 et CDC20B, deux marqueurs de la multiciliogenèse

III. Mécanisme de contrôle transcriptionnel des loci 5q11 et 11q23

La présence de plusieurs miR homologues impliqués dans un même processus biologique, comme c'est le cas des miR-34/449 dans la régulation de la multiciliogenèse (page 83), suggère des mécanismes de compensations. Effectivement, l'équipe de Bao et collaborateur a généré un modèle de souris KO pour les miR-449a/b/c dans lesquelles ils ont observé une augmentation de l'expression de miR-34b/c en compensation du défaut de miR-449 [406,575]. Cette compensation a été mise en évidence fonctionnellement par l'équipe de Song et collaborateurs, qui montrent que les souris double KO pour miR-34a et miR-449a/b/c ou double KO pour miR-34a et miR-34b/c n'ont pas de défaut de multiciliogenèse. Seules les souris triple KO présentent une diminution du nombre de cellules multiciliées [289]. Par ailleurs, nous avons montré que l'induction des miR-449a/b/c est plus précoce que celle des miR-34b/c au cours de la multiciliogenèse chez l'humain et le xénope (page 41)

[286]. Ces résultats suggèrent un contrôle transcriptionnel différent des miR-449a/b/c et miR-34b/c, et la répression de cibles différentes par les miR-449a/b/c et les miR-34b/c.

Lors de mon étude sur les gènes du locus 11q23, j'ai observé dans la littérature une potentielle régulation commune de l'expression transcriptionnelle de ces gènes. En effet, il a été montré que BTG4 et les miR-34b/c partageaient un promoteur commun qui serait sous le contrôle du facteur de transcription TP53 (page 87) [404]. Il a également été montré que LAYN était une cible en aval de TP53 [576]. La localisation des miR-34b/c entre BTG4 et C11orf88 pourrait suggérer que le promoteur commun régule également l'expression de C11orf88. Pour déterminer cela, nous avons déterminé des potentielles séquences promotrices, en se basant sur nos données de séquençage dans nos modèles HAEC et les informations de la littérature, entre les gènes BTG4 et C11orf88 et en amont du gène LAYN. En clonant ces séquences dans des plasmides rapporteurs luciférase, nous pourrons déterminer si l'expression de TP53 par un autre plasmide peut induire ces promoteurs. Ainsi nous pourrions confirmer que les gènes du locus 11q23 sont sous le contrôle du facteur de transcription TP53. Le rôle de facteur de transcription dans la multiciliogenèse a été démontré [409], mais son mécanisme précis est encore inconnu. Ces expériences pourraient probablement mettre la lumière sur l'induction de la multiciliogenèse par TP53 via l'activation de la transcription des miR-34b/c et des gènes du locus 11q23 l'entourant (Figure 129). Les miR-34b/c exerceraient une répression sur leurs cibles pour permettre la multiciliogenèse, et les gènes BTG4, LAYN et C11orf88 joueraient également un rôle dans ce processus.

Nous utiliserons aussi les plasmides rapporteurs luciférase contenant les promoteurs des gènes du locus 11q23 avec des plasmides exprimant le facteur de transcription E2F4 pour vérifier si ce facteur de transcription déjà impliqué dans le contrôle transcriptionnel des gènes du locus 5q11 (miR-449a/b/c (page 83) [577], *MCIDAS* (page 90) et *CCNO* (page 98) [536] et *CDC20B* (page 95) [197]). Des résultats négatifs de cette expérience suggèreraient l'hypothèse d'un contrôle transcriptionnel différent des deux loci, avec le locus 5q11 contrôle du facteur de transcription E2F4 (page 88) et le locus 5q11 contrôle du facteur de transcription TP53.

L'étude de Walentek et collaborateurs a également démontré que FOXJ1 (page 93) et RFX2 (page 94) peuvent se fixer sur la région promotrice de miR-34b/c [577] (Figure 129).

Cette étude nécessiterait des confirmations d'induction transcriptionnelle par un telle fixation, mais fournit un argument supplémentaire quant au contrôle différentiel des loci 5q11 et 11q23. Elle argumente aussi quant au contrôle transcriptionnel dans le temps de ces loci, E2F4 étant un facteur transcriptionnel exprimé en amont de FOXJ1 et RFX2 dans la multiciliogenèse. Cela pourrait expliquer l'expression plus précoce des miR-449a/b/c, et plus tardive des miR-34b/c. L'implication du facteur de transcription TP53 remettrait cependant cette hypothèse en cause, étant un acteur plus précoce de la multiciliogenèse, puisqu'il est impliqué dans l'inhibition de CDK1 pour permettre la sortie du cycle cellulaire des cellules [409]. Les miR-34/449 étant aussi impliqués dans l'inhibition d'acteurs du cycle cellulaire pendant la multiciliogenèse, soulève la question sur leur potentielle interaction dans ce processus avec TP53. Nous utiliserons ainsi les plasmides rapporteurs luciférase contenant les promoteurs des gènes du locus 11q23 avec des plasmides exprimant les facteurs de transcription RFX et FOXJ1 pour vérifier ces hypothèses.



Figure 129 : Schéma proposé pour le contrôle de l'expression transcriptomique des loci 5q11 et 11q23

IV. Locus 11q23 et dyskinésies ciliaires primitives ?

Les dyskinésies ciliaires primitives (DCP) représentent un groupe de pathologiqes caractérisées par des défauts de ciliogenèse (page 102). Outre le cas des patients avec un manque total de cils respiratoires, environ 50% des patients atteints de DCP ont une raréfaction des cils en plus de leur défaut ultrastructural spécifique. Il serait intéressant de tester l'hypothèse selon laquelle les gènes impliqués dans la ciliogenèse des cellules multiciliées pourraient agir comme des gènes modificateurs de la DCP. Il a déjà été montré par l'équipe de Omran que les geux gènes *CCNO* (page 98) et *MCIDAS* (page 90) du locus 5q11, situés à côté de *CDC20B*/miR-449 (page 95 et 83), ont été impliqués dans le trouble de

la clairance mucociliaire humain qui imite la DCP et dont le diagnostic est basé, au moins en partie sur l'identification des défauts ultrastructuraux des cils respiratoires [443,444,448]. En fait, tous les patients présentant des mutations identifiées dans CCNO ou MCIDAS appartenaient à des cohortes DCP. Utiliser une cohorte de patients DCP serait un intérêt particulier pour déterminer si des polymorphismes dans les gènes du locus 11q23 (miR-34b/c, *C11orf88, LAYN* et *BTG4*) pourraient également avoir un impact sur la proportion de cils présents sur les cellules après les agressions des voies respiratoires et la régénération. Dans un premier temps, il serait intéressant de rechercher des corrélations avec les proportions de cellules ciliées et/ou la quantité de cils par cellule. Ces données phénotypiques sont disponibles dans la base de données de la cohorte DCP, puisque tous les patients bénéficient d'une étude en microscopie électronique de leurs cils.

V. Implication de la voie Hh dans la multiciliogenèse

Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré que les voies de signalisation Notch (page 68), BMP (page 70) et celle des GTPases (page 58 et 83) jouent un rôle clé pendant la multiciliogenèse [196,228,286,287,338,534,544]. Ces voies peuvent interagir avec d'autres signaux clés, telles que la voie Hh (page 76) pour contrôler une grande variété de processus au cours du développement ou lors de la tumorigenèse [578,579]. Sous cet aspect, mon travail de thèse a permis d'identifier l'implication d'une voie Hh non canonique, dont l'activité précoce est nécessaire à la multiciliogenèse. Chez les vertébrés, le signal Hh est bien décrit comme contribuant à la formation du cil primaire [545,580], tandis que son rôle dans l'amplification centriolaire et la multiciliogenèse reste inexploré.

Nous avons montré que le ligand SHH et le récepteur Smo de la voie Hh étaient exprimés dans les cils motiles des cellules multiciliées des HAEC en culture ALI (page 42), et que des trois facteurs de transcription marqueurs de la voie canonique Hh (GLI1-3), seuls les transcrits de GLI3 étaient détectables (page 131). Nous avons montré que l'inhibition de Smo par approche pharmacologique ou de transfection de siRNA au cours de la différenciation des HAEC, altérait la multiciliogenèse. En revanche, la suractivation de la voie par traitement avec le ligand SHH n'aurait pas d'effet sur la multiciliogenèse. Il semble que ces différentes modulations de la voie Hh n'affectent pas l'expression des facteurs de transcription GLI, ce qui nous a conduit à émettre l'hypothèse qu'une voie non canonique est nécessaire à la multiciliogenèse dans les cellules de l'épithélium des voies respiratoires humaines. Les analyses transcriptomiques des facteurs de transcription GLI ont attiré notre attention sur l'expression d'un facteur de transcription Gli-similar GLIS3, dont l'expression est fortement induite pendant la différenciation des HAEC. Dans les HAEC, GLIS3 est exprimé dans les cils de cellules multiciliées, et son expression transcriptomique semble altérée par l'inhibition de la voie Hh. GLIS3 interagirait avec GLI2 et GLI3 de la voie canonique Hh [558], suggérant un croisement entre la voie Hh et GLIS3 qui pourrait expliquer l'altération de l'expression de GLIS3 par l'inhibition de la voie Hh dans notre modèle. Si nos observations s'avèrent juste, il serait possible d'émettre l'hypothèse que GLIS3 agisse en aval de la voie Hh pour permettre la multiciliogenèse. L'action de GLIS3 pourrait se produire *via* la voie de signalisation Hippo affectant entre autre la voie de signalisation PCP [558], cette dernière étant impliquée dans la polarisation de l'épithélium et le remodelage du cytosquelette d'actine pendant la différenciation des cellules multiciliées [217–219].

Deux études récentes ont également démontré une implication de la voie Hh dans l'épithélium des voies respiratoires. La première, réalisée par l'équipe de Welsh, a démontré que la voie Hh non canonique influe sur la fréquence des battements ciliaire dans l'épithélium de voies respiratoires bronchiques différenciées [353]. La deuxième, réalisée par l'équipe de Dormoy, montre que l'activité de la voie Hh canonique est nécessaire à la multiciliogenèse [354]. Bien que ces études soient en accord avec certaines de nos observations, elles soulèvent de nombreuses questions concernant la localisation cellulaire du ligand SHH et de l'implication d'un voie canonique ou non canonique.

Pendant notre étude, nous avons comparé l'expression protéique et transcriptomique du ligand SHH dans nos cultures d'HAEC en ALI (page 42) et des cultures de cellules épithéliales des voies respiratoires nasales et bronchiales fournit par Epithelix[®]. Nous avons ainsi pu observer que l'expression protéique du ligand SHH est plus forte dans les bronches que dans le nez (Figure 130A). De manière surprenante, l'expression protéique de SHH dans nos cultures est aussi forte que dans les bronches, alors que nos cellules proviennent d'échantillons nasaux. Le milieu de culture utilisé par Epithelix[®] (Mucilair[™]) étant différent du nôtre, il est probable que cette donnée soit une nouvelle indication de l'effet des milieux de culture sur l'expression protéique de certains gènes. En revanche, les données transcriptomiques en qPCR et en « Single-cell RNA-seq » (page 119) montrent des résultats plus cohérents (Figure 130 B&C). A nouveau, l'expression de SHH est plus forte

dans les bronches que dans le nez, ce qui est cohérent également avec l'étude de l'équipe de Welsh qui retrouve une expression transcriptomique de SHH dans leurs cultures de cellules épithéliales des voies respiratoires bronchiques [353]. Nos cultures montrent une expression de SHH similaire à celle obtenue dans le nez, cohérente avec la provenance de nos échantillons. Ces données nous ont conduits à penser que le ligand SHH était peut-être présent dans le milieu de culture que nous utilisions.



Figure 130 : Expression protéique et transcriptomique du ligand SHH dans l'épithélium de voies respiratoires nasales et bronchique provenant d'Epithelix®, et dans nos cultures de HAEC en ALI en milieu BEGM

Pour déterminer si les milieux de culture que nous utilisons contiennent du SHH et si nos cultures sécrètent SHH dans le milieu extracellulaire, nous avons dosé la présence de SHH dans nos échantillons contenant les deux milieux extracellulaires conditionnés ou non à la surface basale ou apical de nos cultures ALI (collaboration avec l'équipe du Dr Ruat, Institut des Neurosciences Paris-Saclay). Nous avons utilisé une méthode de rapporteur luciférase couplé aux GLI, dont l'activité reflète l'activation de la voie Hh, et donc la présence de Hh dans les échantillons testés. Comparé aux conditions où du SHH a été artificiellement rajouté dans nos milieux (BEGM™ + SHH ou Muciliair™ + SHH), où la réponse luciférase est très forte, nous avons pu voir que les milieu BEGM™ et Mucilair™ ne contiennent pas de SHH. Nous avons aussi pu voir que les cultures HAEC cultivées en milieux BEGM™ ou les culture Epithelix® cultivées en milieu Mucilair™ ne sécrétent pas de SHH dans le compartiment apical, ni dans le compartiment basal.



Figure 131 : Réponse luciférase induite par la présence du ligand SHH dans les milieux de culture de cellules épithéliales des voies respiratoires nasales et bronchiques

Ces observations sont en désaccord avec les études de l'équipe de Welsh et de Dormoy, qui par deux autres méthodes de détection (Western Blot et dosages ELISA) montrent que le ligand SHH est sécrété par les cellules épithéliales de voies respiratoires nasales et bronchiques dans le milieu apical et basolatéral. Ces résultats n'expliquent pas non plus pourquoi l'expression protéique dans nos cultures ALI est aussi forte que dans les cellules épithéliales des voies respiratoires bronchiques d'Epithélix[®], alors que les transcrits de SHH ne sont pas détectables.

Néanmoins, malgré ces observations contradictoires, il apparait que l'activité de la voie SHH soit effectivement requise pour la multiciliogenèse. Comme nous l'avons vu précédemment (page 147), les cellules de l'épithélium respiratoires forment d'abord un cil primaire, qui est par la suite résorbé pour la formation des cils motiles des cellules multiciliées [546]. Par ailleurs, il a été montré que l'altération du cil primaire avant les étapes de multiciliogenèse induit des défauts de structure, de fonction et de nombre des cils motiles dans des tissus murins [581,582]. Comme le lien entre la voie Hedgehog et le cil primaire a été largement établi [548], il serait possible d'émettre l'hypothèse que l'altération de la voie Hh dans nos cultures ALI perturbe le cil primaire dans les étapes précoces de différenciation, ce qui empêcherait la formation des cils motiles dans les cellules multiciliées. L'analyse des cils primaires en début de différenciation pendant l'inhibition de la voie Hh permettrait de confirmer cette hypothèse comme mécanisme additionnel à l'altération de l'expression de FOXJ1 (page 93).

Un lien entre les cils motiles et la voie de signalisation Hh avait déjà été publié auparavant. Une étude réalisée chez l'oursin de mer, montre que la voie Hh est présente dans le cil motile, mais aussi que le cil motile est nécessaire à la voie Hh [583]. En effet, ils montrent que la perturbation du cil motile dans cet organisme diminue l'activité de la voie Hh. Cette étude montre premièrement que l'implication de la voie Hedgehog dans le cil motile est conservée dans les espèces. Elle pourrait nous amener à voir sous un autre angle les observations faites dans l'étude de l'équipe de Dormoy dans l'épithélium des voies respiratoires bronchiques de patients atteints de BPCO (page 106). Ils ont en effet observé une diminution de l'expression transcriptomique et protéique de GLI2, accompagnée d'une perte de translocation dans le noyau chez ces patients, comparé à des individus sains. Ils ont également observé une diminution de l'expression protéique de GLI3 et SMO [354]. Il a été reporté que dans la BPCO, la fréquence des battements ciliaires, et la taille des cils étaient affectés dans cette maladie [486,488–490]. Ces différentes informations peuvent conduire à l'hypothèse que les observations de l'équipe de Dormoy sur la diminution de l'activité de la voie Hh pourraient être une conséquence de l'altération des cils dans la BPCO. Il serait alors possible que la voie Hh soit requise pour la formation des cellules multiciliées, comme le montre nos deux études, mais que les cils motiles soient également requis pour l'activité de la voie Hh, comme ce serait le cas pour les cils primaires [580]. Des investigations supplémentaires, notamment sur l'expression de SHH qui n'a pas été présentée dans l'étude de Dormoy, pourraient répondre à cette hypothèse. Une étude sur les cils primaires dans le cerveau de souris a démontré que RFX3 (page 94) régule indirectement l'activité de l'effecteur GLI3 de la voie Hh et une réduction de la signalisation Hh. Cette régulation indirecte se produit par le rôle de RFX3 dans la formation de l'IFT (page 35) nécessaire au transport des membres de la voie Hh le long du cil primaire [584]. RFX3 joue aussi un rôle dans la formation de l'IFT dans le cils motiles dans les cellules multiciliées [435]. Cet exemple pourrait illustrer comment le cil motile est également nécessaire à la voie Hh.

L'implication de la voie Hh dans l'épithélium mucocilié semble être conservé dans les espèces. En effet, une étude montre chez le xénope, à un stade embryonnaire où il n'est pas supposé avoir de cil primaire, mais uniquement des cils motiles, les transcrits des membres de la voie Hh sont exprimés. Cette étude révèle également que l'inhibition de Chibby (page 58), un acteur de la multiciliogenèse, altère l'expression de GLI2, GLI3 et SHH [585]. Jusqu'alors Chibby était étudié pour son implication dans la voie WNT/ β -caténine, mais cet effet répertorié sur la voie Hh semble indépendant de la voie Wnt- β -caténine. Il serait intéressant de déterminer si ce mécanisme est conservé dans l'épithélium des voies respiratoires humaines en observant les effets d'une inhibition de Chibby sur l'expression des membres de la voie Hh, et inversement, l'effet de l'inhibition de la voie Hh sur Chibby. Par ailleurs, une autre étude chez le xénope montre que l'inhibition de la voie Hh dans l'embryon induit une diminution de l'expression de FOXJ1 [586], et que cette inhibition est induite par la voie canonique de Hh (diminution de l'expression de PTCH1). Cette étude montre également que cette inhibition peut être partiellement restaurée par activation de la voie WNT/ β -caténine (page 73). Ces informations apportent des arguments supplémentaires concernant la conservation de l'implication de la voie Hh dans la formation des cils motiles, et d'une inter-relation possible entre la voie Hh et la voie WNT/ β -caténine.

Un lien entre la voie BMP (page 70) et la voie Hh a été démontrée par une étude pendant le développement embryonnaire de la souris, montrant que la voie Ectodysplasin A (Eda) et son récepteur Edar induisent d'une part l'inhibition de la voie BMP et d'autre part l'activation de la voie SHH [578]. Cette voie Eda est notamment impliquée dans le développement des voies respiratoires [587]. Nous avons montré que l'inhibition de la voie BMP est requise pour la multiciliogenèse [338], et que l'activation de la voie Hh est également requise pour ce processus. Il serait intéressant d'observer si un tel rôle de la voie Eda se maintiendrait dans l'épithélium des voies respiratoires adultes.

VI. Identification des populations composant l'épithélium des voies respiratoires pendant la régénération *in vitro*

Une première étude réalisée par notre laboratoire, à laquelle j'ai été associée, a permis d'identifier et cartographier les populations cellulaires composant l'épithélium des voies respiratoires cultivé *in vitro* en milieu Pneumacult-ALI[™] et BEGM[™] (page 126) [28,30]. Notre étude a axé principalement ses résultats sur les données obtenues en « Single-Cell RNA-seq » (page 119) en milieu Pneumacult[™]. Dans ces conditions de culture, nous avons déterminé que l'épithélium des voies respiratoires était composé de six types cellulaires majeurs : (1) cellules basales en prolifération, (2) cellules basales (page 6), (3) cellules suprabasales (page 6), (4) cellules sécrétrices (cellules « club ») (page 7), (5) cellules à mucus (« goblet ») (page 7), (6) cellules multiciliées (page 11). Nous avons également montré que

l'ordre d'apparition des types cellulaires au cours de la différenciation est le suivant : les cellules basales en prolifération, les cellules basales, puis suprabasales puis sécrétrices. La trajectoire bifurque alors en deux branches se dirigeant vers les cellules à mucus ou les cellules multiciliées comme points finaux de différenciation. Lors d'un clustering plus résolutif les cellules basales ont été séparées en 2 sous-groupes, dont un montre un profil d'expression génique suggérant des capacités migratrices accrues, et un profil plus mésenchymateux. Les cellules sécrétrices, quant à elles, forment en 3 sous-populations dont une exprime des gènes suggérant une interaction enrichie avec le système immunitaire. Les cellules multiciliées, exprimant FOXJ1 (page 93), sont en deux groupes : (1) les cellules multiciliées matures caractérisée par l'expression des gènes multiciliés matures (comme DNAH5) et (2) une sous-population de cellules multiciliées immatures appelées « cellules deutérosomales » qui expriment des gènes spécifiques de la formation des deutérosomes et de l'amplification des centrioles (page 50) requises pour la formation de multiples cils. Une recherche manuelle avec les gènes marqueurs spécifiques FOXI1 et ASCL3 nous a permis également de détecter quelques ionocytes (page 8). Notre première étude a également rapporté des différences observées avec le milieu BEGM, notamment concernant la population de cellules sécrétrices n'exprimant pas SCGB1A1, nous conduisant à définir cette population de « sécrétrice-like », et concernant l'absence de cellule à mucus, modifiant ainsi la trajectoire cellulaire de différenciation en une seule courbe. Ces cellules dépourvues de SCGB1A1 présentent pourtant un profil d'expression génique proche des cellules sécrétrices plus classiques, exprimant la SCGB1A1, démontrant la limitation des approches classiques de détermination se basant uniquement sur un seul marqueur, et renforcent l'intérêt des déterminations sur profil d'expression de centaines de gènes. De plus, ces cellules semblent capables de se différencier en cellules à mucus lorsqu'elles sont stimulées par l'IL-13. En effet, si en condition contrôle nous n'obtenons pas de cellules à mucus en milieu BEGM™, nous observons une apparition de ces cellules après un traitement par l'IL-13, que ce soit de manière chronique pendant la différenciation, ou sur un épithélium pleinement différencié, mais sans jamais détecter l'expression de SCGB1A1. L'absence de cette protéine n'empêche donc pas les cellules sécrétrices-like d'exercer leur fonction de précurseurs des cellules à mucus. Le milieu de culture influence donc de manière significative la composition finale des milieux régénérés in vitro et les profils d'expression des cellules les composants. De manière intéressante, notre équipe a observé que dans l'épithélium nasal in vivo, les cellules

sécrétrices n'expriment pas non plus de *SCGB1A1* [29]. Le milieu BEGM[™] représenterait donc un milieu de choix pour mimer l'épithélium nasal pour la nature des types cellulaires le composant. Inversement, la condition de culture utilisant le milieu Pneumacult[™], si elle conduit à la formation d'un épithélium contenant des cellules sécrétrices exprimant la *SCGB1A1*, elle génère des tissus dont la composition cellulaire globale est très proche de celle de l'épithélium nasal *in vivo*. En effet, cultivées avec ce milieu, les cellules produisent des épithéliums *in vitro* enrichis en cellules basales, avec plusieurs couches de cellules basales, ce qui mime la structure de l'épithélium nasal *in* vivo. Le choix du milieu de culture s'avère donc être un choix décisif selon les mécanismes à étudier et selon le type d'épithélium souhaité.

Ceci nous a conduits à notre deuxième étude, caractérisant plus en détail les caractéristiques des épithéliums des voies respiratoires obtenues dans différents milieux de culture, dont le milieu BEGM[™] et Pneumacult[™], mais aussi deux autres milieux couramment utilisés dans la littérature pour la culture de cellules épithéliales des voies respiratoire *in vitro* à l'Interface Air/Liquide (page 129).

Ainsi dans cette deuxième étude, nous avons montré que cultiver des cellules épithéliales de voies respiratoires d'une même origine dans plusieurs milieux de culture conduisait à l'obtention d'épithélium de voies respiratoires de morphologie, composition cellulaire et expression génique très différents. En effet, en partant de cellules des voies respiratoires bronchiques cultivées sur plastique dans un milieu de prolifération Pneumacult[™] Ex-plus, la mise en culture en insert pendant les 5 jours de prolifération en immersion dans quatre milieux de culture distincts (BEGM™, « Clancy », Pneumacult-Ex-Plus[™] et « Wu ») était suffisante pour induire des différences à ce stade, avant la mise en différenciation. Par la suite, en poursuivant ces cultures à l'Interface Air/Liquide dans les milieux de différenciation correspondants (à nouveau 4 milieux différents), nous avons obtenu en fin de différenciation, dans deux expériences indépendantes des épithéliums de voies respiratoires très différents en termes d'épaisseur, de composition cellulaire et d'expression génique. De manière surprenante, nous avons observé dans les deux expériences indépendantes, une fraction importante de cellules à mucus en utilisant le milieu BEGM[™], ce qui n'était jamais arrivé auparavant sur plus de 200 cultures, chacune issue d'un donneur distinct, mis en différenciation dans ce milieu. Deux différences méthodologiques pourraient expliquer cette différence. La première est l'origine des cellules. Jusqu'à présent, nous établissons des cultures issues d'épithélium nasal, par la facilité d'obtention de ces cellules. Pour cette étude-là, nous avons fait le choix de travailler sur des cellules d'origine bronchique, pour établir un atlas de référence qui soit le plus largement utilisé par les équipes utilisant ce type de cellules. L'autre différence est l'utilisation du milieu de prolifération lors de la première étape d'amplification sur plastique. Nous avons toujours utilisé le milieu BEGM[™], alors que pour cette étude, le milieu Pneumacult-Ex-Plus[™] nous a été imposé par l'équipe fournissant les cellules. Ce milieu permet une prolifération accrue des cellules, mais nous avons montré sur 4 cultures indépendantes qu'il induisait une expression de SPDEF, facteur de transcription contrôlant l'expression de MUC5AC. Si lors de la phase d'expansion sur plastique, nous ne détectons pas de MUC5AC, et que les cellules sont pour la grande majorité des cellules basales, ce milieu pourrait, en induisant de manière précoce l'expression de ce facteur de transcription, imprimer une mémoire cellulaire et permettre la différenciation en cellules à mucus, même en milieu BEGM[™]. Cette observation est à mettre en relation avec les hypothèses avancées par notre équipe concernant la mémoire cellulaire portée par les cellules basales lors de l'asthme. En effet, il a été montré que des épithéliums reconstitués in vitro, à partir de cellules basales de patients asthmatiques sévères, reproduisaient une hyperplasie sécrétoire typique du remodelage épithéliale observé sur l'épithélium in vivo [588,589]. Ces cellules sont amplifiées sur plastique avant différenciation, elles subissent donc plusieurs divisions, en milieu chimiquement défini, dépourvu de tout stimulus inflammatoire. Pourtant, après culture en ALI, les défauts de composition de l'épithélium persistent, indiquant que les cellules ont maintenu une mémoire « inflammatoire » pendant leur mise en culture. Ce phénomène sera étudié plus en détail au cours des trois prochaines années dans l'équipe, et mes résultats concernant l'expression de SPDEF au cours de la prolifération, dans certains milieux seulement, pourront venir étayer les hypothèses de ce travail.

Comme évoqué plus haut, un des avantages de ce type d'approches en « Single-Cell RNA-seq » (page 119), est de bénéficier de profils d'expression de centaines de gènes pour chaque cellule, pour déterminer au mieux les types cellulaires. Pour certains types cellulaires, comme les cellules basales (page 6), les cellules multiciliées (page 11) ou encore les cellules sécrétrices (page 7) ou à mucus (page 11), il est très aisé de faire ce typage, avec quelques marqueurs positifs ou négatifs. Cependant, certains stades intermédiaires de différenciation sont difficiles à catégoriser, surtout que leur profil d'expression génique peut varier selon le milieu de culture utilisé. Se pose aussi la question de la « granulométrie » à utiliser, combien de sous-population peuvent être déterminées à partir d'une même population, et quelle est la réalité physiologique de ces sous-population ? Le « clustering » automatique des cellules, comme celui réalisé par le package Seurat, ne permet pas toujours de séparer convenablement des populations qui pourtant sont bien distinctes, comme par exemple les cellules sécrétrices et les cellules à mucus qui se distinguent par l'expression différentielle de seulement quelques gènes. En effet, ces deux types cellulaires ont des profils d'expression génique très proches, à l'exception des gènes MUC5AC et MUC5B. Seurat (tout comme d'autres package de « clustering ») n'est pas non plus capables de distinguer certaines populations parce que trop peu de cellules les composent. Cela peut être le cas pour les cellules deutérosomales et les population rares [28–30]. Ainsi il devient parfois nécessaire d'annoter manuellement ces populations.

Lors de la poursuite de nos analyses, nous accorderons une attention particulière à l'activité des voies de signalisation clé, dont nos études et celles de la littérature, ont montré une implication dans la différenciation de l'épithélium des voies respiratoires. Une analyse préliminaire de la voie Notch, dont nous avons montré l'implication dans la différenciation de l'épithélium des nuances d'un milieu de culture à l'autre, en termes d'activation ou d'expression des récepteurs.

Pour aller plus loin dans l'analyse de ces données, nous effectuerons des inférences de trajectoires cellulaires en utilisant par exemples les packages Monocle [590], PAGA [591] et Palantir [592], pour déterminer si ces trajectoires peuvent changer en fonction des conditions de culture. Nous accorderons une attention plus particulière aussi aux populations rares pour déterminer si une condition de culture est plus favorable à l'obtention de certaines d'entre elles. Nous avons pu détecter certaines de ces populations rares dans nos cultures, mais en top faible nombre pour être comparées d'un milieu à l'autre. Il nous faut à présent faire une intégration de toutes les données pour augmenter leur nombre, ce qui permettra de les regrouper à part et d'observer leurs profils d'expression génique. Notamment, dans les cellules cultivées en milieu « Clancy », la population d'ionocytes, source majeure de CFTR, sera particulièrement observée, puisque ce

milieu est spécifiquement utilisé pour l'étude de l'activité du canal chlorure CFTR et des effets des modulateurs de l'activité de ce canal dans la recherche de nouvelles molécules thérapeutique visant à améliorer l'activité de CFTR chez les patients CF [203].

Une étude récente a également comparé l'épithélium de voies respiratoires obtenu in vitro en culture ALI dans du milieu BEGM™ ou Pneumacult™ [593], mais n'utilisant pas de technologie « Single-Cell RNA-seq » (page 119). Cette étude rapporte que la condition Pneumacult™ produit un épithélium plus épais, avec plus de cellules multiciliées et moins de cellules non ciliées que dans la condition BEGM™, ce qui est cohérent avec nos résultats. L'obtention d'un nombre de cellules à mucus similaire dans les deux conditions semblent en accord avec les nôtres. Cependant, leur observation que MUC5AC est plus exprimé dans les cellules cultivées en condition Pneumacult™, et que les cellules à mucus contiendraient plus de MUC5AC dans ces conditions, est contraire à nos observations (Figure 132).



Figure 132 : Expression transcriptomique de MUC5AC en milieu BEGM ou Pneumacult en "Single-Cell RNA-seq"

Néanmoins, les auteurs précisent qu'ils ont cultivés leurs cellules pendant la phase d'amplification sur plastique en milieu BEGM[™]. Cela expliquerait d'une part cette différence concernant l'expression de MUC5AC, et d'autres part, indique que l'obtention de cellules à mucus en milieu BEGM[™] dans nos deux études pourrait provenir de l'origine anatomique des cellules. L'augmentation d'expression des protéines liées aux corps basaux qu'ils rapportent dans le milieu Pneumacult[™] par rapport au milieu BEGM[™], est également cohérente avec l'augmentation des cellules deutérosomales que nous avons répertoriée dans le milieu Pneumacult[™]. Ils rapportent également que la longueur des cils des cellules multiciliées est plus importante dans la condition Pneumacult[™]. Bien que nous n'ayons pas fait de mesures quantitatives précises, nos images par immunofluorescence semblent montrer qualitativement que les cils sont plus longs dans la condition de culture en milieu Pneumacult[™] par rapport à celle en milieu BEGM[™]. Cette étude rapporte également que bien que la culture de cellules en milieu Pneumacult™ produise un épithélium plus épais, la résistance transépithéliale est plus élevée en condition BEGM™, et la fonction de barrière de diffusion est plus active en condition Pneumacult[™]. Ces résultats suggèrent un épithélium plus imperméable dans le milieu BEGM™, bien qu'il soit plus fin. Quoi qu'ils observent une augmentation de l'expression protéique de E-cadherine dans les cellules cultivées en milieu Pneumacult[™], sa localisation cellulaire et celle de ZO-1 ne leur permet pas de conclure que la différence de perméabilité vienne de ce fait. Nos expériences ne permettent cependant pas de discuter de leurs observations, car nous n'avons pas réalisé de telles mesures. Il serait néanmoins intéressant de comparer dans de futures expériences la perméabilité dans nos cultures. L'étude de l'équipe de Yang rapporte aussi que dans le milieu BEGM™, la ligne de base des cytokines inflammatoires est plus élevée, en se basant notamment sur l'expression protéique de TSLP plus élevée. J'ai pu observer que nous obtenions un profil différent concernant les expressions transcriptomiques de la E-cadherine, de ZO-1 et de TSLP dans nos cultures. Nous analyserons les expressions protéiques de ces candidats (entre autres) à partir des échantillons protéiques obtenus dans chaque condition de culture.



Figure 133 : Expressions transcriptomiques de CDH1 (E-cadherin), TJP1 (ZO-1) et TSLP en milieu BEGM ou Pneumacult en "Single-Cell RNA-seq"

Cette étude, bien que reposant sur un nombre limité de marqueurs, rapporte néanmoins des résultats similaires aux nôtres concernant la structure globale des épithéliums générés *in vitro* par les deux conditions de culture. En utilisant le profilage par « Single-Cell RNA-seq » (page 119), nos résultats précisent les différences de composition cellulaire et les profils d'expression génique produits par chaque milieu. De plus, nous avons obtenu des résultats avec deux milieux supplémentaires, le milieu « Clancy », couramment utilisé pour des mesures de court-circuit, et le milieu « Half&Half », récemment décrit comme générant un épithélium aux propriétés plus proche des épithéliums *in vivo*. Par ailleurs nous avons montré que l'influence du milieu de prolifération était importante lors des cultures de cellules épithéliales de voies respiratoires à l'Interface Air/Liquide, et leur étude a été réalisée avec le milieu BEGM[™] pendant les étapes de prolifération, apportant certainement des différences comme nous avons pu l'observer pour l'expression de Ecadherine, ZO-1 et TSLP.

Les différentes études auxquelles j'ai contribué durant ma thèse ont permis d'identifier de nouveaux acteurs de la multiciliogenèse et de caractériser une nouvelle voie non-canonique de signalisation Hh dans le contrôle de la différenciation des cellules multiciliées. A travers nos données obtenues en « Single-cell RNA-seq » (page 119), la variabilité des marqueurs cellulaires identifiés pour chaque population cellulaire et leur expression différentielle dans ces mêmes populations d'origines anatomiques différentes ou cultivées dans des conditions différentes appelle premièrement à une harmonisation et un catalogue bien défini des marqueurs cellulaires correspondant à chaque population. De plus, nos études soulignent l'attention particulière qui doit être apportée sur le choix du milieu de culture à utiliser et ses conséquences sur la différenciation des épithéliums. Nos données comparatives soulignent ainsi la caution qui doit être faite concernant les conclusions des résultats obtenus selon le protocole de culture utilisé. Nos études ont également apporté un nouvel éclairage sur les dynamiques de différenciation des progéniteurs dans l'épithélium des voies respiratoires *in vitro*.

En effet, ces méthodes de séquençage du transcriptome de cellules uniques (page 119) mettent également en lumière de nombreux gènes dont l'expression spécifique dans certaines populations leur suggère un rôle particulier. La nécessité de mettre en place des méthodes d'analyses fonctionnelles robustes et reproductibles n'en devient que plus évidente, et la dynamique de notre laboratoire s'inscrit parfaitement dans ces objectifs, notamment avec la mise en place actuelle de la technologie de CRISPR-Cas9 dans nos modèles.

Ces découvertes actuelles et futures permettront de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la régénération de l'épithélium des voies respiratoires. Ainsi, il sera alors possible de mieux déterminer les mécanismes impliqués dans les dysfonctions survenant dans les maladies respiratoires chroniques, pour pouvoir mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le but d'améliorer les conditions de vie des patients atteints d'asthme, de bronchites chroniques, ou encore de la mucoviscidose.

Bibliographie

1. Barkauskas CE, Cronce MJ, Rackley CR, Bowie EJ, Keene DR, Stripp BR, et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. J Clin Invest [Internet]. 2013 [cited 2019 Jul 3];123:3025–36. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23921127

2. Raidt J, Werner C, Menchen T, Dougherty GW, Olbrich H, Loges NT, et al. Ciliary function and motor protein composition of human fallopian tubes. Hum Reprod [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 1];30:2871–80. Available from: https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/dev227

3. Lyons RA, Saridogan E, Djahanbakhch O. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. Hum Reprod Update [Internet]. 2006 [cited 2019 Jul 1];12:363–72. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16565155

4. Halbert SA, Tam PY, Blandau RJ. Egg transport in the rabbit oviduct: the roles of cilia and muscle. Science [Internet]. 1976 [cited 2019 Jul 1];191:1052–3. Available from: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1251215

5. Danielian PS, Hess RA, Lees JA. E2f4 and E2f5 are essential for the development of the male reproductive system. Cell Cycle [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 3];15:250–60. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15384101.2015.1121350

6. Terré B, Lewis M, Gil-Gómez G, Han Z, Lu H, Aguilera M, et al. Defects in efferent duct multiciliogenesis underlie male infertility in GEMC1-, MCIDAS- or CCNO-deficient mice. Development [Internet]. 2019 [cited 2019 Jul 3];146:dev162628. Available from: http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.162628

7. Narita K, Kawate T, Kakinuma N, Takeda S. Multiple primary cilia modulate the fluid transcytosis in choroid plexus epithelium. Traffic [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 1];11:287–301. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0854.2009.01016.x

8. Narita K, Takeda S. Cilia in the choroid plexus: their roles in hydrocephalus and beyond. Front Cell Neurosci [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 1];9:39. Available from: http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fncel.2015.00039/abstract

9. WORTHINGTON WC, CATHCART RS. Ependymal cilia: distribution and activity in the adult human brain. Science [Internet]. 1963 [cited 2019 Jul 1];139:221–2. Available from: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.139.3551.221

10. Delgehyr N, Meunier A, Faucourt M, Bosch Grau M, Strehl L, Janke C, et al. Ependymalcell differentiation, from monociliated to multiciliated cells. Methods Cell Biol [Internet].2015[cited2019Jul1];127:19–35.Availablehttps://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X15000059

11. Gonzalez-Cano L, Fuertes-Alvarez S, Robledinos-Anton N, Bizy A, Villena-Cortes A, Fariñas I, et al. p73 is required for ependymal cell maturation and neurogenic SVZ cytoarchitecture. Dev Neurobiol [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 1];76:730–47. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/dneu.22356

12. Edwards-Faret G, Cebrián-Silla A, Méndez-Olivos EE, González-Pinto K, García-Verdugo JM, Larraín J. Cellular composition and organization of the spinal cord central canal during metamorphosis of the frog Xenopus laevis. J Comp Neurol [Internet]. Wiley-Liss Inc.; 2018 [cited 2020 Mar 26];526:1712–32. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29603210

13. Alfaro-Cervello C, Cebrian-Silla A, Soriano-Navarro M, Garcia-Tarraga P, Matías-Guiu J,

Gomez-Pinedo U, et al. The adult macaque spinal cord central canal zone contains proliferative cells and closely resembles the human. J Comp Neurol [Internet]. Wiley-Liss Inc.; 2014 [cited 2020 Mar 26];522:1800–17. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24638933

14. Hansen A, Zeiske E. Development of the olfactory organ in the zebrafish, Brachydanio rerio. J Comp Neurol [Internet]. 1993 [cited 2019 Jul 1];333:289–300. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8345108

15. Brooks ER, Wallingford JB. In vivo investigation of cilia structure and function using Xenopus. Methods Cell Biol [Internet]. Academic Press Inc.; 2015 [cited 2020 Apr 16];127:131–59. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25837389

16. Walentek P, Quigley IK. What we can learn from a tadpole about ciliopathies and airway diseases: Using systems biology in Xenopus to study cilia and mucociliary epithelia. Genesis [Internet]. 2017 [cited 2019 Jul 3];55:e23001. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/dvg.23001

17. Werner ME, Mitchell BJ. Understanding ciliated epithelia: the power of Xenopus. Genesis[Internet].2012[cited2019Jul3];50:176–85.Availablefrom:http://doi.wiley.com/10.1002/dvg.20824

18. Dubaissi E, Papalopulu N. Embryonic frog epidermis: a model for the study of cell-cellinteractions in the development of mucociliary disease. Dis Model Mech [Internet]. 2011[cited2019Jul3];4:179–92.Availablefrom:http://dmm.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dmm.006494

19. Giepmans BNG, van IJzendoorn SCD. Epithelial cell–cell junctions and plasma membrane domains. Biochim Biophys Acta - Biomembr [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 5];1788:820–31. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18706883

20. Pardo-Saganta A, Law BM, Gonzalez-Celeiro M, Vinarsky V, Rajagopal J. Ciliated cells of pseudostratified airway epithelium do not become mucous cells after ovalbumin challenge. Am J Respir Cell Mol Biol [Internet]. 2013 [cited 2019 Jul 5];48:364–73. Available from: http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2012-0146OC

21. Sachs LA, Finkbeiner WE, Widdicombe JH. Effects of media on differentiation of cultured
human tracheal epithelium. In Vitro Cell Dev Biol Anim [Internet]. 2003 [cited 2019 Jul
3];39:56–62. Available from: http://link.springer.com/10.1290/1543-
706X(2003)039%3C0056:EOMODO%3E2.0.CO;2

22. Norden C. Pseudostratified epithelia - cell biology, diversity and roles in organ formation at a glance. J Cell Sci [Internet]. Company of Biologists Ltd; 2017 [cited 2020 Mar 26];130:1859–63. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28455413

23. Mori M, Mahoney JE, Stupnikov MR, Paez-Cortez JR, Szymaniak AD, Varelas X, et al. Notch3-Jagged signaling controls the pool of undifferentiated airway progenitors. Development [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 5];142:258–67. Available from: http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.116855

24. Hackett NR, Shaykhiev R, Walters MS, Wang R, Zwick RK, Ferris B, et al. The HumanAirway Epithelial Basal Cell Transcriptome. Koenigshoff M, editor. PLoS One [Internet]. 2011[cited2019Jul3];6:e18378.Availablefrom:https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0018378

25. Branchfield K, Nantie L, Verheyden JM, Sui P, Wienhold MD, Sun X. Pulmonary neuroendocrine cells function as airway sensors to control lung immune response. Science [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 3];351:707–10. Available from:

http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.aad7969

26. Montoro DT, Haber AL, Biton M, Vinarsky V, Lin B, Birket SE, et al. A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. Nature [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 3];560:319–24. Available from: http://www.nature.com/articles/s41586-018-0393-7

27. Reid L, Meyrick B, Antony VB, Chang L-Y, Crapo JD, Reynolds HY. The mysterious pulmonary brush cell: a cell in search of a function. Am J Respir Crit Care Med [Internet]. 2005 [cited 2019 Jul 3];172:136–9. Available from: http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200502-203WS

28. Ruiz García S, Deprez M, Lebrigand K, Cavard A, Paquet A, Arguel M-J, et al. Novel dynamics of human mucociliary differentiation revealed by single-cell RNA sequencing of nasal epithelial cultures. Development. 2019;146.

29. Deprez M, Zaragosi L-E, Truchi M, Garcia SR, Arguel M-J, Lebrigand K, et al. A single-cell atlas of the human healthy airways. bioRxiv. 2019;

30. Zaragosi LE, Deprez M, Barbry P. Using single-cell RNA sequencing to unravel cell lineagerelationships in the respiratory tract. Biochem Soc Trans [Internet]. NLM (Medline); 2020[cited2020Mar31];48:327–36.http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31922198

31. Evans MJ, Cox RA, Shami SG, Wilson B, Plopper CG. The Role of Basal Cells in Attachment
of Columnar Cells to the Basal Lamina of the Trachea. Am J Respir Cell Mol Biol [Internet].1989[cited2019Jul3];1:463–70.Availablefrom:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2637758

32. Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. Am J Respir Crit Care Med [Internet]. 1998 [cited 2019 Jul 3];157:2000–6. Available from: http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm.157.6.9707011

33. Evans MJ, Van Winkle LS, Fanucchi M V, Plopper CG. Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium. Exp Lung Res [Internet]. [cited 2019 Jul 3];27:401–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11480582

34. Ghosh M, Ahmad S, Jian A, Li B, Smith RW, Helm KM, et al. Human tracheobronchial basal cells. Normal versus remodeling/repairing phenotypes in vivo and in vitro. Am J Respir Cell Mol Biol [Internet]. 2013 [cited 2019 Jul 3];49:1127–34. Available from: http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2013-0049OC

35. Pardo-Saganta A, Tata PR, Law BM, Saez B, Chow RD-W, Prabhu M, et al. Parent stem cells can serve as niches for their daughter cells. Nature [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 3];523:597–601. Available from: http://www.nature.com/articles/nature14553

36. Cole BB, Smith RW, Jenkins KM, Graham BB, Reynolds PR, Reynolds SD. Tracheal Basal cells: a facultative progenitor cell pool. Am J Pathol [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 3];177:362–76. Available from:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010600922

37. Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, et al. Basal cells as stem cells of
the mouse trachea and human airway epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2009
[cited 2019 Jul 3];106:12771–5. Available from:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19625615

38. Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. Basal Cells Are a MultipotentProgenitor Capable of Renewing the Bronchial Epithelium. Am J Pathol [Internet]. 2004[cited2019Jul3];164:577–88.Availablefrom:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14742263

39. Teixeira VH, Nadarajan P, Graham TA, Pipinikas CP, Brown JM, Falzon M, et al. Stochastic homeostasis in human airway epithelium is achieved by neutral competition of basal cell progenitors. Elife [Internet]. 2013 [cited 2019 Jul 3];2:e00966. Available from: https://elifesciences.org/articles/00966

40. Ghosh M, Brechbuhl HM, Smith RW, Li B, Hicks DA, Titchner T, et al. Context-dependent differentiation of multipotential keratin 14-expressing tracheal basal cells. Am J Respir Cell Mol Biol [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 3];45:403–10. Available from: http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2010-0283OC

41. Inayama Y, Hook GE, Brody AR, Cameron GS, Jetten AM, Gilmore LB, et al. The differentiation potential of tracheal basal cells. Lab Invest [Internet]. 1988 [cited 2019 Jul 3];58:706–17. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3379917

42. Hajj R, Baranek T, Le Naour R, Lesimple P, Puchelle E, Coraux C. Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transit-amplifying cell properties. Stem Cells [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul 3];25:139–48. Available from: http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2006-0288

43. Smirnova NF, Schamberger AC, Nayakanti S, Hatz R, Behr J, Eickelberg O. Detection and quantification of epithelial progenitor cell populations in human healthy and IPF lungs. Respir Res [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 3];17:83. Available from: http://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-016-0404-x

44. Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol [Internet]. 2004 [cited 2019 Jul 3];286:L643-9. Available from: http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.00155.2003

45. Zuo W, Zhang T, Wu DZ, Guan SP, Liew A-A, Yamamoto Y, et al. p63(+)Krt5(+) distal airway stem cells are essential for lung regeneration. Nature [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 3];517:616–20. Available from: http://www.nature.com/articles/nature13903

46. Daniely Y, Liao G, Dixon D, Linnoila RI, Lori A, Randell SH, et al. Critical role of p63 in the development of a normal esophageal and tracheobronchial epithelium. Am J Physiol Cell Physiol [Internet]. 2004 [cited 2019 Jul 3];287:C171-81. Available from: http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00226.2003

47. Watson JK, Rulands S, Wilkinson AC, Wuidart A, Ousset M, Van Keymeulen A, et al. Clonal Dynamics Reveal Two Distinct Populations of Basal Cells in Slow-Turnover Airway Epithelium. Cell Rep [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 3];12:90–101. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124715006099

48. Nakajima M, Kawanami O, Jin E, Ghazizadeh M, Honda M, Asano G, et al. Immunohistochemical and ultrastructural studies of basal cells, Clara cells and bronchiolar cuboidal cells in normal human airways. Pathol Int [Internet]. 1998 [cited 2019 Jul 3];48:944– 53. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9952338

49. Breeze RG, Wheeldon EB. The cells of the pulmonary airways. Am Rev Respir Dis [Internet]. 1977 [cited 2019 Jul 3];116:705–77. Available from: http://www.atsjournals.org/doi/10.1164/arrd.1977.116.4.705

50. Plopper CG, Halsebo JE, Berger WJ, Sonstegard KS, Nettesheim P. Distribution of nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cells in intra- and extrapulmonary airways of the rabbit. Exp Lung Res [Internet]. 1983 [cited 2019 Jul 3];5:79–98. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6628348

51. Cui Y-H, Wang Y-Y, Liu Z. Transdifferentiation of Clara cell 10-kDa protein secreting cells in experimental allergic rhinitis. Am J Rhinol Allergy [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 3];25:145–51. Available from: http://journals.sagepub.com/doi/10.2500/ajra.2011.25.3596

52. Hung C-H, Chen L-C, Zhang Z, Chowdhury B, Lee W-L, Plunkett B, et al. Regulation of TH2 responses by the pulmonary Clara cell secretory 10-kd protein. J Allergy Clin Immunol [Internet]. 2004 [cited 2019 Jul 3];114:664–70. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674904015167

53. Liu Y, Lu X, Yu H-J, Hua X-Y, Cui Y-H, Huang S-K, et al. The expression of osteopontin and its association with Clara cell 10 kDa protein in allergic rhinitis. Clin Exp Allergy [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 3];40:1632–41. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2222.2010.03549.x

54. Evans CM, Williams OW, Tuvim MJ, Nigam R, Mixides GP, Blackburn MR, et al. Mucin is produced by clara cells in the proximal airways of antigen-challenged mice. Am J Respir Cell Mol Biol [Internet]. 2004 [cited 2019 Jul 3];31:382–94. Available from: http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2004-00600C

55. Reynolds SD, Hong KU, Giangreco A, Mango GW, Guron C, Morimoto Y, et al. Conditional clara cell ablation reveals a self-renewing progenitor function of pulmonary neuroendocrine cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol [Internet]. 2000 [cited 2019 Jul 3];278:L1256-63. Available from: http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.2000.278.6.L1256

56. Reynolds SD, Reynolds PR, Pryhuber GS, Finder JD, Stripp BR. Secretoglobins SCGB3A1 and SCGB3A2 define secretory cell subsets in mouse and human airways. Am J Respir Crit Care Med [Internet]. 2002 [cited 2019 Jul 3];166:1498–509. Available from: http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200204-285OC

57. Brody AR, Hook GE, Cameron GS, Jetten AM, Butterick CJ, Nettesheim P. The differentiation capacity of Clara cells isolated from the lungs of rabbits. Lab Invest [Internet]. 1987 [cited 2019 Jul 3];57:219–29. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3613528

58. Chen G, Korfhagen TR, Xu Y, Kitzmiller J, Wert SE, Maeda Y, et al. SPDEF is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production. J Clin Invest [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 3];119:2914–24. Available from: http://www.jci.org/articles/view/39731

59. Tata PR, Mou H, Pardo-Saganta A, Zhao R, Prabhu M, Law BM, et al. Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo. Nature [Internet]. 2013 [cited 2019 Jul 3];503:218–23. Available from: http://www.nature.com/articles/nature12777

60. Johnson NF, Wilson JS, Habbersett R, Thomassen DG, Shopp GM, Smith DM. Separation and characterization of basal and secretory cells from the rat trachea by flow cytometry. Cytometry [Internet]. 1990 [cited 2019 Jul 3];11:395–405. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.990110310

61. Rogers DF. The airway goblet cell. Int J Biochem Cell Biol [Internet]. 2003 [cited 2019 Jul 3];35:1–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12467641

62. Rogers DF. Airway goblet cells: responsive and adaptable front-line defenders. Eur Respir J [Internet]. 1994 [cited 2019 Jul 3];7:1690–706. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7995400

63. Park J-A, Tschumperlin DJ. Chronic intermittent mechanical stress increases MUC5AC protein expression. Am J Respir Cell Mol Biol [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 3];41:459–66. Available from: http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2008-0195OC

64. Rajavelu P, Chen G, Xu Y, Kitzmiller JA, Korfhagen TR, Whitsett JA. Airway epithelial SPDEF integrates goblet cell differentiation and pulmonary Th2 inflammation. J Clin Invest [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 3];125:2021–31. Available from: http://www.jci.org/articles/view/79422

65. Nadel JA, Burgel PR. The role of epidermal growth factor in mucus production. Curr Opin Pharmacol [Internet]. 2001 [cited 2019 Jul 3];1:254–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11712748

66. Porchet N, Aubert J-P. MUC genes: mucin or not mucin? That is the question. médecine/sciences [Internet]. 2004 [cited 2019 Jul 3];20:569–74. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15190477

67. Okuda K, Chen G, Subramani DB, Wolf M, Gilmore RC, Kato T, et al. Localization of Secretory Mucins MUC5AC and MUC5B in Normal/Healthy Human Airways. Am J Respir Crit Care Med [Internet]. 2019 [cited 2019 Jul 3];199:715–27. Available from: https://www.atsjournals.org/doi/10.1164/rccm.201804-0734OC

68. Widdicombe JH, Wine JJ. Airway Gland Structure and Function. Physiol Rev [Internet].2015[cited 2019 Jul 1];95:1241–319.Availablefrom:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26336032

69. Jänicke M, Carney TJ, Hammerschmidt M. Foxi3 transcription factors and Notch signaling control the formation of skin ionocytes from epidermal precursors of the zebrafish embryo. Dev Biol [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul 5];307:258–71. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160607008676

70. Esaki M, Hoshijima K, Nakamura N, Munakata K, Tanaka M, Ookata K, et al. Mechanism of development of ionocytes rich in vacuolar-type H(+)-ATPase in the skin of zebrafish larvae. Dev Biol [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 3];329:116–29. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160609001596

71. Plasschaert LW, Žilionis R, Choo-Wing R, Savova V, Knehr J, Roma G, et al. A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. Nature. Nature Publishing Group; 2018. p. 377–81.

72. Ouadah Y, Rojas ER, Riordan DP, Capostagno S, Kuo CS, Krasnow MA. Rare Pulmonary Neuroendocrine Cells Are Stem Cells Regulated by Rb, p53, and Notch. Cell [Internet]. Cell Press; 2019 [cited 2020 Apr 16];179:403-416.e23. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31585080

73. Tata PR, Rajagopal J. Plasticity in the lung: making and breaking cell identity. Development [Internet]. 2017 [cited 2019 Jul 1];144:755–66. Available from: http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.143784

74. Guha A, Vasconcelos M, Cai Y, Yoneda M, Hinds A, Qian J, et al. Neuroepithelial body microenvironment is a niche for a distinct subset of Clara-like precursors in the developing airways. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 3];109:12592–7. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1204710109

75. Song H, Yao E, Lin C, Gacayan R, Chen M-H, Chuang P-T. Functional characterization of pulmonary neuroendocrine cells in lung development, injury, and tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 3];109:17531–6. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1207238109

76. Ernani V, Jahan R, Smith LM, Marr AS, Kimbrough SE, Kos ME, et al. A phase I study of weekly doxorubicin and oral topotecan for patients with relapsed or refractory small cell lung cancer (SCLC): A Fred and Pamela Buffet Cancer Center Clinical Trials Network study.

Cancer Treat Res Commun. Elsevier Ltd; 2020;22.

77. Gerbe F, Jay P. Intestinal tuft cells: Epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. Mucosal Immunol. Nature Publishing Group; 2016. p. 1353–9.

78. Gerbe F, Sidot E, Smyth DJ, Ohmoto M, Matsumoto I, Dardalhon V, et al. Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. Nature. Nature Publishing Group; 2016;529:226–30.

79. von Moltke J, Ji M, Liang H-E, Locksley RM. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. Nature [Internet]. Nature Publishing Group; 2016 [cited 2020 Mar 26];529:221–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26675736

80. WATSON JH, BRINKMAN GL. ELECTRON MICROSCOPY OF THE EPITHELIAL CELLS OF NORMAL AND BRONCHITIC HUMAN BRONCHUS. Am Rev Respir Dis [Internet]. 1964 [cited 2019 Jul 3];90:851–66. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14233790

81. Shebani E, Shahana S, Janson C, Roomans GM. Attachment of columnar airway epithelial cells in asthma. Tissue Cell [Internet]. Elsevier Ltd; 2005 [cited 2020 Mar 26];37:145–52. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15748741

82. Hansell MM, Moretti RL. Ultrastructure of the mouse tracheal epithelium. J Morphol [Internet]. 1969 [cited 2019 Jul 3];128:159–69. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/jmor.1051280203

83. Greenwood MF, Holland P. The mammalian respiratory tract surface. A scanning electron microscopic study. Lab Invest [Internet]. 1972 [cited 2019 Jul 3];27:296–304. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5057534

84. Toskala E, Smiley-Jewell SM, Wong VJ, King D, Plopper CG. Temporal and spatial distribution of ciliogenesis in the tracheobronchial airways of mice. Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol. NIH Public Access; 2005;289:L454.

85. Zahm JM, Pierrot D, Hinnrasky J, Fuchey C, Chevillard M, Gaillard D, et al. Functional activity of ciliated outgrowths from cultured human nasal and tracheal epithelia. Biorheology [Internet]. 1990 [cited 2019 Jul 3];27:559–65. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2261521

86. Mercer RR, Russell ML, Roggli VL, Crapo JD. Cell number and distribution in human and rat airways. Am J Respir Cell Mol Biol [Internet]. 1994 [cited 2019 Jul 3];10:613–24. Available from: http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/ajrcmb.10.6.8003339

87. Baldwin F. Basal cells in human bronchial epithelium. Anat Rec [Internet]. 1994 [cited 2020 Mar 28];238:360–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8179217

88. Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FBJM. Number and proliferation of Clara cells in normal human airway epithelium. Am J Respir Crit Care Med. American Lung Association; 1999;159:1585–91.

89. Arguel M-J, LeBrigand K, Paquet A, Ruiz García S, Zaragosi L-E, Barbry P, et al. A cost effective 5' selective single cell transcriptome profiling approach with improved UMI design. Nucleic Acids Res [Internet]. 2017 [cited 2020 Apr 16];45:e48. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27940562

90. Lebrigand K, Magnone V, Barbry P, Waldmann R. High throughput, error corrected Nanopore single cell transcriptome sequencing. bioRxiv [Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory; 2019 [cited 2020 Apr 16];831495. Available from: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/831495v1

91. Tsuda A, Henry FS, Butler JP. Particle transport and deposition: Basic physics of particle

kinetics. Compr Physiol. NIH Public Access; 2013;3:1437–71.

92. Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, McElwee MM, Evans SE, Boerner RM, et al. Muc5b is required for airway defence. Nature [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 5];505:412–6. Available from: http://www.nature.com/articles/nature12807

93. Wine JJ. Submucosal Glands and Airway Defense. Proc Am Thorac Soc [Internet]. 2004[cited2019Jul5];1:47–53.Availablefrom:http://pats.atsjournals.org/cgi/doi/10.1513/pats.2306015

94. Sears PR, Davis CW, Chua M, Sheehan JK. Mucociliary interactions and mucus dynamics in ciliated human bronchial epithelial cell cultures. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 3];301:L181-6. Available from: http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.00321.2010

95. Kesimer M, Ehre C, Burns KA, Davis CW, Sheehan JK, Pickles RJ. Molecular organization of the mucins and glycocalyx underlying mucus transport over mucosal surfaces of the airways. Mucosal Immunol [Internet]. 2013 [cited 2019 Jul 3];6:379–92. Available from: http://www.nature.com/articles/mi201281

96. Hattrup CL, Gendler SJ. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. Annu Rev Physiol [Internet]. 2008 [cited 2019 Jul 3];70:431–57. Available from: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100659

97. Button B, Cai L-H, Ehre C, Kesimer M, Hill DB, Sheehan JK, et al. A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. Science [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 3];337:937–41. Available from: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1223012

98. Tarran R. Regulation of Airway Surface Liquid Volume and Mucus Transport by Active Ion Transport. Proc Am Thorac Soc [Internet]. 2004 [cited 2019 Jul 5];1:42–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16113411

99. Elgeti J, Gompper G. Emergence of metachronal waves in cilia arrays. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2013 [cited 2019 Jul 5];110:4470–5. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1218869110

100. Gueron S, Levit-Gurevich K, Liron N, Blum JJ. Cilia internal mechanism and metachronal
coordination as the result of hydrodynamical coupling. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet].1997[cited2019Jul5];94:6001–6.Availablefrom:http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.94.12.6001

101. Brooks ER, Wallingford JB. Multiciliated Cells. Curr Biol [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 3];24:R973–82. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25291643

102. Gómez MI, Prince A. Airway epithelial cell signaling in response to bacterial pathogens. Pediatr Pulmonol [Internet]. 2008 [cited 2019 Jul 5];43:11–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18041080

103. Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, Schleimer RP. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. Am J Respir Cell Mol Biol [Internet]. 2004 [cited 2019 Jul 5];31:358–64. Available from: http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2003-03880C

104. Marcet B, Horckmans M, Libert F, Hassid S, Boeynaems J-M, Communi D. Extracellular nucleotides regulate CCL20 release from human primary airway epithelial cells, monocytes and monocyte-derived dendritic cells. J Cell Physiol [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul 5];211:716–27. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.20979
105. Tokita E, Tanabe T, Asano K, Suzaki H, Rubin BK. Club cell 10-kDa protein attenuatesairway mucus hypersecretion and inflammation. Eur Respir J [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul5];44:1002–10.Availablefrom:

http://erj.ersjournals.com/lookup/doi/10.1183/09031936.00080913

106. Wijkstrom-Frei C, El-Chemaly S, Ali-Rachedi R, Gerson C, Cobas MA, Forteza R, et al.Lactoperoxidase and Human Airway Host Defense. Am J Respir Cell Mol Biol [Internet]. 2003[cited2019Jul5];29:206–12.Availablefrom:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626341

107. Gerson C, Sabater J, Scuri M, Torbati A, Coffey R, Abraham JW, et al. The lactoperoxidase system functions in bacterial clearance of airways. Am J Respir Cell Mol Biol [Internet]. 2000 [cited 2019 Jul 5];22:665–71. Available from: http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/ajrcmb.22.6.3980

108. Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin--a multifunctional protein with antimicrobial properties. Mol Immunol [Internet]. 2003 [cited 2019 Jul 5];40:395–405. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14568385

109. Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, Heinzel-Wieland R, Steffens GJ, Dijkman JH. Antibacterial activity of antileukoprotease. Infect Immun [Internet]. 1996 [cited 2019 Jul 5];64:4520–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8890201

110. Konstan MW, Cheng PW, Boat TF. A comparative study of lysozyme and its secretion by tracheal epithelium. Exp Lung Res [Internet]. 1982 [cited 2019 Jul 5];3:175–81. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7106064

111. Martin E, Ganz T, Lehrer RI. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. J Leukoc Biol [Internet]. 1995 [cited 2019 Jul 5];58:128–36. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/jlb.58.2.128

112. Gattas MV, Forteza R, Fragoso MA, Fregien N, Salas P, Salathe M, et al. Oxidative epithelial host defense is regulated by infectious and inflammatory stimuli. Free Radic Biol Med [Internet]. 2009 [cited 2020 Mar 26];47:1450–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19703552

113. Farquhar MG, PALADE GE. JUNCTIONAL COMPLEXES IN VARIOUS EPITHELIA. J Cell Biol [Internet]. 1963 [cited 2019 Jul 5];17:375–412. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13944428

114. Stehbens SJ, Paterson AD, Crampton MS, Shewan AM, Ferguson C, Akhmanova A, et al. Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. J Cell Sci [Internet]. 2006 [cited 2019 Jul 5];119:1801–11. Available from: http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.02903

115. Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. J Biol Chem [Internet]. 1998 [cited 2019 Jul 5];273:29745–53. Available from: http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.273.45.29745

116. Green KJ, Jones JC. Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. FASEB J. FASEB; 1996;10:871–81.

117. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Connexins, Connexons, and Intercellular Communication. Annu Rev Biochem [Internet]. 1996 [cited 2019 Jul 5];65:475–502. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8811187

118. Debec A, Sullivan W, Bettencourt-Dias M. Centrioles: active players or passengers during mitosis? Cell Mol Life Sci [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 3];67:2173–94. Available

from: http://link.springer.com/10.1007/s00018-010-0323-9

119. Guichard P, Chrétien D, Marco S, Tassin A-M. Procentriole assembly revealed by cryoelectron tomography. EMBO J [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 3];29:1565–72. Available from: http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2010.45

120. Keller LC, Geimer S, Romijn E, Yates J, Zamora I, Marshall WF. Molecular architecture of the centriole proteome: the conserved WD40 domain protein POC1 is required for centriole duplication and length control. Doxsey S, editor. Mol Biol Cell [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 3];20:1150–66. Available from: http://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e08-06-0619

121. Hiraki M, Nakazawa Y, Kamiya R, Hirono M. Bld10p constitutes the cartwheel-spoke tip and stabilizes the 9-fold symmetry of the centriole. Curr Biol [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul 3];17:1778–83. Available from:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096098220701980X

122. Pelletier L, O'Toole E, Schwager A, Hyman AA, Müller-Reichert T. Centriole assembly in Caenorhabditis elegans. Nature [Internet]. 2006 [cited 2019 Jul 3];444:619–23. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17136092

123. Wang K, Chen X, Guo CY, Liu FQ, Wang JR, Sun LF. [Cilia ultrastructural and gene variation of primary ciliary dyskinesia: report of three cases and literatures review]. Zhonghua er ke za zhi = Chinese J Pediatr [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 5];56:134–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29429202

124. Ke YN, Yang WX. Primary cilium: An elaborate structure that blocks cell division? Gene. Elsevier; 2014. p. 175–85.

125. Paintrand M, Moudjou M, Delacroix H, Bornens M. Centrosome organization and centriole architecture: their sensitivity to divalent cations. J Struct Biol [Internet]. [cited 2019 Jul 3];108:107–28. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1486002

126. Loncarek J, Bettencourt-Dias M. Building the right centriole for each cell type. J Cell Biol [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 3];217:823–35. Available from: http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201704093

127. Nakazawa Y, Hiraki M, Kamiya R, Hirono M. SAS-6 is a Cartwheel Protein that Establishes the 9-Fold Symmetry of the Centriole. Curr Biol [Internet]. 2007 [cited 2020 Mar 26];17:2169–74. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18082404

128. Ishikawa H, Kubo A, Tsukita S, Tsukita S. Odf2-deficient mother centrioles lack distal/subdistal appendages and the ability to generate primary cilia. Nat Cell Biol [Internet]. 2005 [cited 2019 Jul 1];7:517–24. Available from: http://www.nature.com/articles/ncb1251

129. Yang J, Liu X, Yue G, Adamian M, Bulgakov O, Li T. Rootletin, a novel coiled-coil protein, is a structural component of the ciliary rootlet. J Cell Biol [Internet]. 2002 [cited 2019 Jul 3];159:431–40. Available from: http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.200207153

130. Azimzadeh J, Hergert P, Delouvée A, Euteneuer U, Formstecher E, Khodjakov A, et al. hPOC5 is a centrin-binding protein required for assembly of full-length centrioles. J Cell Biol [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 3];185:101–14. Available from: http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.200808082

131. Tsou M-FB, Stearns T. Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle. Nature [Internet]. 2006 [cited 2019 Jul 3];442:947–51. Available from: http://www.nature.com/articles/nature04985

132. Tsang WY, Dynlacht BD. CP110 and its network of partners coordinately regulate cilia assembly. Cilia [Internet]. 2013 [cited 2019 Jul 5];2:9. Available from:

https://ciliajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2046-2530-2-9

133. Singla V, Romaguera-Ros M, Garcia-Verdugo JM, Reiter JF. Ofd1, a human disease gene,regulates the length and distal structure of centrioles. Dev Cell [Internet]. 2010 [cited 2019Jul3];18:410–24.Availablefrom:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580710000511

134. Pedersen LB, Schrøder JM, Satir P, Christensen ST. The Ciliary Cytoskeleton. Compr Physiol [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2012 [cited 2019 Jul 5]. p. 779–803. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23728985

135. Tateishi K, Yamazaki Y, Nishida T, Watanabe S, Kunimoto K, Ishikawa H, et al. Two appendages homologous between basal bodies and centrioles are formed using distinct Odf2 domains. J Cell Biol [Internet]. 2013 [cited 2019 Jul 3];203:417–25. Available from: http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201303071

136. Schmidt TI, Kleylein-Sohn J, Westendorf J, Le Clech M, Lavoie SB, Stierhof Y-D, et al.Control of centriole length by CPAP and CP110. Curr Biol [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul5];19:1005–11.Availablefrom:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982209011166

137. Mennella V, Keszthelyi B, McDonald KL, Chhun B, Kan F, Rogers GC, et al. Subdiffractionresolution fluorescence microscopy reveals a domain of the centrosome critical for pericentriolar material organization. Nat Cell Biol [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 3];14:1159– 68. Available from: http://www.nature.com/articles/ncb2597

138. Kollman JM, Merdes A, Mourey L, Agard DA. Microtubule nucleation by γ-tubulin complexes. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 3];12:709–21. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21993292

139. Lawo S, Hasegan M, Gupta GD, Pelletier L. Subdiffraction imaging of centrosomes reveals higher-order organizational features of pericentriolar material. Nat Cell Biol [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 3];14:1148–58. Available from: http://www.nature.com/articles/ncb2591

140. Dammermann A, Merdes A. Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. J Cell Biol [Internet]. 2002 [cited 2019 Jul 3];159:255–66. Available from: http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.200204023

141. Vladar EK, Stearns T. Molecular characterization of centriole assembly in ciliated epithelial cells. J Cell Biol [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul 3];178:31–42. Available from: http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.200703064

142. Gupta GD, Coyaud É, Gonçalves J, Mojarad BA, Liu Y, Wu Q, et al. A Dynamic ProteinInteraction Landscape of the Human Centrosome-Cilium Interface. Cell [Internet]. 2015[cited2019Jul3];163:1484–99.Availablefrom:https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286741501421X

143. Nachury M V, Loktev A V, Zhang Q, Westlake CJ, Peränen J, Merdes A, et al. A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. Cell [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul 1];129:1201–13. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286740700534X

144. Prosser SL, Pelletier L. Centriolar satellite biogenesis and function in vertebrate cells [Internet]. J. Cell Sci. NLM (Medline); 2020 [cited 2020 Mar 29]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31896603

145. Anderson RG. The three-dimensional structure of the basal body from the rhesus monkey oviduct. J Cell Biol [Internet]. 1972 [cited 2019 Jul 3];54:246–65. Available from:

http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.54.2.246

146. Dawe HR, Farr H, Gull K. Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. J Cell Sci [Internet]. 2007 [cited 2020 Mar 26];120:7–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17182899

147. Kunimoto K, Yamazaki Y, Nishida T, Shinohara K, Ishikawa H, Hasegawa T, et al. Coordinated Ciliary Beating Requires Odf2-Mediated Polarization of Basal Bodies via Basal Feet. Cell [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 3];148:189–200. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411013663

148. Fort C, Bastin P. Élongation de l'axonème et dynamique du transport intraflagellaire. médecine/sciences [Internet]. 2014 [cited 2019 Jun 30];30:955–61. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25388576

149. Yang J, Gao J, Adamian M, Wen X-H, Pawlyk B, Zhang L, et al. The ciliary rootlet maintains long-term stability of sensory cilia. Mol Cell Biol [Internet]. 2005 [cited 2019 Jul 3];25:4129–37. Available from: http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.25.10.4129-4137.2005

150. Wang W-J, Tay HG, Soni R, Perumal GS, Goll MG, Macaluso FP, et al. CEP162 is an axoneme-recognition protein promoting ciliary transition zone assembly at the cilia base. Nat Cell Biol [Internet]. 2013 [cited 2019 Jul 1];15:591–601. Available from: http://www.nature.com/articles/ncb2739

151. Czarnecki PG, Shah J V. The ciliary transition zone: from morphology and molecules to medicine. Trends Cell Biol [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 1];22:201–10. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892412000165

152. Gonçalves J, Pelletier L. The Ciliary Transition Zone: Finding the Pieces and Assembling the Gate. Mol Cells [Internet]. 2017 [cited 2019 Jul 1];40:243–53. Available from: http://www.molcells.org/journal/view.html?doi=10.14348/molcells.2017.0054

153. Li C, Jensen VL, Park K, Kennedy J, Garcia-Gonzalo FR, Romani M, et al. MKS5 and CEP290 Dependent Assembly Pathway of the Ciliary Transition Zone. Basto R, editor. PLoS Biol [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 1];14:e1002416. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1002416

154. Garcia-Gonzalo FR, Corbit KC, Sirerol-Piquer MS, Ramaswami G, Otto EA, Noriega TR, et al. A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. Nat Genet [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 1];43:776–84. Available from: http://www.nature.com/articles/ng.891

155. Williams CL, Li C, Kida K, Inglis PN, Mohan S, Semenec L, et al. MKS and NPHP modules cooperate to establish basal body/transition zone membrane associations and ciliary gate function during ciliogenesis. J Cell Biol [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 1];192:1023–41. Available from: http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201012116

156. Czarnecki PG, Shah J V. The ciliary transition zone: From morphology and molecules to medicine. Trends Cell Biol. 2012. p. 201–10.

157. Betleja E, Cole DG. Ciliary trafficking: CEP290 guards a gated community. Curr Biol[Internet].2010[cited2019Jul1];20:R928-31.Availablefrom:https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982210012157

158. Chih B, Liu P, Chinn Y, Chalouni C, Komuves LG, Hass PE, et al. A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain. Nat Cell Biol [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 1];14:61–72. Available from: http://www.nature.com/articles/ncb2410

159. Hu Q, Milenkovic L, Jin H, Scott MP, Nachury M V, Spiliotis ET, et al. A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. Science [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 1];329:436–9. Available from: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1191054

160. Molla-Herman A, Ghossoub R, Blisnick T, Meunier A, Serres C, Silbermann F, et al. The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. J Cell Sci [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 3];123:1785–95. Available from: http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.059519

161. Wloga D, Webster DM, Rogowski K, Bré M-H, Levilliers N, Jerka-Dziadosz M, et al. TTLL3Is a tubulin glycine ligase that regulates the assembly of cilia. Dev Cell [Internet]. 2009 [cited2019Jul3];16:867–76.Availablehttps://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580709001701

162. Satir P, Christensen ST. Overview of structure and function of mammalian cilia. Annu Rev Physiol [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul 3];69:377–400. Available from: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236

163. Jenkins PM, McEwen DP, Martens JR. Olfactory cilia: linking sensory cilia function and human disease. Chem Senses [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 1];34:451–64. Available from: https://academic.oup.com/chemse/article-lookup/doi/10.1093/chemse/bjp020

164. Sun S, Fisher RL, Bowser SS, Pentecost BT, Sui H. Three-dimensional architecture of epithelial primary cilia. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. National Academy of Sciences; 2019 [cited 2020 Mar 26];116:9370–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31004057

165. Lindemann CB, Lesich KA. Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible. J Cell Sci [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 5];123:519–28. Available from: http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.051326

166. Ishikawa T. Axoneme structure from motile cilia. Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2017 [cited 2020 Mar 26];9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27601632

167. Yuan S, Zhao L, Brueckner M, Sun Z. Intraciliary calcium oscillations initiate vertebrate left-right asymmetry. Curr Biol [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 1];25:556–67. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982214016546

168. Hirokawa N, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S. Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. Cell [Internet]. 2006 [cited 2019 Jul 1];125:33–45. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286740600300X

169. Hamada H, Meno C, Watanabe D, Saijoh Y. Establishment of vertebrate left-right asymmetry. Nat Rev Genet [Internet]. 2002 [cited 2019 Jul 1];3:103–13. Available from: http://www.nature.com/articles/nrg732

170. Yoshiba S, Shiratori H, Kuo IY, Kawasumi A, Shinohara K, Nonaka S, et al. Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2. Science [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 1];338:226–31. Available from: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1222538

171. McGrath J, Somlo S, Makova S, Tian X, Brueckner M. Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. Cell [Internet]. 2003 [cited 2019 Jul 1];114:61–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12859898

172. Nakamura T, Gold GH. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. Nature [Internet]. 1987 [cited 2019 Jul 5];325:442–4. Available from: http://www.nature.com/articles/325442a0

173. Schwander M, Kachar B, Müller U. The cell biology of hearing [Internet]. J. Cell Biol.2010[cited2020Mar26].p.9–20.Availablefrom:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20624897

174. McGrath J, Roy P, Perrin BJ. Stereocilia morphogenesis and maintenance through regulation of actin stability. Semin. Cell Dev. Biol. Academic Press; 2017. p. 88–95.

175. Hsiao Y-C, Tong ZJ, Westfall JE, Ault JG, Page-McCaw PS, Ferland RJ. Ahi1, whose human ortholog is mutated in Joubert syndrome, is required for Rab8a localization, ciliogenesis and vesicle trafficking. Hum Mol Genet [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 1];18:3926–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19625297

176. Engel BD, Ludington WB, Marshall WF. Intraflagellar transport particle size scales inversely with flagellar length: revisiting the balance-point length control model. J Cell Biol [Internet]. 2009 [cited 2019 Jun 30];187:81–9. Available from: http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.200812084

177. Wren KN, Craft JM, Tritschler D, Schauer A, Patel DK, Smith EF, et al. A differential
cargo-loading model of ciliary length regulation by IFT. Curr Biol [Internet]. 2013 [cited 2019
Jun 30];23:2463–71. Available from:
https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982213013195

178. Fort C, Bonnefoy S, Kohl L, Bastin P. Intraflagellar transport is required for the maintenance of the trypanosome flagellum composition but not its length. J Cell Sci [Internet]. 2016 [cited 2019 Jun 30];129:3026–41. Available from: http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.188227

179. Bertiaux E, Mallet A, Fort C, Blisnick T, Bonnefoy S, Jung J, et al. Bidirectional intraflagellar transport is restricted to two sets of microtubule doublets in the trypanosome flagellum. J Cell Biol [Internet]. 2018 [cited 2019 Jun 30];217:4284–97. Available from: http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201805030

180. Cole DG, Diener DR, Himelblau AL, Beech PL, Fuster JC, Rosenbaum JL. Chlamydomonas kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in Caenorhabditis elegans sensory neurons. J Cell Biol [Internet]. 1998 [cited 2019 Jun 30];141:993–1008. Available from: http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.141.4.993

181. Bhogaraju S, Cajanek L, Fort C, Blisnick T, Weber K, Taschner M, et al. Molecular basis of
tubulin transport within the cilium by IFT74 and IFT81. Science [Internet]. 2013 [cited 2019
Jun 30];341:1009–12.AvailableJun30];341:1009–12.Available

http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1240985

182. Soares H, Carmona B, Nolasco S, Viseu Melo L, Gonçalves J. Cilia Distal Domain: Diversity in Evolutionarily Conserved Structures. Cells [Internet]. MDPI AG; 2019 [cited 2020 Mar 30];8:160. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30769894

183. Singla V, Reiter JF. The Primary Cilium as the Cell's Antenna: Signaling at a Sensory Organelle. Science (80-) [Internet]. 2006 [cited 2019 Jul 1];313:629–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16888132

184. Choksi SP, Lauter G, Swoboda P, Roy S. Switching on cilia: transcriptional networks regulating ciliogenesis. Development [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 3];141:1427–41. Available from: http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.074666

185. Rawlins EL, Hogan BLM. Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? Development [Internet]. 2006 [cited 2019 Jul 3];133:2455–65. Available from:

http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.02407

186. Coraux C, Hajj R, Lesimple P, Puchelle E. Réparation et régénération de l'épithélium respiratoire. médecine/sciences [Internet]. 2005 [cited 2019 Jul 1];21:1063–9. Available from: http://www.medecinesciences.org/10.1051/medsci/200521121063

187. Park J-A, Fredberg JJ. Cell Jamming in the Airway Epithelium. Ann Am Thorac Soc [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 5];13 Suppl 1:S64-7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27027955

188. Pardo-Saganta A, Law BM, Tata PR, Villoria J, Saez B, Mou H, et al. Injury induces direct lineage segregation of functionally distinct airway basal stem/progenitor cell subpopulations. Cell Stem Cell [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 3];16:184–97. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S193459091500003X

189. Malicki J, Avanesov A, Li J, Yuan S, Sun Z. Analysis of Cilia Structure and Function in Zebrafish. Methods Cell Biol [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 3]. p. 39–74. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21550439

190. Nasevicius A, Ekker SC. Effective targeted gene "knockdown" in zebrafish. Nat Genet[Internet].2000[cited2019Jul3];26:216–20.Availablefrom:http://www.nature.com/articles/ng1000_216

191. Eisen JS, Smith JC. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. Development [Internet]. 2008 [cited 2019 Jul 3];135:1735–43. Available from: http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.001115

192. Ye C, Chen Z, Liu Z, Wang F, He X. Defining endogenous barcoding sites for CRISPR/Cas9based cell lineage tracing in zebrafish. J Genet Genomics. Institute of Genetics and Developmental Biology; 2020;

193. Song Z, Zhang X, Jia S, Yelick PC, Zhao C. Zebrafish as a Model for Human Ciliopathies [Internet]. J. Genet. Genomics. Institute of Genetics and Developmental Biology; 2016 [cited 2020 Mar 29]. p. 107–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27020031

194. Kramer-Zucker AG, Olale F, Haycraft CJ, Yoder BK, Schier AF, Drummond IA. Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. Development [Internet]. 2005 [cited 2019 Jul 3];132:1907–21. Available from: http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.01772

195. Meunier A, Azimzadeh J. Multiciliated Cells in Animals. Cold Spring Harb Perspect Biol[Internet].2016[cited2019Jul3];8:a028233.Availablehttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27580630

196. Marcet B, Chevalier B, Luxardi G, Coraux C, Zaragosi L-E, Cibois M, et al. Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. Nat Cell Biol [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 1];13:693–9. Available from: http://www.nature.com/articles/ncb2241

197. Revinski DR, Zaragosi L-E, Boutin C, Ruiz-Garcia S, Deprez M, Thomé V, et al. CDC20B is required for deuterosome-mediated centriole production in multiciliated cells. Nat Commun [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 5];9:4668. Available from: http://www.nature.com/articles/s41467-018-06768-z

198. Whitcutt MJ, Adler KB, Wu R. A biphasic chamber system for maintaining polarity of differentiation of culture respiratory tract epithelial cells. Vitr Cell Dev Biol. Springer-Verlag; 1988;24:420–8.

199. Wu R, Nolan E, Turner C. Expression of tracheal differentiated functions in serum-free

hormone-supplemented medium. J Cell Physiol [Internet]. 1985 [cited 2020 Mar 26];125:167–81. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4055904

200. Wu R, Yankaskas J, Cheng E, Knowles MR, Boucher R. Growth and differentiation of human nasal epithelial cells in culture. Serum-free, hormone-supplemented medium and proteoglycan synthesis. Am Rev Respir Dis [Internet]. 1985 [cited 2020 Mar 26];132:311–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3896079

201. Gruenert DC, Finkbeiner WE, Widdicombe JH. Culture and transformation of human airway epithelial cells. Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. 1995.

202. Martin WR, Brown C, Zhang YJ, Wu R. Growth and differentiation of primary tracheal
epithelial cells in culture: regulation by extracellular calcium. J Cell Physiol [Internet]. 1991
[cited 2019 Jul 3];147:138–48. Available from:
http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.1041470118

203. Brewington JJ, Filbrandt ET, LaRosa FJ, Moncivaiz JD, Ostmann AJ, Strecker LM, et al. Brushed nasal epithelial cells are a surrogate for bronchial epithelial CFTR studies. JCI insight [Internet]. NLM (Medline); 2018 [cited 2020 Apr 14];3. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29997283

204. Chung KF, Adcock I, Wu R. Culture of Normal Human Airway Epithelial Cells and Measurement of Mucin Synthesis and Secretion. Asthma. Humana Press; 2003. p. 31–9.

205. Al Jord A, Lemaître A-I, Delgehyr N, Faucourt M, Spassky N, Meunier A. Centriole amplification by mother and daughter centrioles differs in multiciliated cells. Nature [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 3];516:104–7. Available from: http://www.nature.com/articles/nature13770

206. Mercey O, Al Jord A, Rostaing P, Mahuzier A, Fortoul A, Boudjema AR, et al. Dynamics of centriole amplification in centrosome-depleted brain multiciliated progenitors. Sci Rep [Internet]. Nature Publishing Group; 2019 [cited 2020 Mar 26];9:13060. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31506528

207. Mercey O, Levine MS, LoMastro GM, Rostaing P, Brotslaw E, Gomez V, et al. Massive centriole production can occur in the absence of deuterosomes in multiciliated cells. Nat Cell Biol. Nature Research; 2019;21:1544–52.

208. Dye BR, Hill DR, Ferguson MA, Tsai YH, Nagy MS, Dyal R, et al. In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. Elife. eLife Sciences Publications Ltd; 2015;2015:1–25.

209. Hild M, Jaffe AB. Production of 3-D Airway Organoids From Primary Human Airway Basal Cells and Their Use in High-Throughput Screening. Curr Protoc Stem Cell Biol [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2016 [cited 2019 Jul 3];37:IE.9.1-IE.9.15. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/cpsc.1

210. Dye BR, Dedhia PH, Miller AJ, Nagy MS, White ES, Shea LD, et al. A bioengineered niche promotes in vivo engraftment and maturation of pluripotent stem cell derived human lung organoids. Elife. eLife Sciences Publications Ltd; 2016;5.

211. Dye BR, Youngblood RL, Oakes RS, Kasputis T, Clough DW, Spence JR, et al. Human lung organoids develop into adult airway-like structures directed by physico-chemical biomaterial properties. Biomaterials [Internet]. Elsevier Ltd; 2020 [cited 2020 Mar 31];234:119757. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31951973

212. Picollet-D'hahan N, Dolega ME, Liguori L, Marquette C, Le Gac S, Gidrol X, et al. A 3D Toolbox to Enhance Physiological Relevance of Human Tissue Models [Internet]. Trends Biotechnol. Elsevier Ltd; 2016 [cited 2020 Apr 15]. p. 757–69. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27497676

213. McDowell EM, Becci PJ, Schürch W, Trump BF. The respiratory epithelium. VII. Epidermoid metaplasia of hamster tracheal epithelium during regeneration following mechanical injury. J Natl Cancer Inst [Internet]. 1979 [cited 2020 Mar 31];62:995–1008. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/285300

214. Delplanque A, Coraux C, Tirouvanziam R, Khazaal I, Puchelle E, Ambros P, et al. Epithelial stem cell-mediated development of the human respiratory mucosa in SCID mice. J Cell Sci. 2000;113:767–78.

215. Arason AJ, Jonsdottir HR, Halldorsson S, Benediktsdottir BE, Bergthorsson JT, Ingthorsson S, et al. deltaNp63 has a role in maintaining epithelial integrity in airway epithelium. PLoS One [Internet]. Public Library of Science; 2014 [cited 2020 Mar 27];9:e88683. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24533135

216. Warner SMB, Hackett T-L, Shaheen F, Hallstrand TS, Kicic A, Stick SM, et al. Transcription factor p63 regulates key genes and wound repair in human airway epithelial basal cells. Am J Respir Cell Mol Biol [Internet]. 2013 [cited 2020 Mar 27];49:978–88. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23837456

217. Vladar EK, Bayly RD, Sangoram AM, Scott MP, Axelrod JD. Microtubules enable the planar cell polarity of airway cilia. Curr Biol [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 3];22:2203–12. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982212011487

218. Vladar EK, Lee YL, Stearns T, Axelrod JD. Observing planar cell polarity in multiciliated mouse airway epithelial cells. Methods Cell Biol. Academic Press Inc.; 2015;127:37–54.

219. Vladar EK, Nayak J V, Milla CE, Axelrod JD. Airway epithelial homeostasis and planar cell polarity signaling depend on multiciliated cell differentiation. JCI insight [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 3];1. Available from: https://insight.jci.org/articles/view/88027

220. Rawlins EL, Okubo T, Xue Y, Brass DM, Auten RL, Hasegawa H, et al. The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium. Cell Stem Cell [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 3];4:525–34. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590909001568

221. Cui Y-H, Wang Y-Y, Liu Z. Transdifferentiation of Clara Cell 10-kDa Protein Secreting Cells in Experimental Allergic Rhinitis. Am J Rhinol Allergy [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 3];25:145–51. Available from: http://journals.sagepub.com/doi/10.2500/ajra.2011.25.3596

222. Kotton DN, Morrisey EE. Lung regeneration: Mechanisms, applications and emerging stem cell populations. Nat. Med. Nature Publishing Group; 2014. p. 822–32.

223. Park KS, Wells JM, Zorn AM, Wert SE, Laubach VE, Fernandez LG, et al. Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol [Internet]. 2006 [cited 2020 Mar 31];34:151–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16239640

224. Duan D, Sehgal A, Yao J, Engelhardt JF. Lef1 transcription factor expression defines airway progenitor cell targets for In utero gene therapy of submucosal gland in cystic fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol [Internet]. American Lung Association; 1998 [cited 2020 Mar 31];18:750–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9618379

225. Lynch TJ, Engelhardt JF. Progenitor cells in proximal airway epithelial development and regeneration. J Cell Biochem [Internet]. Wiley-Liss Inc.; 2014 [cited 2020 Mar 31];115:1637–45. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24818588

226. Hegab AE, Ha VL, Gilbert JL, Zhang KX, Malkoski SP, Chon AT, et al. Novel

stem/progenitor cell population from murine tracheal submucosal gland ducts with multipotent regenerative potential. Stem Cells [Internet]. 2011 [cited 2020 Mar 31];29:1283–93. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21710468

227. Hegab AE, Nickerson DW, Ha VL, Darmawan DO, Gomperts BN. Repair and regeneration of tracheal surface epithelium and submucosal glands in a mouse model of hypoxic-ischemic injury. Respirology. 2012;17:1101–13.

228. Marcet B, Chevalier B, Coraux C, Kodjabachian L, Barbry P. MicroRNA-based silencing ofDelta/Notch signaling promotes multiple cilia formation. Cell Cycle [Internet]. 2011 [cited2019Jul1];10:2858–64.Availablehttp://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.10.17.17011

229. Xia P, Liu Y, Chen J, Cheng Z. Cell Cycle Proteins as Key Regulators of Postmitotic Cell Death. Yale J Biol Med [Internet]. 2019 [cited 2020 Mar 26];92:641–50. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31866779

230. Fragkos M, Naim V. Rescue from replication stress during mitosis [Internet]. Cell Cycle. Taylor and Francis Inc.; 2017 [cited 2020 Mar 26]. p. 613–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28166452

231. Fliegauf M, Benzing T, Omran H. When cilia go bad: Cilia defects and ciliopathies. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. Nature Publishing Group; 2007. p. 880–93.

232. Pearson CG, Culver BP, Winey M. Centrioles Want to Move Out and Make Cilia [Internet]. Dev. Cell. 2007 [cited 2020 Mar 26]. p. 319–21. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17765674

233. Tang TK. Centriole biogenesis in multiciliated cells. Nat Cell Biol [Internet]. 2013 [cited 2019 Jul 3];15:1400–2. Available from: http://www.nature.com/articles/ncb2892

234. Klos Dehring DA, Vladar EK, Werner ME, Mitchell JW, Hwang P, Mitchell BJ.Deuterosome-mediated centriole biogenesis. Dev Cell [Internet]. 2013 [cited 2019 Jul3];27:103–12.Availablefrom:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S153458071300508X

235. Delattre M, Gönczy P. The arithmetic of centrosome biogenesis. J Cell Sci [Internet].2004[cited2019Jul3];117:1619–30.Availablefrom:http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.01128

236. Azimzadeh J, Wong ML, Downhour DM, Sánchez Alvarado A, Marshall WF. Centrosome loss in the evolution of planarians. Science [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 3];335:461–3. Available from: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1214457

237. Sonnen KF, Gabryjonczyk A-M, Anselm E, Stierhof Y-D, Nigg EA. Human Cep192 and
Cep152 cooperate in Plk4 recruitment and centriole duplication. J Cell Sci [Internet]. 2013
[cited 2019 Jul 5];126:3223–33. Available from:
http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.129502

238. Sonnen KF, Schermelleh L, Leonhardt H, Nigg EA. 3D-structured illumination microscopyprovides novel insight into architecture of human centrosomes. Biol Open [Internet]. 2012[cited2019Jul3];1:965–76.Availablefrom:http://bio.biologists.org/lookup/doi/10.1242/bio.20122337

239. Arquint C, Nigg EA. The PLK4-STIL-SAS-6 module at the core of centriole duplication. Biochem Soc Trans [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 3];44:1253–63. Available from: http://www.biochemsoctrans.org/cgi/doi/10.1042/BST20160116

240. Zhao H, Zhu L, Zhu Y, Cao J, Li S, Huang Q, et al. The Cep63 paralogue Deup1 enables

massive de novo centriole biogenesis for vertebrate multiciliogenesis. Nat Cell Biol [Internet]. 2013 [cited 2019 Jul 5];15:1434–44. Available from: http://www.nature.com/articles/ncb2880

241. Leidel S, Delattre M, Cerutti L, Baumer K, Gönczy P. SAS-6 defines a protein family required for centrosome duplication in C. elegans and in human cells. Nat Cell Biol [Internet]. 2005 [cited 2019 Jul 3];7:115–25. Available from: http://www.nature.com/articles/ncb1220

242. Arbi M, Pefani D-E, Taraviras S, Lygerou Z. Controlling centriole numbers: Geminin family members as master regulators of centriole amplification and multiciliogenesis. Chromosoma [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 3];127:151–74. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00412-017-0652-7

243. Kleylein-Sohn J, Westendorf J, Le Clech M, Habedanck R, Stierhof Y-D, Nigg EA. Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. Dev Cell [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul3];13:190–202.Availablefrom:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580707002638

244. Rodrigues-Martins A, Riparbelli M, Callaini G, Glover DM, Bettencourt-Dias M. Revisiting the role of the mother centriole in centriole biogenesis. Science [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul 3];316:1046–50. Available from: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1142950

245. Tang C-JC, Lin S-Y, Hsu W-B, Lin Y-N, Wu C-T, Lin Y-C, et al. The human microcephaly protein STIL interacts with CPAP and is required for procentriole formation. EMBO J [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 3];30:4790–804. Available from: http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2011.378

246. Arquint C, Sonnen KF, Stierhof Y-D, Nigg EA. Cell-cycle-regulated expression of STIL controls centriole number in human cells. J Cell Sci [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 3];125:1342–52. Available from: http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.099887

247. Vulprecht J, David A, Tibelius A, Castiel A, Konotop G, Liu F, et al. STIL is required for centriole duplication in human cells. J Cell Sci [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 3];125:1353–62. Available from: http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.104109

248. Ohta M, Ashikawa T, Nozaki Y, Kozuka-Hata H, Goto H, Inagaki M, et al. Direct interaction of Plk4 with STIL ensures formation of a single procentriole per parental centriole. Nat Commun [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 3];5:5267. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25342035

249. Kim S, Ma L, Shokhirev MN, Quigley I, Kintner C. Multicilin and activated E2f4 induce multiciliated cell differentiation in primary fibroblasts. Sci Rep. Nature Publishing Group; 2018;8.

250. Mori M, Hazan R, Danielian PS, Mahoney JE, Li H, Lu J, et al. Cytoplasmic E2f4 forms organizing centres for initiation of centriole amplification during multiciliogenesis. Nat Commun [Internet]. 2017 [cited 2019 Jul 3];8:15857. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28675157

251. Spassky N, Meunier A. The development and functions of multiciliated epithelia. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. 2017 [cited 2019 Jul 3];18:423–36. Available from: http://www.nature.com/articles/nrm.2017.21

252. Gegg M, Böttcher A, Burtscher I, Hasenoeder S, Van Campenhout C, Aichler M, et al. Flattop regulates basal body docking and positioning in mono- and multiciliated cells. Elife [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 3];3. Available from: https://elifesciences.org/articles/03842

253. Al Jord A, Shihavuddin A, Servignat d'Aout R, Faucourt M, Genovesio A, Karaiskou A, et

al. Calibrated mitotic oscillator drives motile ciliogenesis. Science [Internet]. 2017 [cited 2019Jul5];358:803–6.Availablefrom:

http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aan8311

254. Jord A Al, Spassky N, Meunier A. Amplification des centrioles - Quand le centriole fils du centrosome prend le contrôle. médecine/sciences. Éditions EDK, Groupe EDP Sciences; 2015;31:250–3.

255. Sorokin SP. Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. J Cell Sci [Internet]. 1968 [cited 2019 Jul 3];3:207–30. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5661997

256. Zhao H, Chen Q, Fang C, Huang Q, Zhou J, Yan X, et al. Parental centrioles are dispensable for deuterosome formation and function during basal body amplification. EMBO Rep [Internet]. EMBO; 2019 [cited 2020 Mar 31];20. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.15252/embr.201846735

257. Ito D, Zitouni S, Jana SC, Duarte P, Surkont J, Carvalho-Santos Z, et al. Pericentrinmediated SAS-6 recruitment promotes centriole assembly. Elife. eLife Sciences Publications Ltd; 2019;8.

258. Rayamajhi D, Roy S. Multiciliated Cells: Rise and Fall of the Deuterosomes [Internet]. Trends Cell Biol. Elsevier Ltd; 2020 [cited 2020 Mar 31]. p. 259–62. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32200804

259. Chevrier V, Piel M, Collomb N, Saoudi Y, Frank R, Paintrand M, et al. The Rho-associatedprotein kinase p160ROCK is required for centrosome positioning. J Cell Biol [Internet]. 2002[cited2020Mar26];157:807–17.http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12034773

260. Lemullois M, Boisvieux-Ulrich E, Laine MC, Chailley B, Sandoz D. Development and functions of the cytoskeleton during ciliogenesis in metazoa. Biol Cell [Internet]. 1988 [cited 2020 Mar 26];63:195–208. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2904829

261. Lemullois M, Klotz C, Sandoz D. Immunocytochemical localization of myosin during ciliogenesis of quail oviduct. Eur J Cell Biol. 1987;43:429–37.

262. Boisvieux-Ulrich E, Lainé MC, Sandoz D. Cytochalasin D inhibits basal body migration and ciliary elongation in quail oviduct epithelium. Cell Tissue Res [Internet]. 1990 [cited 2019 Jul 3];259:443–54. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2317839

263. Dawe HR, Adams M, Wheway G, Szymanska K, Logan C V, Noegel AA, et al. Nesprin-2 interacts with meckelin and mediates ciliogenesis via remodelling of the actin cytoskeleton. J Cell Sci [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 5];122:2716–26. Available from: http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.043794

264. Gouin E, Welch MD, Cossart P. Actin-based motility of intracellular pathogens [Internet]. Curr. Opin. Microbiol. Elsevier Ltd; 2005 [cited 2020 Mar 26]. p. 35–45. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15694855

265. Hong H, Kiim J, Kim J. Myosin heavy chain 10 (MYH10) is required for centriole migration during the biogenesis of primary cilia. Biochem Biophys Res Commun. Academic Press Inc.; 2015;461:180–5.

266. Ioannou A, Santama N, Skourides PA. Xenopus laevis nucleotide binding protein 1 (xNubp1) is important for convergent extension movements and controls ciliogenesis via regulation of the actin cytoskeleton. Dev Biol [Internet]. 2013 [cited 2019 Jul 5];380:243–58. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160613002479

267. Werner ME, Hwang P, Huisman F, Taborek P, Yu CC, Mitchell BJ. Actin and microtubulesdrive differential aspects of planar cell polarity in multiciliated cells. J Cell Biol [Internet].2011[cited2019Jul5];195:19–26.Availablehttp://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201106110

268. Herawati E, Taniguchi D, Kanoh H, Tateishi K, Ishihara S, Tsukita S. Multiciliated cell basal bodies align in stereotypical patterns coordinated by the apical cytoskeleton. J Cell Biol [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 3];214:571–86. Available from: http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201601023

269. Antoniades I, Stylianou P, Skourides PA. Making the connection: ciliary adhesioncomplexes anchor basal bodies to the actin cytoskeleton. Dev Cell [Internet]. 2014 [cited2019Jul3];28:70–80.Availablehttps://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580713007302

270. Guirao B, Meunier A, Mortaud S, Aguilar A, Corsi JM, Strehl L, et al. Coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity orients mammalian motile cilia. Nat Cell Biol [Internet]. Nature Publishing Group; 2010 [cited 2020 Mar 27];12:341–50. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20305650

271. Mitchell B, Jacobs R, Li J, Chien S, Kintner C. A positive feedback mechanism governs the polarity and motion of motile cilia. Nature [Internet]. Nature Publishing Group; 2007 [cited 2020 Mar 27];447:97–101. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17450123

272. Wallingford JB, Mitchell B. Strange as it may seem: The many links between Wnt signaling, planar cell polarity, and cilia. Genes Dev. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2011. p. 201–13.

273. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. Nature [Internet]. 1990 [cited 2019 Jul 5];348:125–32. Available from: http://www.nature.com/articles/348125a0

274. 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 [Internet]. 2008 [cited 2019 Jul 3];40:871–9. Available from: http://www.nature.com/articles/ng.104

275. Yasunaga T, Hoff S, Schell C, Helmstädter M, Kretz O, Kuechlin S, et al. The polarity protein Inturned links NPHP4 to Daam1 to control the subapical actin network in multiciliated cells. J Cell Biol [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 5];211:963–73. Available from: http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201502043

276. Miyatake K, Kusakabe M, Takahashi C, Nishida E. ERK7 regulates ciliogenesis by phosphorylating the actin regulator CapZIP in cooperation with Dishevelled. Nat Commun [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 5];6:6666. Available from: http://www.nature.com/articles/ncomms7666

277. Treat AC, Wheeler DS, Stolz DB, Tsang M, Friedman PA, Romero G. The PDZ Protein Na+/H+ Exchanger Regulatory Factor-1 (NHERF1) Regulates Planar Cell Polarity and Motile Cilia Organization. Nam S-C, editor. PLoS One [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 3];11:e0153144. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0153144

278. Shaw RJ, Henry M, Solomon F, Jacks T. RhoA-dependent phosphorylation and relocalization of ERM proteins into apical membrane/actin protrusions in fibroblasts. Mol Biol Cell [Internet]. 1998 [cited 2019 Jul 5];9:403–19. Available from: http://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.9.2.403

279. Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: integrators at the cell

cortex. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. 2002 [cited 2019 Jul 5];3:586–99. Available from: http://www.nature.com/articles/nrm882

280. Huang T, You Y, Spoor MS, Richer EJ, Kudva V V, Paige RC, et al. Foxj1 is required for apical localization of ezrin in airway epithelial cells. J Cell Sci [Internet]. 2003 [cited 2019 Jul 3];116:4935–45. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14625387

281. Gomperts BN, Gong-Cooper X, Hackett BP. Foxj1 regulates basal body anchoring to the cytoskeleton of ciliated pulmonary epithelial cells. J Cell Sci [Internet]. 2004 [cited 2019 Jul 3];117:1329–37. Available from: http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.00978

282. Park TJ, Haigo SL, Wallingford JB. Ciliogenesis defects in embryos lacking inturned or fuzzy function are associated with failure of planar cell polarity and Hedgehog signaling. Nat Genet [Internet]. 2006 [cited 2019 Jun 30];38:303–11. Available from: http://www.nature.com/articles/ng1753

283. Oishi I, Kawakami Y, Raya Á, Callol-Massot C, Belmonte JCI. Regulation of primary cilia formation and left-right patterning in zebrafish by a noncanonical Wnt signaling mediator, duboraya. Nat Genet [Internet]. 2006 [cited 2019 Jul 1];38:1316–22. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17013396

284. Pan J, You Y, Huang T, Brody SL. RhoA-mediated apical actin enrichment is required for ciliogenesis and promoted by Foxj1. J Cell Sci [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul 5];120:1868–76. Available from: http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.005306

285. Adams M, Simms RJ, Abdelhamed Z, Dawe HR, Szymanska K, Logan C V, et al. A meckelin-filamin A interaction mediates ciliogenesis. Hum Mol Genet [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 1];21:1272–86. Available from: https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/ddr557

286. Chevalier B, Adamiok A, Mercey O, Revinski DR, Zaragosi LE, Pasini A, et al. MiR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways. Nat Commun. Nature Publishing Group; 2015;6.

287. Mercey O, Kodjabachian L, Barbry P, Marcet B. MicroRNAs as key regulators of GTPasemediated apical actin reorganization in multiciliated epithelia. Small GTPases. Taylor and Francis Inc.; 2016. p. 54–8.

288. Burke MC, Li F-Q, Cyge B, Arashiro T, Brechbuhl HM, Chen X, et al. Chibby promotes ciliary vesicle formation and basal body docking during airway cell differentiation. J Cell Biol [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 3];207:123–37. Available from: http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201406140

289. Song R, Walentek P, Sponer N, Klimke A, Lee JS, Dixon G, et al. miR-34/449 miRNAs are required for motile ciliogenesis by repressing cp110. Nature [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 1];510:115–20. Available from: http://www.nature.com/articles/nature13413

290. Salathe M. Regulation of Mammalian Ciliary Beating. Annu Rev Physiol [Internet]. Annual Reviews; 2007 [cited 2020 Mar 27];69:401–22. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16945069

291. Ishikawa T. Axoneme structure from motile cilia. Cold Spring Harb Perspect Biol. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2017;9.

292. Chateau S, D'Ortona U, Poncet S, Favier J. Transport and Mixing Induced by Beating Cilia in Human Airways. Front Physiol [Internet]. Frontiers Media S.A.; 2018 [cited 2020 Mar 27];9:161. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29559920

293. Chien YH, Werner ME, Stubbs J, Joens MS, Li J, Chien S, et al. Bbof1 is required to

maintain cilia orientation. Dev [Internet]. 2013 [cited 2020 Apr 1];140:3468–77. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23900544

294. M. Vanaki S, Holmes D, Saha SC, Chen J, Brown RJ, Jayathilake PG. Muco-ciliary clearance: A review of modelling techniques [Internet]. J. Biomech. Elsevier Ltd; 2020 [cited 2020 Mar 27]. p. 109578. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31916998

295. Shaykhiev R, Zuo W-L, Chao I, Fukui T, Witover B, Brekman A, et al. EGF shifts human airway basal cell fate toward a smoking-associated airway epithelial phenotype. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2013 [cited 2019 Jun 30];110:12102–7. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1303058110

296. Burgel PR, Nadel JA. Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium. Thorax. BMJ Publishing Group; 2004. p. 992–6.

297. Burgel P-R, Nadel JA. Epidermal growth factor receptor-mediated innate immune
responses and their roles in airway diseases. Eur Respir J [Internet]. 2008 [cited 2019 Jun
30];32:1068–81.30];32:1068–81.Available

http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.00172007

298. Burgel PR, Escudier E, Coste A, Dao-Pick T, Ueki IF, Takeyama K, et al. Relation of epidermal growth factor receptor expression to goblet cell hyperplasia in nasal polyps. J Allergy Clin Immunol [Internet]. 2000 [cited 2019 Jun 30];106:705–12. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674900630518

299. Takeyama K, Dabbagh K, Lee HM, Agustí C, Lausier JA, Ueki IF, et al. Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1999 [cited 2019 Jun 30];96:3081–6. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.96.6.3081

300. Takeyama K, Jung B, Shim JJ, Burgel PR, Dao-Pick T, Ueki IF, et al. Activation of epidermal growth factor receptors is responsible for mucin synthesis induced by cigarette smoke. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol [Internet]. 2001 [cited 2019 Jul 5];280:L165-72. Available from: http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.2001.280.1.L165

301. Schagen J, Sly PD, Fantino E. Characterizing well-differentiated culture of primary human nasal epithelial cells for use in wound healing assays. Lab Investig. Nature Publishing Group; 2018;98:1478–86.

302. Rida PCG, Le Minh N, Jiang YJ. A Notch feeling of somite segmentation and beyond. Dev Biol [Internet]. 2004 [cited 2019 Jul 5];265:2–22. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14697349

303. Bessho Y, Kageyama R. Oscillations, clocks and segmentation. Curr Opin Genet Dev [Internet]. 2003 [cited 2019 Jul 5];13:379–84. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12888011

304. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science [Internet]. 1999 [cited 2019 Jul 5];284:770–6. Available from: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.284.5415.770

305. Stupnikov MR, Yang Y, Mori M, Lu J, Cardoso W V. Jagged and delta ligands control distinct events during airway progenitor cell differentiation. Elife. eLife Sciences Publications Ltd; 2019;8.

306. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet [Internet]. 2004 [cited 2019 Jul 1];5:522–31. Available from: http://www.nature.com/articles/nrg1379

307. Pursglove SE, Mackay JP. CSL: a notch above the rest. Int J Biochem Cell Biol [Internet].2005[cited2019Jul5];37:2472–7.Availablefrom:https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272505002013

308. Zhang S, Chung W, Wu G, Egan SE, Xu K. Tumor-suppressive activity of Lunatic Fringe in
prostate through differential modulation of Notch receptor activation. Neoplasia [Internet].2014[cited2019Jul5];16:158–67.Availablefrom:https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1476558614800158

309. Ylivinkka I, Hu Y, Chen P, Rantanen V, Hautaniemi S, Nyman TA, et al. Netrin-1-inducedactivation of Notch signaling mediates glioblastoma cell invasion. J Cell Sci [Internet]. 2013[cited2019Jul5];126:2459–69.http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.120022

310. Dang TP, Eichenberger S, Gonzalez A, Olson S, Carbone DP. Constitutive activation of Notch3 inhibits terminal epithelial differentiation in lungs of transgenic mice. Oncogene [Internet]. 2003 [cited 2019 Jul 5];22:1988–97. Available from: http://www.nature.com/articles/1206230

311. Fortini ME. Introduction--Notch in development and disease. Semin Cell Dev Biol[Internet].2012[cited2019Jul5];23:419–20.Availablefrom:https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952112000432

312. Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. Nat Rev Mol Cell Biol[Internet].2006[cited2019Jul5];7:678–89.Availablefrom:http://www.nature.com/articles/nrm2009

313. Bray SJ. Notch signalling in context. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 5];17:722–35. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27507209

314. Kopan R, Ilagan MXG. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. Cell [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 5];137:216–33. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867409003821

315. Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. Development [Internet]. 2004 [cited 2019 Jul 5];131:965–73. Available from: http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.01074

316. Kitagawa M. Notch signalling in the nucleus: roles of Mastermind-like (MAML) transcriptional coactivators. J Biochem [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 5];159:287–94. Available from: https://academic.oup.com/jb/article-lookup/doi/10.1093/jb/mvv123

317. Lafkas D, Shelton A, Chiu C, de Leon Boenig G, Chen Y, Stawicki SS, et al. Therapeutic
antibodies reveal Notch control of transdifferentiation in the adult lung. Nature [Internet].2015[cited2019Jul5];528:127–31.Availablefrom:http://www.nature.com/articles/nature15715

318. Ohashi S, Natsuizaka M, Yashiro-Ohtani Y, Kalman RA, Nakagawa M, Wu L, et al. NOTCH1 and NOTCH3 coordinate esophageal squamous differentiation through a CSL-dependent transcriptional network. Gastroenterology [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 5];139:2113–23. Available from:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508510012898

319. Rock JR, Gao X, Xue Y, Randell SH, Kong Y-Y, Hogan BLM. Notch-dependentdifferentiation of adult airway basal stem cells. Cell Stem Cell [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul5];8:639–48.Availablefrom:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590911001688

320. Morimoto M, Liu Z, Cheng H-T, Winters N, Bader D, Kopan R. Canonical Notch signaling

in the developing lung is required for determination of arterial smooth muscle cells and selection of Clara versus ciliated cell fate. J Cell Sci [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 5];123:213–24. Available from: http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.058669

321. Liu Y, Pathak N, Kramer-Zucker A, Drummond IA. Notch signaling controls the differentiation of transporting epithelia and multiciliated cells in the zebrafish pronephros. Development [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul 5];134:1111–22. Available from: http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.02806

322. Tsao P-N, Vasconcelos M, Izvolsky KI, Qian J, Lu J, Cardoso W V. Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways. Development [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 5];136:2297–307. Available from: http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.034884

323. 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 [Internet]. 1999 [cited 2019 Jul 5];126:4715–28. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10518489

324. Morimoto M, Nishinakamura R, Saga Y, Kopan R. Different assemblies of Notch receptors coordinate the distribution of the major bronchial Clara, ciliated and neuroendocrine cells. Development [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 5];139:4365–73. Available from: http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.083840

325. Ball AJ, Abrahamsson AE, Tyrberg B, Itkin-Ansari P, Levine F. HES6 reverses nuclear reprogramming of insulin-producing cells following cell fusion. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul 5];355:331–7. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X07002057

326. Garcia SR, Deprez M, Lebrigand K, Paquet A, Cavard A, Arguel M-J, et al. Single-cell RNA sequencing reveals novel cell differentiation dynamics during human airway epithelium regeneration. bioRxiv [Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory; 2018 [cited 2019 Jul 5];451807. Available from: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/451807v1

327. Danahay H, Pessotti AD, Coote J, Montgomery BE, Xia D, Wilson A, et al. Notch2 is required for inflammatory cytokine-driven goblet cell metaplasia in the lung. Cell Rep [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 5];10:239–52. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124714010468

328. Guseh JS, Bores SA, Stanger BZ, Zhou Q, Anderson WJ, Melton DA, et al. Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development. Development [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 5];136:1751–9. Available from: http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.029249

329. Quigley IK, Stubbs JL, Kintner C. Specification of ion transport cells in the Xenopus larval skin. Development [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 3];138:705–14. Available from: http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.055699

330. Takahashi H, Ikeda T. Transcripts for two members of the transforming growth factorbeta superfamily BMP-3 and BMP-7 are expressed in developing rat embryos. Dev Dyn [Internet]. 1996 [cited 2019 Jul 5];207:439–49. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-

0177%28199612%29207%3A4%3C439%3A%3AAID-AJA8%3E3.0.CO%3B2-I

331. Vukicevic S, Helder MN, Luyten FP. Developing human lung and kidney are major sitesfor synthesis of bone morphogenetic protein-3 (osteogenin). J Histochem Cytochem[Internet].1994[cited2019Jul5];42:869–75.Availablefrom:

http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/42.7.8014470

332. Maguer-Satta V, Bartholin L, Jeanpierre S, Ffrench M, Martel S, Magaud J-P, et al. Regulation of human erythropoiesis by activin A, BMP2, and BMP4, members of the TGFbeta family. Exp Cell Res [Internet]. 2003 [cited 2019 Jul 5];282:110–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12531697

333. Salazar VS, Gamer LW, Rosen V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. Nat Rev Endocrinol [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 5];12:203–21. Available from: http://www.nature.com/articles/nrendo.2016.12

334. Sampath TK, Rashka KE, Doctor JS, Tucker RF, Hoffmann FM. Drosophila transforming growth factor beta superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1993 [cited 2019 Jul 5];90:6004–8. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.90.13.6004

335. Weaver M, Yingling JM, Dunn NR, Bellusci S, Hogan BL. Bmp signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung development. Development [Internet]. 1999 [cited 2019 Jul 5];126:4005–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10457010

336. Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. Cell [Internet]. 2003 [cited 2019 Jul 5];115:281–92. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14636556

337. Shafiquzzaman M, Biswas S, Li P, Mishina Y, Li B, Liu H. The noncanonical BMP signaling pathway plays an important role in club cell regeneration. Stem Cells. Wiley-Blackwell; 2020;38:437–50.

338. Cibois M, Luxardi G, Chevalier B, Thomé V, Mercey O, Zaragosi L-E, et al. BMP signalling
controls the construction of vertebrate mucociliary epithelia. Development [Internet]. 2015
[cited 2019 Jul 5];142:2352–63. Available from:
http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.118679

339. Feng X-H, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. Annu Rev Cell Dev Biol [Internet]. 2005 [cited 2019 Jul 3];21:659–93. Available from: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.21.022404.142018

340. Kretzschmar M, Massagué J. SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. Curr Opin Genet Dev [Internet]. 1998 [cited 2019 Jul 3];8:103–11. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529613

341. Kahlem P, Newfeld SJ. Informatics approaches to understanding TGFbeta pathway regulation. Development [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 3];136:3729–40. Available from: http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.030320

342. Mou H, Vinarsky V, Tata PR, Brazauskas K, Choi SH, Crooke AK, et al. Dual SMAD Signaling Inhibition Enables Long-Term Expansion of Diverse Epithelial Basal Cells. Cell Stem Cell [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 3];19:217–31. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590916300960

343. Tözser J, Earwood R, Kato A, Brown J, Tanaka K, Didier R, et al. TGF-β Signaling
Regulates the Differentiation of Motile Cilia. Cell Rep [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul
5];11:1000–7.5];11:1000–7.Available

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221112471500412X

344. Haas M, Gómez Vázquez JL, Sun DI, Tran HT, Brislinger M, Tasca A, et al. ΔN -Tp63 Mediates Wnt/ β -Catenin-Induced Inhibition of Differentiation in Basal Stem Cells of

Mucociliary Epithelia. Cell Rep. Elsevier B.V.; 2019;28:3338-3352.e6.

345. Clevers H. Wnt/β-Catenin Signaling in Development and Disease [Internet]. Cell. 2006[cited2020Mar27].p.469–80.Availablefrom:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17081971

346. Aros CJ, Paul MK, Pantoja CJ, Bisht B, Meneses LK, Vijayaraj P, et al. High-Throughput Drug Screening Identifies a Potent Wnt Inhibitor that Promotes Airway Basal Stem Cell Homeostasis. Cell Rep. Elsevier B.V.; 2020;30:2055-2064.e5.

347. Malleske DT, Hayes D, Lallier SW, Hill CL, Reynolds SD. Regulation of Human Airway Epithelial Tissue Stem Cell Differentiation by β-Catenin, P300, and CBP. Stem Cells [Internet]. Wiley-Blackwell; 2018 [cited 2020 Mar 27];36:1905–16. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30171668

348. Brechbuhl HM, Ghosh M, Smith MK, Smith RW, Li B, Hicks DA, et al. β-Catenin Dosage Isa Critical Determinant of Tracheal Basal Cell Fate Determination. Am J Pathol [Internet].2011[cited2019Jul1];179:367–79.Availablehttps://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944011003324

349. Smith MK, Koch PJ, Reynolds SD. Direct and indirect roles for β-catenin in facultative
basal progenitor cell differentiation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol [Internet]. 2012
[cited 2019 Jul 1];302:L580-94. Available from:
http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.00095.2011

350. Baarsma HA, Königshoff M. *'WNT-er is coming'*: WNT signalling in chronic lung diseases. Thorax [Internet]. 2017 [cited 2019 Jul 1];72:746–59. Available from: http://thorax.bmj.com/lookup/doi/10.1136/thoraxjnl-2016-209753

351. Durham AL, McLaren A, Hayes BP, Caramori G, Clayton CL, Barnes PJ, et al. Regulation of Wnt4 in chronic obstructive pulmonary disease. FASEB J [Internet]. 2013 [cited 2019 Jul 1];27:2367–81. Available from: http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fj.12-217083

352. Gorojankina T. Hedgehog signaling pathway: A novel model and molecular mechanisms of signal transduction. Cell Mol Life Sci [Internet]. Birkhauser Verlag AG; 2016 [cited 2020 Apr 12];73:1317–32. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26762301

353. Mao S, Shah AS, Moninger TO, Ostedgaard LS, Lu L, Tang XX, et al. Motile cilia of human airway epithelia contain hedgehog signaling components that mediate noncanonical hedgehog signaling. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. National Academy of Sciences; 2018 [cited 2020 Mar 27];115:1370–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29358407

354. Belgacemi R, Luczka E, Ancel J, Diabasana Z, Perotin J-M, Germain A, et al. Airway epithelial cell differentiation relies on deficient Hedgehog signalling in COPD. EBioMedicine [Internet]. Elsevier B.V.; 2020 [cited 2020 Mar 27];51:102572. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31877414

355. Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature [Internet]. 2004 [cited 2019 Jul 1];431:350–5. Available from: http://www.nature.com/articles/nature02871

356. Zorc M, Jevsinek Skok D, Godnic I, Calin GA, Horvat S, Jiang Z, et al. Catalog of MicroRNA Seed Polymorphisms in Vertebrates. Navarro A, editor. PLoS One [Internet]. 2012 [cited 2019 Jun 30];7:e30737. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22303453

357. Stark A, Brennecke J, Russell RB, Cohen SM. Identification of Drosophila MicroRNA targets. Ronald H. A. Plasterk, editor. PLoS Biol [Internet]. 2003 [cited 2019 Jul 1];1:E60. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.0000060

358. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell [Internet]. 2009[cited2019Jul1];136:215–33.Availablefrom:https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867409000087

359. Berezikov E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. Nat Rev Genet[Internet].2011[cited2019Jul1];12:846–60.Availablehttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094948

360. Fabian MR, Mathonnet G, Sundermeier T, Mathys H, Zipprich JT, Svitkin Y V, et al. Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. Mol Cell [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 1];35:868–80. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276509005504

361. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet].2014[cited2019Jul1];15:509–24.Availablefrom:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25027649

362. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature [Internet]. 2003 [cited 2019 Jul 1];425:415–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14508493

363. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. Nature [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 1];466:835–40. Available from: http://www.nature.com/articles/nature09267

364. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines,indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell [Internet]. 2005 [cited2019Jul1];120:15–20.Availablehttps://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867404012607

365. Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. Cell [Internet]. 2006 [cited 2019 Jul 1];125:1111–24. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406005800

366. Lutter D, Marr C, Krumsiek J, Lang EW, Theis FJ. Intronic microRNAs support their host
genes by mediating synergistic and antagonistic regulatory effects. BMC Genomics
[Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 1];11:224. Available from:
http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-11-224

367. BOHNSACK MT. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. RNA [Internet]. 2004 [cited 2019 Jul 1];10:185–91. Available from: http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.5167604

368. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. Nature [Internet]. 2004 [cited 2019 Jul 1];432:231–5. Available from: http://www.nature.com/articles/nature03049

369. Gregory RI, Yan K-P, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. Nature [Internet]. 2004 [cited 2019 Jul 1];432:235–40. Available from: http://www.nature.com/articles/nature03120

370. Chong MMW, Zhang G, Cheloufi S, Neubert TA, Hannon GJ, Littman DR. Canonical and
alternate functions of the microRNA biogenesis machinery. Genes Dev [Internet]. 2010 [cited
2019 Jul 1];24:1951–60. Available from:
http://genesdev.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gad.1953310

371. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. Cell [Internet]. 2004 [cited 2019 Jul

1];118:57-68.

Available

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286740400618X

372. Wilson RC, Tambe A, Kidwell MA, Noland CL, Schneider CP, Doudna JA. Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. Mol Cell [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 1];57:397–407. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276514009514

373. Park J-E, Heo I, Tian Y, Simanshu DK, Chang H, Jee D, et al. Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. Nature [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 1];475:201–5. Available from: http://www.nature.com/articles/nature10198

374. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of premicroRNAs and short hairpin RNAs. Genes Dev [Internet]. 2003 [cited 2019 Jul 1];17:3011–6. Available from: http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1158803

375. Auyeung VC, Ulitsky I, McGeary SE, Bartel DP. Beyond secondary structure: primary-
sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing. Cell [Internet]. 2013 [cited
2019 Jul 1];152:844–58. Available from:
https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867413000834

376. Li J, Kim T, Nutiu R, Ray D, Hughes TR, Zhang Z. Identifying mRNA sequence elements for target recognition by human Argonaute proteins. Genome Res [Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2014 [cited 2020 Mar 27];24:775–85. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24663241

377. Lee LW, Zhang S, Etheridge A, Ma L, Martin D, Galas D, et al. Complexity of the
microRNA repertoire revealed by next-generation sequencing. RNA [Internet]. 2010 [cited
2019 Jul 1];16:2170–80. Available from:
http://rnajournal.cshlp.org/cgi/doi/10.1261/rna.2225110

378. Starega-Roslan J, Krol J, Koscianska E, Kozlowski P, Szlachcic WJ, Sobczak K, et al.Structural basis of microRNA length variety. Nucleic Acids Res [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul1];39:257–68.Availablefrom:https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkq727

379. Chandradoss SD, Schirle NT, Szczepaniak M, MacRae IJ, Joo C. A Dynamic Search Process Underlies MicroRNA Targeting. Cell [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 1];162:96–107. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867415007576

380. Frank F, Sonenberg N, Nagar B. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. Nature [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 1];465:818–22. Available from: http://www.nature.com/articles/nature09039

381. Zekri L, Kuzuoğlu-Öztürk D, Izaurralde E. GW182 proteins cause PABP dissociation fromsilenced miRNA targets in the absence of deadenylation. EMBO J [Internet]. 2013 [cited 2019Jul1];32:1052–65.Availablefrom:http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2013.44

382. Braun JE, Huntzinger E, Fauser M, Izaurralde E. GW182 proteins directly recruit
cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. Mol Cell [Internet]. 2011 [cited 2019
Jul 1];44:120–33.Jul1];44:120–33.Availablefrom:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276511007246

383. Eulalio A, Tritschler F, Izaurralde E. The GW182 protein family in animal cells: Newinsights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. RNA [Internet]. 2009[cited2019Jul1];15:1433–42.Availablefrom:http://rnajournal.cshlp.org/cgi/doi/10.1261/rna.1703809

from:

384. Eulalio A, Helms S, Fritzsch C, Fauser M, Izaurralde E. A C-terminal silencing domain in GW182 is essential for miRNA function. RNA [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 1];15:1067–77. Available from: http://rnajournal.cshlp.org/cgi/doi/10.1261/rna.1605509

385. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. GW182 interaction with Argonaute is essential for
miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. Nat Struct Mol Biol [Internet].2008[cited2019Jul1];15:346–53.Availablefrom:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18345015

386. Monteys AM, Spengler RM, Wan J, Tecedor L, Lennox KA, Xing Y, et al. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. RNA [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 1];16:495–505. Available from: http://rnajournal.cshlp.org/cgi/doi/10.1261/rna.1731910

387. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNAsequences, targets and gene nomenclature. Nucleic Acids Res [Internet]. 2006 [cited 2019 Jul1];34:D140-4.Availablefrom:https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkj112

388. Tan GC, Chan E, Molnar A, Sarkar R, Alexieva D, Isa IM, et al. 5' isomiR variation is of functional and evolutionary importance. Nucleic Acids Res [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 1];42:9424–35. Available from: https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gku656

389. Cloonan N, Wani S, Xu Q, Gu J, Lea K, Heater S, et al. MicroRNAs and their isomiRsfunction cooperatively to target common biological pathways. Genome Biol [Internet]. 2011[cited2019Jul1];12:R126.Availablefrom:http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2011-12-12-r126

390. Neilsen CT, Goodall GJ, Bracken CP. IsomiRs--the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. Trends Genet [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 1];28:544–9. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168952512001126

391. Manzano M, Forte E, Raja AN, Schipma MJ, Gottwein E. Divergent target recognition by
coexpressed 5'-isomiRs of miR-142-3p and selective viral mimicry. RNA [Internet]. 2015
[cited 2019 Jul 1];21:1606–20. Available from:
http://rnajournal.cshlp.org/lookup/doi/10.1261/rna.048876.114

392. Wyman SK, Knouf EC, Parkin RK, Fritz BR, Lin DW, Dennis LM, et al. Post-transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome complexity. Genome Res [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 1];21:1450–61. Available from: http://genome.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gr.118059.110

393. Llorens F, Bañez-Coronel M, Pantano L, del Río JA, Ferrer I, Estivill X, et al. A highly
expressed miR-101 isomiR is a functional silencing small RNA. BMC Genomics [Internet].2013[cited 2019 Jul 1];14:104. Available from:
http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-14-104

394. Newman MA, Mani V, Hammond SM. Deep sequencing of microRNA precursors reveals extensive 3' end modification. RNA [Internet]. 2011 [cited 2020 Mar 27];17:1795–803. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21849429

395. Mercey O, Popa A, Cavard A, Paquet A, Chevalier B, Pons N, et al. Characterizing isomiR variants within the microRNA-34/449 family. FEBS Lett. 2017;591.

396. Bou Kheir T, Futoma-Kazmierczak E, Jacobsen A, Krogh A, Bardram L, Hother C, et al. miR-449 inhibits cell proliferation and is down-regulated in gastric cancer. Mol Cancer [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 1];10:29. Available from: http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-10-29

397. Jeon HS, Lee SY, Lee EJ, Yun SC, Cha EJ, Choi E, et al. Combining microRNA-449a/b with a HDAC inhibitor has a synergistic effect on growth arrest in lung cancer. Lung Cancer [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 1];76:171–6. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169500211005277

398. Noonan EJ, Place RF, Pookot D, Basak S, Whitson JM, Hirata H, et al. miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer. Oncogene [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 1];28:1714–24. Available from: http://www.nature.com/articles/onc200919

399. Yuan S, Tang C, Zhang Y, Wu J, Bao J, Zheng H, et al. mir-34b/c and mir-449a/b/c are required for spermatogenesis, but not for the first cleavage division in mice. Biol Open [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 1];4:212–23. Available from: http://bio.biologists.org/cgi/doi/10.1242/bio.201410959

400. Comazzetto S, Di Giacomo M, Rasmussen KD, Much C, Azzi C, Perlas E, et al. Oligoasthenoteratozoospermia and infertility in mice deficient for miR-34b/c and miR-449 loci. Miska EA, editor. PLoS Genet [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 1];10:e1004597. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1004597

401. Fededa JP, Esk C, Mierzwa B, Stanyte R, Yuan S, Zheng H, et al. MicroRNA-34/449 controls mitotic spindle orientation during mammalian cortex development. EMBO J [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 1];35:2386–98. Available from: http://emboj.embopress.org/lookup/doi/10.15252/embj.201694056

402. Lizé M, Pilarski S, Dobbelstein M. E2F1-inducible microRNA 449a/b suppresses cell proliferation and promotes apoptosis. Cell Death Differ [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 5];17:452–8. Available from: http://www.nature.com/articles/cdd2009188

403. Yang X, Feng M, Jiang X, Wu Z, Li Z, Aau M, et al. 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 Dev [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 1];23:2388–93. Available from: http://genesdev.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gad.1819009

404. Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, et al. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. Cancer Res [Internet]. 2008 [cited 2019 Jul 5];68:4123–32. Available from: http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-08-0325

405. Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, et al. p53-mediatedactivation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. Curr Biol [Internet]. 2007 [cited2019Jul1];17:1298–307.Availablehttps://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982207016387

406. Wu J, Bao J, Kim M, Yuan S, Tang C, Zheng H, 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 U S A [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 1];111:E2851-7. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1407777111

407. Human hg19 chrX:15578261-15621068 UCSC Genome Browser v395 [Internet]. [cited2020Mar27].Availablefrom:https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chrX%3A15578261-

15621068&hgsid=815901165_SDAD5FSYtgTcUgygaj1ZktIkyJyy

408. Marshall CB, Mays DJ, Beeler JS, Rosenbluth JM, Boyd KL, Santos Guasch GL, et al. p73 IsRequired for Multiciliogenesis and Regulates the Foxj1-Associated Gene Network. Cell Rep[Internet].2016[cited2019Jul3];14:2289–300.Availablefrom:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124716301383

409. McConnell AM, Yao C, Yeckes AR, Wang Y, Selvaggio AS, Tang J, et al. p53 Regulates Progenitor Cell Quiescence and Differentiation in the Airway. Cell Rep [Internet]. Elsevier B.V.; 2016 [cited 2020 Mar 27];17:2173–82. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27880895

410. Chand HS, Montano G, Huang X, Randell SH, Mebratu Y, Petersen H, et al. A genetic variant of p53 restricts the mucous secretory phenotype by regulating SPDEF and Bcl-2 expression. Nat Commun [Internet]. Nature Publishing Group; 2014 [cited 2020 Mar 27];5:5567. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25429397

411. Danielian PS, Bender Kim CF, Caron AM, Vasile E, Bronson RT, Lees JA. E2f4 is requiredfor normal development of the airway epithelium. Dev Biol [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul3];305:564–76.Availablefrom:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160607001686

412. Chong YL, Zhang Y, Zhou F, Roy S. Distinct requirements of E2f4 versus E2f5 activity for multiciliated cell development in the zebrafish embryo. Dev Biol. Elsevier Inc.; 2018;443:165–72.

413. Stracker TH. E2F4/5-mediated transcriptional control of multiciliated cell differentiation: redundancy or fine-tuning? Dev. Biol. Elsevier Inc.; 2019. p. 20–1.

414. Humbert PO, Rogers C, Ganiatsas S, Landsberg RL, Trimarchi JM, Dandapani S, et al. E2F4 is essential for normal erythrocyte maturation and neonatal viability. Mol Cell [Internet]. 2000 [cited 2019 Jul 3];6:281–91. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10983976

415. Terré B, Piergiovanni G, Segura-Bayona S, Gil-Gómez G, Youssef SA, Attolini CS-O, et al.GEMC1 is a critical regulator of multiciliated cell differentiation. EMBO J [Internet]. 2016[cited2019Jul3];35:942–60.Availablefrom:http://emboj.embopress.org/lookup/doi/10.15252/embj.201592821

416. McGarry TJ, Kirschner MW. Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. Cell [Internet]. 1998 [cited 2019 Jul 3];93:1043–53. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9635433

417. Arbi M, Pefani D-E, Kyrousi C, Lalioti M-E, Kalogeropoulou A, Papanastasiou AD, et al. GemC1 controls multiciliogenesis in the airway epithelium. EMBO Rep [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 5];17:400–13. Available from: http://embor.embopress.org/lookup/doi/10.15252/embr.201540882

418. Balestrini A, Cosentino C, Errico A, Garner E, Costanzo V. GEMC1 is a TopBP1-interacting protein required for chromosomal DNA replication. Nat Cell Biol [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 3];12:484–91. Available from: http://www.nature.com/articles/ncb2050

419. Zhou F, Narasimhan V, Shboul M, Chong YL, Reversade B, Roy S. Gmnc Is a Master Regulator of the Multiciliated Cell Differentiation Program. Curr Biol [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 3];25:3267–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26778655

420. Kyrousi C, Lalioti M-E, Skavatsou E, Lygerou Z, Taraviras S. Mcidas and GemC1/Lynkeas specify embryonic radial glial cells. Neurogenes (Austin, Tex) [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 5];3:e1172747. Available from:

https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23262133.2016.1172747

421. Kyrousi C, Arbi M, Pilz G-A, Pefani D-E, Lalioti M-E, Ninkovic J, et al. Mcidas and GemC1 are key regulators for the generation of multiciliated ependymal cells in the adult neurogenic niche. Development [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 5];142:3661–74. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26395491

422. Ma L, Quigley I, Omran H, Kintner C. Multicilin drives centriole biogenesis via E2f proteins. Genes Dev [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 3];28:1461–71. Available from: http://genesdev.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gad.243832.114

423. Stubbs JL, Vladar EK, Axelrod JD, Kintner C. Multicilin promotes centriole assembly and ciliogenesis during multiciliate cell differentiation. Nat Cell Biol [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 3];14:140–7. Available from: http://www.nature.com/articles/ncb2406

424. Pefani D-E, Dimaki M, Spella M, Karantzelis N, Mitsiki E, Kyrousi C, et al. Idas, a novel phylogenetically conserved geminin-related protein, binds to geminin and is required for cell cycle progression. J Biol Chem [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 3];286:23234–46. Available from: http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M110.207688

425. Villa M, Crotta S, Dingwell KS, Hirst EMA, Gialitakis M, Ahlfors H, et al. The aryl hydrocarbon receptor controls cyclin O to promote epithelial multiciliogenesis. Nat Commun [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 5];7:12652. Available from: http://www.nature.com/articles/ncomms12652

426. Nemajerova A, Amelio I, Gebel J, Dötsch V, Melino G, Moll UM. Non-oncogenic roles of TAp73: from multiciliogenesis to metabolism. Cell Death Differ [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 3];25:144–53. Available from: http://www.nature.com/articles/cdd2017178

427. Nemajerova A, Kramer D, Siller SS, Herr C, Shomroni O, Pena T, et al. TAp73 is a central transcriptional regulator of airway multiciliogenesis. Genes Dev [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 3];30:1300–12. Available from:

http://genesdev.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gad.279836.116

428. Marques MM, Villoch-Fernandez J, Maeso-Alonso L, Fuertes-Alvarez S, Marin MC. The Trp73 Mutant Mice: A Ciliopathy Model That Uncouples Ciliogenesis From Planar Cell Polarity. Front Genet [Internet]. Frontiers Media S.A.; 2019 [cited 2020 Mar 27];10:154. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30930930

429. Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. 2009 [cited 2020 Mar 27];10:778–90. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19851336

430. Tan FE, Vladar EK, Ma L, Fuentealba LC, Hoh R, Espinoza FH, et al. Myb promotes centriole amplification and later steps of the multiciliogenesis program. Development [Internet]. 2013 [cited 2019 Jul 3];140:4277–86. Available from: http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.094102

431. Pan J-H, Adair-Kirk TL, Patel AC, Huang T, Yozamp NS, Xu J, et al. Myb permits multilineage airway epithelial cell differentiation. Stem Cells [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 3];32:3245–56. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/stem.1814

432. Thomas J, Morlé L, Soulavie F, Laurençon A, Sagnol S, Durand B. Transcriptional control of genes involved in ciliogenesis: a first step in making cilia. Biol Cell. Wiley-Blackwell; 2010;102:499–513.

433. Didon L, Zwick RK, Chao IW, Walters MS, Wang R, Hackett NR, et al. RFX3 modulation of FOXJ1 regulation of cilia genes in the human airway epithelium. Respir Res [Internet]. 2013 [cited 2019 Jul 3];14:70. Available from: http://respiratory-research.com/content/14/1/70

434. You Y, Huang T, Richer EJ, Schmidt J-EH, Zabner J, Borok Z, et al. Role of f-box factor foxj1 in differentiation of ciliated airway epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol [Internet]. 2004 [cited 2019 Jul 3];286:L650-7. Available from: http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.00170.2003

435. Choksi SP, Babu D, Lau D, Yu X, Roy S. Systematic discovery of novel ciliary genes through functional genomics in the zebrafish. Development [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 3];141:3410–9. Available from: http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.108209

436. Jacquet B V, Salinas-Mondragon R, Liang H, Therit B, Buie JD, Dykstra M, et al. FoxJ1dependent gene expression is required for differentiation of radial glia into ependymal cells and a subset of astrocytes in the postnatal brain. Development [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 3];136:4021–31. Available from: http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.041129

437. El Zein L, Ait-Lounis A, Morlé L, Thomas J, Chhin B, Spassky N, et al. RFX3 governs growth and beating efficiency of motile cilia in mouse and controls the expression of genes involved in human ciliopathies. J Cell Sci [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 3];122:3180–9. Available from: http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.048348

438. Chung M-I, Peyrot SM, LeBoeuf S, Park TJ, McGary KL, Marcotte EM, et al. RFX2 is broadly required for ciliogenesis during vertebrate development. Dev Biol [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 3];363:155–65. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160611014497

439. Chung M-I, Kwon T, Tu F, Brooks ER, Gupta R, Meyer M, et al. Coordinated genomic control of ciliogenesis and cell movement by RFX2. Elife [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 3];3:e01439. Available from: https://elifesciences.org/articles/01439

440. Baas D, Meiniel A, Benadiba C, Bonnafe E, Meiniel O, Reith W, et al. A deficiency in RFX3 causes hydrocephalus associated with abnormal differentiation of ependymal cells. Eur J Neurosci [Internet]. 2006 [cited 2019 Jul 1];24:1020–30. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9568.2006.05002.x

441. Walentek P. Ciliary transcription factors in cancer--how understanding ciliogenesis can promote the detection and prognosis of cancer types. J Pathol [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 5];239:6–9. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/path.4703

442. Quigley IK, Kintner C. Rfx2 Stabilizes Foxj1 Binding at Chromatin Loops to Enable Multiciliated Cell Gene Expression. Wallingford J, editor. PLoS Genet [Internet]. 2017 [cited 2019 Jul 3];13:e1006538. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1006538

443. Wallmeier J, Al-Mutairi DA, Chen C-T, Loges NT, Pennekamp P, Menchen T, et al. Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. Nat Genet [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 3];46:646–51. Available from: http://www.nature.com/articles/ng.2961

444. Boon M, Wallmeier J, Ma L, Loges NT, Jaspers M, Olbrich H, et al. MCIDAS mutations result in a mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. Nat Commun [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 5];5:4418. Available from: http://www.nature.com/articles/ncomms5418

445. Funk MC, Bera AN, Menchen T, Kuales G, Thriene K, Lienkamp SS, et al. Cyclin O (Ccno) functions during deuterosome-mediated centriole amplification of multiciliated cells. EMBO J [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 5];34:1078–89. Available from:

http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.15252/embj.201490805

446. Núnez-Ollé M, Jung C, Terré B, Balsiger NA, Plata C, Roset R, et al. Constitutive Cyclin O deficiency results in penetrant hydrocephalus, impaired growth and infertility. Oncotarget [Internet]. 2017 [cited 2019 Jul 5];8. Available from: http://www.oncotarget.com/fulltext/21818

447. Núnez-Ollé M, Stracker TH, Gil-Gómez G. CCNO mutations in NPH? Aging (Albany NY) [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 5];10:158–9. Available from: http://www.aging-

us.com/article/101379/text

448. Amirav I, Wallmeier J, Loges NT, Menchen T, Pennekamp P, Mussaffi H, et al. Systematic Analysis of CCNO Variants in a Defined Population: Implications for Clinical Phenotype and Differential Diagnosis. Hum Mutat [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 5];37:396–405. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/humu.22957

449. Shapiro AJ, Leigh MW. Value of transmission electron microscopy for primary ciliary dyskinesia diagnosis in the era of molecular medicine: Genetic defects with normal and nondiagnostic ciliary ultrastructure. Ultrastruct Pathol [Internet]. 2017 [cited 2019 Jul 5];41:373– 85. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01913123.2017.1362088

450. Mitchison HM, Valente EM. Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. J Pathol [Internet]. 2017 [cited 2019 Jul 1];241:294–309. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/path.4843

451. Bachmann-Gagescu R. [Genetic complexity of ciliopathies and novel genes identification]. Med Sci (Paris) [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 1];30:1011–23. Available from: http://www.medecinesciences.org/10.1051/medsci/20143011016

452. Sreekumar V, Norris DP. Cilia and development [Internet]. Curr. Opin. Genet. Dev. Elsevier Ltd; 2019 [cited 2020 Mar 27]. p. 15–21. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31201996

453. Sedykh I, TeSlaa JJ, Tatarsky RL, Keller AN, Toops KA, Lakkaraju A, et al. Novel roles for the radial spoke head protein 9 in neural and neurosensory cilia. Sci Rep [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 1];6:34437. Available from: http://www.nature.com/articles/srep34437

454. Bertrand B, Collet S, Eloy P, Rombaux P. Secondary ciliary dyskinesia in upper respiratory tract. Acta Otorhinolaryngol Belg [Internet]. 2000 [cited 2019 Jul 1];54:309–16. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11082767

455. Lu H, Anujan P, Zhou F, Zhang Y, Chong YL, Bingle CD, et al. Mcidas mutant mice reveal a two-step process for the specification and differentiation of multiciliated cells in mammals. Dev [Internet]. Company of Biologists Ltd; 2019 [cited 2020 Mar 27];146. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30877126

456. Asthma [Internet]. [cited 2020 Mar 27]. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/asthma

457. Wenzel SE. Asthma phenotypes: The evolution from clinical to molecular approaches [Internet]. Nat. Med. 2012 [cited 2020 Mar 27]. p. 716–25. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22561835

458. Pascual RM, Peters SP. Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: an overview. J Allergy Clin Immunol [Internet]. 2005 [cited 2019 Jul 5];116:477–86; quiz 487. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674905016489

459. Ressler B, Lee RT, Randell SH, Drazen JM, Kamm RD. Molecular responses of rat tracheal epithelial cells to transmembrane pressure. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol [Internet]. 2000 [cited 2019 Jul 5];278:L1264-72. Available from: http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.2000.278.6.L1264

460. Grainge CL, Lau LCK, Ward JA, Dulay V, Lahiff G, Wilson S, et al. Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. N Engl J Med [Internet]. Massachussetts Medical Society; 2011 [cited 2020 Mar 27];364:2006–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21612469

461. Barlow JL, Peel S, Fox J, Panova V, Hardman CS, Camelo A, et al. IL-33 is more potent than IL-25 in provoking IL-13-producing nuocytes (type 2 innate lymphoid cells) and airway contraction. J Allergy Clin Immunol [Internet]. 2013 [cited 2020 Mar 27];132:933–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23810766

462. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, et al. T-helper type 2driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. Am J Respir Crit Care Med [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 5];180:388–95. Available from: http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200903-0392OC

463. Giovannini-Chami L, Paquet A, Sanfiorenzo C, Pons N, Cazareth J, Magnone V, et al. The "one airway, one disease" concept in light of Th2 inflammation. Eur Respir J. European Respiratory Society; 2018;52.

464. Giovannini-Chami L, Marcet B, Moreilhon C, Chevalier B, Illie MI, Lebrigand K, et al. Distinct epithelial gene expression phenotypes in childhood respiratory allergy. Eur Respir J [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 5];39:1197–205. Available from: http://erj.ersjournals.com/lookup/doi/10.1183/09031936.00070511

465. Evans CM, Raclawska DS, Ttofali F, Liptzin DR, Fletcher AA, Harper DN, et al. The polymeric mucin Muc5ac is required for allergic airway hyperreactivity. Nat Commun [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 5];6:6281. Available from: http://www.nature.com/articles/ncomms7281

466. Reader JR, Tepper JS, Schelegle ES, Aldrich MC, Putney LF, Pfeiffer JW, et al.Pathogenesis of mucous cell metaplasia in a murine asthma model. Am J Pathol [Internet].2003 [cited 2019 Jul 5];162:2069–78. Available from:https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010643386

467. Kondo M, Tamaoki J, Takeyama K, Isono K, Kawatani K, Izumo T, et al. Elimination of IL-13 reverses established goblet cell metaplasia into ciliated epithelia in airway epithelial cell culture. Allergol Int [Internet]. 2006 [cited 2019 Jul 5];55:329–36. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1323893015309850

468. Turner J, Roger J, Fitau J, Combe D, Giddings J, Heeke G Van, et al. Goblet cells are derived from a FOXJ1-expressing progenitor in a human airway epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 3];44:276–84. Available from: http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2009-0304OC

469. Thomas B, Rutman A, Hirst RA, Haldar P, Wardlaw AJ, Bankart J, et al. Ciliary dysfunction and ultrastructural abnormalities are features of severe asthma. J Allergy Clin Immunol [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 5];126:722-729.e2. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674910009723

470. Ojiaku CA, Yoo EJ, Panettieri RA. Transforming Growth Factor β1 Function in AirwayRemodeling and Hyperresponsiveness. The Missing Link? Am J Respir Cell Mol Biol [Internet].2017[cited 2019 Jul 5];56:432–42.Availablefrom:http://www.atsjournals.org/doi/10.1165/rcmb.2016-0307TR

471. Zhang W, Huang Y, Wu Y, Gunst SJ. A novel role for RhoA GTPase in the regulation of airway smooth muscle contraction. Can J Physiol Pharmacol [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 5];93:129–36. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25531582

472. Kudo M, Melton AC, Chen C, Engler MB, Huang KE, Ren X, et al. IL-17A produced by $\alpha\beta$ T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. Nat Med [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 5];18:547–54. Available from: http://www.nature.com/articles/nm.2684

473. Chiba Y, Todoroki M, Misawa M. Activation of signal transducer and activator of transcription factor 1 by interleukins-13 and -4 in cultured human bronchial smooth muscle cells. J Smooth Muscle Res. 2010;45:279–88.

474. Koopmans T, Kumawat K, Halayko AJ, Gosens R. Regulation of actin dynamics by WNT-5A: implications for human airway smooth muscle contraction. Sci Rep [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 1];6:30676. Available from: http://www.nature.com/articles/srep30676

475. Lai HY, Rogers DF. Mucus hypersecretion in asthma: intracellular signalling pathways as targets for pharmacotherapy. Curr Opin Allergy Clin Immunol [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 5];10:67–76. Available from: https://insights.ovid.com/crossref?an=00130832-201002000-00012

476. Papi A, Brightling C, Pedersen SE, Reddel HK. Asthma. Lancet (London, England) [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 5];391:783–800. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673617333111

477. Oh CK, Geba GP, Molfino N. Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma. Eur Respir Rev [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 5];19:46–54. Available from:

http://err.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09059180.00007609

478. Gomperts BN, Kim LJ, Flaherty SA, Hackett BP. IL-13 regulates cilia loss and foxj1expression in human airway epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol [Internet]. 2007 [cited2019Jul5];37:339–46.Availablehttp://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2006-04000C

479. Tyner JW, Kim EY, Ide K, Pelletier MR, Roswit WT, Morton JD, et al. Blocking airway mucous cell metaplasia by inhibiting EGFR antiapoptosis and IL-13 transdifferentiation signals. J Clin Invest [Internet]. 2006 [cited 2019 Jul 5];116:309–21. Available from: http://www.jci.org/cgi/doi/10.1172/JCI25167

480. Chung KF. Targeting the interleukin pathway in the treatment of asthma. Lancet (London, England) [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 5];386:1086–96. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673615001579

481. Oettgen HC, Geha RS. IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. J Allergy Clin Immunol [Internet]. 2001 [cited 2019 Jul 5];107:429–40. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674901890564

482. Gauvreau GM, Arm JP, Boulet L-P, Leigh R, Cockcroft DW, Davis BE, et al. Efficacy and safety of multiple doses of QGE031 (ligelizumab) versus omalizumab and placebo in inhibiting allergen-induced early asthmatic responses. J Allergy Clin Immunol [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 5];138:1051–9. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674916300215

483. Chanez P, Contin-Bordes C, Garcia G, Verkindre C, Didier A, De Blay F, et al. Omalizumab-induced decrease of Fc{RI expression in patients with severe allergic asthma. Respir Med [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 5];104:1608–17. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095461111000332X

484. Woodruff PG, Boushey HA, Dolganov GM, Barker CS, Yang YH, Donnelly S, et al. Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul 5];104:15858–63. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0707413104

485. Postma DS, Bush A, van den Berge M. Risk factors and early origins of chronic

obstructive pulmonary disease. Lancet (London, England) [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul5];385:899–909.Availablefrom:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614604463

486. Yaghi A, Zaman A, Cox G, Dolovich MB. Ciliary beating is depressed in nasal cilia from chronic obstructive pulmonary disease subjects. Respir Med [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 5];106:1139–47. Available from:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0954611112001539

487. James AL, Wenzel S. Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases. Eur Respir J [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul 5];30:134–55. Available from: http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.00146905

488. Hessel J, Heldrich J, Fuller J, Staudt MR, Radisch S, Hollmann C, et al. Intraflagellar transport gene expression associated with short cilia in smoking and COPD. Bogaard H, editor. PLoS One [Internet]. 2014 [cited 2019 Jun 30];9:e85453. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0085453

489. Leopold PL, O'Mahony MJ, Lian XJ, Tilley AE, Harvey B-G, Crystal RG. Smoking is associated with shortened airway cilia. Feghali-Bostwick C, editor. PLoS One [Internet]. 2009 [cited 2019 Jul 5];4:e8157. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0008157

490. AUERBACH O, STOUT AP, HAMMOND EC, GARFINKEL L. Changes in bronchial epitheliumin relation to sex, age, residence, smoking and pneumonia. N Engl J Med [Internet]. 1962[cited2019Jul5];267:111–9.Availablefrom:http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM196207192670301

491. Puchelle E, Zahm J-M, Tournier J-M, Coraux C. Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc [Internet]. 2006 [cited 2019 Jul 5];3:726–33. Available from: http://pats.atsjournals.org/cgi/doi/10.1513/pats.200605-126SF

492. Maselli DJ, Hanania NA. Asthma COPD overlap: Impact of associated comorbidities [Internet]. Pulm. Pharmacol. Ther. Academic Press; 2018 [cited 2020 Mar 27]. p. 27–31. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30172866

493. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The Nature of Small-
Airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. N Engl J Med [Internet]. 2004
[cited 2019 Jul 5];350:2645–53. Available from:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15215480

494. Garelli V, Petitpierre N, Nicod LP. [The asthma-COPD overlap syndrome]. Rev Med Suisse [Internet]. 2015 [cited 2020 Mar 27];11:2145–50. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742234

495. Schmidt BZ, Haaf JB, Leal T, Noel S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis: current perspectives. Clin Pharmacol [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 5];8:127–40. Available from: https://www.dovepress.com/cystic--fibrosis-transmembrane-conductance-regulator-modulators-in-cys-peer-reviewed-article-CPAA

496. Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP, Boyle MP, Dunitz JM, Durie PR, et al. Effect of VX-770 in
persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. N Engl J Med [Internet]. 2010
[cited 2019 Jul 5];363:1991–2003. Available from:
http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0909825

497. Nevez G, Robert-Gangneux F, Pougnet L, Virmaux M, Belleguic C, Deneuville E, et al. Pneumocystis jirovecii and Cystic Fibrosis in Brittany, France. Mycopathologia [Internet].

Springer Netherlands; 2018 [cited 2020 Aug 8];183:81–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28688008/

498. Davis PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med [Internet].1996[cited2019Jul5];154:1229–56.Availablefrom:http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm.154.5.8912731

499. Tsui L, Buchwald M, Barker D, Braman J, Knowlton R, Schumm J, et al. Cystic fibrosislocus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. Science (80-) [Internet]. 1985[cited2019Jul5];230:1054–7.Availablehttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2997931

500. Kerem B, Rommens J, Buchanan J, Markiewicz D, Cox T, Chakravarti A, et al.Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science (80-) [Internet]. 1989[cited 2019 Jul 5];245:1073–80.Available from:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2570460

501. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. Science [Internet]. 1989 [cited 2019 Jul 5];245:1059–65. Available from: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.2772657

502. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon NOA, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. Science (80-). 1989;245:1066–73.

503. Kartner N, Hanrahan JW, Jensen TJ, Naismith AL, Sun SZ, Ackerley CA, et al. Expression of the cystic fibrosis gene in non-epithelial invertebrate cells produces a regulated anion conductance. Cell [Internet]. 1991 [cited 2020 Mar 27];64:681–91. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1705179

504. Rommens JM, Dho S, Bear CE, Kartner N, Kennedy D, Riordan JR, et al. cAMP-inducible chloride conductance in mouse fibroblast lines stably expressing the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. National Academy of Sciences; 1991 [cited 2020 Mar 27];88:7500–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1715567

505. Egan M, Flotte T, Afione S, Solow R, Zeitlin PL, Carter BJ, et al. Defective regulation of outwardly rectifying Cl- channels by protein kinase a corrected by insertion of CFTR. Nature [Internet]. 1992 [cited 2020 Mar 27];358:581–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1380129

506. Keating D, Marigowda G, Burr L, Daines C, Mall MA, McKone EF, et al. VX-445-Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. N Engl J Med [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 5];379:1612–20. Available from: http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1807120

507. Davies JC, Moskowitz SM, Brown C, Horsley A, Mall MA, McKone EF, et al. VX-659tezacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis and one or two Phe508del alleles. N Engl J Med. Massachussetts Medical Society; 2018;379:1599–611.

508. Dalemans W, Barbry P, Champigny G, Jallat S, Dott K, Dreyer D, et al. Altered chlorideion channel kinetics associated with the ΔF508 cystic fibrosis mutation. Nature [Internet].1991[cited2020Mar27];354:526–8.Availablehttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1722027

509. Puchelle E, Gaillard D, Ploton D, Hinnrasky J, Fuchey C, Boutterin MC, et al. Differential localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal and cystic

fibrosis airway epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol [Internet]. 1992 [cited 2019 Jul 5];7:485–91. Available from: http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/ajrcmb/7.5.485

510. Schwiebert EM, Egan ME, Hwang TH, Fulmer SB, Allen SS, Cutting GR, et al. CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. Cell [Internet]. 1995 [cited 2020 Mar 27];81:1063–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7541313

511. Stutts M, Canessa C, Olsen J, Hamrick M, Cohn J, Rossier B, et al. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. Science (80-) [Internet]. 1995 [cited 2019 Jul 5];269:847–50. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7543698

512. Reddy MM, Light MJ, Quinton PM. Activation of the epithelial Na+ channel (ENaC) requires CFTR Cl- channel function. Nature [Internet]. 1999 [cited 2019 Jul 5];402:301–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10580502

513. Nagel G, Barbry P, Chabot H, Brochiero E, Hartung K, Grygorczyk R. CFTR fails to inhibit
the epithelial sodium channel ENaC expressed in Xenopus laevis oocytes. J Physiol [Internet].2005[cited2019Jul5];564:671–82.Availablefrom:http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2004.079046

514. Stutts MJ, Rossier BC, Boucher RC. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inverts protein kinase A-mediated regulation of epithelial sodium channel single channel kinetics. J Biol Chem [Internet]. 1997 [cited 2019 Jul 5];272:14037–40. Available from: http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.272.22.14037

515. Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, Abou Alaiwa MH, Ramachandran S, Moninger TO, et al. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. Nature [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 5];487:109–13. Available from: http://www.nature.com/articles/nature11130

516. Machen TE. Innate immune response in CF airway epithelia: hyperinflammatory? Am J Physiol Physiol [Internet]. 2006 [cited 2019 Jul 5];291:C218–30. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16825601

517. Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC. Increased airway epithelial Na+ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. Nat Med [Internet]. 2004 [cited 2019 Jul 5];10:487–93. Available from: http://www.nature.com/articles/nm1028

518. Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzy JT, Davis CW, et al. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. Cell [Internet]. 1998 [cited 2019 Jul 5];95:1005–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9875854

519. Boucher RC. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. Trends Mol Med [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul 5];13:231–40. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491407000858

520. Matsui H, Wagner VE, Hill DB, Schwab UE, Rogers TD, Button B, et al. A physical linkage between cystic fibrosis airway surface dehydration and Pseudomonas aeruginosa biofilms. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2006 [cited 2019 Jul 5];103:18131–6. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0606428103

521. Zhou-Suckow Z, Duerr J, Hagner M, Agrawal R, Mall MA. Airway mucus, inflammation and remodeling: emerging links in the pathogenesis of chronic lung diseases. Cell Tissue Res [Internet]. 2017 [cited 2019 Jul 5];367:537–50. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00441-016-2562-z

522. Engelhardt JF, Yankaskas JR, Ernst SA, Yang Y, Marino CR, Boucher RC, et al. Submucosal

glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. Nat Genet [Internet]. 1992 [cited 2019 Jul 5];2:240–8. Available from: http://www.nature.com/articles/ng1192-240

523. Barbry P, Cavard A, Chanson M, Jaffe AB, Plasschaert LW. Regeneration of airway epithelial cells to study rare cell states in cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2020;19.

524. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. Cell [Internet]. 1997 [cited 2019 Jul 5];88:553–60. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9038346

525. Adam D, Roux-Delrieu J, Luczka E, Bonnomet A, Lesage J, Mérol J-C, et al. Cystic fibrosis airway epithelium remodelling: involvement of inflammation. J Pathol [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 5];235:408–19. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/path.4471

526. Hajj R, Lesimple P, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Puchelle E, Coraux C. Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. J Pathol [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul 5];211:340–50. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/path.2118 527. Stoltz DA, Meyerholz DK, Pezzulo AA, Ramachandran S, Rogan MP, Davis GJ, et al. Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth. Sci Med [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 5];2:29ra31. Available Transl from: http://stm.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scitranslmed.3000928

528. Chen J-H, Stoltz DA, Karp PH, Ernst SE, Pezzulo AA, Moninger TO, et al. Loss of anion transport without increased sodium absorption characterizes newborn porcine cystic fibrosis airway epithelia. Cell [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 5];143:911–23. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867410013097

529. Stanich JE, Gibbons SJ, Eisenman ST, Bardsley MR, Rock JR, Harfe BD, et al. Ano1 as a regulator of proliferation. Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol [Internet]. 2011 [cited 2020 Apr 14];301:G1044-51. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21940901

530. Jung J, Nam JH, Park HW, Oh U, Yoon J-H, Lee MG. Dynamic modulation of ANO1/TMEM16A HCO3(-) permeability by Ca2+/calmodulin. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2013 [cited 2020 Apr 14];110:360–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23248295

531. Jia L, Liu W, Guan L, Lu M, Wang K. Inhibition of Calcium-Activated Chloride Channel ANO1/TMEM16A Suppresses Tumor Growth and Invasion in Human Lung Cancer. PLoS One [Internet]. Public Library of Science; 2015 [cited 2020 Apr 14];10:e0136584. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26305547

532. Sonneville F, Ruffin M, Coraux C, Rousselet N, Le Rouzic P, Blouquit-Laye S, et al. MicroRNA-9 downregulates the ANO1 chloride channel and contributes to cystic fibrosis lung pathology. [cited 2020 Apr 14]; Available from: www.nature.com/naturecommunications

533. Bardin P, Sonneville F, Corvol H, Tabary O. Emerging microRNA Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. Front Pharmacol [Internet]. Frontiers Media S.A.; 2018 [cited 2020 Apr 14];9:1113. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30349480

534. Mercey O, Chevalier B, Kodjabachian L, Barbry P, Marcet B. [MicroRNAs pull the strings of motile cilia]. Med Sci (Paris) [Internet]. 2015 [cited 2020 Apr 13];31:1078–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26672659

535. Mercey O, Popa A, Cavard A, Paquet A, Chevalier B, Pons N, et al. Characterizing isomiR variants within the microRNA-34/449 family. FEBS Lett [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun

27];591:693–705. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/1873-3468.12595

536. Arbi M, Pefani D-E, Taraviras S, Lygerou Z. Controlling centriole numbers: Geminin family members as master regulators of centriole amplification and multiciliogenesis. Chromosoma [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 5];127:151–74. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00412-017-0652-7

537. Funk MC, Bera AN, Menchen T, Kuales G, Thriene K, Lienkamp SS, et al. Cyclin O (Ccno) functions during deuterosome-mediated centriole amplification of multiciliated cells. EMBO J [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 3];34:1078–89. Available from: http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.15252/embj.201490805

538. Eenjes E, Mertens TCJ, Buscop-Van Kempen MJ, Van Wijck Y, Taube C, Rottier RJ, et al. A novel method for expansion and differentiation of mouse tracheal epithelial cells in culture. Sci Rep [Internet]. Nature Publishing Group; 2018 [cited 2020 Aug 11];8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29743551/

539. Garcia SR. Appréhender l'hétérogénéité cellulaire et la dynamique de différenciation des épithéliums des voies aériennes au moyen de signatures transcriptionnelles sur cellule unique [Internet]. http://www.theses.fr. Université Côte d'Azur (ComUE); 2018 Dec. Available from: http://www.theses.fr/2018AZUR4204

540. Thèses [Internet]. [cited 2020 Aug 18]. Available from: https://www.theses.fr/

541. Forteza RM, Casalino-Matsuda SM, Falcon NS, Valencia Gattas M, Monzon ME. Hyaluronan and layilin mediate loss of airway epithelial barrier function induced by cigarette smoke by decreasing E-cadherin. J Biol Chem [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 5];287:42288– 98. Available from: http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M112.387795

542. Auer RL, Starczynski J, McElwaine S, Bertoni F, Newland AC, Fegan CD, et al. Identification of a potential role for POU2AF1 and BTG4 in the deletion of 11q23 in chronic lymphocytic leukemia. Genes Chromosomes Cancer [Internet]. 2005 [cited 2019 Jul 5];43:1–10. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/gcc.20159

543. Mano H, Nakatani S, Kimira Y, Mano M, Sekiguchi Y, Im R-H, et al. Age-related decrease of IF5/BTG4 in oral and respiratory cavities in mice. Biosci Biotechnol Biochem [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 5];79:960–8. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09168451.2015.1008976

544. Garciá SR, Deprez M, Lebrigand K, Cavard A, Paquet A, Arguel MJ, et al. Novel dynamics of human mucociliary differentiation revealed by single-cell RNA sequencing of nasal epithelial cultures. Dev. Company of Biologists Ltd; 2019;146.

545. Ruat M, Roudaut H, Ferent J, Traiffort E. Hedgehog trafficking, cilia and brain functions. Differentiation [Internet]. 2012 [cited 2020 Apr 8];83:S97-104. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22169886

546. Jain R, Pan J, Driscoll JA, Wisner JW, Huang T, Gunsten SP, et al. Temporal relationship between primary and motile ciliogenesis in airway epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. American Thoracic Society; 2010;43:731–9.

547. Goetz SC, Anderson K V. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. Nat Rev Genet [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 1];11:331–44. Available from: http://www.nature.com/articles/nrg2774

548. Kim J, Hsia EYC, Brigui A, Plessis A, Beachy PA, Zheng X. The role of ciliary trafficking in Hedgehog receptor signaling. Sci Signal [Internet]. American Association for the Advancement of Science; 2015 [cited 2020 Apr 11];8:ra55. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26038600

549. Bellusci S, Furuta Y, Rush MG, Henderson R, Winnier G, Hogan BLM. Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. Development. 1997;124:53–63.

550. Pepicelli C V., Lewis PM, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. Curr Biol. Current Biology Ltd; 1998;8:1083–6.

551. Villavicencio EH, Walterhouse DO, Iannaccone PM. The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. Am J Hum Genet [Internet]. University of Chicago Press; 2000 [cited 2020 Apr 11];67:1047–54. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11001584

552. Cigna N, Farrokhi Moshai E, Brayer S, Marchal-Somme J, Wémeau-Stervinou L, Fabre A, et al. The hedgehog system machinery controls transforming growth factor-β-dependent myofibroblastic differentiation in humans: involvement in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Pathol [Internet]. 2012 [cited 2020 Apr 11];181:2126–37. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23031257

553. Peng T, Frank DB, Kadzik RS, Morley MP, Rathi KS, Wang T, et al. Hedgehog actively maintains adult lung quiescence and regulates repair and regeneration. Nature [Internet]. Nature Publishing Group; 2015 [cited 2020 Apr 11];526:578–82. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26436454

554. Henkin RI, Abdelmeguid M, Knöppel AB. On the mechanism of smell loss in patients with Type II congenital hyposmia. Am J Otolaryngol - Head Neck Med Surg [Internet]. W.B. Saunders; 2016 [cited 2020 Apr 11];37:436–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27221029

555. Henkin RI, Hosein S, Stateman WA, Knöppel AB, Abdelmeguid M. Improved smell function with increased nasal mucus sonic hedgehog in hyposmic patients after treatment with oral theophylline. Am J Otolaryngol - Head Neck Med Surg [Internet]. W.B. Saunders; 2017 [cited 2020 Apr 11];38:143–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27923495

556. Shah AS, Yehuda BS, Moninger TO, Kline JN, Welsh MJ. Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. Science (80-). 2009;325:1131–4.

557. Hoch L, Faure H, Roudaut H, Schoenfelder A, Mann A, Girard N, et al. MRT-92 inhibits Hedgehog signaling by blocking overlapping binding sites in the transmembrane domain of the Smoothened receptor. FASEB J [Internet]. FASEB; 2015 [cited 2020 Apr 8];29:1817–29. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25636740

558. Lichti-Kaiser K, ZeRuth G, Kang HS, Vasanth S, Jetten AM. Gli-Similar Proteins. Their Mechanisms of Action, Physiological Functions, and Roles in Disease. Vitam Horm. Academic Press Inc.; 2012. p. 141–71.

559. Walentek P, Quigley IK, Sun DI, Sajjan UK, Kintner C, Harland RM. Ciliary transcription factors and miRNAs precisely regulate Cp110 levels required for ciliary adhesions and ciliogenesis. Elife [Internet]. eLife Sciences Publications Ltd; 2016 [cited 2020 Apr 10];5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27623009

560. Mercey O. 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. http://www.theses.fr. Côte d'Azur; 2016 Dec.

561. Ma J-B, Yuan Y-R, Meister G, Pei Y, Tuschl T, Patel DJ. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the A. fulgidus Piwi protein. Nature [Internet]. 2005 [cited 2020 Apr 14];434:666–70. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15800629

562. Haynes J, Srivastava J, Madson N, Wittmann T, Barber DL. Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. Mol Biol Cell [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 5];22:4750–64. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22031288

563. Doi Y, Itoh M, Yonemura S, Ishihara S, Takano H, Noda T, et al. 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. J Biol Chem [Internet]. 1999 [cited 2019 Jul 5];274:2315–21. Available from: http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.274.4.2315

564. Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE, et al. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. Science (80-). 2010;328:1566–9.

565. De Jong EM, Douben H, Eussen BH, Felix JF, Wessels MW, Poddighe PJ, et al. 5q11.2 deletion in a patient with tracheal agenesis. Eur J Hum Genet. 2010;18:1265–8.

566. Barbier P, Dorléans A, Devred F, Sanz L, Allegro D, Alfonso C, et al. Stathmin and interfacial microtubule inhibitors recognize a naturally curved conformation of tubulin dimers. J Biol Chem [Internet]. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.; 2010 [cited 2020 Apr 13];285:31672–81. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20675373

567. Ishikawa H, Marshall WF. Intraflagellar transport and ciliary dynamics. Cold Spring Harb Perspect Biol. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2017;9.

568. Hilton LK, Gunawardane K, Kim JW, Schwarz MC, Quarmby LM. The kinases LF4 and CNK2 control ciliary length by feedback regulation of assembly and disassembly rates. Curr Biol [Internet]. 2013 [cited 2020 Apr 11];23:2208–14. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24184104

569. Neugebauer JM, Amack JD, Peterson AG, Bisgrove BW, Yost HJ. FGF signalling during
embryo development regulates cilia length in diverse epithelia. Nature [Internet]. 2009
[cited 2020 Apr 13];458:651–4. Available from:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19242413

570. Wegener KL, Basran J, Bagshaw CR, Campbell ID, Roberts GCK, Critchley DR, et al. Structural basis for the interaction between the cytoplasmic domain of the hyaluronate receptor layilin and the talin F3 subdomain. J Mol Biol [Internet]. 2008 [cited 2019 Jul 3];382:112–26. Available from:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283608008255

571. Bono P, Cordero E, Johnson K, Borowsky M, Ramesh V, Jacks T, et al. Layilin, a cell surface hyaluronan receptor, interacts with merlin and radixin. Exp Cell Res [Internet]. Academic Press Inc.; 2005 [cited 2020 Apr 13];308:177–87. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15913605

572. Forteza R, Lieb T, Aoki T, Savani RC, Conner GE, Salathe M. Hyaluronan serves a novel role in airway mucosal host defense. FASEB J [Internet]. Wiley; 2001 [cited 2020 Apr 13];15:2179–86. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11641244

573. Zahm J-M, Milliot M, Bresin A, Coraux C, Birembaut P. The effect of hyaluronan on airway mucus transport and airway epithelial barrier integrity: potential application to the cytoprotection of airway tissue. Matrix Biol [Internet]. 2011 [cited 2020 Apr 13];30:389–95. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21839834

574. Winkler GS. The mammalian anti-proliferative BTG/Tob protein family. J Cell Physiol
[Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 5];222:66–72. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.21919

575. Bao J, Li D, Wang L, Wu J, Hu Y, Wang Z, et al. MicroRNA-449 and microRNA-34b/c function redundantly in murine testes by targeting E2F transcription factor-retinoblastoma protein (E2F-pRb) pathway. J Biol Chem [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 1];287:21686–98. Available from: http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M111.328054

576. Rovillain E, Mansfield L, Lord CJ, Ashworth A, Jat PS. An RNA interference screen for identifying downstream effectors of the p53 and pRB tumour suppressor pathways involved in senescence. BMC Genomics [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 5];12:355. Available from: http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-12-355

577. Walentek P, Quigley IK, Sun DI, Sajjan UK, Kintner C, Harland RM. Ciliary transcription factors and miRNAs precisely regulate Cp110 levels required for ciliary adhesions and ciliogenesis. Elife [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 5];5. Available from: https://elifesciences.org/articles/17557

578. Pummila M, Fliniaux I, Jaatinen R, James MJ, Laurikkala J, Schneider P, et al. Ectodysplasin has a dual role in ectodermal organogenesis: inhibition of Bmp activity and induction of Shh expression. Development [Internet]. 2007 [cited 2020 Apr 13];134:117–25. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17164417

579. Li L, Grausam KB, Wang J, Lun MP, Ohli J, Lidov HGW, et al. Sonic Hedgehog promotes proliferation of Notch-dependent monociliated choroid plexus tumour cells. Nat Cell Biol [Internet]. Nature Publishing Group; 2016 [cited 2020 Apr 13];18:418–30. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26999738

580. Bangs F, Anderson K V. Primary cilia and Mammalian Hedgehog signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2017;9.

581. Shah AS, Farmen SL, Moninger TO, Businga TR, Andrews MP, Bugge K, et al. Loss of Bardet-Biedl syndrome proteins alters the morphology and function of motile cilia in airway epithelia. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2008 [cited 2020 Apr 11];105:3380–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18299575

582. Brown NE, Murcia NS. Delayed cystogenesis and increased ciliogenesis associated with the re-expression of polaris in Tg737 mutant mice. Kidney Int. Blackwell Publishing Inc.; 2003;63:1220–9.

583. Warner JF, McCarthy AM, Morris RL, McClay DR. Hedgehog signaling requires motile cilia in the sea urchin. Mol Biol Evol [Internet]. 2014 [cited 2020 Apr 12];31:18–22. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24124205

584. Benadiba C, Magnani D, Niquille M, Morlé L, Valloton D. The Ciliogenic Transcription Factor RFX3 Regulates Early Midline Distribution of Guidepost Neurons Required for Corpus Callosum Development. PLoS Genet [Internet]. 2012 [cited 2020 Apr 12];8:1002606. Available from: www.plosgenetics.org

585. Shi J, Zhao Y, Galati D, Winey M, Klymkowsky MW. Chibby functions in Xenopus ciliary assembly, embryonic development, and the regulation of gene expression. Dev Biol [Internet]. Academic Press Inc.; 2014 [cited 2020 Apr 13];395:287–98. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220153

586. Walentek P, Hagenlocher C, Beyer T, Müller C, Feistel K, Schweickert A, et al. ATP4 and ciliation in the neuroectoderm and endoderm of Xenopus embryos and tadpoles. Data Br. Elsevier Inc.; 2015;4:22–31.

587. Rawlins EL, Hogan BLM. Intercellular growth factor signaling and the development of

mouse tracheal submucosal glands. Dev Dyn [Internet]. 2005 [cited 2020 Apr 13];233:1378– 85. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15973734

588. Carlini F, Picard C, Garulli C, Piquemal D, Roubertoux P, Chiaroni J, et al. Bronchial Epithelial Cells from Asthmatic Patients Display Less Functional HLA-G Isoform Expression. Front Immunol. 2017;8:6.

589. Gras D, Chanez P, Vachier I, Petit A, Bourdin A. Bronchial epithelium as a target for innovative treatments in asthma. Pharmacol Ther. Elsevier Inc.; 2013;140:290–305.

590. Trapnell C, Cacchiarelli D, Grimsby J, Pokharel P, Li S, Morse M, et al. The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. Nat Biotechnol. 2014;32:381–6.

591. Wolf FA, Hamey FK, Plass M, Solana J, Dahlin JS, Göttgens B, et al. PAGA: graph abstraction reconciles clustering with trajectory inference through a topology preserving map of single cells. Genome Biol. Genome Biology; 2019;20:59.

592. Setty M, Kiseliovas V, Levine J, Gayoso A, Mazutis L, Pe'er D. Characterization of cell fate probabilities in single-cell data with Palantir. Nat Biotechnol. Springer US; 2019;37:451–60.

593. Leung C, Wadsworth SJ, Yang SJ, Dorscheid DR. Structural and functional variations in human bronchial epithelial cells cultured in air liquid interface using different growth media. Am J Physiol Cell Mol Physiol. American Physiological Society; 2020;