

Rôle de la villine dans la plasticité et la réparation de l'épithélium intestinal

Chez l'adulte, la muqueuse intestinale se caractérise par un renouvellement rapide et perpétuel de l'épithélium le long de l'axe crypte/villosité, bien documenté aujourd'hui tant sur le plan cinétique que morphogénétique. Ce processus dynamique de renouvellement requiert la production des quatre types cellulaires différenciés de l'épithélium intestinal à partir de cellules souches pluripotentes présentes dans la profondeur des cryptes (*m/s* 1996, n° 4, p. 517). Il se poursuit par la migration des cellules différenciées le long des villosités et s'achève par leur élimination dans la lumière intestinale, lorsqu'elles atteignent le sommet des villosités. Ce processus implique une régulation stricte entre plusieurs mécanismes cellulaires (comme la signalisation, la prolifération, la différenciation, l'adhérence, la migration et l'apoptose), contrôlés par des gènes particuliers.

Les cellules épithéliales intestinales présentent une remarquable polarité cellulaire déterminée par deux domaines membranaires distincts, la membrane basolatérale et le domaine apical. Celui-ci est caractérisé par la présence de très nombreuses digitations qui constituent une structure très organisée, la bordure en brosse [1]. La villine, identifiée au début des années 1980 par le groupe de K. Weber, est une protéine localisée dans les microvillosités de la bordure en brosse des entérocytes et des cellules du tubule proximal du rein. La villine se lie à l'actine et, *in vitro*, a une action sur l'actine qui dépend de la concentration intracellulaire de calcium : à faible concentration de Ca^{2+} , elle permet la mise en faisceau

des filaments d'actine, tandis qu'à forte concentration de Ca^{2+} , elle les fragmente [2]. L'obtention de l'ADN complémentaire complet codant pour la villine humaine [3] nous a permis d'analyser l'effet morphogénétique de cette protéine dans des fibroblastes qui en sont normalement dépourvus [4, 5]. En effet, la surexpression de la villine dans ces cellules induit la formation, sur leur face dorsale, de prolongements membranaires spectaculaires, constitués d'actine filamenteuse et de villine. Ce processus est consécutif à une quasi-disparition des câbles de *stress*, riches en actine, présents sur la face ventrale des cellules. L'obtention de mutants de la villine a révélé le rôle crucial, dans la formation des faisceaux de filaments d'actine, d'un motif d'acides aminés chargés correspondant à la séquence KKEK, et situé à l'extrémité carboxy-terminale du domaine *headpiece* contenant les sites de liaison à l'actine et au Ca^{2+} [6, 7]. Inversement, la suppression de l'expression de la villine dans des cellules épithéliales coliques $CaCO_2$ (qui expriment normalement la villine), empêche l'assemblage de la bordure en brosse [8]. Ces expériences *in vitro* ont constitué la base rationnelle de notre démarche expérimentale pour démontrer le rôle fonctionnel de la villine *in vivo*.

En collaboration avec M. Cohen Tannoudji et C. Babinet (Institut Pasteur, Paris, France), nous avons obtenu des souris invalidées (*vill^{-/-}*) pour le gène de la villine. Les souris mutantes ne présentent pas de pathologie particulière dans les conditions standard d'élevage. A notre grande surprise,

l'analyse de l'intestin en microscopie électronique à transmission a révélé que, ni l'assemblage des microvillosités, ni l'organisation du réseau de microvillosités ne sont affectés par l'absence de villine. L'expression ou la localisation des différentes protéines présentes dans la bordure en brosse (ezrine, BBM1, isoformes de fimbrine, actine, sucrase-isomaltase, aminopeptidase neutre...) ne sont pas non plus modifiées chez les souris mutantes. Ainsi, ces résultats suggèrent que, *in vivo*, le rôle de la villine dans la formation des faisceaux de filaments d'actine est soit redondant soit compensé par d'autres mécanismes. Ils illustrent la complexité des interactions protéiques qui se mettent en place au cours de l'embryogenèse et/ou pendant l'organogenèse au niveau de la cellule, du tissu, ou de l'organe.

Si la villine n'est pas nécessaire pour la mise en faisceau des filaments d'actine *in vivo*, qu'en est-il de la fragmentation des filaments d'actine, processus dépendant de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire ? Les conséquences de l'absence de villine sur la dynamique des microfilaments d'actine ont été étudiées *in vitro*, sur des préparations de bordures en brosse, et *in vivo*, par des approches pharmacologiques et physiopathologiques. Les études *in vitro* ont montré que la bordure en brosse des souris mutantes est plus rigide et plus stable que celle des souris sauvages, l'ajout de calcium n'entraînant la formation de vésicules que chez les souris sauvages. Ces résultats confirment le rôle de la villine dans la fragmentation des filaments d'actine des microvillo-

sités. *In vivo*, toutes les manœuvres augmentant la concentration intracellulaire de calcium des entérocytes (comme l'activation des récepteurs muscariniques) induisent une fragmentation de l'actine des microvillosités (détectée par le marquage par la phalloïdine), mais uniquement chez les souris sauvages.

On sait que l'administration par voie orale de dextran, sous forme de sodium sulfate, induit des lésions importantes de la muqueuse colique chez la souris. Après 13 jours de traitement, la survie des souris mutantes ($36 \pm 9,6\%$) est nettement inférieure à celle des souris sauvages ($70 \pm 8,8\%$), et leurs lésions coliques beaucoup plus sévères. Il semble donc que l'absence de villine limite la réparation des lésions. On peut émettre l'hypothèse d'un rôle de la villine dans la réorganisation des filaments d'actine et donc dans la mobilité et l'organisation des cellules.

En conclusion, *in vivo*, la villine est responsable, dans les cellules intestinales, de la fragmentation de l'actine dépendante du calcium [7], et est impliquée dans la plasticité épithéliale induite par différents stimulus (figure 1). Elle semble donc avoir un rôle majeur dans la dynamique des filaments d'actine et la réorganisation cellulaire au cours de diverses situations physiologiques (régime ou jeûne) ou pathologiques (infections, blessures ou stress), processus mettant en jeu les propriétés de motilité cellulaire et/ou de réparation tissulaire. Ces résultats illustrent une fois de plus la complexité des stratégies expérimentales nécessaires pour analyser le rôle fonctionnel de tel ou tel gène au sein d'un organisme. Ils démontrent aussi que l'absence initiale d'un phénotype informatif chez des animaux *knock out* peut conduire à rechercher des fonctions, peut-être plus subtiles mais plus intéressantes et jusqu'alors restées dans l'ombre.

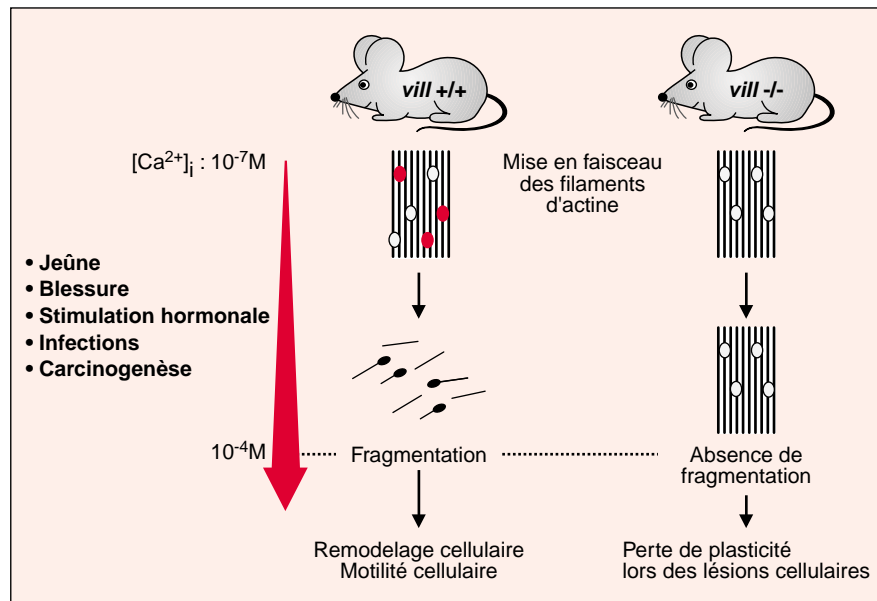


Figure 1. **Rôle de la villine dans la fragmentation des filaments d'actine et sur la réparation de l'épithélium intestinal.** La mise en faisceau des filaments d'actine *in vivo* n'est pas affectée par l'absence de villine (*vill -/-*). En présence de villine (*+/+*), la fragmentation des filaments d'actine (secondaire à l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire) permet le remodelage et la motilité cellulaire. L'absence de villine (*-/-*) empêche la fragmentation des filaments d'actine, leur réorganisation et la réparation tissulaire.

1. Arpin M, Friederich E. Cytoskeletal components in intestinal brush border morphogenesis: an evaluation of their function. In: Fleming TP, ed. *Epithelial Organization and Development*. London: Chapman and Hall, 1992.
2. Friederich E, Louvard D. Villin. *Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins*. In: Kreis T, Vale R, eds. New York: Sambrook and Tooze at Oxford University Press, 1999: 175-9.
3. Arpin M, Pringault E, Finidori J, et al. Sequence of human villin: a large duplicated domain homologous with other actin-severing proteins and a unique small carboxy-terminal domain related to villin specificity. *J Cell Biol* 1988; 107: 1759-66.
4. Friederich E, Huet C, Arpin M, Louvard D. Villin induces microvilli growth and actin redistribution in transfected fibroblasts. *Cell* 1989; 59: 461-75.
5. Friederich E, Pringault E, Arpin M, Louvard D. From the structure to the function of villin, an actin-binding protein of the brush border. *Bioessays* 1990; 12: 403-8.
6. Friederich E, Vancompernelle K, Huet C, et al. An actin-binding site containing a conserved motif of charged amino acid residues is essential for the morphogenic effect of villin. *Cell* 1992; 70: 81-92.

7. Ferrary E, Cohen-Tannoudji M, Pehau-Arnudet G, et al. *In vivo*, villin is required for Ca^{2+} -dependent F-actin disruption in intestinal brush borders. *J Cell Biol* 1999; 146: 819-29.
8. Costa de Beauregard MA, Pringault E, Robine S, Louvard D. Suppression of villin expression by antisense RNA impairs brush border assembly in polarized epithelial intestinal cells. *EMBO J* 1995; 14: 409-21.

Sylvie Robine
Daniel Louvard*

Morphogénèse et signalisation cellulaires, UMR 144, Cnrs/Institut Curie, 26, rue d'Ulm, 75231 Paris Cedex 05, France.

* Les auteurs de cette nouvelle remercient tous les chercheurs, étudiants et techniciens qui ont contribué au cours de ces nombreuses années à l'ensemble de ce travail et dont les noms apparaissent dans la liste des références.