



**HAL**  
open science

# Étude de la fonction de la protéine Bug22p dans différents organismes

Chloé Laligné

► **To cite this version:**

Chloé Laligné. Étude de la fonction de la protéine Bug22p dans différents organismes. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA112170 . tel-00746881

**HAL Id: tel-00746881**

**<https://theses.hal.science/tel-00746881>**

Submitted on 30 Oct 2012

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS XI  
ECOLE DOCTORALE GENES, GENOMES, CELLULES

Présentée par Chloé Laligné

Pour obtenir le grade de  
Docteur es sciences de l'Université Paris XI

# Étude de la fonction de la protéine Bug22p dans différents organismes

Soutenance le 29 septembre 2011

## Composition du jury

Jean-Michel ROSSIGNOL *Président du jury*  
Renata BASTO *Rapporteur*  
Sophie SAUNIER *Rapporteur*  
David BOUCHEZ *Examineur*  
France KOLL *Directrice de thèse*



## Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire  
ARN : Acide RiboNucléique  
*At* : *Arabidopsis thaliana*  
ATP : Adénosine TriPhosphate  
Bb : Basal body  
BBS : Bardet Biedl Syndrome  
BUG : Basal body up Regulated Gene  
*Ce* : *Caenorhabditis elegans*  
CLS : Ciliary Localisation Signal  
*Cr* : *Chlamydomonas reinhardtii*  
*Dm* : *Drosophila melanogaster*  
*Dr* : *Danio rerio*  
DUF : Domain with Unknown Function  
EM : Electron Microscopy  
FAP : Fibroblast Activation Protein  
FS : Fibrous Sheath  
GDP : Guanosine diphosphate  
GFP : Green Fluorescent Protein  
GTP : Guanosine triphosphate  
GTL3 : Gene Trap Locus 3  
*Hs* : *Homo sapiens*  
IDA ; Inner Dynein Arm  
IFT : Intra Flagellar Transport  
IMCD : Inner Medullary Collecting Duct  
JBTS : *JouBerT* Syndrome  
K : lysine  
kDa : Kilo-Dalton  
MDCK : Madin-Darby Canine Kidney  
MKS : Meckel Syndrom  
MTOC : MicroTubule Organizing Center  
NLS : Nuclear Localisation Signal  
NPHP : NePHronoPhtisis  
OA : Oral apparatus  
ODA : Outer Dynein Arm  
ODFs : Outer Dense Fibers  
PCD : Primary ciliary dyskinesia  
PDGFR $\alpha$  : Platelet-Derived Growth Factor Receptors *alpha*  
PKD : Polycystic Kidney Disease  
*Pp* : *Physcomitrella patens*  
PPB : Pre-Prophase Band  
*Pt* : *Paramecium tetraurelia*  
RFP : Red Fluorescent Protein  
RFX : Regulatory factor X  
RPE1 : Retinal Pigment Epithelial  
SEM : Scanning Electron Microscopy  
TTLL : Tubuline Tyrosine ligase like  
TZ : Transition Zone  
UA : Unités arbitraires



# Table des matières

Liste des abréviations .....	- 1 -
Table des matières .....	- 2 -
<b>Introduction .....</b>	<b>- 5 -</b>
Introduction générale .....	- 6 -
Le cil, structure générale.....	- 8 -
Le corps basal.....	- 8 -
La zone de transition.....	- 9 -
Le compartiment ciliaire.....	- 10 -
Le cil, deux fonctions principales.....	- 15 -
La sensorialité.....	- 15 -
La motilité.....	- 16 -
La diversité des types cellulaires ciliés chez les vertébrés .....	- 18 -
Le cil, un organe ubiquitaire chez l'adulte .....	- 18 -
Les cils dans l'embryogénèse, cas des cils du nœud embryonnaire .....	- 21 -
Les pathologies ciliaires.....	- 22 -
Les ciliopathies .....	- 22 -
Cils et cancers, rôle du cil primaire.....	- 23 -
Des modèles d'étude des cils.....	- 25 -
<i>Mus musculus</i> .....	- 25 -
<i>Danio rerio</i> .....	- 26 -
<i>Caenorhabditis elegans</i> .....	- 26 -
<i>Drosophila melanogaster</i> .....	- 28 -
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	- 28 -
<i>Paramecium tetraurelia</i> et <i>Tetrahymena thermophila</i> .....	- 29 -



Des protéines centriolaires retrouvées dans des organismes sans cil ni centriole .....	- 31 -
Les kinésines .....	- 31 -
Les centrines .....	- 32 -
Les protéines de type FOP .....	- 33 -
La katanine .....	- 34 -
Les tubuline-tyrosine-ligases-like .....	- 35 -
 Choix de la protéine Bug22p comme sujet d'étude .....	 - 36 -
 <b>Matériel et méthodes.....</b>	 <b>- 38 -</b>
Etude de PtBug22p chez la paramécie : .....	- 39 -
Présentation du matériel biologique .....	- 39 -
Une voie de sécrétion régulée.....	- 42 -
Deux types de noyaux .....	- 43 -
Cils et corps basaux .....	- 43 -
Témoins utilisés.....	- 45 -
Construction des plasmides d'expression :.....	- 45 -
Immunofluorescence <i>in situ</i> .....	- 46 -
 Etude d'AtBug22p chez les plantes terrestres.....	 - 47 -
Construction du plasmide pour l'extinction génique, pGREEN-AtBUG22 .....	- 47 -
Construction des plasmides d'expression permettant l'expression d'AtBug22p avec une étiquette fluorescente à sa partie N terminale.....	- 47 -
Construction des plasmides d'expression permettant l'expression d'AtBug22p avec une étiquette fluorescente à sa partie C terminale.....	- 48 -
Expression transitoire dans les feuilles de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	- 49 -
Expression stable d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	- 49 -
 Etude de HsBug22p dans les cellules de mammifère en culture .....	 - 50 -
Anticorps et plasmides : .....	- 50 -
Culture des cellules pour l'immunofluorescence : .....	- 50 -
Culture des cellules et transfection : .....	- 51 -
Immunofluorescence :.....	- 51 -
 <b>Résultats .....</b>	 <b>- 52 -</b>
Introduction.....	- 53 -
BUG22 dans les différentes espèces eucaryotes.....	- 54 -
Des analyses à haut débits.....	- 54 -
Conclusion .....	- 59 -



Chapitre I. Analyse de la fonction de Bug22p chez la paramécie .....	- 60 -
Implication de PtBug22p dans la détermination du battement ciliaire .....	- 60 -
Intéreactants potentiels de PtBug22p .....	- 65 -
PtBug22p est-elle une protéine du complexe IFT ?.....	- 70 -
Un site d'adressage ciliaire intrinsèque à la séquence protéique de Bug22p .....	- 73 -
 Chapitre II. Analyse de la fonction de Bug22p chez les plantes terrestres .....	- 77 -
Analyse fonctionnelle de la protéine Bug22p.....	- 77 -
Localisation de la protéine Bug22p .....	- 79 -
 Chapitre III. Analyse de la fonction de Bug22p dans les cellules de mammifère en culture .....	- 84 -
Localisation de Bug22p dans les cellules de mammifère en culture.....	- 84 -
Localisation de la protéine endogène avec l'anticorps GTL3.....	- 84 -
Localisation de HsBug22p par fusion à la GFP et effet de la surexpression.....	- 86 -
 Chapitre IV. PtBug22p et les modifications post-traductionnelles des tubulines chez la paramécie.....	- 92 -
 <b>Discussion.....</b>	<b>- 99 -</b>
 <b>Bibliographie .....</b>	<b>- 108 -</b>



# **Introduction**



## Introduction générale

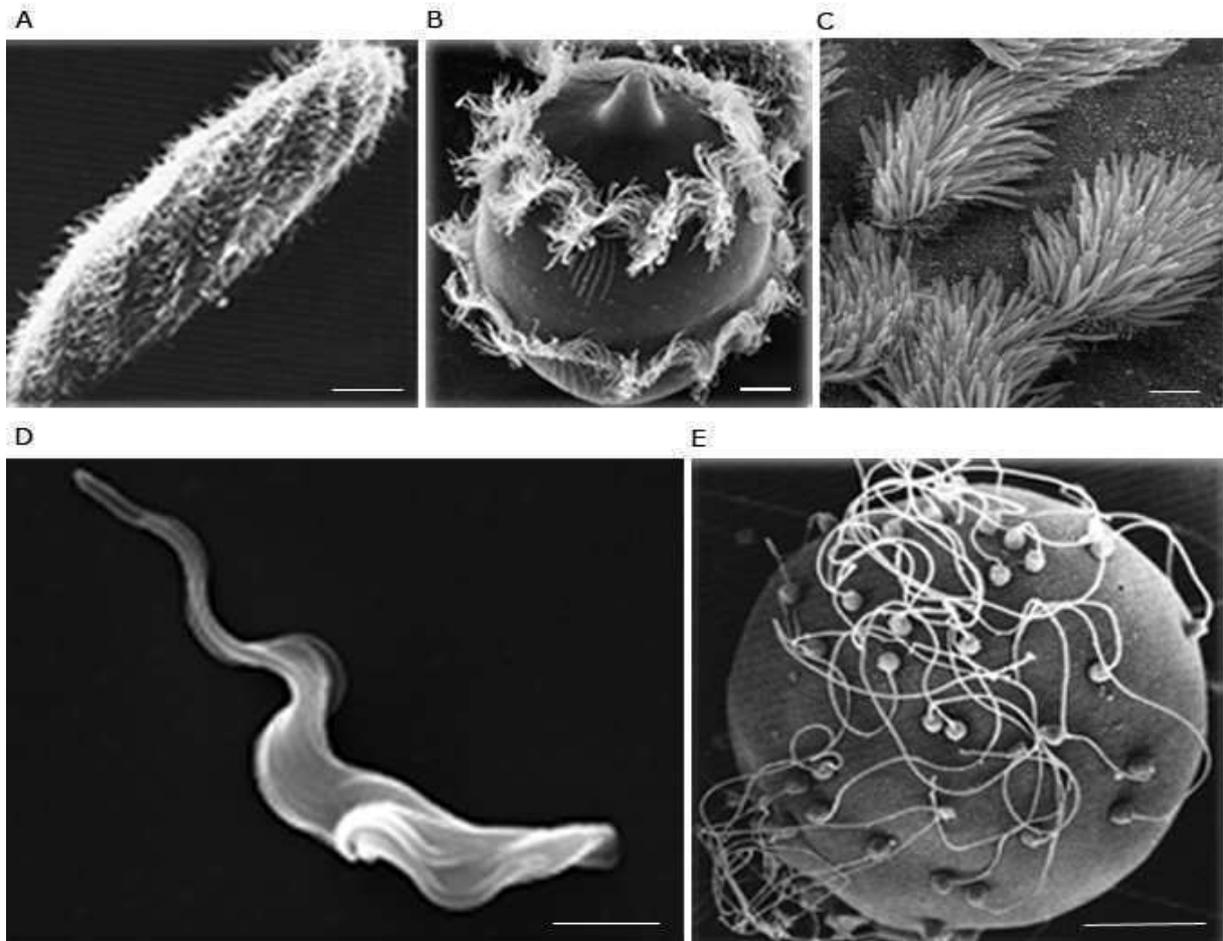
Les cils et flagelles sont des organites qui s'étendent dans l'espace extracellulaire et sont ancrés à la cellule par une structure appelée corps basal. Ubiquitaires, ils ont été extrêmement conservés chez les eucaryotes. Bien que découverts très tôt lors des premières observations structurales, ils ont longtemps été considérés comme des organites nécessaires essentiellement à la motilité et ignorés d'une large proportion de la communauté scientifique. Pourtant dès 1976 Afzelius remarquait que des problèmes respiratoires et de stérilité liés à des défauts de motilité ciliaire étaient souvent associés à des désordres de l'asymétrie droite/gauche et suggérait que le cil pouvait jouer un rôle dans le développement des vertébrés (Afzelius, 1976). Ce rôle dans le développement est maintenant largement reconnu depuis qu'il a été démontré que leur dysfonctionnement pouvait conduire à des maladies humaines associées à d'importants défauts développementaux. Leur étude est devenue maintenant un sujet important de recherche.

Malgré leur grande conservation au cours de l'évolution, les cils ont été perdus dans quelques phyla tels que les plantes terrestres ou la plupart des champignons. Ils ont des fonctions capitales dans des organismes aussi variés que les protistes ou les vertébrés. Dans les phyla où les cils ont disparu, certaines protéines ciliaires ont été conservées, soit parce qu'elles avaient une fonction distincte de la fonction ciliaire, soit parce qu'elles avaient une même fonction dans le cil et le corps cellulaire, comme les tubulines par exemple. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'une de ces protéines, la protéine Bug22p.



Je vais dans l'introduction, rappeler brièvement les données concernant les cils, leur structure, leur mécanisme d'assemblage et leur fonction. Puis, je traiterai du rôle des cils chez les vertébrés et présenterai les principaux défauts liés à leur dysfonctionnement chez l'homme, via notamment l'étude des ciliopathies, ainsi que leur rôle dans certains processus de cancérisation. Je tenterai de montrer l'importance de l'utilisation des organismes modèles pour permettre une meilleure compréhension des mécanismes liés à la fonction ciliaire. Je ferai enfin un bref résumé de l'état des connaissances sur les protéines ciliaires et centriolaires conservées chez les organismes dépourvus de cils et centrioles.

Dans la partie Résultats, je commencerai par présenter l'état de nos connaissances sur la protéine Bug22p quand j'ai débuté ce travail, expliquant ainsi mon choix d'étudier cette protéine. Ensuite, je résumerai mes résultats sur la fonction ciliaire de Bug22p obtenus par une étude fonctionnelle des cils motiles chez la paramécie et je présenterai la publication associée. Enfin, je décrirai l'exploration des autres fonctions de la protéine Bug22p en élargissant les recherches aux plantes et aux cellules de mammifères. Je terminerai par une courte discussion globale de mes résultats, les points spécifiques étant discutés dans chaque partie des Résultats.



**Figure 1: Diversité des types cellulaires ciliés**

Présentation de différents types cellulaires ciliés observés en microscopie électronique à balayage et montrant la diversité d'organismes et de tissus présentant des cils et flagelles. A. *Paramecium tetraurelia*. Barre d'échelle : 20µm. B. *Didinium balbanii*. Barre d'échelle : 20µm. C. Cils d'un épithélium respiratoire de poumon humain. Barre d'échelle : 2µm. D. *Trypanosoma brucei*. Barre d'échelle : 2µm. E. Œuf de palourde entouré de plusieurs spermatozoïdes à sa surface. Barre d'échelle : 50µm.

## Le cil, structure générale

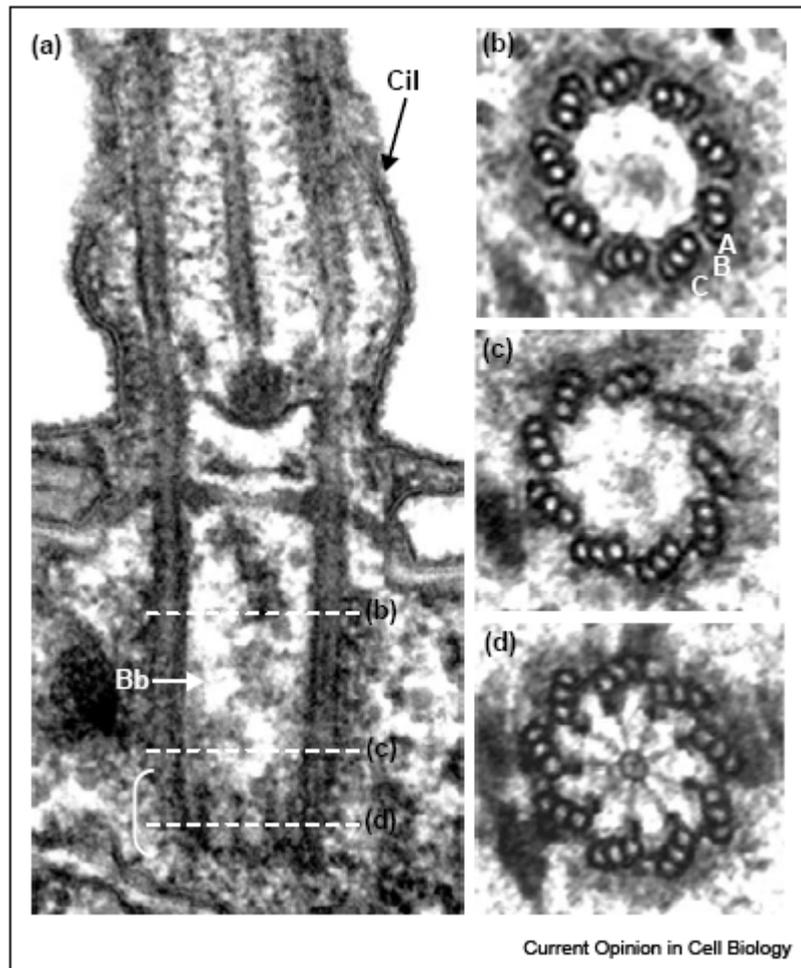
Les cils sont des extensions cellulaires formées d'un cœur cytosquelettique constitué de microtubules. La figure 1 présente différents organismes et cellules ciliées. Bien que l'architecture générale des cils ait été conservée au cours de l'évolution, on observe des variabilités de fonction selon les types cellulaires, les tissus ou les organismes auxquels on s'intéresse. Ainsi, leur nombre, leur longueur, leur position et leur motilité peuvent être hautement variable d'un type cellulaire à l'autre, d'un organisme à l'autre. La différence entre les cils et les flagelles est principalement historique, liée à leur longueur et leur mode de battement, mais les deux organelles disposent d'une architecture générale commune.

La structure ciliaire est ancrée à la membrane plasmique par un corps basal et elle est isolée du milieu extérieur par une membrane prolongeant la membrane plasmique. Ces deux membranes ont des compositions protéiques différentes. Une zone de transition contenant les fibres de transition permet de créer une barrière entre le corps basal et le cil, ce qui fait du cil un compartiment à part entière en ne laissant passer que les protéines spécifiquement ciliaires (Gilula et al, 1972). Le compartiment ciliaire peut être décomposé en trois domaines distincts, le cytosquelette ou axonème, le compartiment soluble et la membrane (Bloodgood, 2000).

### Le corps basal

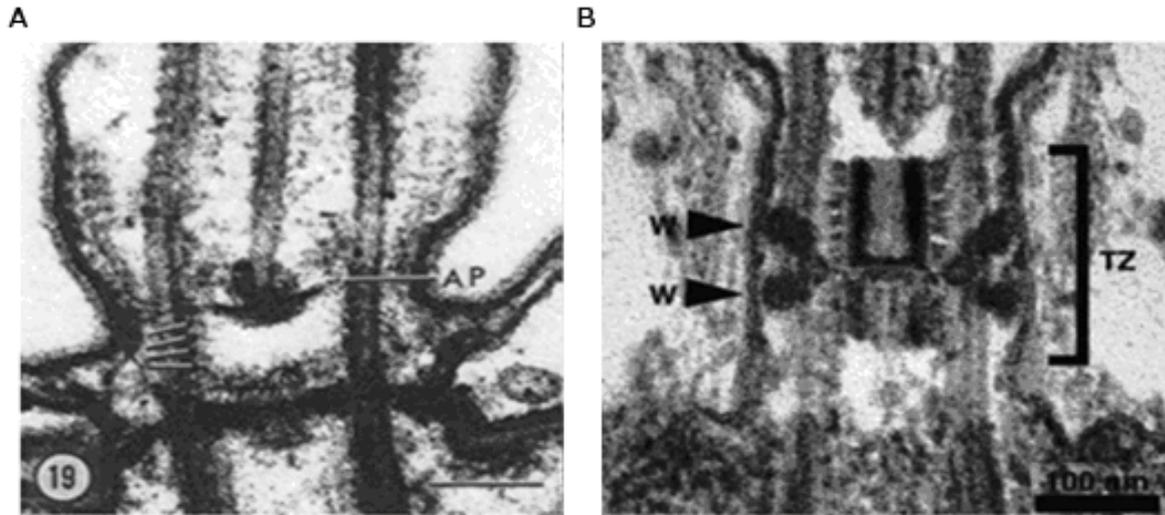
Le corps basal, structure centriolaire ancrée à la membrane plasmique (figure 2 a), qui sert de plateforme à la construction du cil, est composé de 9 triplets de microtubules A, B et C. Les microtubules sont des structures polarisées faites de centaines de sous-unités d'hétérodimères d' $\alpha$ -tubulines et de  $\beta$ -tubulines, assemblées en protofilaments. Dans le cas général, l'association de 13 protofilaments va ensuite former le microtubule. Alors que le





**Figure 2 : Ultrastructure du cil et du corps basal.**

(a). Section longitudinale à travers un corps basal et son cil observés chez la paramécie, *P. tetraurelia* (b) – (d) Sections transversales à différents niveaux du corps basal et montrant la continuité des microtubules, de la partie distale (b) à la partie proximale (d). Les différents empilements des disques du cartwheel peuvent être observés dans la partie proximale du corps basal. D'autres matériels fibreux sont présent : dans le lumen du cylindre microtubulaire et comme un lien entre tubule C des triplets de microtubule et le tubule A du triplet adjacent. Bb : Basal body. Barre d'échelle 2 $\mu$ m. (Photo : Nicole Garreau de Loubresse dans Beisson et Wright, 2003).



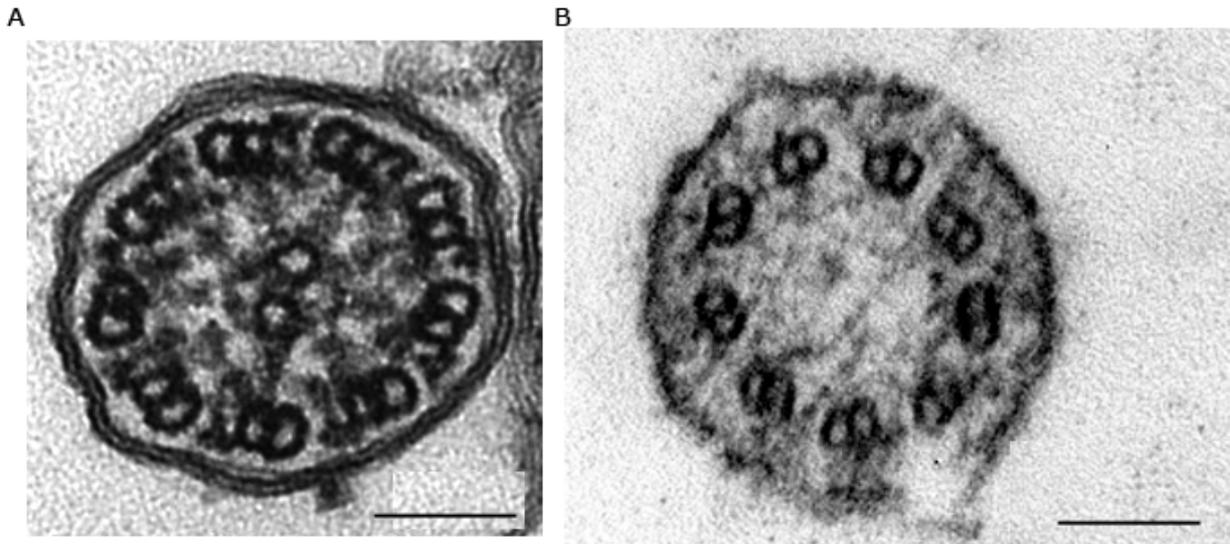
**Figure 3 : Ultrastructure de la zone de transition comparée chez *P. tetraurelia* et *C. reinhardtii***

A. Zone de transition chez la paramécie, *Paramecium tetraurelia*. (Dute et Kung, 1978). AP : Axosomal Plate. B. Zone de transition chez l'algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii* (Betleja et Cole, 2010). TZ : Transition zone. Barres d'échelles: 100nm. Les images, prises en microscopie électronique, présentent l'ultrastructure des zones de transitions, en coupes longitudinales. Les zones de transitions présentées ici montrent deux exemples des grandes variabilités d'architecture des zones de transition. Dans les deux cas, elle est située entre le corps basal et le compartiment ciliaire. Les microtubules externes la traversent et la paire centrale est polymérisée à partir de la partie distale de l'axosome, par contre ces axosomes présentent des caractéristiques structurales différentes. lors que la zone de transition de la paramécie est constituée d'une plaque axosomale, on retrouve un axosome entouré de structures en W chez l'algue verte.

microtubule A du corps basal est complet, les microtubules B et C sont composés chacun de 10 protofilaments et imbriqués dans le microtubule qui le précède (figure 2 b, c, d). Dans la partie proximale du corps basal se trouve le cartwheel (figure 2 d) qui constitue une structure essentielle pour l'initiation de la duplication des corps basaux (Cavalier-Smith, 1974; Dippell, 1968 ; Allen, 1969) et sous-tend la symétrie 9. Il a récemment été démontré que cette symétrie 9 est déterminée par la protéine SAS-6 (Nakazawa, 2007 ; Kitagawa et al., 2011). La dissection moléculaire du processus d'assemblage du corps basal a été effectuée chez différents organismes (pour revues : Beisson et wright, 2003 ; Dawe et al., 2007). Ce mécanisme est également conservé chez la paramécie et a été bien décrit au laboratoire. Parmi les protéines conservées on compte par exemple plusieurs tubulines ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$ ), SAS-6 mais aussi différentes protéines telles que CPAP/SAS-4, Cep135/Bld10 (Ruiz et al., 1999 ; Garreau de Loubresse et al., 2001 ; Dupuis-Williams et al., 2002 ; Klotz et al., 2003 ; Ruiz et al., 2004 ; Jerka-Dziadosz et al., 2010 ; Gogendeau et al., 2011).

### **La zone de transition**

Les cils sont des organelles présentant une composition en lipide et protéines différente de celle du reste de la cellule. Cette différence est engendrée et maintenue par un contrôle strict du passage des protéines du corps cellulaire au cil à travers la zone de transition. La structure de cette région est bien documentée par Gilula et Satir (1972). Pourtant, sa composition protéique est longtemps restée un mystère, mais commence à être élucidée. (Craigie et al., 2010; Williams et al., 2011, Benzing et Schremer, 2011). La zone de transition est une barrière imperméable qui empêche la diffusion libre des vésicules et macromolécules du cytoplasme au cil (Nachury et al., 2010). Bien que l'architecture générale, le mode de fonctionnement et de biogénèse des cils aient été conservés, ils doivent répondre à des besoins différents selon les organismes ou les cellules auxquels ils sont associés. Certaines de ces différences se répercutent sur l'architecture de la zone de transition (figure 3). Sur cette figure, sont comparées les zones de transition de



**Figure 4 : Structure des cils**

Coupes transversales de cils en microscopie électronique. Les cils sont constitués d'un squelette de microtubules organisés en 9 doublets périphériques. A. Ces microtubules peuvent entourer une paire centrale de microtubules, on parle alors de structure 9+2 et le cil est motile (Rompolas et al., 2010). B. En l'absence de paire centrale, il s'agit d'une structure 9+0 et le cil est généralement non motile.

la paramécie *P. tetraurelia* (Dute et Kung, 1978) et de l'algue unicellulaire, *C. reinhardtii* (Betleja et Cole, 2010).

Plusieurs observations suggèrent qu'il existe des similarités entre les mécanismes de transport vers le cil et l'import nucléaire. En particulier, Dishinger et coll. (2010) ont montré que la partie C terminale de Kif17, une des kinésines motrices du transport intraflagellaire, contenait un signal de localisation ciliaire (dit CLS) qui présente de fortes similarités avec les signaux classiques de localisation nucléaire (NLS). Par ailleurs ils ont montré que, tout comme l'import nucléaire, le passage des protéines dans le cil dépend d'un gradient Ran-GTP/Ran-GDP et de l'importin- $\beta$ . Une CLS avait aussi été trouvée dans KAP, une autre kinésine ciliaire qui a pour caractéristique d'être relocalisée du cil vers le noyau durant le cycle mitotique (Morris et al., 2004).

## Le compartiment ciliaire

### L'axonème

L'axonème est composé de 9 doublets de microtubules. Disposé en cylindre, ce squelette axonémal, en prolongement du corps basal, donne aux cils et flagelles leur forme caractéristique. Les paires de microtubules sont constituées d'un microtubule A complet et d'un microtubule B incomplet imbriqué dans le premier, qui prolongent respectivement les microtubules A et B du corps basal.

Il existe deux grandes catégories de cils, les cils motiles et les cils immotiles. Selon le type de cil, les doublets de microtubules entourent (structure de type 9+2) ou non (structure de type 9+0) une paire de microtubules centraux qui sont chacun constitués de 13 protofilaments. Ils sont non jointifs et entourés d'une gaine (figure 4). Les doublets périphériques sont reliés entre eux par des liens de nexine et sont chacun reliés à la paire centrale par les ponts radiaires. Sur chaque microtubule B sont accrochés 2 bras de



dynéines, le bras interne (IDA), et le bras externe (ODA). Ces dynéines sont des protéines motrices qui vont faire le lien entre les paires de microtubules adjacentes et permettre le mouvement ciliaire (Satir et Christensen, 2007 ; Ginger et al., 2008 ; Lindermann et Lesich, 2010). Les cils de structure 9+0 ont été initialement décrits à partir de cils d'épithélium neural de poulet (Sotelo et Trujillo-Cenoz, 1958). Cette structure est définie par l'absence de paire centrale de microtubules, mais nous pouvons aussi noter l'absence des bras internes et externes de dynéines, ainsi que des ponts radiaires. Néanmoins, il a été observé que la présence de bras de dynéines en absence de paire centrale permet la motilité ciliaire (Flock et Duvall, 1965).

Comme la plupart des microtubules, les microtubules axonémaux sont sujets à des modifications post-traductionnelles de leurs tubulines incluant acétylation, détyrosination, polyglutamylation et polyglycylation (pour revue : Verhey et Gaertig, 2007 ; Westermann et Weber, 2003). Les modifications post-traductionnelles des tubulines de type polyglutamylation et polyglycylation forment des chaînes plus ou moins longues d'acides aminés et une seule et même molécule de tubuline peut contenir de multiples types de modifications ou le même type à plusieurs sites. Il en résulte qu'un axonème mature est composé de centaines d'isoformes de tubulines distinctes.

### **La zone des 'singlets'**

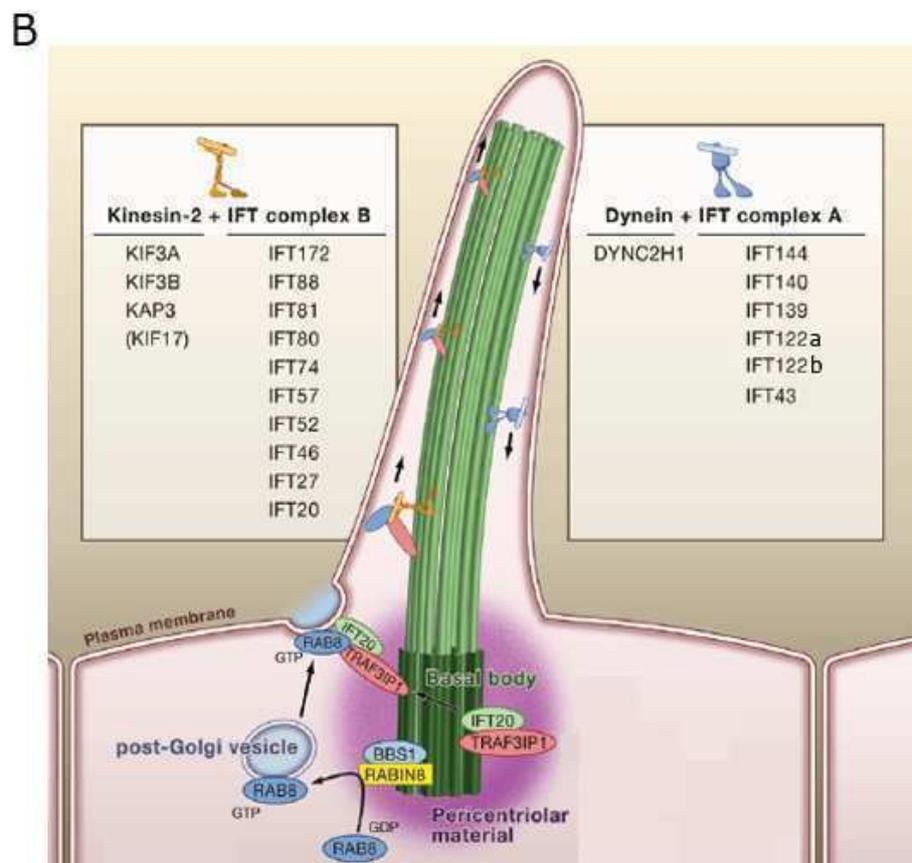
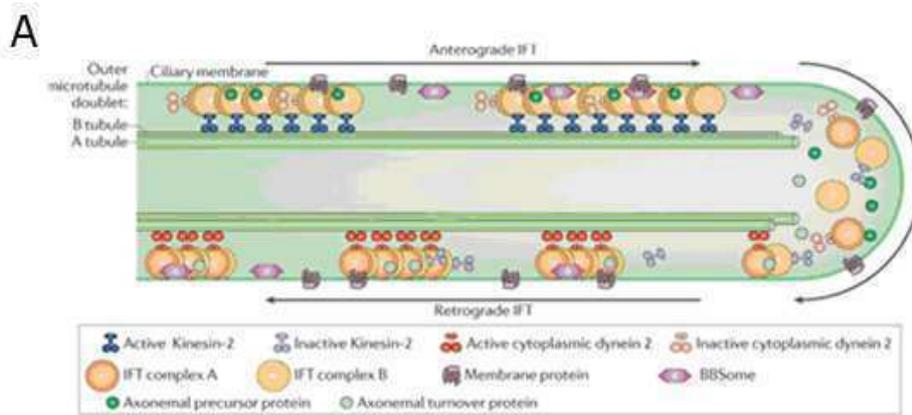
En général, dans la partie distale de l'axonème, le tubule B s'arrête, laissant le tubule A ('singlet') et la paire centrale continuer vers la pointe du cil. Cette architecture est retrouvée dans les cils motiles comme dans les cils immotiles. Le signal de passage entre doublets et 'singlets' ne semble pas régulé de la même manière dans tous les organismes. La transition des doublets vers les 'singlets' apparaît simultanément pour tous les doublets dans les cils épendymaires de rat (Brightman et Palay, 1963) et dans les cils olfactifs de la grenouille (Reese, 1965). Dans les cils primaires de rein de souris, par exemple, la transition semble se faire de façon plus aléatoire (Gluenz et al., 2010). La zone



des 'singlets' dans les cils olfactifs de grenouille apparaît comme très étendue (Reese, 1965) ainsi que dans les cils des photorécepteurs (Insinna et Besharse, 2008) et dans les cils des neurones sensoriels chez le nématode (Snow et al., 2004). Ces cils ont pour point commun d'avoir des fonctions très développées dans la signalisation, ce qui suggère que la partie distale formée de 'singlets' est une zone dédiée aux fonctions sensorielles. Dans les cils olfactifs, des molécules impliquées dans la signalisation cellulaire telles que l'adénylate cyclase III ou la sous unité  $G_{olf\alpha}$  de la protéine G se localisent majoritairement dans cette zone (Menco et al. 1992). La partie distale du cil peut aussi être associée à des mécanismes de motilité. Dans les cils des cellules respiratoires et de l'oviducte, la zone de 'singlets' est rigidifiée par des liens entre les tubules A et la membrane ciliaire. Ces liens permettent de garder une rigidité ciliaire face à la propulsion du mucus dans la trachée et au mouvement de l'ovule dans l'oviducte (revue : Fisch et Dupuis-Williams, 2011).

### **La pointe ciliaire**

La pointe ciliaire est le site de croissance et résorption de l'axonème. Dans cette région, les microtubules périphériques disparaissent pour laisser la paire centrale seule. Les microtubules externes se terminent par une coiffe (Sale et Satir, 1977 ; Dentler, 1980). Il a été constaté des variations de structure dans la pointe ciliaire, mais un point commun à tous les cils motiles et flagelles est la présence d'une structure en filament qui termine la paire centrale et sa coiffe (Dentler, 1984 ; Dentler et Rosenbaum, 1977). Les cils motiles de structure 9+0 possèdent une structure dense liée à la membrane sur la pointe du cil (Bertelli et Regoli, 1994). La coiffe de la paire centrale de microtubules dans les cils motiles pourrait renforcer la structure ciliaire et être requise pour résister aux forces engendrées par le mouvement (revue : Fisch et Dupuis-Williams, 2011).



### Figure 5 : Le transport intraflagellaire

A. Le moteur du transport intraflagellaire antérograde est la Kinesin-II. Il permet le transport des complexes A and B de l'IFT, des protéines axonémales et de la dynéine cytoplasmique de type 2 jusqu'à la pointe du cil. Durant le mouvement antérograde, la Kinesin-II est active et le moteur rétrograde, la dynéine cytoplasmique 2 reste passif. Au bout du cil, le complexe IFT antérograde modifie sa conformation pour laisser place au complexe de transport rétrograde. La dynéine cytoplasmique de type 2 est alors activée et transporte le complexe IFT pendant son mouvement rétrograde, jusqu'au corps cellulaire. Le transport intraflagellaire est impliqué dans la mise en place des protéines transmembranaires et du BBSome notamment. (D'après Ishikawa et Marshall, 2011).

B. Les protéines cargos transportées par le système IFT sont prises en charge au niveau du corps basal. Chez *Chlamydomonas*, le complexe B est composé d'au moins dix protéines IFTs, listées sur la gauche de la figure. Le complexe A est composé quant à lui d'au moins six IFTs listées sur la droite du schéma. Adapté de Gerdes et al., 2009.

## Le cil, assemblage

Les structures ciliaires et flagellaires sont assemblées directement à partir du corps basal et les protéines qui le composent doivent être transportées dans le compartiment ciliaire en formation. Par ailleurs, les cils sont en constant renouvellement protéique. L'apport de protéines doit donc être assuré en continu par un système de transport qui va du cytoplasme jusqu'à la pointe du cil et *vice-versa*. C'est le transport intraflagellaire (IFT) qui est responsable de ce trafic (figure 5).

Les particules IFT découvertes sur des flagelles immobilisés chez *Chlamydomonas* se déplacent de façon bidirectionnelle sous la membrane flagellaire à une vitesse de  $2\mu\text{m/s}$  dans la direction antérograde et  $3,5\mu\text{m/s}$  dans la direction rétrograde (Kozminski et al. 1993). Le mouvement est assuré par l'action de protéines motrices, des kinésines, dans le mouvement antérograde, et des dynéines dans le mouvement rétrograde (figure 5 A).

Les kinésines ont été pour la première fois purifiées à partir d'œufs d'oursins qui ont permis de mettre en évidence un complexe hétérotrimérique constitué de deux sous-unités motrices de 90 et 85 kDa et d'une sous-unité non motrice de 100 kDa. (Cole et al. 1992 ; 1993 ; Scholey et al., 2003). Le nématode *C. elegans* a permis, grâce à l'utilisation de la GFP et à des observations *in vivo*, de suivre la machinerie IFT (Orozco et al., 1999). La principale découverte a été l'identification des moteurs du transport antérograde conduite par deux complexes protéiques : le complexe hétérotrimérique Kinesin-II et le complexe homodimérique OSM-3 (Snow et al., 2004). Ces deux complexes protéiques se déplacent ensemble dans la même particule IFT et agissent de façon redondante dans la zone intermédiaire du cil. Au bout du segment intermédiaire, dans la zone des 'singlets', les deux moteurs se dissocient, le complexe Kinesin-II retourne à la base du cil pendant que le



complexe OSM-3 continue de suivre la particule IFT et ses cargos, augmentant sa vitesse de déplacement jusqu'à la pointe du cil.

L'implication des dynéines cytoplasmiques dans le mouvement rétrograde a été démontrée chez le nématode par l'analyse du mutant *Che3*, muté dans le gène *DHC1b*. En effet, chez ce mutant, le mouvement retour des protéines de l'IFT et notamment de la Kinésin-II est aboli (Signor et al., 1999). Chez *Chlamydomonas*, il a été montré que la délétion de DHC1b empêche elle aussi le mouvement rétrograde des IFT (Pazour et al., 1999).

Le complexe IFT peut être décomposé en deux sous-ensembles: le complexe B qui permet le mouvement antérograde et le complexe A qui permet le mouvement rétrograde (Cole et al., 1998 ; Piperno and Mead, 1997). Les principaux composants des complexes IFT A et IFT B ont été identifiés. La figure 5 B schématise la composition de ces complexes chez *Chlamydomonas*. Nous pouvons noter que le complexe B, mené par la Kinesin-II, est composé d'au moins dix protéines et que le complexe A est, quant à lui, composé d'au moins six protéines différentes (Scholey, 2008).

En plus de permettre la construction du cil et le recyclage des protéines qui le constituent, le système IFT permet une transmission efficace de différents signaux captés par des récepteurs ancrés dans la membrane ciliaire (Ocbina et Anderson, 2008).



## Le cil, deux fonctions principales

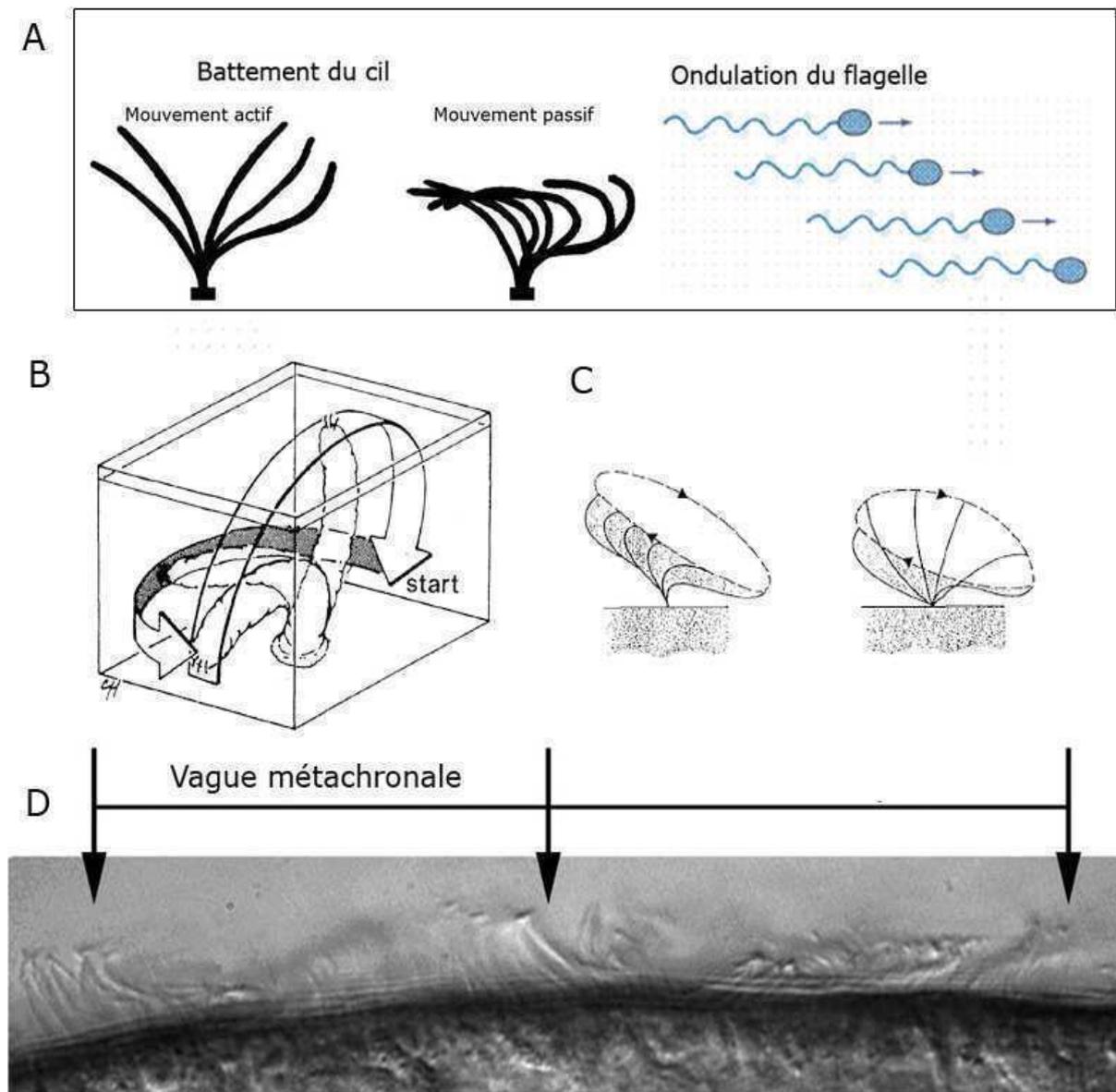
Le cil a une fonction principale, conservée, qui est de sentir son environnement et de transmettre l'information au corps cellulaire. Une seconde fonction est retrouvée dans une grande partie des cils : la motilité. Cette motilité permet le mouvement relatif de la cellule par rapport à son environnement, conduisant ainsi soit au mouvement de la cellule si elle est libre, soit au mouvement du fluide environnant si la cellule est incorporée dans un tissu. Cette motilité, vraisemblablement présente dans l'eucaryote ancestral, a été perdue dans certains cils au cours de l'évolution.

### La sensorialité

C'est grâce à la présence de nombreux récepteurs à sa membrane et au transport intraflagellaire que le cil est une véritable antenne cellulaire capable de capter et de transmettre les variations de son environnement. Ainsi les photorécepteurs sont localisés dans les membranes des extensions ciliaires des cônes et des bâtonnets dans la rétine, tandis que les cils des neurones olfactifs et gustatifs contiennent des chimiorécepteurs sensibles aux molécules odorantes ou gustatives.

Les cils primaires sont aussi impliqués dans la détection de signaux produits à l'intérieur de l'organisme. Parmi ces récepteurs présents à leur surface nous pouvons inclure par exemple les récepteurs PC1 et PC2, impliqués dans la mécano-sensation, et dont les défauts entraînent le développement de kystes rénaux (Pan et al., 2005).

Les récepteurs impliqués dans la régulation de plusieurs voies de signalisation, qui jouent des rôles importants dans le développement et le maintien de la fonctionnalité des



**Figure 6 : Schéma présentant le battement ciliaire.**

A. Comparaison du battement ciliaire, décomposé en 2 phases, mouvement actif et mouvement passif (Rompolas et al, 2010), avec le battement flagellaire, plus proche d'une ondulation. B. Schéma en 3 dimensions illustrant un cycle du battement ciliaire. Le cycle commence avec un battement actif suivi par mouvement latéral de retour. (Edwards et al., 1992). C. Vue de profil du battement ciliaire (Salomon et Tounier, 1991). D. Présentation du mouvement métachrone avec ses deux composantes, antérograde, rapide vers la gauche et rétrograde, plus lent, vers la droite. Le mouvement de fluide est alors dirigé vers la gauche. (Adapté de Rompolas et al, 2010).

tissus comme la voie Hedgehog et la signalisation Wnt, sont également localisés sur la membrane du cil primaire (Veland et al., 2009 ; Lancaster et al., 2009). Au cours du cycle cellulaire, la signalisation Hedgehog prend naissance dans le cil pour permettre le contrôle des progressions des phases G1/S et G2/M via les cyclines D1 et B1 (Adolphe et al., 2006). Après la naissance, la signalisation Hedgehog joue un rôle important dans le développement du cerveau. C'est au sein des cils primaires que cette voie de signalisation régule la formation et la maintenance des précurseurs des neurones granulaires de l'hippocampe, responsables de la neurogénèse de l'adulte (Han et al., 2008). Il a été suggéré que, chez les vertébrés, les IFTs pourraient médier la relocalisation dynamique des composants de voies de signalisations en réponse à l'intervention de différents ligands (Scholey et Anderson, 2006), notamment par l'intermédiaire de KIF7, kinésine motrice impliquée dans la voie de signalisation Hedgehog. Il en résulte que la disruption de la voie Hedgehog mime beaucoup des symptômes retrouvés dans les différentes ciliopathies, tels que la polydactylie et des anomalies du squelette et cranio-faciales.

Enfin les cils motiles des épithéliums respiratoires contiennent des récepteurs de type T2R analogues aux récepteurs gustatifs qui peuvent augmenter la motilité des cils en réponse aux stimuli (Shah et al., 2009).

## **La motilité**

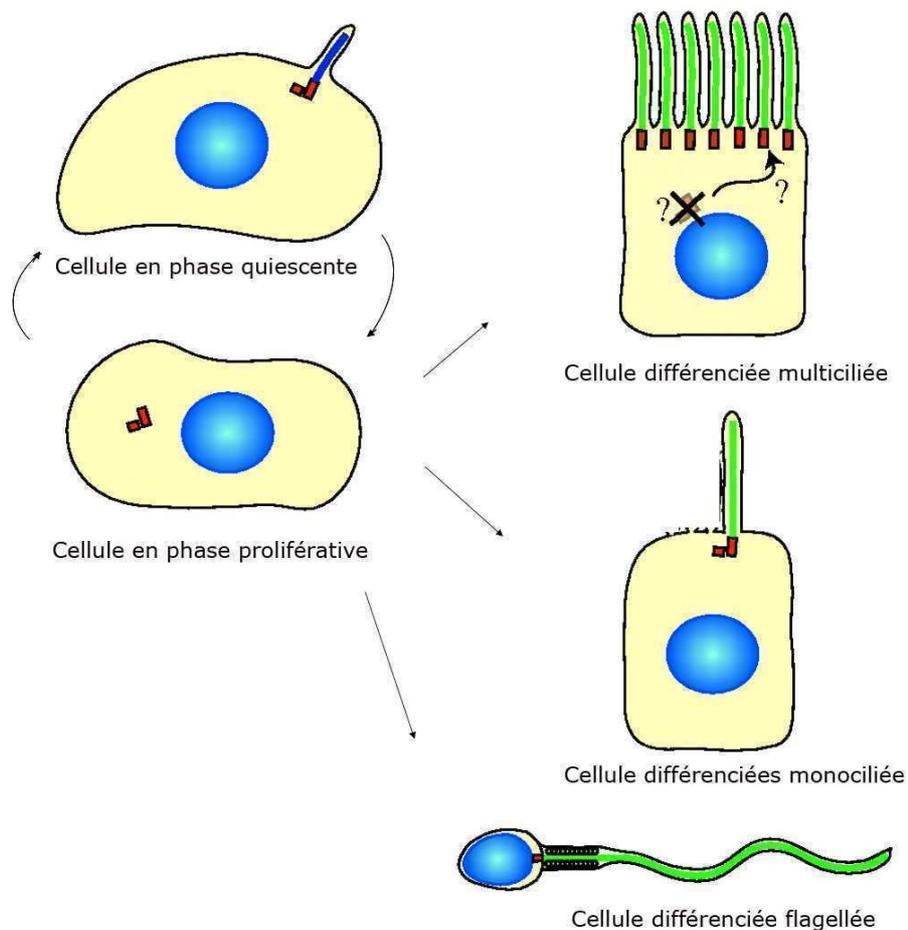
Le rôle du battement ciliaire est la création d'un flux permettant le déplacement d'organismes ou de fluides. L'efficacité du battement ciliaire dépend de nombreux facteurs dont le nombre de cils actifs et de leur coordination, de la vitesse de déplacement de l'extrémité de chaque cil, mais aussi de la forme et de la fréquence du battement. Les cils motiles (structure 9+2) sont distinguables des flagelles par leur mouvement : les cils « battent » alors que les flagelles « ondulent » le long d'un axe (figure 6 A). J'ai choisi de décrire ici plus précisément le battement ciliaire.



Le battement des cils vibratiles comprend deux phases l'une active, l'autre passive, séparées par une phase de repos, de telle sorte que les produits liquides ou les particules brassées par les cils sont déplacés dans une seule direction. Le mouvement du battement ciliaire est présenté sur la figure 6 A et B. Le mouvement actif, ou phase de propulsion, consiste en l'extension du cil, tel un fouet, son extrémité pénétrant à une vitesse élevée dans le milieu extracellulaire. Le cil tendu balaie un certain volume de liquide dans un plan presque perpendiculaire à la surface cellulaire, ce qui permet la poussée du fluide entourant le cil. Durant une courte phase de repos, le cil reste tendu, son extrémité pointant dans la direction du flux, minimisant ainsi la résistance à l'écoulement de celui-ci. Enfin, le mouvement passif permet au cil de revenir à sa position initiale en ne brassant que peu de fluide. Il débute près de la surface cellulaire, le cil se courbe à sa base et, la courbure gagne l'extrémité du cil en le ramenant en arrière. Le cil peut avoir un mouvement rotatif qui minimise encore une propulsion de fluide dans le sens inverse au mouvement (figure 6 C). Un nouveau mouvement actif suit immédiatement cette phase.

Lorsque les cils sont nombreux à la surface d'un organisme unicellulaire ou d'un épithélium cilié, leurs axonèmes se maintiennent parallèles les uns par rapport aux autres. Pour que le battement soit efficace, les cils côte-à-côte doivent fonctionner en groupe de manière synchrone et les cils alignés dans le plan du battement doivent battre de manière décalée dans le temps : chaque cil a un mouvement légèrement en avance par rapport à celui qui le précède, ce qui forme des vagues dites métachronales qui cheminent à la surface de la cellule (figure 6 D).

Les mouvements ciliaires sont dus à l'action des dynéines axonémales qui sont assemblées sous forme de bras accrochés à intervalles réguliers le long des microtubules A. Elles permettent le glissement des microtubules grâce à l'alternance de fixation puis d'hydrolyse d'ATP. Les bras internes (IDA) seraient responsables de l'initiation du battement ciliaire. Les bras externes (ODA) moduleraient la vitesse de ce battement.



**Figure 7 : Les différentes voies de ciliogénèse chez les vertébrés.**

Dans une cellule en phase proliférative, le centrosome, constitué de deux centrioles et de matériel péricentriolaire, organise le réseau de microtubules intracellulaires, aide à la formation du fuseau bipolaire, régule son positionnement lors de la division asymétrique et joue un rôle crucial dans la mise en place et la maintenance de la polarité cellulaire. Lorsque la cellule entre en phase quiescente, elle est capable de nucléer un cil particulier, le cil primaire à partir d'un centriole ancré à la membrane. Cet état cilié est un état réversible et lorsque la cellule entre à nouveau en phase proliférative, le cil se résorbe pour libérer le centriole. La cellule peut aussi se différencier en cellule ciliée pour former des épithéliums ciliés, des cellules monociliées, en générales sensorielles ou des spermatozoïdes flagellés (Adapté de Dawe et al., 2007).

## **La diversité des types cellulaires ciliés chez les vertébrés**

Bien que qu'ils soient présents chez la grande majorité des eucaryotes, c'est chez les vertébrés que l'on trouve la plus grande diversité de cellules ciliées chez un même organisme. Chez l'homme par exemple, les cils interviennent dans de très nombreux processus cellulaires. Comme le montre la figure 7, le cil qui est nucléé à la surface des cellules en phase quiescente est capable de se résorber quand la cellule entre en phase G1. Au contraire, les cellules différenciées nucléent des cils de manière irréversible : elles peuvent être multiciliées, monociliées ou flagellées. Par ailleurs, au cours de l'embryogénèse, on voit apparaître une structure ciliée particulière au sein du nœud embryonnaire.

### **Le cil, un organe ubiquitaire chez l'adulte**

#### ***Le cil dans le cycle cellulaire, le cil primaire***

Un cil particulier, le cil primaire est retrouvé dans la quasi-totalité des cellules en phase quiescente (G0). Lorsque les cellules se réengagent dans un processus de prolifération, le cil primaire se résorbe et il ne subsiste alors que son corps basal qui reprend la fonction de centriole et assemble le centrosome, principal centre organisateur des microtubules. Le centrosome, constitué de deux centrioles et du matériel péricentriolaire, organise et positionne le réseau de microtubules du fuseau bipolaire et, durant la division asymétrique, il joue un rôle crucial dans la mise en place et la maintenance de la polarité cellulaire. Dans les cellules post-mitotiques qui entrent en phase quiescente, le centrosome migre vers la surface pour réassembler un nouveau cil primaire.



## Les cellules différenciées

### La cellule multiciliée

Les cils des cellules multiciliées sont le plus généralement des cils motiles de structure 9+2, bien que l'on trouve aussi des cils immotiles de structure 9+2 à la surface des cellules olfactives. La différenciation d'une cellule en cellule multiciliée permet la formation d'épithéliums responsables de la création des mouvements de fluides. Ainsi, l'épithélium de la trachée permet l'évacuation des mucus, celui de l'oviducte permet la migration de l'ovule et celui de l'épendyme est à l'origine du flux cérébrospinal qui permet la migration des neuroblastes de la paroi des ventricules latéraux où ils naissent vers le bulbe olfactif (Sawamoto et al., 2006). Ces cils sont aussi des senseurs de leur environnement, ce qui leur permet d'adapter leur battement aux conditions extracellulaires, comme la viscosité par exemple.

La formation de ces épithéliums multiciliés dépend de la multiplication des centrioles qui seront chacun ancrés à la membrane plasmique pour permettre la nucléation d'un cil. Deux mécanismes de production des centrioles ont été identifiés, un mécanisme centriolaire et un mécanisme acentriolaire (pour revue : Beisson et Wright, 2003). Dans le mécanisme centriolaire, la duplication du nouveau centriole se produit à la base de l'ancien perpendiculairement à celui-ci. Dans le mécanisme acentriolaire, les centrioles sont formés autour d'une structure intermédiaire appelée deuterosome (Anderson and Brenner, 1971; Chang et al., 1979; Dirksen, 1971 ; Hagiwara et al., 1992; Kalnins et al., 1972; Lemullois et al., 1988; Sorokin, 1968 a et b; Steinman, 1968) qui forment des clusters autour desquels, se développeront les pro centrioles. Le nombre de pro centrioles apparaissant autour d'un deuterosome est corrélé à sa taille. C'est ce dernier mécanisme qui est utilisé pour générer les corps basaux des cellules multiciliées.



### La cellule monociliée

Les cellules différenciées monociliées portent généralement des cils non motiles (de structure 9+0). Ces cils sont exclusivement sensoriels. On en trouve notamment dans le rein, ou des dérivés de cils dont la membrane est très modifiée dans la rétine, c'est le cas des cônes des bâtonnets, qui sont formés à partir d'un des deux centrioles matures pré-existants.

### La cellule flagellée

Chez les vertébrés, le seul exemple de cellule flagellée est le spermatozoïde. Historiquement, la différence entre cil et flagelle est principalement due à une différence dans la forme de leur battement, comme nous l'avons vu précédemment. Un flagelle unique permet le déplacement cellulaire, alors que les cils ont besoin d'être nucléés en nombre afin de permettre la motilité. La structure axonémale du spermatozoïde n'est pas différente de celle du cil mais, chez les mammifères, le flagelle du spermatozoïde comporte deux structures accessoires qui entourent l'axonème, ODFs (Outer Dense Fibers) et FS (Fibrous Sheath). La structure ODFs est constituée de neuf fibres situées autour de l'axonème dans la pièce intermédiaire. FS est une structure doublant la membrane plasmique, entourant l'axonème et les fibres de types ODFs (Revue : Inaba, 2011). Ces deux structures sont impliquées non seulement dans la maintenance d'une structure flagellaire élastique, mais jouent aussi un rôle dans la régulation de la motilité (Fawcett, 1975 ; Si and Okuno, 1993). Ces structures ont probablement pour rôle de renforcer la structure flagellaire et favoriser la dispersion efficace des spermatozoïdes.



## Les cils dans l'embryogénèse, cas des cils du nœud embryonnaire

Chez les vertébrés, les cils interviennent très tôt au cours de l'embryogénèse. Les deux fonctions du cil sont mises à contribution : la sensorialité et la motilité. C'est le cas par exemple des cils au stade blastula au sein du nœud de Hensen. Des études réalisées chez la souris montrent le rôle des cils nodaux dans la mise en place de l'asymétrie droite/gauche. A ce stade, une coordination/coopération entre cils motiles et cils immotiles va permettre l'établissement de cette polarité. Les cils nodaux localisés au centre du nœud possèdent des bras de dynéine, mais pas de paire centrale de microtubules. Ces deux propriétés créent une motilité caractéristique. Ces cils ne battent pas dans un plan comme le font classiquement les cils motiles, mais ont un mouvement rotatoire. Ce mouvement conduit à la création d'un flux nodal dirigé vers la gauche entraînant la création d'un flux de calcium asymétrique responsable de la mise en place de l'asymétrie droite/gauche (Nonaka et al., 1998, 2002, 2005 ; McGrath et al., 2003). Les cils situés en périphérie du nœud seraient non motiles bien ceci soit encore controversé (et al.) et serviraient de senseur de ce flux. Le flux ainsi créé conduit à l'ouverture d'un canal calcique constitué des polycystines 1 et 2 (PKD1 et PKD2) dans les cils non motiles localisés en périphérie. Ce flux de calcium induit ensuite une voie de signalisation qui provoque l'asymétrie (Tanaka et al., 2005). Les organes se développent alors dans des positions spécifiques en fonction de ce gradient.

**Table 1. Phenotypic Overlap and Genes Associated with Ciliopathies**

Ciliopathy	Leber Congenital Amaurosis	Nephronophthisis	Senior- Loken Syndrome	Joubert Syndrome	Bardet- Biedl Syndrome	Meckel- Gruber Syndrome
Phenotype						
cerebellar hypoplasia		X		<b>X</b>	X	
encephalocele						<b>X</b>
hepatic disease		X	X	X	X	<b>X</b>
kidney disease		<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
mental retardation	X	X		<b>X</b>	<b>X</b>	
obesity				X	<b>X</b>	
polydactyly				X	<b>X</b>	<b>X</b>
retinopathy	<b>X</b>	X	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	
situs inversus			X	X	X	X

### **Tableau 1 : Effets communs retrouvés dans les ciliopathies**

Ce tableau présente des effets retrouvés dans différentes pathologies. Alors que l'encéphalite est retrouvée dans une seule des ciliopathies présentées ici (le syndrome MGS), les autres phénotypes sont retrouvés dans trois, quatre ou même cinq pathologies différentes. (Gerdes et al., 2009).

## Les pathologies ciliaires

Comme nous venons de le voir, chez les vertébrés et notamment chez l'homme, les cils sont ubiquitaires. Il n'est donc pas étonnant que des mutations dans les gènes impliqués dans leur genèse ou leur fonctionnement entraînent des maladies aux effets extrêmement pléiotropes. Ces maladies génétiques sont regroupées sous le terme de ciliopathies. Des défauts ciliaires sont également incriminés dans certains processus cancéreux.

### Les ciliopathies

Dans les années 70, Bjorn Afzelius (1976) remarquait que des patients atteints de stérilité due à des défauts de motilité du spermatozoïde présentaient également des bronchites chroniques et des *situs inversus* (positionnement des organes en miroir). Cette ciliopathie, la dyskynésie ciliaire primitive ou PCD, est la première à avoir été décrite. C'est une maladie génétique rare, due à des mutations dans les gènes codant pour le dynéines abolissant la motilité ciliaire.

À l'heure actuelle, d'autres ciliopathies ont pu être mises en évidence (revues: Badano et al., 2006 ; Fliegauf et al., 2007 ; Nigg and Raff, 2009 ; Cardenas-Rodriguez, Badano, 2009). Elles comprennent des maladies qui touchent aussi bien le rein (maladie polykystique), que l'œil, le cerveau, le foie ou le cœur et peuvent provoquer obésité et diabète. Les ciliopathies telles que la polykystose rénale, la néphronosphthisis, les syndromes de Meckel-Joubert ou de Bardet-Biedl ont été décrites et étudiées indépendamment, mais on retrouve des phénotypes chevauchants dans ces pathologies, comme illustré sur le tableau 1. Le séquençage complet des génomes associé aux études

**Table 1. Phenotypic Overlap and Genes Associated with Ciliopathies**

Ciliopathy	Leber Congenital Amaurosis	Nephronophthisis	Senior- Loken Syndrome	Joubert Syndrome	Bardet- Biedl Syndrome	Meckel- Gruber Syndrome	Reference
<i>AIF1</i>	X						Schockel et al., 2000
<i>CRB1</i>	X						Lotery et al., 2001, den Hollander et al., 2001
<i>CRX</i>	X						Freund et al., 1998
<i>GUCY2D</i>	X						Perrault et al., 1996
<i>IMPDH1</i>	X						Bowne et al., 2006
<i>RDH12</i>	X						Perrault et al., 2004
<i>RPE65</i>	X						Marlhens et al., 1997
<i>RPGRIP1</i>	X						Dryja et al., 2001
<i>LCA5</i>	X						den Hollander et al., 2007
<i>CEP290</i>	X	X	X	X	X	X	den Hollander et al., 2006, Sayer et al., 2006, Valente et al., 2006, Leitch et al., 2008, Baala et al., 2007
<i>NPHP1</i>		X	X	X			Hildebrandt et al., 1997, Hildebrandt et al., 2007, Parisi et al., 2004
<i>INVS</i>		X	X				Otto et al., 2003, O'Toole et al., 2006
<i>NPHP3</i>		X	X			X	Olbrich et al., 2003, Bergmann et al., 2008
<i>NPHP4</i>		X	X				Mollet et al., 2002, Otto et al., 2002
<i>NPHP5</i>		X	X				Otto et al., 2005
<i>GLIS2</i>		X					Attanasio et al., 2007
<i>NEK8</i>		X					Otto et al., 2008
<i>AH11</i>					X		Ferland et al., 2004, Dixon-Salazar et al., 2004
<i>TMEM67</i>					X	X	Baala et al., 2007, Leitch et al., 2008, Smith et al., 2006
<i>RPGRIP1L</i>		X			X	X	Wolf et al., 2007, Arts et al., 2007, Delouis et al., 2007
<i>ARL13B</i>					X		Cantagrel et al., 2008
<i>BBS1</i>					X		Mkytyn et al., 2002
<i>BBS2</i>					X	X	Nishimura et al., 2001, Karmous-Benailly et al., 2005
<i>BBS3</i>					X		Fan et al., 2004, Chiang et al., 2004
<i>BBS4</i>					X	X	Myktyyn et al., 2001, Karmous-Benailly et al., 2005
<i>BBS5</i>					X		Li et al., 2004
<i>BBS6</i>					X	X	Katsanis et al., 2000, Karmous-Benailly et al., 2005
<i>BBS7</i>					X		Badano et al., 2003
<i>BBS8</i>					X		Ansley et al., 2003
<i>BBS9</i>					X		Nishimura et al., 2005
<i>BBS10</i>					X		Stoetzel et al., 2006
<i>BBS11</i>					X		Chiang et al., 2006
<i>BBS12</i>					X		Stoetzel et al., 2007
<i>MGCG203</i>					X		Badano et al., 2006
<i>MKS1</i>					X	X	Kyttala et al., 2006, Leitch et al., 2008
<i>CC2D2A</i>					X	X	Tallia et al., 2008, Gorden et al., 2008

Bold type indicates primary phenotypic characteristics. Phenotypic severity increases left to right.

## **Tableau 2 : Gènes présentant des mutations chez des patients atteints de ciliopathies.**

Certains gènes sont associés à une ciliopathie alors que d'autres ont été mis en cause dans différentes pathologies. Il semble que différentes mutations dans un même gène puissent avoir des répercussions plus ou moins développées chez le patient de la même manière que des variants alléliques peuvent engendrer une gamme de phénotypes. (Gerdes et al., 2009). La bibliographie associée à ce tableau n'a pas été reportée ici, elle est accessible dans l'article d'origine.

effectuées sur différents modèles a permis, ces dernières années, d'identifier un grand nombre de gènes impliqués dans ces pathologies. Certains de ces gènes sont présentés dans le tableau 2 qui met en relation les gènes mutés chez des patients avec la pathologie développée. Certains gènes ne sont associés qu'à une ciliopathie bien spécifique, comme *BBS1* qui est associé au syndrome de Bardet Biedl (Cantagrel et al., 2008), alors que d'autres sont incriminés dans plusieurs type de ciliopathies comme *BBS2*, d'abord associé au syndrome de Bardet-Biedl (Nishimura et al., 2001) puis retrouvé associé au syndrome de Meckel-Gruber (Karmous-Benailly et al., 2005). Finalement, tout comme des variants alléliques peuvent induire différents phénotypes, Gerdes et al. (2009) suggèrent que différentes mutations dans un même gène peuvent contribuer à induire des désordres cliniques distincts. Sur cette base, il peut être noté des liens directs entre les syndromes de Meckel-Gruber, de Joubert, de Bardet-Biedl et les néphronophtisis.

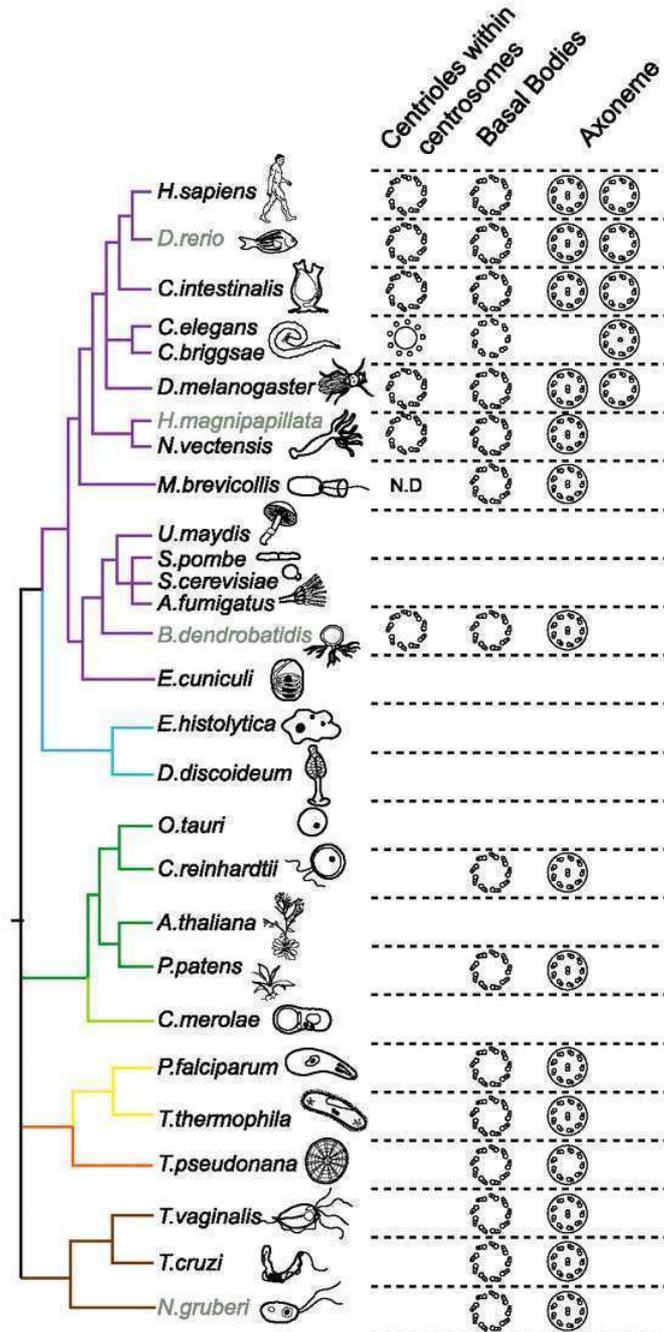
### **Cils et cancers, rôle du cil primaire**

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération anarchique de cellules au sein d'un tissu. Le contrôle de l'équilibre entre phase proliférative et phase quiescente est donc essentiel pour un bon développement et maintien des tissus. Des dérèglements dans les voies de signalisation Hedgehog ou Wnt, souvent altérées dans les ciliopathies, sont également à l'origine de nombreux cancers (Mans et al., 2008). Il a été démontré que l'inhibition de la biogenèse des cils primaires pouvait soit induire soit au contraire réprimer le processus de cancérisation, via une modification de la voie Hedgehog (Han et al., 2009 ; Wong et al., 2009). Il semble aussi que la séquestration d'une partie de la  $\beta$ -caténine dans le cil primaire permette de réguler la voie Wnt canonique, importante pour le développement embryonnaire, et que cette régulation soit éteinte dans les cellules cancéreuses en phase proliférative (Lancaster et al., 2011).



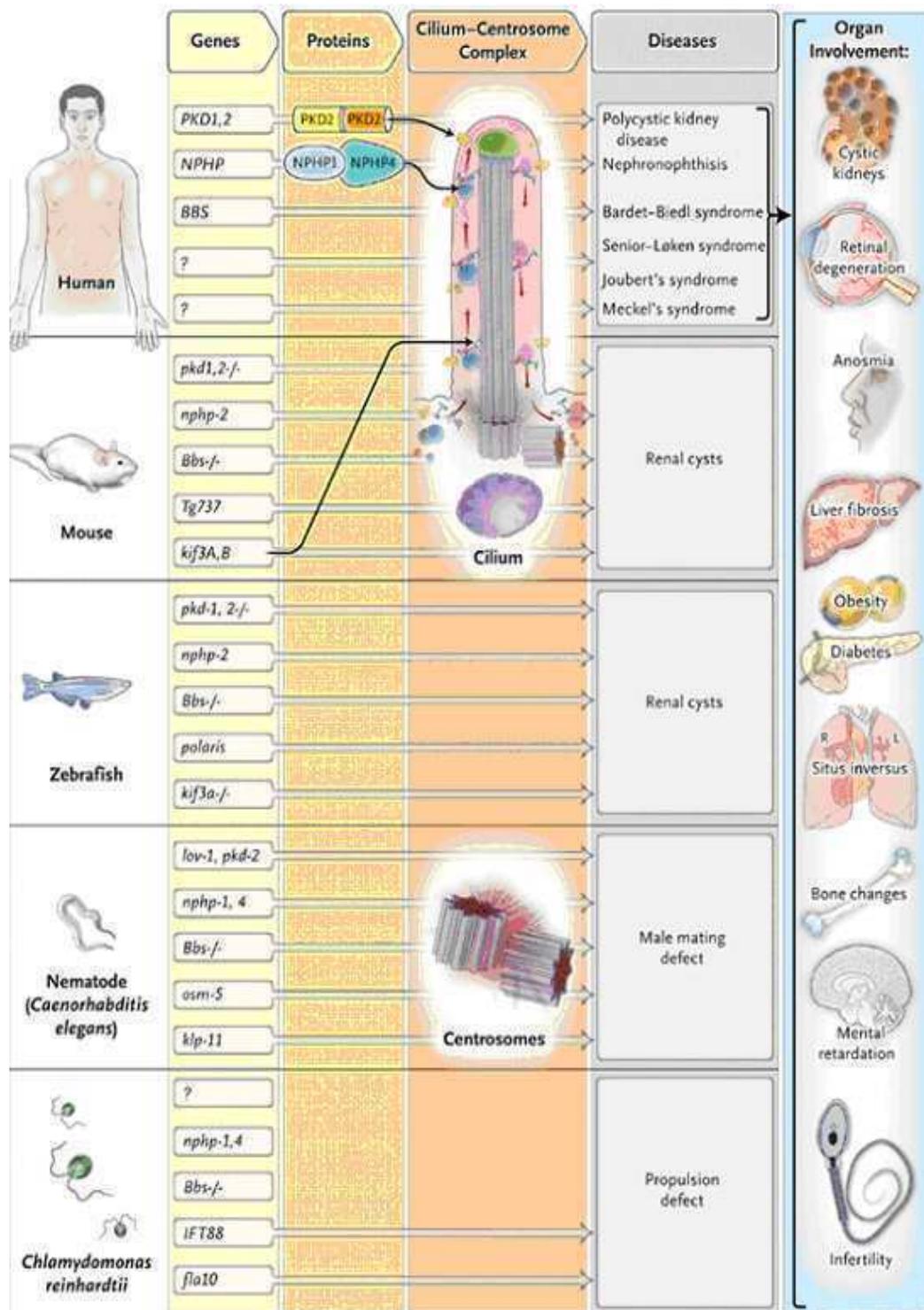
Récemment, des résultats expérimentaux ont également montré des défauts de ciliogénèse dans des cultures cellulaires dérivées de glioblastome ou d'adenocarcinome pancréatique (Moser et al., 2009 ; Seeley et al., 2009). L'hypothèse selon laquelle le dysfonctionnement des cils pourrait jouer un rôle dans des processus de cancérisation est aussi étayée par le fait que certains gènes, mutés dans des cancers sporadiques, sont des gènes codant pour des protéines ciliaires.





**Figure 8 : Conservation des centrioles, corps basaux et cils au cours de l'évolution des eucaryotes.**

Arbre simplifié de l'évolution des eucaryotes, présentant des espèces représentatives qui ont conservé ou non leurs centrioles, corps basaux et cils. Présentes dans l'eucaryote ancestral, les structures centriolaires et ciliaires ont été perdues secondairement dans différents groupes ; chez la majorité des plantes supérieures, représentée ici par *A. thaliana* ; chez certains champignons représentés ici par *A. fumigatus*, *S. cerevisiae*, *S. pombe* et *U. maydis*, ainsi que chez certains amoebozoa représentés ici par *D. discoideum*. (Adapté de Carvalho-Santos et al., 2010).



**Figure 9: Effets de mutations dans différents organismes.**

Schéma montrant la conservation des effets d'une mutation dans différents orthologues, allant de l'homme à l'algue verte. L'étude des ciliopathies dans des modèles est rendue possible grâce à la grande conservation des gènes impliqués dans la fonction ciliaire. (Hildebrandt et al., 2011).

## Des modèles d'étude des cils

Le cil est une structure qui préexistait dans l'eucaryote ancestral et qui est toujours présente chez la majorité des eucaryotes, bien qu'il ait été perdu dans quelques phyla, comme les plantes terrestres et la plupart des champignons (figure 8). Les progrès considérables réalisés ces dernières années dans la compréhension des maladies humaines liées aux dysfonctionnements ciliaires et sur la cancérisation ont été possibles grâce aux connaissances préalablement acquises sur les cils motiles ou immotiles d'organismes modèles aussi éloignés de l'homme et des mammifères que sont l'algue verte, le nématode ou la drosophile, mais aussi chez le poisson zèbre ou la souris (revue : Vincensini et al., 2011). La figure 9 présente quelques exemples de gènes conservés, impliqués dans des ciliopathies, qui ont des fonctions au sein du cil aussi bien qu'au centrosome, ainsi que les organes atteints lorsqu'ils sont mutés.

### *Mus musculus*

L'absence de cils est létale dès le stade embryonnaire chez la souris et l'étude des cils chez ce modèle est donc compliquée. La possibilité de construire des mutants conditionnels fait que certains dysfonctionnements peuvent être tolérés et permet ainsi l'analyse de gènes impliqués dans des maladies génétiques rares, en dépit du temps requis pour générer des souches de souris mutantes. Si la souris est un modèle complexe à manipuler, elle reste néanmoins un organisme de choix permettant d'extrapoler facilement les études effectuées pour une meilleure compréhension de mécanismes impliqués dans les ciliopathies.



Il a été montré par exemple chez cet organisme que des défauts dans le système IFT affectent la signalisation Hedgehog (Huangfu et al. 2003). Nous avons vu précédemment que chez les vertébrés, différents composants clés de cette voie sont fortement enrichis dans les cils ; cet enrichissement ne semble pas conservé dans des organismes tels que la drosophile. KIF7 chez la souris est une kinésine motrice permettant un trafic direct de protéines au sein du cil (Cheung et al, 2009). Généralement trouvée à la base du cil, KIF7 est retrouvée dans le cil lorsque la voie Hedgehog est activée. Chez la drosophile, l'homologue de KIF7, Cos2, est un composant clé de la voie de signalisation Hedgehog, mais son domaine moteur est inactivé.

### **Danio rerio**

Chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) comme chez l'homme, les embryons contiennent des cellules ciliées. Chez l'adulte, on retrouve des cils motiles comme des cils immotiles. Le principal avantage de cet organisme est de permettre de réaliser des extinctions géniques de manière efficace qui peuvent être combinées avec de l'imagerie *in vivo* de haute qualité. C'est grâce à des travaux sur le poisson zèbre qu'a été établi un lien entre la formation de kystes rénaux et des dysfonctionnements ciliaires (Sun et al., 2004). Comme chez les mammifères, les cils sont impliqués dans de multiples fonctions et des mutations de gènes associées avec l'apparition de kystes rénaux entraînent des défauts pléiotropiques qui incluent des défauts de la mise en place de la polarité droite/gauche, la dégradation de photorécepteurs et l'hydrocéphalie par exemple.

### **Caenorhabditis elegans**

Le nématode *C. elegans* est dépourvu de cils motiles mais dispose de cils immotiles à l'extrémité de 60 des 302 neurones sensoriels de l'adulte hermaphrodite (Perkins et al., 1986). Les vers utilisent ces neurones pour percevoir leur environnement, par exemple les



variations de concentration saline. Des collections de mutants incapables de réagir à différents stimuli ont été générées. Ces mutants ont été classés en deux grandes familles, les mutants che (Chemosensory) et osm (Osmosensory). Le ver permet une étude des cils immotiles sans qu'il y ait d'interférence avec des effets sur les cils motiles, comme chez le poisson zèbre ou la souris, et ces animaux sont aisés à observer. C'est chez cet organisme qu'il a été découvert par exemple que les orthologues de protéines BBS, impliquées dans certaines ciliopathies et notamment le syndrome de Bardet Biedl, permettent de stabiliser les sous-unités A et B du complexe IFT, respectivement liées aux moteurs Kinesin-II et OSM 3 (Blacque et al. 2003 ; Ou et al, 2005 ; Pan et al. 2006).

La première évidence que l'expression des gènes ciliaires dans les organismes multicellulaires pouvait être régulée par un facteur de transcription spécialisé vient également des travaux réalisés chez le nématode. En effet, Swoboda et al. (2000) ont montré que de nombreux gènes impliqués dans la ciliogénèse étaient soumis au contrôle de DAF-19, facteur de transcription de type RFX qui reconnaît un motif spécifique, la X-box qui se trouve en amont du codon 'start'. Il a depuis été montré qu'un facteur de transcription de type RFX est aussi impliqué dans la ciliogénèse chez la drosophile et la souris (Dubruille et al., 2002 ; Laurençon et al., 2007). Plus tard, un autre facteur de transcription, FOXJ1 responsable du contrôle de l'expression des gènes codant des protéines spécifiques de la fonction motile des cils chez les vertébrés a été découvert (Stubbs et al, 2008 ; Yu et al. 2008). Les recherches des séquences régulatrices de type X-box par bioinformatique ont permis par la suite de mettre en évidence des protéines potentiellement impliquées dans la ciliogénèse et qui n'avaient pu être identifiées dans les analyses de protéomique, notamment des protéines dans le transport des protéines ciliaires dans le cytoplasme (Blacque et al. 2003 ; Ou et al, 2005 ; Pan et al. 2006).



## *Drosophila melanogaster*

La drosophile possède des cils sensoriels et seuls ses gamètes mâles portent des flagelles motiles. Les stimuli, mécaniques et auditifs, sont détectés par les cils des neurones sensoriels. Si les cils sensoriels sont assemblés par le système IFT, la spermatogenèse prend place au sein d'un syncytium dans lequel 64 axonèmes sont construits dans le cytosol, la membrane étant ensuite ajoutée pour individualiser chacun des gamètes (Hans et al., 2003 ; Sarpal et al., 2003). Chez cet organisme, les études génétiques sont facilitées par des outils tels que l'insertion de transposons ou l'expression de protéines, et grâce à des cribles comportementaux basés sur le manque de réponse sensorielle (Lee et al., 2008), différents mutants de la machinerie IFT ont été identifiés. La drosophile est donc un très bon modèle pour l'étude des mécanismes de transduction de signaux en réponse à des stimuli mécaniques ou sonores. C'est dans un crible génétique effectué chez la mouche qu'IFT88 a été identifié pour la première fois (Kerman et al., 1994). Les mouches mutantes ont des défauts de coordination.

## *Chlamydomonas reinhardtii*

L'algue verte *Chlamydomonas* possède deux flagelles positionnés au pôle apical de la cellule durant la phase végétative. Selon le sens de la nage leur battement peut être de type flagellaire ou ciliaire. Ces flagelles ne sont pas essentiels au déroulement du cycle cellulaire et sont désassemblés à la mitose. De la même manière que dans le cas du cil primaire des mammifères, les centrioles migrent alors aux pôles du fuseau, contribuant ainsi à la mitose. Après la division, chaque cellule fille contient deux centrioles. Ces deux centrioles vont être capables de s'ancrer à la membrane et de nucléer deux nouveaux flagelles.

*Chlamydomonas* offre de nombreux avantages pratiques pour l'étude des flagelles eucaryotes. Elle peut croître de manière synchrone et une grande quantité de flagelles



peuvent être facilement purifiées pour des analyses biochimiques. La génétique a permis la production et la caractérisation de nombreuses souches mutantes. Enfin, l'algue verte manifeste des comportements de nage complexes en réponse à des stimuli, tels que la lumière, qui permettent de disséquer les voies de régulation du battement flagellaire. La composition protéique des flagelles a été mise en évidence par spectrométrie de masse en 2005 (Pazour et al., 2005) et permet d'estimer le nombre de protéines à plus de 500. *Chlamydomonas* a principalement permis la dissection du mécanisme de transport intraflagellaire et de ses acteurs incluant les moteurs (Kozminski et al., 1993 ; 1995) ainsi que la composition des particules IFT (Piperno et Mead, 1997 ; Cole et al., 1998). La mise en évidence de l'importance du rôle du transport intraflagellaire dans la voie de signalisation Hedgehog dans le cil primaire a largement bénéficié de la dissection de ce mécanisme. Les mutants de *Chlamydomonas* ont aussi beaucoup contribué à la dissection de l'assemblage du corps basal (revues : Dutcher, 2003 ; Marshall, 2008).

### ***Paramecium tetraurelia* et *Tetrahymena thermophila***

Les ciliés tels que *Paramecium tetraurelia* ou *Tetrahymena thermophila* ont depuis longtemps constitué des modèles reconnus pour l'étude des cils, à la fois de leur motilité et de leurs propriétés sensorielles (Eckert, 1972; Machemer and Ogura, 1979). Ces cellules, facilement cultivées en laboratoire, offrent l'avantage de leur grande taille et de leurs nombreux cils (revue : Pearson et Winey, 2009). Elles ont depuis longtemps servi de modèle pour l'étude de la biogénèse de corps basaux (Dippell, 1968 ; Allen, 1968), dont le patron spatio-temporal de duplication est bien connu (Iftode et al, 1989). Plus récemment, la mise au point d'une technique simple et efficace de RNAi par « feeding » (Galvani and Sperling, 2002) et le séquençage de son génome (Aury et al, 2006) ont permis, chez la Paramécie, la dissection moléculaire des étapes initiales de la duplication des corps basaux et l'analyse de leur maturation et de leur ancrage à la surface cellulaire chez la Paramécie (Ruiz et al, 2005 ; Jerka-Dziadosz et al, 2010 ; Gogondeau et al, 2010 ; Aubusson-Fleury, en préparation).



Dans l'exploration moléculaire des cils, l'apport original des ciliés fut la découverte, à partir d'un anticorps anti-tubuline ciliaire de paramécie (Cohen et al, 1982), d'une nouvelle modification post-traductionnelle des tubulines, la polyglycylation (Redeker et al, 1994), qui se rajoutait aux modifications déjà connues, polyglutamylaton et acétylation. Et c'est chez *Tetrahymena* qu'une analyse poussée du rôle de ces modifications sur l'assemblage et le mouvement ciliaire ont été effectuées (revue : Wloga and Gaertig, 2010). Récemment des études chez *Tetrahymena* (Akela et al., 2010) réalisées parallèlement à celles sur *C. elegans*, (Shida et al., 2010) ont permis la découverte de l'acetyl-transférase responsable de l'acétylation des  $\alpha$ -tubulines des microtubules axonémaux.



## Des protéines centriolaires retrouvées dans des organismes sans cil ni centriole

Bien qu'extrêmement conservés au cours de l'évolution, les cils et les structures centriolaires ont été perdus dans deux phyla de manière indépendante, chez les plantes terrestres, ainsi que chez la majorité des champignons. Dans chacun de ces phyla, certaines espèces ont gardé néanmoins ces organelles, notamment pour permettre la motilité de leurs gamètes.

Certaines des protéines impliquées dans la fonction des cils et centrioles sont néanmoins conservées chez les végétaux terrestres, en particulier celles impliquées dans l'organisation des microtubules. Plusieurs ont été décrites dans la revue de Gardiner et Marc (2010). J'en développerai ici quelques exemples.

### Les kinésines

Si, chez les organismes ciliés, les kinésines permettent le mouvement antérograde des IFT le long de l'axonème, elles sont également impliquées dans le transport des cargos dans le corps cellulaire.

Chez les plantes, on trouve un total de 61 kinésines (Lee et Liu, 2004). Ce grand nombre pourrait expliquer l'absence de perturbations en ce qui concerne la croissance et le développement lorsqu'on les inactive individuellement. Le grand nombre de kinésines permet peut être de voir apparaître des fonctions hautement spécialisées pour chacune d'entre elles (Gardiner et Marc, 2011). Par exemple, KAC1 et KAC2, deux kinésines-like, ne paraissent pas se lier aux microtubules mais plutôt à l'actine, permettant le mouvement des chloroplastes (Suetsugu et al., 2010). Au contraire, dans les cellules de mammifères, les kinésines sont beaucoup plus spécialisées dans leur fonction, transportant divers cargos le long des microtubules.



## Les centrines

Les centrines centriolaires ont été définies en deux sous-familles, les centrines de type 2 et de type 3 (Bornens et Azimzadeh, 2007). Les centrines de la première sous-famille sont présentes chez l'algue verte *Chlamydomonas*, ainsi que chez les insectes et les vertébrés mais sont absentes chez la plupart des champignons. Les centrines de type 3 sont retrouvées chez les champignons et chez les vertébrés, mais absentes chez les plantes. Les deux isoformes sont pourtant présentes dans le protiste bikonte *Giardia intestinalis*, montrant que la duplication ancestrale du gène "centrine" s'est produite avant la séparation entre les unikontes (champignons et animaux) et les bikontes (plantes et protozoaires) et que l'absence de l'une des isoformes dans un taxon est due à une perte secondaire. Il semble que la perte de la centrine 2 soit corrélée à la perte de l'appareil motile. Chez les plantes terrestres, il existe au moins deux types de centrines qui, bien que divergentes, sont très apparentées aux centrines de type 2.

La fonction centriolaire des centrines de type 2 et 3 a été étudiée chez divers organismes (cellules de mammifère, xénope, *Chlamydomonas*, *Tetrahymena* et la paramécie) (Middendorp et al., 2000 ; Salisbury et al., 2002 ; Koblenz et al., 2003 ; Ruiz et al., 2005 ; Stemm-Wolf et al., 2005). Les résultats, parfois contradictoires, convergent actuellement vers un rôle non pas dans l'assemblage ou l'initiation de la duplication des centrioles/corps basaux mais plutôt dans leur maturation et ancrage dans la membrane dans le cas des cils (Ruiz et al., 2005 ; Vonderfecht et al., 2011 ).

En plus de sa fonction dans le cil et centriole, la centrine 2 est présente au pore nucléaire chez les mammifères et elle est impliquée dans l'export d'ARNm du noyau vers le cytoplasme (Resendes et al., 2008). Chez les mammifères comme chez plantes terrestres, la centrine 2 est aussi retrouvée au noyau où elle intervient dans la recombinaison homologue et la réparation de nucléotides excisés (Molinier et al., 2004 ; Liang et al.,



2006). La centrine 3 est aussi localisée au noyau chez la levure et de la même manière que la centrine 2, elle intervient aussi dans les mécanismes d'export de l'ARNm (Fischer et al., 2004).

### Les protéines de type FOP

Les protéines TONNEAU1, découvertes chez les plantes, ont également des homologues impliqués dans les fonctions centriolaires. Chez *A. thaliana*, ces protéines TONNEAU1 se localisent à la préprophase-band (PPB) et le long des microtubules corticaux et leurs mutations induisent de fortes modifications dans le développement de la plante et dans la forme des cellules (Azimzadeh et al., 2008). La centrine 2 est un interagissant direct de TONNEAU1 qui joue un rôle important dans la division cellulaire (Azimzadeh et al., 2008).

TONNEAU1 fait partie d'une famille de protéines contenant à leur extrémité N terminale un domaine conservé dans plusieurs protéines qui se localisent au niveau des centrioles et des cils chez les organismes qui contiennent ces structures (FOP, FOP-like, OFD1p ou FOR20) (Romio et al., 2004 ; Sedjaï, 2010 ; Aubusson et al, en préparation).

Chez la paramécie, il a été montré au sein du laboratoire que la protéine PtFOR20p se localise aux corps basaux et que sa déplétion entraîne une incapacité pour les corps basaux à s'ancrer à la membrane plasmique. Ces corps basaux restent dans le cytoplasme et la cellule n'est plus capable de nucléer des cils (Aubusson et al., communication personnelle). Ce phénotype ressemble à ceux observés après déplétion des centrines, montrant que PtFOR20p agirait, elle aussi, sur la maturation du corps basal et pourrait indiquer une action de FOR20p dans les mêmes voies que les centrines (Aubusson et al., en préparation).



## La katanine

Chez *Tetrahymena*, il a été démontré que la katanine fusionnée à la GFP se localise au niveau des corps basaux et le long des cils entre les microtubules de l'axonème et la membrane ciliaire (Sharma et al., 2007). Sa déplétion entraîne une incapacité pour la cellule à nucléer des axonèmes complets, les observations en microscopie électronique montrant des cils abortifs n'ayant pas de paire centrale de microtubules. Sa surexpression entraîne des modifications des doublets périphériques de l'axonème : des cassures et une dépolymérisation plus active que chez le témoin. La katanine est donc essentielle à la ciliogénèse et diminue la quantité de microtubules modifiés.

La déplétion de la katanine favorise également l'apparition de modifications post-traductionnelles (polyglutamylation et polyglycylation) sur les réseaux de microtubules cytoplasmiques et induit une plus grande stabilité des microtubules. Son rôle serait de couper préférentiellement les microtubules les plus anciens, et plus modifiés, favorisant ainsi leur dynamique. Dans les cellules animales, la katanine joue un rôle dans la formation et l'organisation des microtubules acentrosomaux. Son action permet de couper les microtubules existant afin de générer de nouveaux sites de croissance des microtubules (Roll-Mecak et Vale., 2006).

La katanine est aussi retrouvée chez les plantes terrestres qui contiennent dans le cytoplasme des cellules en interphase des réseaux de microtubules hautement organisés (Bartolini et Gundersen, 2006). Dans ce système, les microtubules croissent directement à partir d'anciens microtubules dispersés autour du cortex cellulaire (Chan et al., 2003), puis se détachent et sont relocalisés. Il a été montré par fusion GFP que la katanine se localise aux jonctions entre microtubules dans les cellules végétales, au niveau des sites de nucléation du microtubule néoformé, après sa formation. L'étude révèle que la katanine disparaît de ce site de nucléation juste avant, ou au moment où les deux microtubules sont dissociés (Nakamura et al., 2010). La katanine semble donc intervenir dans la séparation des deux sites de nucléation. L'hypothèse la plus probable est que la katanine a conservé la



même fonction dans les cellules animales et végétales : son rôle serait de couper les microtubules pour permettre la dynamique microtubulaire.

### Les tubuline-tyrosine-ligases-like

Les protéines de type tubuline-tyrosine-ligase sont capables de catalyser la ré-addition de tyrosine sur les tubulines où la tyrosine codée en C-terminal a été préalablement retirée post-traductionnellement (Smertenko et al., 1997). Dans les neurones, la tyrosination des tubulines permet la navigation de la Kinesin-1 des microtubules dendritiques vers les microtubules axonéaux détyrosinés (Konishi et Setou, 2009).

On trouve aussi des tubuline-tyrosine-ligases-like qui sont capables de catalyser la polyglutamylation ainsi que la polyglycylation des tubulines (Janke et al., 2008 ; Ikegami et Setou, 2009). Ces enzymes sont toutes deux nécessaires à la détermination d'un battement ciliaire efficace. et il semble que les enzymes TTLL6 (de types polyglutamylase et celles de type polyglycylylase (TTLL3) aient chacune un rôle différent dans la détermination du battement ciliaire et que leurs actions soient additionnelles (Suryavanshi et al., 2010 ; Pathak et al., 2011).

Alors que plusieurs TTLL sont codées dans les génomes des organismes ciliés, on ne retrouve qu'un seul représentant de cette protéine codée dans le génome *d'Arabidopsis* (Gardiner et Marc, 2003) qui semble proche de la protéine TTLL12, qui a la capacité de catalyser la polyglutamylation des tubulines (Gardiner et al., 2011)



## Choix de la protéine Bug22p comme sujet d'étude

Le laboratoire dans lequel j'ai effectué mon travail de thèse utilise la paramécie, *Paramecium tetraurelia*, comme modèle pour l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'assemblage et la fonction ciliaire ainsi que dans la duplication des corps basaux.

Lors de mon arrivée au laboratoire, une analyse du protéome obtenu à partir de cils purifiés de paramécie était en cours d'achèvement. Parmi les 733 protéines identifiées avec une forte probabilité comme pouvant être ciliaires (Arnaiz et al., 2009), nous avons choisi d'étudier la protéine Bug22p car elle avait deux propriétés remarquables : son taux élevé de conservation (90% d'identité entre les protéines de l'homme et de la paramécie par exemple) et sa présence dans le génome des angiospermes, plantes dont les cellules sont pourtant dépourvues de cil et centriole. Ce dernier élément, qui peut paraître paradoxal, a été décisif dans mon choix. En effet la présence de *BUG22* chez les plantes pouvait signifier que cette protéine avait une fonction générale dans la cellule, conservée chez les plantes, mais aussi nécessaire à l'activité ou la biogenèse ciliaire dans les organismes ciliés. Des données récentes indiquent que plusieurs protéines ciliaires ont aussi d'autres rôles dans la cellule, par exemple dans le noyau (Morris et al., 2004 ; Banerjee et al., 2010), dans le trafic membranaire (Sedmak et Wolfrum, 2010), dans la mitose (Delaval et al., 2011). Il est donc très important de préciser les diverses fonctions des protéines ciliaires au sein de la structure ciliaire elle-même ainsi que dans d'autres organelles de la cellule afin de mieux comprendre les effets pléiotropes souvent associés aux ciliopathies.

Pour conforter l'hypothèse que Bug22p, bien qu'identifiée chez les plantes, pouvait avoir une fonction ciliaire, j'ai dans un premier temps recherché sa présence parmi les protéines identifiées dans différentes analyses globales (protéomiques, transcriptomiques



et génomiques comparatives) réalisées pour inventorier les protéines ciliaires chez différents organismes. Cette étude nous ayant confortés dans notre hypothèse, j'ai entrepris l'analyse fonctionnelle de Bug22p d'abord chez la paramécie, travail qui a été publié (Laligné et al, 2010) et que je commencerai par résumer. Afin de pouvoir préciser la fonction non ciliaire de la protéine, j'ai ensuite entrepris son analyse chez les plantes. Le cycle de croissance de la plante *A. thaliana* nécessitant des temps d'attente de plusieurs semaines, j'ai en parallèle élargi mes recherches et tenté de préciser les fonctions ciliaires et non ciliaires de Bug22p dans la paramécie et dans des cellules de mammifère en culture.



# **Matériels et méthodes**



## Matériels et méthodes

En ce qui concerne les techniques de biologie moléculaire et cellulaire, je présenterai ici les méthodes utilisées pour les expériences complémentaires et ne développerai pas les techniques déjà décrites dans la publication et qui est incorporée dans le chapitre 1 des Résultats de ce manuscrit.

### Etude de PtBug22p chez la paramécie :

#### *Présentation du matériel biologique*

La paramécie fait partie du groupe très diversifié des ciliés eux-mêmes appartenant au grand ensemble des alvéolés. Cet ensemble a émergé dans la même branche des eucaryotes que celle qui a donné naissance aux plantes, séparée de celle des métazoaires et des champignons.

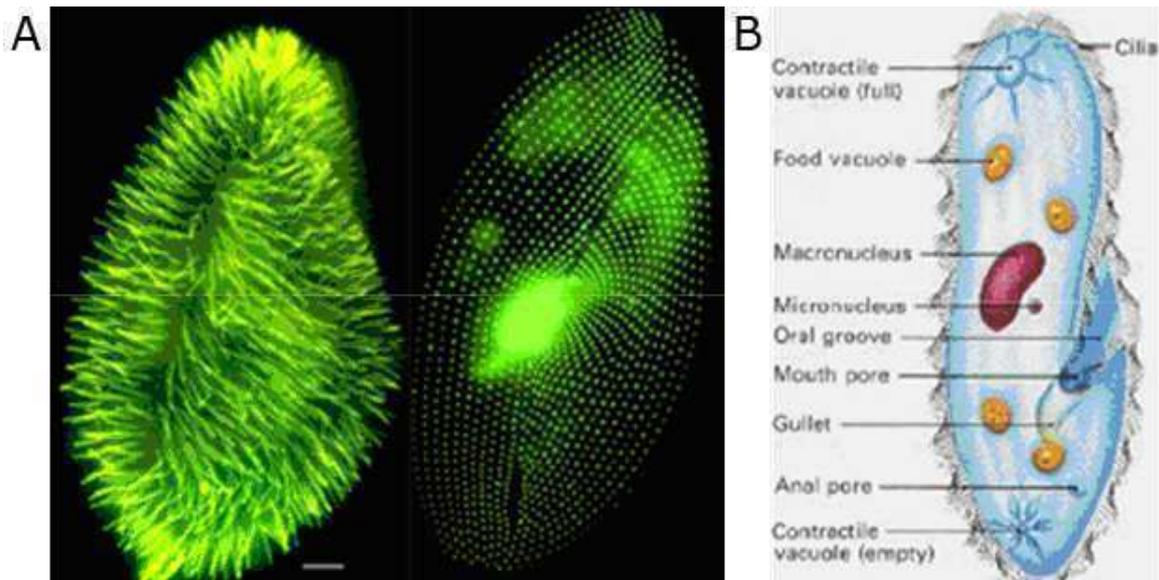
*Paramecium tetraurelia* est une cellule de très grande taille (130 $\mu$ m) décrite par Joblot (1718) comme un chausson qui nage en forme de spirale et qui est capable de réagir face à un obstacle. Une observation plus poussée de la paramécie permet de voir que cet organisme est un système extrêmement complexe qui a depuis toujours intrigué les biologistes, que ce soit pour l'étude de ses organelles, notamment les cils, vacuoles pulsatiles, noyaux (somatiques et germinaux), cristaux et trichocystes, ou pour son comportement impliquant sa locomotion, sa prise de nourriture ou sa capacité d'adaptation face à des changements d'environnement.



## Un modèle, des outils

Depuis quelques années, différents outils facilitant l'utilisation de cet organisme comme modèle ont été façonnés. Notamment, le laboratoire dans lequel j'effectue ma thèse a été un véritable moteur dans la génomique chez cet organisme :

- Il a initié la mise en œuvre du séquençage du génome au Genoscope (Aury et al., 2006).  
  
→ Ce séquençage a permis de mettre en évidence au moins trois duplications successives du génome complet de la paramécie. Il ne reste que très peu de traces d'une quatrième duplication plus ancienne. En conséquence, beaucoup de protéines sont codées par plusieurs gènes paralogues appelés « ohnologues », car issus de duplications globales de génome
- Il a développé une méthode d'inactivation génique par ARN interférence (Galvani et Sperling, 2002),
- Il a développé une base de données pour l'organisme, ParameciumDB (Arnaiz et al., 2007), ce qui a grandement facilité les analyses post-génomiques telles que l'analyse protéomique de fractions ciliaires (Arnaiz et al., 2009) et l'analyse du transcriptome pendant la ciliogénèse (Arnaiz et al, 2010),
- Enfin, une base de données permettant d'établir la correspondance entre gènes identifiés dans des études ciliaires chez différentes espèces, Cildb, a aussi été mise en œuvre au laboratoire (Arnaiz et al., 2009). L'utilisation de cette base de données a d'ores et déjà permis de montrer qu'il existe chez la paramécie de nombreuses



**Figure 10 : Présentation de la paramécie *P. tetraurelia***

A. Observation des cils de la paramécie en immunofluorescence (marqués avec l'anticorps anti-cils qui est un anticorps anti-tubuline polyglycylée). Barre : 10 $\mu$ m. (Janine Beisson, communication personnelle) et des corps basaux en immuno-fluorescence (marqués avec l'anticorps ID5). Barre d'échelle : 10 $\mu$ m. B. Schéma présentant les principaux organites de la paramécie.

protéines homologues aux protéines humaines impliquées dans les ciliopathies ou le cancer.

→ Le travail entrepris depuis quelques années concerne l'étude des homologues de protéines dont le dysfonctionnement est connu pour être responsable de ciliopathies (collaboration avec Tania Attié-Bitach et Sophie Saunier sur MKS2 impliquée dans les syndromes de Joubert et Meckel) mais aussi l'étude de protéines ciliaires nouvelles, retrouvées chez l'homme, et qui pourraient être candidates pour la recherche de gènes responsables de ciliopathies non identifiées, dont Bug22p qui a fait l'objet de mon travail.

Dans la suite de ce chapitre, je présenterai les principales caractéristiques de cet organisme et je développerai plus particulièrement les aspects concernant les cils et corps basaux.

## **La paramécie, un unicellulaire complexe**

### **Présentation générale**

Dès le 19<sup>ième</sup> siècle, la grande taille et la répartition géographique mondiale de la paramécie en ont fait un organisme très largement étudié par les biologistes. Des études cytologiques et physiologiques ont montré que la paramécie présente des fonctions cellulaires extrêmement complexes et diverses à tel point que l'on peut faire le rapprochement avec les organes des métazoaires. La figure 10 présente la paramécie. Ce protiste possède des cils vibratiles recouvrant la totalité de la surface cellulaire et permettant le déplacement de la cellule et la prise de nourriture ; c'est une cellule polarisée avec un pôle antérieur et un pôle postérieur, une face ventrale et une face



dorsale, une gauche et une droite, reconnaissables grâce à l'agencement des corps basaux ancrés à son cortex (figure 10 A).

La figure 10 B schématise les principaux organites présents chez ce cilié. La paramécie possède un système digestif complet : un appareil oral dans lequel vont se former les vacuoles digestives par capture de bactéries grâce à un battement ciliaire organisé. Ces bactéries vont être phagocytées et digérées au cours d'un processus de cyclose des vacuoles digestives et fusion avec des lysosomes, puis les déchets solides vont être rejetés au niveau du cytoprocte. La paramécie possède aussi l'équivalent de « reins », que sont les vacuoles pulsatiles qui permettent l'élimination des déchets liquides et la circulation de l'eau et des minéraux, contrôlant ainsi la pression osmotique de la cellule.

### *Une voie de sécrétion régulée*

La paramécie possède une voie de sécrétion régulée, la voie d'exocytose des trichocystes qui lui sert de moyen de défense contre ses prédateurs (revue : Vayssié et al., 2000). Les trichocystes contiennent du matériel cristallin ancrés sous la membrane plasmique et sont relargués en quelques millisecondes, dans le milieu, en réponse à un stress tel que l'attaque de prédateurs. Des mutants affectés dans la voie de sécrétion régulée ont pu être isolés car elle n'est pas essentielle pour la paramécie dans les conditions de culture en laboratoire (Cohen et Beisson, 1980). Ces souches ont été mises en évidence par un crible basé sur l'absence d'exocytose des trichocystes révélée par de l'acide psychrique, un fixateur sécrétagogue. Parmi cette collection, la classe de mutants nd, pour non-discharge trichocystes, a été identifiée. Il a été montré que les trichocystes sont parfaitement formés et ancrés sous la membrane mais incapables d'être relargués dans le milieu extérieur. Les mutations dans ces gènes peuvent être facilement complétées en permettant l'expression du gène sauvage (Froissard et al., 2004).



Lors des expériences préliminaires effectuées, nous n'avons observé aucune modification de la voie de sécrétion régulée, PtBug22p ne semble pas intervenir dans la voie de formation et de relargage des trichocystes. Nous avons donc utilisé cette propriété pour nos différents témoins. Ces témoins seront explicités plus tardivement dans ce matériel et méthodes.

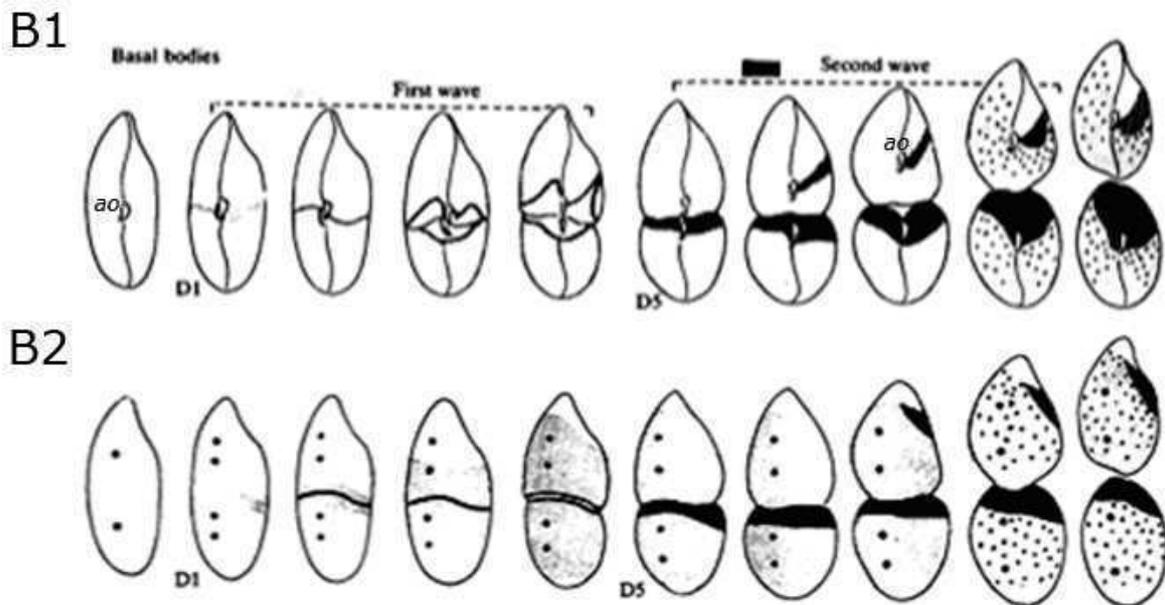
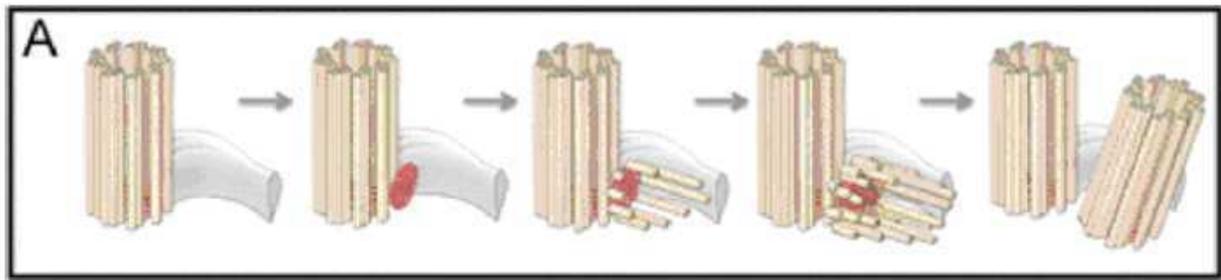
### **Deux types de noyaux**

La paramécie présente deux types de noyaux, le micronoyau ou noyau germinale, et le macronoyau, ou noyau somatique. La présence de deux types de noyaux qui coexistent dans le même cytoplasme est une caractéristique spécifique des ciliés et préfigure la dualité germe/soma rencontrée chez les métazoaires. Lors de la division végétative des cellules, les micronoyaux entrent en mitose. Le macronoyau contient des centaines de copies de chaque gène, il se divise sans multiplication de l'ADN.

La reproduction sexuée peut être de deux types : (1) la conjugaison, qui permet la fécondation réciproque des deux partenaires ; (2) l'autogamie, qui consiste en une autofécondation (Sonneborn, 1974). A chaque événement sexuel, le macronoyau est dégradé et un nouveau est formé à partir du nouveau noyau diploïde. Lors de la formation du nouveau macronoyau, les chromosomes sont amplifiés (environ 800 fois) des séquences spécifiques sont éliminées et des télomères sont formés (Meyer et Garnier, 2002).

### **Cils et corps basaux**

La paramécie est un unicellulaire recouvert de plus de 4000 cils qu'elle utilise pour se déplacer et se nourrir. Ces cils sont disposés d'une façon bien définie sur toute la surface de la cellule grâce à la régulation fine de l'implantation des corps basaux (figure 10 A). L'architecture corticale est déterminée par l'arrangement des corps basaux et du cytosquelette qui leur est associé. Cette organisation définit plusieurs milliers de



**Figure 11 : La duplication des corps basaux chez *Paramecium tetraurelia***

A. Présentation schématique de la duplication des corps basaux de la paramécie à l'échelle d'un corps basal. (Gogendeau et al., 2011) B. Présentation schématique des vagues de duplication des corps basaux chez la paramécie à l'échelle de la cellule. B1. Face ventrale, B2. Face dorsale. La première vague de duplication débute au sillon central puis se propage. La deuxième vague se localise au niveau de ce même sillon sur la cellule arrière et proche de l'appareil oral sur la cellule avant. ao : appareil oral (Iftode et al., 1989).

territoires, appelées unités corticales, et organisés en rangées longitudinales, les cinéties. Chaque unité corticale possède un ou deux corps basaux, avec un ou deux cils dans les unités à deux corps basaux, selon sa position sur la cellule. Lors de la division cellulaire, les corps basaux de la paramécie sont dupliqués afin de reproduire deux paramécies filles avec un agencement des corps basaux totalement identique à celui de la cellule mère.

La duplication du corps basal a été extrêmement bien étudiée, en particulier au laboratoire (Iftode et al., 1989). Sur la figure 11 A, un schéma décrit la duplication de ces corps basaux. Le corps basal père, ancré à la membrane, reste cilié. Hormis son ancrage membranaire, la duplication du corps basal de la paramécie est identique à la duplication centriolaire rencontrée chez les métazoaires. Le corps basal fils va apparaître à proximité du corps basal père, en position antérieure à ce dernier dans la rangée de corps basaux, et de façon perpendiculaire à ce dernier. Le corps basal fils va alors s'allonger. Après sa formation, le corps basal néoformé va se redresser afin de s'ancrer à la membrane plasmique (Dippell, 1968 ; Iftode et Fleury-Aubusson, 2003 ; Jerka-Dziadosz et al., 2010 ; Gogendeau et al., 2011). Les corps basaux ne sont pas tous dupliqués également. Certaines zones ne subissent que très peu de réarrangements alors que d'autres subissent une hyperduplication. Ces champs sont visualisable figure 11 B. La duplication des corps basaux débute dans la partie médiane de la paramécie, près de l'appareil oral, et l'on voit très vite apparaître le fuseau de division. La zone de duplication va alors s'étendre autour de ce sillon. Au fur et à mesure de la duplication, les paramécies vont s'allonger et l'on voit apparaître un anneau de constriction de plus en plus réduit entre les deux, jusqu'à la séparation complète des cellules.

Chez la paramécie, les cils sont motiles à l'exception d'un petit nombre de cils non motiles (3 à 10), à l'arrière de la cellule, plus longs que les autres. Ces derniers ont un rôle encore mal compris, mais il est admis qu'ils doivent servir de gouvernail à la cellule. Les cils motiles battent de manière coordonnée pour former les vagues métachronales



observées par Pàrducz (1952) puis Grebecki (1964). Cette coordination assure une nage en spirale extrêmement efficace pour le déplacement de la paramécie.

### Témoins utilisés

Lors des transformations par injection, le mutant nd7-1 est utilisé (Skouri et Cohen, 1997). Le gène sauvage *ND7* contenu dans un plasmide d'expression de type pPXV (décrit dans le papier) est co-injecté avec le gène d'intérêt. Les cellules co-transformées acquièrent alors la capacité de relarguer leurs trichocystes. Les cellules transformées sont mises en évidence par de l'acide psychrique, fixateur sécrétagogue

La souche utilisée lors des expériences d'inactivation génique est la souche sauvage de référence de type d4-2. Les cellules sont inactivées pour le gène d'intérêt et, en parallèle, pour le gène *ND7*, utilisé ici comme témoin de l'efficacité de l'inactivation génique. Les cellules d4-2 après inactivation génique contrôle perdent leur capacité à relarguer leurs trichocystes. Ce phénotype est révélé par l'acide psychrique.

### Construction des plasmides d'expression :

Les différentes séquences correspondant aux gènes *BUG22* ont été clonées dans le vecteur pPXV-GFP afin de permettre leur expression dans la paramécie. Les sites de clonages sont chaque fois les sites *Spe1/Xho1*. Dans les quatre cas, la GFP est fusionnée à la partie C terminale du gène *BUG22* d'intérêt.

### pPXV-PtBug22-GFP :

Le gène *PtBUG22c* a été amplifié à l'aide des oligonucléotides  
GACTGTAAGTATGTTCAAGAACTCATTCC et  
CGATTCCTCGAGTCTCCTCCTCCTTATTTTATAGATGG.

<b>Anticorps</b>	<b>dilution</b>	<b>Spécificité</b>	<b>Structure mise en évidence</b>	<b>Référence</b>
ID5	1/350	Anti-polyglutamylation	Corps basaux	Wehland et Weber, 1987
TAP952	1/50	Anti-monoglycylation	Corps basaux et cils	Callen et al., 1994
Anti-cils	1/500	Anti-polyglycylation	Corps basaux et cils	Cohen et al., 1982
TEU 348	1/50	Anti- $\alpha$ -tubuline acétylé	Corps basaux, cils et réseaux de tubulines acétylées internes	Callen et al., 1994
Poly E	1/50	Anti-polyglutamylation	Corps basaux et cils	Shang et al., 2002
Poly G	1/50	Anti-polyglycylation	Corps basaux et cils	Duan et Gorovsky, 2002

**Tableau 3 : Anticorps primaires utilisés sur *P. tetraurelia***

Les anticorps utilisés ont des spécificités propres et reconnaissent différents niveaux de modifications post-traductionnelles, ils permettent la mise en évidence de différentes structures dans la paramécie.

*pPXV-HsBug22-GFP :*

Le gène *HsBUG22* a été amplifié à l'aide des oligonucléotides

GACTGTAAGTAGTATGTTCAAAAACACG et CGATTCCTCGAGTCCTCCTCCTTGCTTGCCTTGTTTC

*pPXV-CeBug22-GFP :*

Le gène *CeBUG22* a été amplifié à l'aide des oligonucléotides

GACTGTAAGTAGTATGTTTCATAACACG et CGATTCCTCGAGTCCTCCTCCTCAGAAAGTCATTGC.

*pPXV-AtBug22-GFP :*

Le gène *AtBUG22* a été amplifié à l'aide des oligonucléotides

GACTGTAAGTAGTATGTTCAAGAACACGTTTCAATCTG et  
CGATTCCTCGAGTCCTCCTCCTGCTTTCTGCACTGGGAGATAC.

***Immunofluorescence in situ.***

Les cellules sont perméabilisées en TBS-triton X-100, 3% durant 5 minutes puis fixées en TBST paraformaldéhyde durant 10 minutes sauf pour les anticorps anti- $\alpha$ -tubuline et TEU 348 pour lesquels les cellules sont fixées 45 minutes. Les cellules sont ensuite lavées en TBST-BSA. Les cellules sont marquées 45 minutes par l'anticorps primaire (les différents anticorps primaires utilisés sont présentés dans le tableau 3). Les cellules sont ensuite lavées en TBST-BSA avant d'être marquées par les anticorps secondaires utilisés au 1/500. Les anticorps secondaires utilisés sont les alexa 488 et 555. Les noyaux sont marqués au Hoescht-33258 et les lames sont montées avec du Cityfluor (London).



## Etude d'AtBug22p chez les plantes terrestres

Les expériences réalisées sur les plantes terrestres ont été effectuées dans le laboratoire de David Bouchez à l'UMR1318 de Versailles en collaboration avec Martine Pastuglia. Des plants d'*Arabidopsis thaliana* et de *Nicotiana Benthiana* ont été utilisés.

### Construction du plasmide pour l'extinction génique, pGREEN-AtBUG22

Deux séquences en palindrome de 540pb s'étendant du nucléotide 30 au nucléotide 570 ont été amplifiées par PCR en utilisant les oligo-nucléotides GTCTCGAGTCTGTCTATTTTGTACAGTC et GTGGTACCTGCTTTCTGCACTGGGAG pour la première PCR et les oligo-nucléotides GAATCGATTCTGTCTATTTTGTACAG et CTGGATCCTGCTTTCTGCACTGGGAG pour la deuxième. Ces fragments ont été clonés aux sites *Xho1/Kpn1* pour le premier fragment et *BamH1/Cla1* pour le deuxième, dans le plasmide pKANNIBAL (conformément au protocole décrit par Helliwell et Waterhouse en 2003). Puis la cassette d'intérêt a été transférée par les sites Not1 dans le plasmide pGREEN.

### Construction des plasmides d'expression permettant l'expression d'AtBug22p avec une étiquette fluorescente à sa partie N terminale

#### Plasmide donneur Gateway :

Le gène *AtBUG22* avec son codon stop a été amplifié avec les oligonucléotides GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACAAAATGTTCAAGAACACGTTTC et GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCATGCTTTCTGCACTGGGAG. Ce fragment a ensuite été cloné dans le plasmide donneur permettant le transfert de cassette de type gateway.



*pGWB6-AtBUG22* :

Le gène *AtBUG22* a été transféré du plasmide donneur dans le plasmide d'expression pGWB6 grâce au système gateway.

*pH7WGR2-AtBUG22* :

Le gène *AtBUG22* a été transféré du plasmide donneur dans le plasmide d'expression pH7WGR2 grâce au système gateway.

***Construction des plasmides d'expression permettant l'expression d'AtBug22p avec une étiquette fluorescente à sa partie C terminale.***

*Plasmide donneur gateway* :

Le gène *AtBUG22* sans son codon stop a été amplifié avec les oligonucléotides GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACAAAATGTTCAAGAACACGTTTC et GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATGCTTTCTGCACTGGGAG. Ce fragment a ensuite été cloné dans le plasmide donneur permettant le transfert de cassette de type gateway.

*pGWB5-AtBUG22* :

Le gène *AtBUG22* a été transféré du plasmide donneur dans le plasmide d'expression pGWB5 grâce au système gateway.



### *pH7RWG2-AtBUG22* :

Le gène *AtBUG22* a été transféré du plasmide donneur dans le plasmide d'expression pH7RWG2 grâce au système gateway.

### *Expression transitoire dans les feuilles de Nicotiana benthamiana*

Chacun des plasmides d'expression a été introduit dans *Agrobacterium tumefaciens* (souche C58C1, pMP90) par électrolocation. Les bactéries transformées ont été cultivées sur la nuit à 28°C sous agitation. Chaque culture a été culotée, lavée et resuspendue dans du milieu d'infiltration (13g/L de milieu de bouturage (Duchefa Biochemie) et 40g/L de sucre, pH5,7) à une DO<sub>600</sub> de 0,5. Les feuilles de tabac *N. benthamiana* ont été infiltrées par pression à travers l'épiderme inférieur. La fluorescence, RFP ou GFP a été détectée 2 jours après l'infiltration.

### *Expression stable d'Arabidopsis thaliana*

Les plants *d'Arabidopsis* ont été transformés selon le protocole d'infiltration vide de Bechtold et Al (1993).



## **Etude de HsBug22p dans les cellules de mammifère en culture**

Les expériences réalisées sur les cellules de mammifère en culture ont été effectuées au laboratoire de Sophie Saunier avec l'aide de Flora Legendre dans l'unité INSERM U983 à l'Hôpital Necker-Enfant Malades, Paris 15<sup>ème</sup>.

Les cellules de mammifère en culture utilisées ont la capacité de nucléer un cil primaire à leur arrivée en phase quiescente. Elles sont de type IMCD (Inner Medullary Collecting Duct), cellules rénales du canal collecteur médullaire interne de souris et de type RPE1 (Retinal Pigment Epithelium), cellules épithéliales de rétine humaine.

### **Anticorps et plasmides :**

Les anticorps commerciaux sont : GTL3, utilisé au 200<sup>ième</sup> ; l' $\alpha$ -tubuline et l' $\alpha$ -tubuline acétylé (Sigma), utilisés tout deux au 1000<sup>ième</sup> ; la  $\beta$ -caténine (Transduction Laboratories), utilisée au 200<sup>ième</sup> ; le péricentrine, utilisé au 200<sup>ième</sup>. Les anticorps secondaires étaient les Alexa Fluor, 488 et 555 (Molecular Probes), utilisés chacun au 200<sup>ième</sup>. Les noyaux sont marqués au Hoescht utilisés au 200<sup>ième</sup>. Le plasmide utilisé pour les transfections est le même que celui utilisé dans la publication (laligné et al., 2010). La phalloïdine a été utilisée au 200<sup>ième</sup>.

### **Culture des cellules pour l'immunofluorescence :**

Les cellules d'épithélium de rétine (RPE1) et les cellules d'épithélium de reins (IMCD) sont communément utilisées pour étudier la formation du cil primaire. Elles sont cultivées dans des boîtes de 24 puits jusqu'à 80 à 100% de confluence pour les cellules menées à phase quiescente et jusqu'à 30 à 60% pour les cellules gardées en phase



proliférative, en DMEM/F12 (Gibco) supplémenté avec 10 % de serum de veau foetal. Les cellules sont alors placées en Opti-MEM (Gibco), milieu minimum dépourvu de facteurs de croissance, pour induire la ciliogénèse ou laissées en DMEM/F12 pour les cellules gardées en phase proliférative.

### **Culture des cellules et transfection :**

Les cellules RPE1 sont cultivées jusqu'à 60 à 80% de confluence en DMEM / F12 (Gibco) dans des boîtes de 24 puits et transfectées avec l'agent de transfection FuGENE HD (Roche) dans l'Opti-MEM. Chaque culture est transfectée avec une quantité d'ADN de 0,25 avec un ratio de FuGENE HD 1:3 ou avec 0,5µg d'ADN et un ratio de FuGENE HD de 2:4. Puis les cellules sont starvées de 24 à 48H pour induire la ciliogénèse.

### **Immunofluorescence :**

Les cellules sont soit fixées en méthanol froid (-20°C) pendant 15 minutes, soit fixées en paraformaldéhyde 4% pendant 20 minutes suivit de NH<sub>4</sub>Cl à 50mM à température ambiante et perméabilisées au triton 0,3% pendant 10 minutes. Les lames sont bloquées et marquées dans du PBS-BSA (3%) –tween (0,1%). Les lavages sont faits en PBS. Les lames sont montées en Fluoprep.



# Résultats



**Figure 12 : Relations évolutives entre les gènes paralogues *PtBUG22*.**

Copie d'écran de la base de données ParameciumDB (<http://paramecium.cgm.cnrs-gif.fr/>) montrant les relations évolutives entre les différents paralogues *PtBUG22* retrouvés chez la paramécie, *Paramecium tetraurelia* : ces gènes sont issus des deux dernières duplications et sont donc, de ce fait, des ohnologues. L'ohnologue de la duplication la plus ancienne a vraisemblablement été perdu. La correspondance entre les numéros d'accèsion des gènes et le nom que nous leur avons donné est reportée sur la figure.

## Introduction

Le point de départ du projet provenait de l'identification de la protéine PtBug22p dans le protéome de cils de paramécie *Paramecium tetraurelia*. Cette protéine s'avère être codée par quatre gènes chez cet organisme, ce qui s'explique par le fait que son génome a subi plusieurs duplications globales au cours de l'évolution (Aury et al., 2006) entraînant une multiplication des gènes. Les gènes paralogues issus d'une duplication globale d'un génome sont communément appelés ohnologues. Chacune de ces duplications a été suivie soit de la délétion d'une des copie dupliquée, soit de la conservation des deux copies qui ont plus ou moins divergé, pouvant permettre l'acquisition de nouvelles fonction, les pertes de gènes dupliqués étant les événements les plus fréquents. La conservation de deux copies de gènes reflète généralement des contraintes évolutives liées à une stœchiométrie stricte avec d'autres protéines au sein de complexes supramoléculaires ou à un fort taux d'expression des produits pour lesquels ils codent (Aury et al., 2006).

Les relations d'ohnologie entre les quatre gènes *PtBUG22* présentées figure 12 montrent que ces quatre gènes proviennent des deux duplications les plus récentes du génome et que les ohnologues de la duplication la plus ancienne ont été perdus. Ils présentent des divergences nucléotidiques, mais codent des protéines 100% identiques longues de 191 acides aminés et ayant un point isoélectrique de 9,76. Cette conservation de la séquence protéique suggère que PtBug22p est, chez la paramécie, soumise à de fortes contraintes.



Espèces	Centrioles / corps basaux	Cil ou flagelle motile	Cil immotile	<i>BUG22</i>	% d'identité protéique avec PtBug22p	Synonymes
<i>H.sapiens</i>	Oui	Oui	Oui	Oui	91	fSAP23,C16orf80,GTL3
<i>D. rerio</i>	Oui	Oui	Oui	Oui	91	zgc:73380
<i>X. laevi</i>	Oui	Oui	Oui	Oui	91	
<i>C. intestinalis</i>	Oui	Oui	Oui	Oui	92	
<i>D. melanogaster</i>	Oui*	Oui	Oui	Oui	91	CG5343
<i>C. elegans</i>	Oui*	Non	Oui*	Oui	78	
<i>T. adhaerens</i>	ND	Oui	ND	Oui	85	
<i>M. brevicollis</i>	Oui	Oui	Non	Oui	91	
<i>S. cerevisiae</i>	Non	Non	Non	Non		
<i>B. dendrobatidis</i>	Oui	Oui	Non	Oui	85	
<i>A. thaliana</i>	Non	Non	Non	Oui	74	
<i>S. moellendorffii</i>	Oui	Oui	Non	Oui	86	
<i>P. patens</i>	Oui	Oui	Non	Oui	87	
<i>C. reinhardtii</i>	Oui	Oui	Non	Oui	90	BUG22,FAP20
<i>Chlorella sp</i>	Oui	Non	Non	Oui	82	
<i>Micromonas sp</i>	Oui	Oui	Non	Oui	91	
<i>D.discoideum</i>	Non	Non	Non	Non		
<i>P. tetraurelia</i>	Oui	Oui	Oui	Oui	100	BUG22
<i>T. thermophila</i>	Oui	Oui	ND	Oui	95	
<i>N. gruberi</i>	ND	Oui	Non	Oui	90	
<i>T. gondii</i>	Oui*	Oui	Non	Oui	84	
<i>P. falciparum</i>	Oui	Oui	Non	Oui	45	
<i>Gi. Lamblia</i>	Oui	Oui	Non	Oui	77	
<i>T. brucei</i>	Oui	Oui	Non	Oui	82	
<i>T. pseudonana</i>	Oui	Non	Non	Oui	92	
<i>P. tricornutum</i>	ND	Non	Non	Non		

**Tableau 4 : Conservation du gène *BUG22* au cours de l'évolution**

Présence ou absence de *BUG22* dans différents organismes corrélée à la présence de cils flagelles et centrioles. Nous constatons que *BUG22* est retrouvé dans toutes les espèces portant cils et flagelles sans exception. *BUG22* est par contre absent dans les espèces ne portant pas ces structures excepté chez les plantes supérieures, par exemple *A. thaliana*. Les pourcentages d'identité protéique entre PtBug22p et ces homologues, estimés à partir de CilDB et les synonymes de *BUG22* sont reportés dans le tableau.

\* : La structure a beaucoup divergée de la structure centriolaire ou ciliaire communément conservée dans l'évolution.

	Référence	Espèce	Protéomes	Présence de Bug22p
Protéomes de cils et flagelles et spermatozoïdes	Arnaiz et al. 2009	<i>P. tetraurelia</i>	Cils	Oui
	Pazour et al. 2005	<i>C. reinhardtii</i>	Flagelles	Oui
	Boesger et al. 2009	<i>C. reinhardtii</i>	Flagelles phosphoprotéome	Non
	Ostrowski et al. 2002	<i>H. sapiens</i>	Cils	Non
	Liu et al. 2007	<i>M. musculus</i>	Photorécepteurs cils sensoriels	Oui
	Cao et al. 2006	<i>M. musculus</i>	Axonèmes flagelles spermatozoïdes	Non
	Mayer et al. 2008	<i>R. norvegicus</i>	Cils sensoriels olfactifs	Non
	Mayer et al. 2009	<i>R. norvegicus</i>	Cils sensoriels olfactifs	Non
	Broadhead et al. 2006	<i>T. brucei</i>	Flagelles	Oui
	Smith et al. 2005	<i>T. thermophila</i>	Cils	Oui
	Dorus et al. 2006	<i>D. melanogaster</i>	Spermatozoïde complet	Non
	Marinez-Heredia et al. 2006	<i>H. sapiens</i>	Spermatozoïde complet	Non
	Baker et al. 2008	<i>M. musculus</i>	Spermatozoïde complet	Oui
	Baker et al. 2008	<i>R. norvegicus</i>	Spermatozoïde complet	Oui
	Huang et al. 2008	<i>M. musculus</i>	Spermatozoïde complet pendant la spermatogénèse	Non

**Tableau 5 : Résultats des analyses protéomiques de cils et flagelles dans différentes espèces**

Les données obtenues dans différentes études de protéomes ciliaires compilées dans la base de donnée Cildb (<http://cildb.cgm.cnrs-gif.fr/>) ont été analysées afin d'extraire les informations concernant Bug22p. Cette protéine est identifiée dans 7 études sur les 15 répertoriées.

## **BUG22 dans les différentes espèces eucaryotes**

Le tableau 4 décrit la présence ou l'absence de Bug22p dans le génome de différentes espèces, corrélée à la présence ou non de cils, flagelles et centrioles. La protéine Bug22p est présente chez tous les organismes portant des cils et flagelles. On la retrouve aussi chez les plantes terrestres, que celles-ci comportent ou non une phase flagellée dans leur cycle. Par contre, chez les champignons qui ont perdu leur fonction ciliaire, on ne retrouve pas la protéine Bug22p, bien qu'elle soit présente dans les champignons qui ont gardés une phase flagellée.

## **Des analyses à haut débits**

J'ai examiné les études à haut débit disponibles concernant les cils, flagelles et centrioles réalisées sur divers organismes pour rechercher si on y détectait la présence de Bug22p. Je donnerai ici les données obtenues à partir de ces études au début de ma thèse, ainsi que celles provenant des analyses plus récentes, facilement accessibles par la base de données CilDB.

## **Analyses de protéomes**

Le tableau 5 décrit la présence ou l'absence de Bug22p dans différentes analyses de protéomes réalisées soit à partir de cils et flagelles isolés soit à partir d'extraits totaux de cellules flagellées (spermatozoïdes). En plus de sa présence dans la protéomique de cils de paramécies, Bug22p est retrouvée dans la plupart des analyses concernant les cils motiles ou immotiles : par exemple flagelles chez *Chlamydomonas* (Pazour et al. 2005) et trypanosome (Broadhead et al. 2006), et photorécepteurs de la souris (Liu et al. 2007).

	Référence	espèce	Protéome	Présence de Bug22p
Protéomiques de corps basaux, centrioles et MTOCs	Keller et al. 2005	<i>C. reinhardtii</i>	Corps basaux	Oui
	Kilburn et al. 2007	<i>T. thermophila</i>	Corps basaux	Non
	Muller et al. 2010	<i>D. melanogaster</i>	Centrosome mitotique	Non
	Andersen et al. 2003	<i>H. sapiens</i>	Centrosome	Non
	Nogales-Cadenas et al. 2006	<i>H. sapiens</i>	centrosomeDB (compilation)	Non
	Sauer et al. 2005	<i>H. sapiens</i>	Fuseaux mitotiques	Non
	Sakamoto et al. 2008	<i>R. norvegicus</i>	MAPs	Non
	Hughes et al. 2008	<i>D. melanogaster</i>	MAPs	Non

**Tableau 6 : Résultats des analyses protéomiques de corps basaux, centrioles et MTOCs dans différentes espèces**

Les données obtenues dans différentes études de protéomes de corps basaux et MTOCs compilées dans la base de donnée Cildb ont été analysées afin d'extraire les informations concernant Bug22p. Cette protéine est identifiée dans 1 étude sur les 8 répertoriées.

	Référence	Espèce	Expression	Sur-expression de BUG22
Analyses de transcriptomes	Arnaiz et al. 2010	<i>P. tetraurelia</i>	Reciliation	oui pour a et c non pour b et d.
	Kubo et al. 2008	<i>H. sapiens</i>	Ectoderme sur-exprimant foxJ1	Oui
	Chen et al. 2006	<i>C. elegans</i>	Régulation négative dans daf19	Non
	Keller et al. 2005	<i>C. reinhardtii</i>	Reflagellation	Oui
	Pazour et al. 2005	<i>C. reinhardtii</i>	Reflagellation	Non
	Stolc et al. 2005	<i>C. reinhardtii</i>	Reflagellation	Oui
	Stubbs et al. 2008	<i>X. laevis</i>	Analyse comparative de tissus ciliés	Non
	Blaque et al. 2005	<i>C. elegans</i>	Analyse comparative de tissus ciliés	Non
	Ross et al. 2007	<i>H. sapiens</i>	Différentiation muco-ciliaire	Non
	McClintock et al. 2008	<i>M. musculus</i>	Analyse comparative de tissus ciliés	Non

**Tableau 7 : Résultats d'analyses de transcriptomes pendant la ciliogénèse dans différentes espèces**

Les données obtenues dans différentes études de transcriptome pendant la ciliogénèse compilées dans la base de donnée Cildb ont été analysées afin d'extraire les informations concernant *BUG22*. Ce gène est identifié dans 3 études sur les 9 répertoriées.

Bug22p est également retrouvée dans les protéomes de spermatozoïdes complets étudiés chez le rat et chez la souris (Baker et al. 2008) ou de corps basaux chez *Chlamydomonas*, mais est absente des autres analyses de protéome de corps basaux, centrosomes et MTOCs (tableau 6).

### Analyse de l'expression de BUG22

#### Transcriptomes

En complément de l'analyse du protéome ciliaire, le laboratoire a effectué une analyse de l'expression des gènes de paramécies en cours de ciliogénèse. Sur les 39642 gènes dénombrés, 963 sont surexprimés avec un taux de confiance moyen (Arnaiz et al., 2010). Sur ces 963 gènes surexprimés, on retrouve les gènes *PtBUG22a* et *PtBUG22c*. Ce résultat, associé à d'autres analyses qui révèlent que *CrBUG22* est également surexprimé durant la régénération du flagelle chez *Chlamydomonas* (Keller et al. 2005, Stolc et al. 2005) et pendant la ciliogénèse des cils motiles chez le Xénope (Stubbs et al. 2008), conforte l'hypothèse d'une implication de Bug22p dans la fonction des cils motiles (tableau 7).

#### Hybridations *in situ* dans des organismes ciliés

Dans le cadre d'analyses systématiques de l'expression génique durant l'embryogénèse, l'expression du gène *BUG22* a été étudiée par hybridation *in situ* réalisée chez la drosophile et le poisson zèbre. L'expression spécifique de *BUG22* chez la drosophile est visualisable sur la page <http://insitu.fruitfly.org/cgi-bin/ex/report.pl?ftype=3&ftext=RE32166-tf> et chez le poisson zèbre sur la page <http://zfin.org/action/quicksearch?pageSize=25&query=zgc%3A73380&categoryID=Expression>.



Durant l'embryogénèse de la drosophile, il est observé que le transcrit de *DmBUG22* est présent aux stades très précoces de l'embryogénèse en tant que transcrit maternel ainsi que dans les cellules du blastoderme. Son expression est ensuite détectée très faiblement de manière ubiquitaire, mais *DmBUG22* est enrichi dans le système nerveux sensoriel ainsi que dans les complexes sensoriels dorsaux/latéraux et ceux de la tête. Finalement, *DmBUG22* est exprimé dans les régions qui donneront naissance aux cils sensoriels.

De la même manière que pour la drosophile, il a été effectué des analyses systématique de l'expression génique durant l'embryogénèse du poisson zèbre (*D. rerio*) (Thisse et al., 2004). Il est montré que *DrBUG22* est exprimé dans la vésicule de Kupffers, équivalente au nœud embryonnaire des vertébrés. *DrBUG22* est exprimé au niveau du tube neural et du canal pronéphrique auxquels s'ajoute la corde spinale ventrale. Ces organes sont ceux qui sont principalement touchés lors de mutations de gènes codant des protéines ciliaires chez le poisson zèbre. La présence de *DrBUG22* dans ces organes est donc un élément supplémentaire impliquant DrBug22p dans la fonction ciliaire.

#### Analyse par hybridation in situ chez un organisme non cilié, *A. thaliana*

La protéine AtBug22p n'a pas été la cible d'analyses spécifiques effectuées chez les plantes terrestres, mais il est possible de trouver des données sur son expression grâce à des analyses systématiques accessibles dans des bases de données spécialisées. Ces analyses ont permis de réunir différents éléments qui ont, bien sûr, besoin d'être vérifiés par une phase d'expérimentation spécifique, mais qui peuvent nous donner des pistes pour évoquer une éventuelle fonction pour la protéine AtBug22p.

Les résultats d'une analyse de l'expression du gène *AtBUG22* dans les différentes organes de la plante *A. thaliana* sont accessibles dans la base de données



<https://www.genevestigator.com/gv/>. Ces analyses montrent qu'*AtBUG22* est un gène exprimé de façon ubiquitaire dans la plante. Ce gène est sur-exprimé précocement au cours du développement de la plante puisqu'on la retrouve au niveau des cotylédons, elle est à nouveau plus exprimée après la floraison, dans les étamines et dans le pollen. *AtBUG22* est aussi exprimé dans le xylème. On peut aussi noter que *AtBUG22* est plus exprimée dans la feuille juvénile et que son expression décroît lorsque la feuille entre en sénescence. Une autre étude réalisée cette fois en fonction de la chronologie de la croissance de la plante a montré que le niveau d'expression le plus fort se situe au niveau de la graine sèche.

Une deuxième base de données : <http://bar.utoronto.ca/welcome.htm> permet d'obtenir des informations sur l'expression d'*AtBUG22*. Les résultats indiquent qu'*AtBUG22* est exprimé préférentiellement dans les stomates ainsi que dans la graine sèche et dans les racines.

### **Analyse génomique**

Chez le nématode, la drosophile et la souris l'expression des gènes ciliaires est contrôlée par des facteurs de transcription de type RFX qui se fixent spécifiquement sur une séquence régulatrice appelée "X-box" (revue : Thomas et al., 2010). Trois équipes ont utilisé des approches bioinformatiques et génomiques pour tenter d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la ciliogénèse en recherchant la présence de « X-box » dans leurs séquences promotrices (Efimenko et al., 2005 ; Blacque et al., 2005 ; Laurençon et al., 2007). Bien que des séquences de type « X-box » n'aient pas été mises en évidence en amont du gène *DmBUG22* chez la drosophile, on retrouve ce type de séquence devant le gène *CeBUG22* chez le nématode ce qui suggère fortement que *CeBug22p* est exprimé dans des tissus ciliés de cet organisme. Le nématode n'ayant pas de cils motiles, cela indique que cette protéine intervient également dans la biogénèse ou le fonctionnement des cils non motiles.



### Recherche de partenaires

La technique de double hybride a été utilisée à grande échelle pour détecter, en masse, des interactions physiques entre deux protéines codées par le génome de différents organismes. Nous avons recherché d'éventuels partenaires de Bug22p dans les bases de données décrivant ces interactions (BIOGRID).

Chez la drosophile, *D. melanogaster*, deux interagants potentiels de DmBug22p (Giot et al, 2003) ont été identifiés. Le premier, su(wa) pour "supressor of white apricot" (FBgn0003638) est un facteur de régulation du splicing des pré-messagers (Zachar et al., 1994). Le second est la Qilin (FBgn0031196) dont des homologues ont été identifiés chez plusieurs espèces (dyf-3 chez le nématode et CLUAP1 chez l'homme). Si cette protéine a été localisée dans le noyau de cellules épithéliales de colon humain de type HCT116 (Takahashi et al., 2004), elle a également clairement une fonction ciliaire. En effet, elle a été tout d'abord identifiée comme protéine impliquée dans la formation de kystes rénaux chez *D. rerio* (Sun et al., 2004), maladie causée par la perte de fonction des cils des cellules rénales. Puis, chez *C. elegans* et *C. reinhardtii*, il a ensuite été démontré qu'elle participe au transport intraflagellaire et fait partie intégrante du complexe B des IFT (Murayama et al., 2005 ; Ou et al. 2005). L'interaction potentielle entre la Qilin et Bug22p était donc un argument supplémentaire en faveur de la fonction ciliaire de ce dernier.



## Conclusion

L'ensemble de ces données suggérait fortement une implication de Bug22p dans la fonction ciliaire, mais il était nécessaire de le démontrer. C'est pourquoi j'ai entrepris son analyse fonctionnelle en commençant par étudier principalement sa localisation et l'effet de sa déplétion chez la paramécie. La très grande conservation en acides aminés observée entre les protéines de paramécie et de l'homme nous a également incités à vérifier si elle s'accompagnait d'une conservation fonctionnelle. Les premiers résultats ont été décrits dans un article (Laligné et al., 2010), ils sont résumés dans le prochain chapitre. Les résultats de l'étude fonctionnelle réalisée par la suite seront présentés dans les chapitres suivants.



## **Chapitre I. Analyse de la fonction de Bug22p chez la paramécie**

### **Implication de PtBug22p dans la détermination du battement ciliaire**

Une analyse fonctionnelle par localisation et inactivation génique a permis de mettre en évidence l'implication de PtBug22p dans la détermination de la forme du battement ciliaire de la paramécie. Ces résultats ont été publiés (Laligné et al., 2010) et sont présentés dans ce chapitre, je serai donc brève dans leur description.

Bug22p, a Conserved Centrosomal / Ciliary Protein Also Present in Higher Plants, Is Required for an Effective Ciliary Stroke in *Parmecium*

*Laligné, C., Klotz, C., Garreau de Loubresse, N., Lemullois, M., Hori, M., Laurent, F.X., Papon F., Louis, B., Cohen, J. & Koll, F. 2010. Eukaryotic Cell 9, 645-655.*



### *Etude de la localisation de PtBug22p*

Par fusion avec la GFP j'ai montré que, chez la paramécie, la protéine PtBug22p comme la protéine humaine se localisent à la fois dans les corps basaux et les cils. Des observations en microscopie électronique permettent de préciser que dans les cils la protéine apparaît régulièrement espacée le long de l'axonème entre les microtubules et la membrane, ce qui peut suggérer qu'elle fait partie du complexe intraflagellaire. Elle est également associée aux corps basaux : dans ce cas on l'observe le long des microtubules formant le cœur du corps basal, dans la zone de transition dans des corps basaux ciliés et entre corps basal et membrane sur des corps basaux non ciliés (figure 4 de l'article).

Depuis la publication, j'ai réalisé d'autres expériences de transformation de paramécie avec le plasmide exprimant la protéine GFP-PtBug22 mais en utilisant un protocole différent. En particulier alors que l'expression de la protéine hybride dans les premières transformations était contrôlée par le vecteur injecté sous sa forme native, les suivantes ont été réalisées avec un vecteur injecté dans le macronoyau sous forme linéaire. Cette linéarisation présente l'avantage de libérer les télomères présents dans la séquence du plasmide et de stabiliser, après transformation dans le macronoyau, le mini-chromosome ainsi obtenu. Comme on peut le constater sur la figure 13, en plus du marquage au niveau des cils et des corps basaux, on observe un marquage conséquent au niveau du noyau. Le réexamen des images obtenues dans les premières expériences confirme que les noyaux étaient effectivement faiblement marqués, mais ce faible marquage était masqué par l'intensité du marquage ciliaire et pouvait passer pour non spécifique.

Nous avons également localisé la protéine dans des cellules humaines (HeLa) non ciliées au niveau des centrioles des cellules en interphase ce qui suggère que cette protéine en plus de sa fonction dans le cil et le corps basal pourrait avoir une fonction au niveau du centrosome.



### *Etude de PtBug22p par inactivation génique*

L'inactivation de *PtBUG22* par ARNi chez la paramécie conduit à un fort ralentissement de la nage des cellules, puis à la mort cellulaire après 3 ou 4 divisions suivant l'inactivation. Des analyses en vidéo microscopie à haute vitesse et en microscopie électronique ont montré que ce ralentissement n'est dû, ni à une absence de cils, ni au ralentissement du battement ciliaire, mais plutôt à un manque de rigidité de ces cils qui induit une modification de la forme du battement ciliaire, le rendant inefficace. Les observations en microscopie électronique de coupes transversales de cils des cellules inactivées indiquent que ce manque de rigidité n'est pas associé avec des défauts importants de la structure de l'axonème. Toutefois les coupes longitudinales montrent que 30% d'entre eux sont souvent courbés avec des pliures de l'axonème.

Après inactivation génique, nous avons pu noter l'apparition de corps basaux délocalisés ou mal orientés sur le cortex de la cellule (figure S3 de l'article) ces défauts étant beaucoup plus prononcés au niveau des corps basaux du goulet. Ceci n'avait pas été inclus dans notre article mais est clairement visualisable sur la figure 14. De telles anomalies de positionnement des corps basaux, quoique plus prononcées, avaient également été constatées chez la paramécie lorsque les centrines centriolaires de type 2 et 3 étaient inactivées (Ruiz et al., 2005). Cette similarité de phénotype pouvait suggérer une interaction (directe ou indirecte) entre les centrines et PtBug22p dans un mécanisme participant à l'ancrage des corps basaux au cortex. L'hypothèse d'une interaction entre PtBug22p et les centrines et en particulier avec la centrine 2 était étayée par le fait que, comme PtBug22p, la centrine 2 se localise chez la paramécie le long des microtubules des corps basaux et au niveau de la zone de transition. Nous avons par ailleurs noté dans la discussion de l'article une coévolution de Bug22p avec les centrines de type 2.



### *Conservation fonctionnelle de Bug22p entre l'homme et la paramécie*

Les défauts de nage induits par la déplétion des protéines de paramécie ont pu être compensés par la transformation avec un plasmide permettant l'expression de l'ADNc *HsBUG22* humain, ce qui montre la conservation fonctionnelle des deux protéines. Cette observation constitue le premier exemple de complémentation fonctionnelle par un gène humain chez un cilié et ouvre la voie à une recherche plus appliquée, en particulier sur les effets des mutations génétiques humaines touchant des protéines ciliaires.

### *Identification d'une séquence consensus*

L'alignement des protéines Bug22p de plusieurs organismes (figure 1 de l'article) révèle l'existence d'une séquence consensus qui diverge entre les protéines de plantes et celles des organismes contenant cils et centrioles. Une hypothèse attrayante est que l'ensemble des acides aminés qui diffèrent dans ces consensus puissent définir une séquence faisant partie d'un signal permettant l'adressage de la protéine dans le cil. De façon étonnante la séquence consensus de la protéine CeBug22p du nématode, qui ne possède que des cils immotiles, contient les 6 premiers acides aminés sur les 7 du consensus ciliaire mais diffère par le dernier acide aminé. Une telle observation permet de supposer que la protéine de nématode pourrait avoir une spécificité différente de celle des protéines d'organismes contenant des cils motiles.

L'article est accessible à l'adresse suivante : <http://ec.asm.org/cgi/content/full/9/4/645>



Après la publication de cet article, je me suis attachée à préciser la fonction de Bug22p chez les plantes, puis dans les cellules de mammifères en culture et j'ai en parallèle essayé d'apporter des éléments de réponses à cinq questions ouvertes par les premiers résultats obtenus chez la paramécie :

1) Existe-t-il une interaction entre Bug22p et la Qilin comme le suggèrent les expériences de double hybride chez la drosophile ?

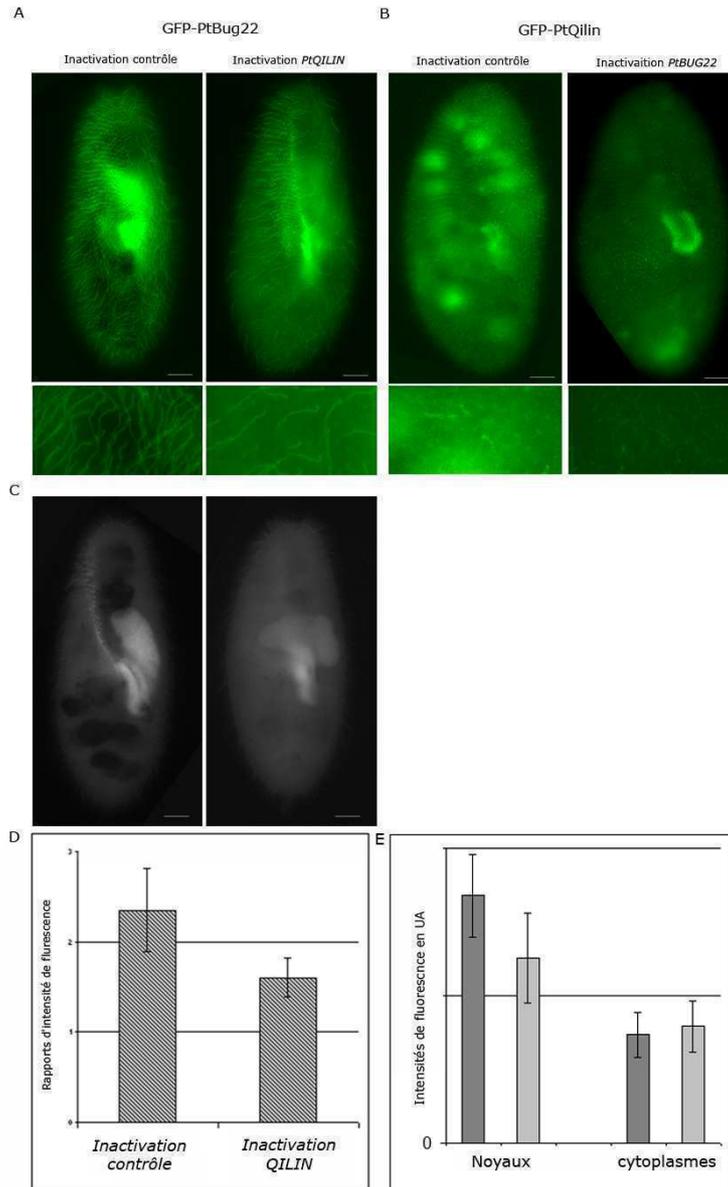
2) Existe-t-il une interaction entre Bug22p et la centrine 2 et des protéines de type FOP (FOR20 en l'occurrence) comme nous l'avons suggéré dans la discussion de l'article ?

3) Bug22p est-elle une protéine de l'IFT ?

4) Les changements d'acides aminés observés dans la séquence consensus des protéines de plante ou de nématode par rapport aux consensus des organismes possédant des cils motiles modifient-ils la capacité de la protéine à pénétrer dans les cils motiles ?

5) La protéine PtBug22p impliquée dans la motilité chez la paramécie, est-elle présente au sein de cils primaires non motiles des mammifères ?

Je décrirai tout d'abord les expériences que j'ai réalisées sur la paramécie pour répondre aux quatre premières questions, puis ensuite mes études réalisées chez les plantes. J'exposerai enfin les résultats obtenus sur les cellules de mammifère qui m'ont amenés à reprendre certaines analyses chez la paramécie



**Figure 13 : Localisation de PtBug22p et Ptqilin dans la paramécie et recherche d'une éventuelle interaction entre les deux.**

La localisation des protéines PtQilinA et PtBug22c est effectuée grâce à une fusion de la GFP en Nter des protéines. A. La protéine GFP-PtBug22 se localise dans les cils de la même manière après l'inactivation de *PtQILIN A+C* qu'après l'inactivation contrôle. B : La protéine GFP-PtQilinA se localise de façon faible dans une partie des cils de la même manière après la déplétion de la protéine PtBug22p que dans la déplétion contrôle. C : En revanche, on observe une différence de répartition de GFP-Bug22 entre le noyau et le cytoplasme selon qu'on inactive les *PtQILIN* ou non. La fluorescence est, chaque fois, observée au microscope à fluorescence directement sur des cellules fixées. Barres d'échelles : 10µm. D-E Estimations de la quantité de fluorescence GFP-PtBug22 après 36H d'inactivation contrôle et *PtQILIN*. D. Mesure du rapport de fluorescence entre noyau et cytoplasme E. Intensités de fluorescence, estimées dans ImageJ en Unités Arbitraires (UA) dans le noyau et dans le cytoplasme. La localisation nucléaire de la protéine GFP-PtBug22 semble diminuer après 36H d'inactivation *PtQILIN*. La Qilin semble donc essentielle à la localisation nucléaire de Bug22p.

## Intéractants potentiels de PtBug22p

### Recherche d'une interaction avec la Qilin

Chez la paramécie, quatre gènes ohnologues (issus des deux dernières duplications de génome) codent pour quatre Qilin distinctes en séquence protéique (PtQilin A, B, C et D), l'une d'entre elles, PtQilinA, diffère des trois autres par une délétion d'environ 40 acides aminés dans sa partie C terminale. Si ces quatre protéines fusionnées à la GFP se localisent de façon identique dans les cils de paramécies (Houssein Chalhoub, étudiant en Master 2 en 2009), des résultats préliminaires indiquaient que la PtQilinA était également capable de se localiser dans le noyau (Houssein Chalhoub, communication personnelle) comme c'est le cas de CLUAP1 (nom de la Qilin chez l'homme) dans les cellules de carcinomes colorectaux (Takahashi et al. 2004). La double localisation de la PtQilinA et de PtBug22p dans le cil et le noyau de paramécie ainsi que l'interaction observée en double hybride entre ces mêmes protéines de drosophile nous ont incitées à rechercher une relation entre la PtQilin et PtBug22p. Pour cela nous avons réalisé des expériences d'inactivation des gènes *PtBUG22* sur des cellules exprimant la PtQilinA fusionnée à la GFP et des inactivations des gènes de *PtQilin* sur des cellules exprimant GFP-PtBug22.

La figure 13, permet de comparer la fluorescence observée sur des cellules témoins exprimant GFP-PtBug22 (figure 13 A) et celle de cellules exprimant PtQilinA-GFP (figure 13 B). Alors que les noyaux de toutes les cellules des clones exprimant GFP-PtBug22 étaient clairement fluorescents (figure 13 C, inactivation contrôle), le marquage des noyaux des cellules exprimant PtQilinA-GFP était variable, le noyau de certaines cellules étant fluorescents et d'autres non (résultat non montré). Nous n'avons pu déterminer clairement les causes de cette variabilité, ce qui ne nous a pas permis de tester l'effet de la déplétion de PtBug22p sur la localisation nucléaire de PtQilinA-GFP.



Sur les cellules exprimant GFP-PtBug22 (figure 13 A), nous observons une fluorescence intense au niveau des corps basaux et le long des cils. En ce qui concerne la PtQilinA-GFP (figure 13 B), une fluorescence plus faible est également détectée au niveau des corps basaux et ne s'étendant que sur la partie proximale de cils. Tous les cils ne sont pas fluorescents.

Comme nous pouvons le constater sur la figure 13 B, la déplétion de PtBug22p n'entraîne pas de baisse de la fluorescence au niveau des cils dans les transformants exprimant la PtQilinA-GFP, indiquant que PtBug22p n'est pas essentielle à la localisation ciliaire de PtQilin.

L'inactivation de *PtQILIN* entraîne une réduction de la taille des cils, 2 à 3 divisions après l'inactivation, ce qui a conduit à leur disparition complète (Chalhoub, communication personnelle) compatible avec son rôle au sein du complexe IFT B observé chez les autres organismes. Comme nous pouvons le constater sur la figure 13 B, si la déplétion de la Qilin induit bien un raccourcissement des cils des cellules exprimant la GFP-PtBug22, ces cils sont toujours fluorescents, indiquant que l'absence de PtQilin n'empêche ni l'insertion ni le maintien de GFP-PtBug22 dans la structure ciliaire. Toutefois on peut noter que, même en absence de cils, les corps basaux sont toujours marqués, indiquant que le recrutement au corps basal est indépendant de cette protéine de l'IFT.

Nous pouvons constater sur la figure 13 C que la fluorescence nucléaire des cellules transformées par GFP-PtBug22 et déplétée pour PtQilin semble diminuer par rapport au témoin. Nous avons quantifié cette diminution en estimant la différence de fluorescence mesurée dans le noyau et dans le cytoplasme ; la moyenne des rapports d'intensité, estimés sur 45 cellules témoins et 47 cellules inactivées, entre ces deux compartiments sont présentés figure 13 D. Comme attendu, le rapport diminue, passant de 2,4 +/- 0,5 à 1,6 +/- 0,2. Pour préciser la cause de la modification du rapport, nous avons analysé les mesures

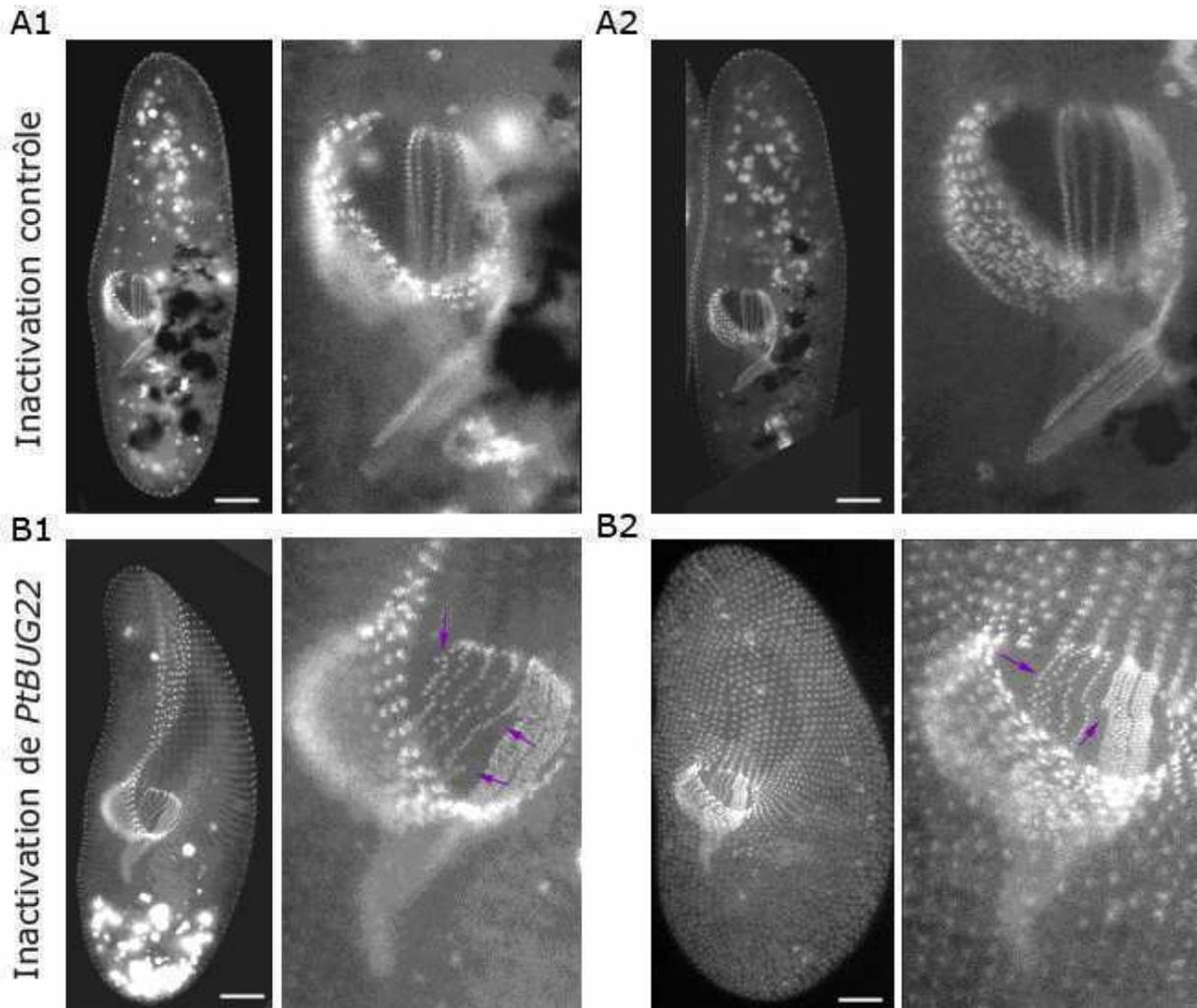


d'intensité obtenues en unité arbitraire. En effet, la diminution de ce rapport peut être due, soit à la diminution de l'intensité de fluorescence dans le noyau, soit à une hausse de l'intensité de fluorescence cytoplasmique, soit à l'addition de ces deux phénomènes. La figure 13 E permet de visualiser les intensités moyennes mesurées dans le cytoplasme et dans le noyau en unité arbitraire. L'intensité de fluorescence nucléaire est réduite en absence de PtQilin alors que l'intensité mesurée dans le cytoplasme reste stable. Ce résultat suggère donc que PtQilin est bien impliquée dans la localisation nucléaire de la protéine PtBug22p.

### Conclusion – discussion

L'ensemble de ces expériences suggère que la localisation de la PtQilin et de PtBug22p dans les cils ne sont pas interdépendantes. Néanmoins il serait intéressant de visualiser l'effet des inactivations sur des cellules en cours de reciliation et au cours de la division. Nous disposons actuellement de nouveaux outils, en particulier de nouveaux anticorps et de nouvelles techniques de marquages immuno-cytochimiques qui permettent de visualiser les cils dès le début de leur formation et sur toute leur longueur (voir plus loin). L'utilisation de ces anticorps pourrait permettre d'étudier plus finement l'effet de ces inactivations croisées.

Bien que l'expression de GFP-PtBug22 n'ait pas été réalisée sous son propre promoteur, la présence de PtBug22p au sein du noyau ne semble pas être un artefact ni résulter d'une simple diffusion de la molécule hybride. Plusieurs protéines ayant des masses moléculaires voisines de Bug22p ont été fusionnées à la GFP (toutes les centrinines par exemple, Gogendeau et al. 2008) et aucune d'elles n'a été observée dans le noyau. Par ailleurs la protéine Bug22p a été retrouvée de façon indépendante dans deux analyses globales de protéome associé au spliceosome (Zhou et al., 2002 ; Herold et al., 2009), ce qui, bien qu'indirectement, étaye l'hypothèse d'une localisation nucléaire. Si nous n'avons pu observer de relation entre PtQilin et PtBug22p au niveau des cils, ces résultats



**Figure 14 : Observation des appareils oraux des paramécies après la première division en milieu d'inactivation *PtBUG22*.**

Les corps basaux sont ici observés grâce à l'expression de la centrine 3 fusionnée à la GFP (GFP-Ptcen3). La fluorescence est observée au microscope à fluorescence, en direct, sur des cellules fixées. La forme générale des cellules ainsi que le positionnement des corps basaux de l'appareil oral de ces paramécies est montré sur des cellules inactivées pour le gène témoin, *ND7* (A1,A2) ainsi que sur des cellules inactivées pour *PtBUG22* (B1,B2). La désorganisation des alignements ciliaires dans l'appareil oral est clairement visible dans les cellules inactivées pour *PtBUG22* (flèches). Barres d'échelles : 10µm.

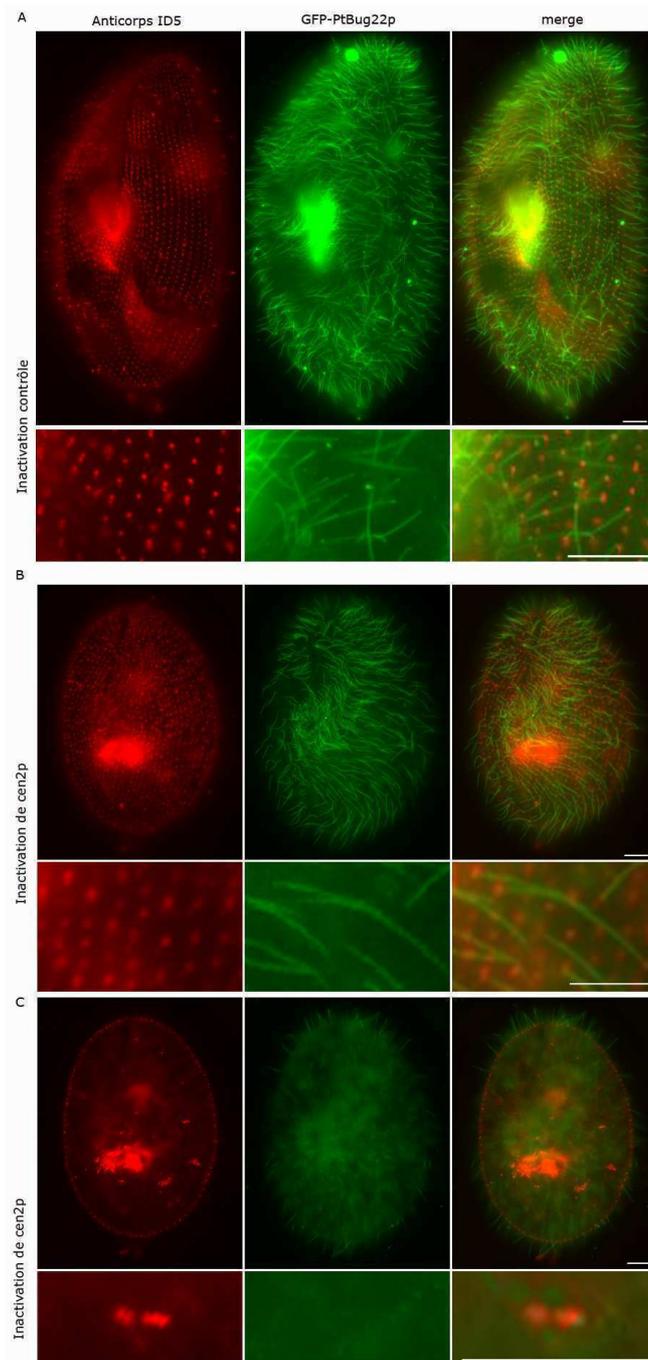
suggèrent que la localisation de PtBug22p dans le noyau pourrait dépendre de la Qilin. Finalement, le résultat obtenu suggère que l'interaction chez la drosophile, observée en double hybride, pourrait refléter une interaction nucléaire plutôt que ciliaire. L'interaction observée en double hybride entre la Qilin et la protéine DmBug22p de drosophile pourrait donc être le témoin de cette interaction directe de ces molécules au sein du noyau. L'interaction de DmBug22p avec le Suppresseur de white apricot, facteur d'épissage, dans ce crible double hybride pourrait alors aussi être significative.

Toutefois il sera important de tester la localisation nucléaire de la protéine Bug22p exprimée sous son propre promoteur et de vérifier par la suite la possible interaction avec la Qilin.

#### **Recherche d'interactions entre PtBug22p et des protéines impliquées dans l'ancrage des corps basaux : PtCen2p et PtFOR20p.**

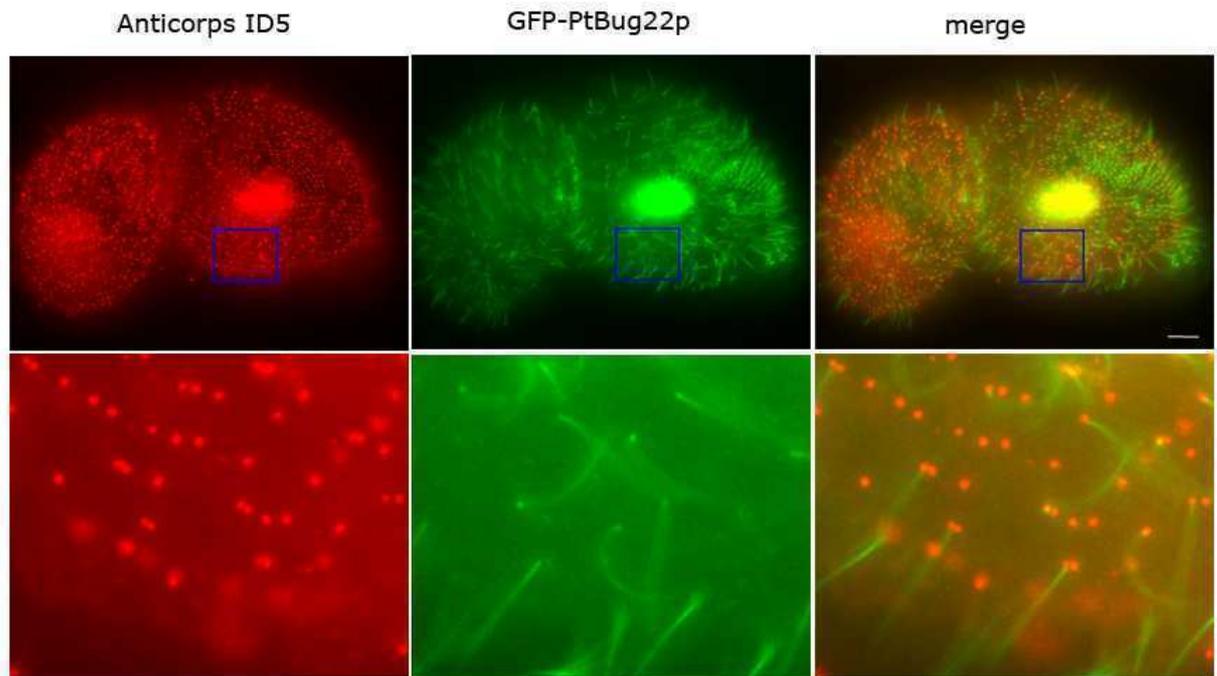
Comme nous l'avons déjà souligné, plusieurs observations laissaient supposer une interaction entre PtBug22p et les centrines de type PtCen2p. Tout d'abord, PtBug22p et la centrine 2 semblent avoir co-évolué (voir discussion de l'article). Deuxièmement, l'inactivation de PtBug22p entraîne des désordres dans le positionnement des corps basaux de la paramécie (figure 14), tout comme l'inactivation génique de *PtCEN2*. Enfin, la microscopie électronique révèle que les deux protéines sont localisées le long des microtubules à l'intérieur du corps basal et à leur extrémité distale au niveau de la plaque terminale (Ruiz et al., 2005 ; Laligné et al., 2010). Des études chez les plantes ont montré également que des protéines de type Tonneau à domaine FOP, dont un homologue est représenté par la protéine PtFor20p chez la paramécie, étaient reliées fonctionnellement aux centrines 2 (Azimzadeh et al., 2008). Comme nous l'avons discuté dans l'article, Bug22p pourrait bien aussi interagir avec ces protéines à domaine FOP. Pour tester une telle hypothèse, nous avons employé la même stratégie que celle utilisée pour détecter les





**Figure 15 : Localisation de GFP-PtBug22 après inactivation *PtCEN2***

L'inactivation *PtCEN2* provoque une incapacité pour la cellule d'ancrer les corps basaux néoformés au cortex cellulaire. Ces corps basaux restent alors internalisés dans le corps cellulaire de la paramécie. L'anticorps ID5, ici visualisé en rouge, permet de localiser les corps basaux. En vert est représentée la localisation de la protéine GFP-PtBug22. A. Dans les témoins, la fluorescence verte montre une localisation ciliaire de GFP-PtBug22 ainsi que dans les corps basaux. B. La localisation GFP-PtBug22 est préservée au cortex de cellules inactivées pour la centrine 2. C. La localisation GFP-PtBug22 n'est pas observée au niveau des corps basaux internes. GFP-PtBug22 a donc besoin de la centrine 2 pour se localiser aux corps basaux de la paramécie. La fluorescence de la GFP est observée en direct sur des cellules fixées. Barre d'échelle : 10µm.



**Figure 16 : Localisation de la protéine GFP-Bug22 après inactivation *PtFOR20*.**

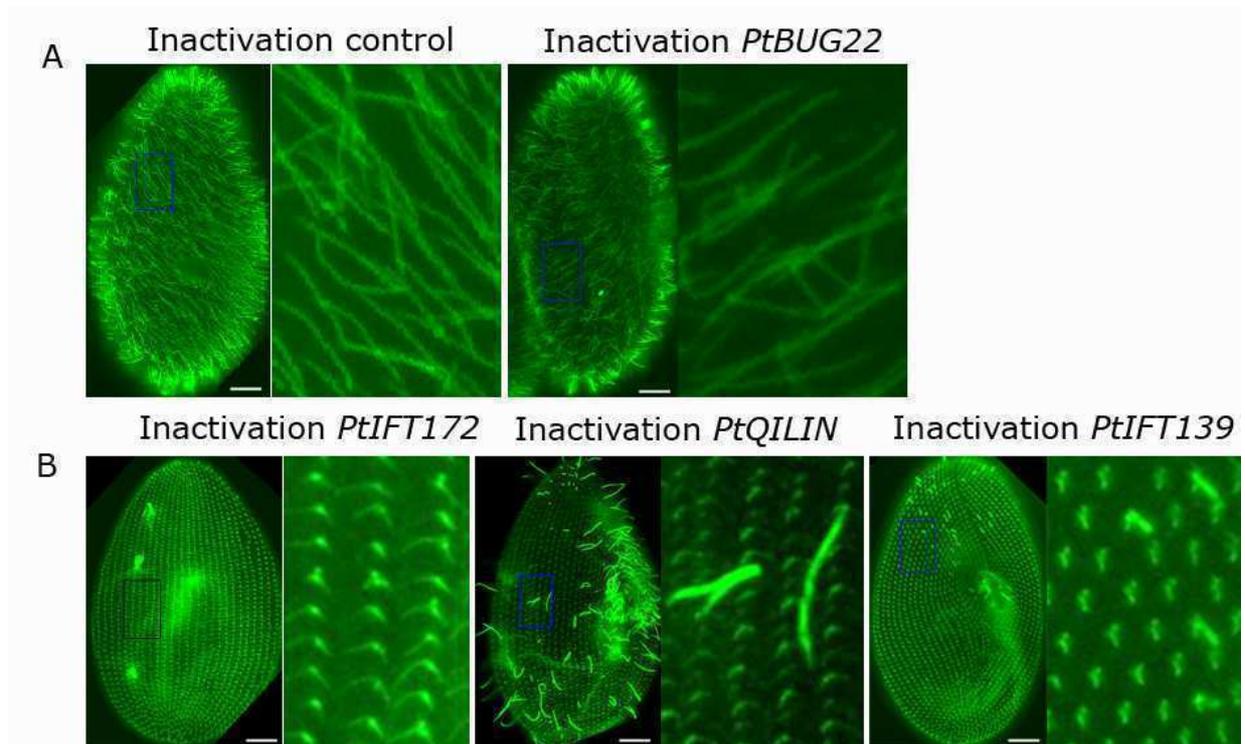
L'inactivation *PtFOR20* empêche l'ancrage des corps basaux néoformés. Ceux-ci ne sont alors plus capables de nucléer des cils. Ici l'anticorps ID5, en rouge, permet de visualiser les corps basaux ancestraux comme ceux néoformés pendant la duplication en cours. GFP-PtBug22 est visualisée en vert. Nous constatons que seuls quelques corps basaux ont incorporé la protéine ; ces corps basaux sont ciliés, ils étaient présents avant la division cellulaire. GFP-PtBug22 a donc besoin de la présence de PtFor20p pour se localiser aux cils et corps basaux.

interactions entre Bug22p et la Qilin, à savoir inactiver les gènes *PtCEN2* et *PtFOR20* dans des cellules exprimant GFP-PtBug22.

Chez la paramécie, les déplétions de PtCen2p et de PtFor20p induisent des phénotypes très similaires consistant en des défauts d'accrochage des corps basaux au cortex et d'un déficit en cils (Ruiz et al., 2005 ; Aubusson et al., en préparation). Les figures 15 et 16 montrent la fluorescence observée sur des transformants exprimant GFP-PtBug22 déplétés pour PtCen2p (figure 15) et PtFor20p (figure 16). Les cellules marquées par l'anticorps ID5, qui décore spécifiquement les corps basaux, présentent le phénotype caractéristique de l'inactivation : corps basaux mal positionnés et / ou internes. Dans les deux types de déplétion, les cils présents sont fluorescents, mais le signal GFP est absent des corps basaux mal positionnés sur le cortex et non ciliés tout comme des corps basaux internes.

### Conclusion – discussion

Ces expériences indiquent une absence d'interaction entre PtBug22p et les deux protéines de corps basaux car la surexpression de GFP-PtBug22 ne modifie pas les effets de l'inactivation de *PtCEN2* ni de *PtFOR20*. En revanche, la localisation de PtCen2p et de PtFor20p précède l'intégration de PtBug22p au niveau des corps basaux néoformés au cours de la duplication. Il faudrait par ailleurs également tester l'effet de l'inactivation des gènes codant la centrine 3 sur la localisation de GFP-PtBug22. En effet des résultats récents, obtenus au laboratoire, montrent que l'inactivation de ces gènes conduit à un défaut de l'ancrage membranaire de corps basaux qui contiennent des structures distales nécessaires à leur ancrage au niveau du cortex, ce qui n'est pas le cas des corps basaux internes dans les cellules déplétées pour la PtCen2p et PtFor20p (Ruiz et al., 2005 ; Aubusson et al., en préparation). Il se pourrait donc que PtBug22p soit présente dans ces structures.

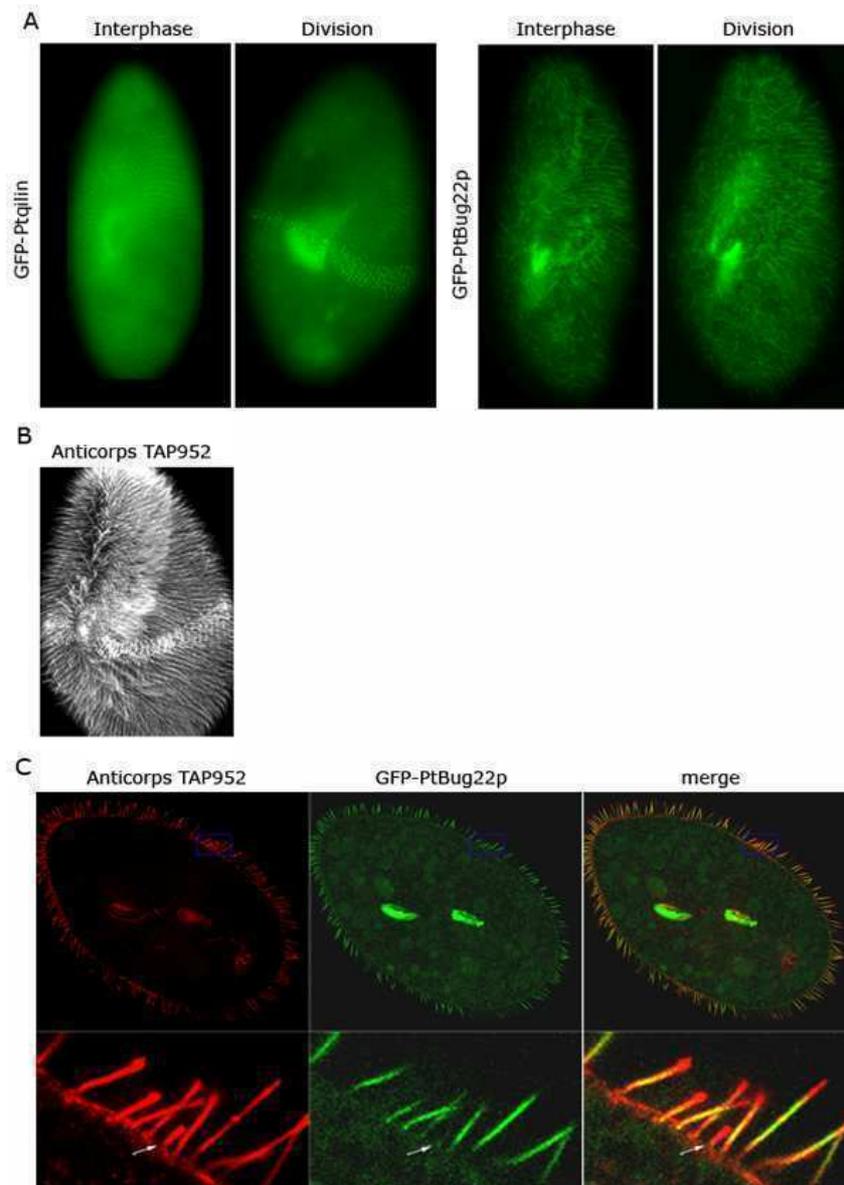


**Figure 17 : Effets de l'inactivation de protéines de l'IFT sur les cils**

Observation des effets de l'inactivation génique *PtBUG22* et de protéines de l'IFT comparés à un témoin et visualisés avec l'anticorps anti-cils au microscope à fluorescence après 48H d'inactivation génique. A. Comparaison de cellules déplétées pour une protéine témoin (*PtND7p*) et pour *PtBug22p*. B. Comparaison avec des paramécies déplétées pour deux protéines de l'IFT B, *PtIFT172p* et *PtQilin* (Houssein Chaloub, Etudiant en Master2 en 2009 et Shi Lei, doctorant, communications personnelles) et une de l'IFT A, *PtIFT139p* (Shi Lei, communication personnelle). Nous constatons que les cellules déplétées pour les protéines de l'IFT ont perdues leur ciliature contrairement à la cellule témoin et celle inactivée pour *PtBug22p*. Barres d'échelles : 10μm.

## **PtBug22p est-elle une protéine du complexe IFT ?**

Chez la paramécie, comme chez la plupart des organismes (Cao et al., 2010 ; Fan et al., 2010 ; revue : Rosenbaum et Witman, 2002 ; Scholey et Anderson, 2006), la déplétion de protéines des complexes IFT B, telles que PtIFT172p (figure 17 et figure S4 de l'article) et PtQilin (Houssein Chalhoub, communication personnelle ; figure 17) induit une réduction de la taille des cils suivie d'une disparition complète de la ciliature. C'est également le cas pour la protéine PtIFT139p qui fait partie du complexe IFT A (Shi Lei, communication personnelle). Comme nous l'avons déjà souligné, bien que la déplétion de PtBug22p ne semble pas avoir d'effet sur la biogénèse des cils (figure 17 ; figure S4 de l'article), deux observations pouvaient laisser penser que cette protéine était partenaire du complexe IFT : (1) elle se localise dans le cil à intervalles réguliers entre axonème et membrane tout comme plusieurs protéines de l'IFT (Sedmak et Wolfrum, 2010) ; (2) l'un des deux interactants identifiés par double hybride comme partenaires potentiels de Bug22p chez la drosophile est la Qilin, une protéine de l'IFT B (Giot et al., 2003). Bien que nous n'ayons pas vu d'interaction claire entre la PtQilin et PtBug22p au niveau des cils chez la paramécie, nous avons néanmoins testé l'hypothèse d'une possible appartenance de PtBug22p au complexe de transport intraflagellaire,



**Figure 18 : Analyse de la localisation de la protéine GFP-PtBug22 au cours de la ciliogénèse en comparaison avec la localisation de la protéine GFP-Ptqilin.**

A. Observation de la localisation des protéines GFP-Ptqilin et GFP-PtBug22 dans une paramecie en interphase et en division. La protéine GFP-Ptqilin se localise principalement au niveau des corps basaux. Lorsque la cellule entre en division, Ptqilin-GFP est surexprimée dans les cils en cours de formation (Houssein Chaloub et Shi Lei, communication personnelle). La protéine GFP-PtBug22 se localise dans les corps basaux et les cils, que la cellule soit en interphase ou en division. Les cellules sont observées au microscope à fluorescence. B. Observation d'une cellule marquée par l'anticorps TAP952, spécifique des faibles niveaux d'acétylation de l' $\alpha$ -tubuline. Nous constatons que les cils sont marqués sur toute la surface cellulaire et que les cils de la région du sillon de division sont plus intensément révélés par cet anticorps. (Anne Aubusson, communication personnelle). C. Visualisation en microscopie confocale de la localisation de la protéine PtBug22-GFP sur des cils en formation dans une cellule en cours de division avec l'anticorps anti-cils et TAP952. (Anne Aubusson, communication personnelle).

### *Comparaison de la localisation de protéines de l'IFT B avec PtBug22p*

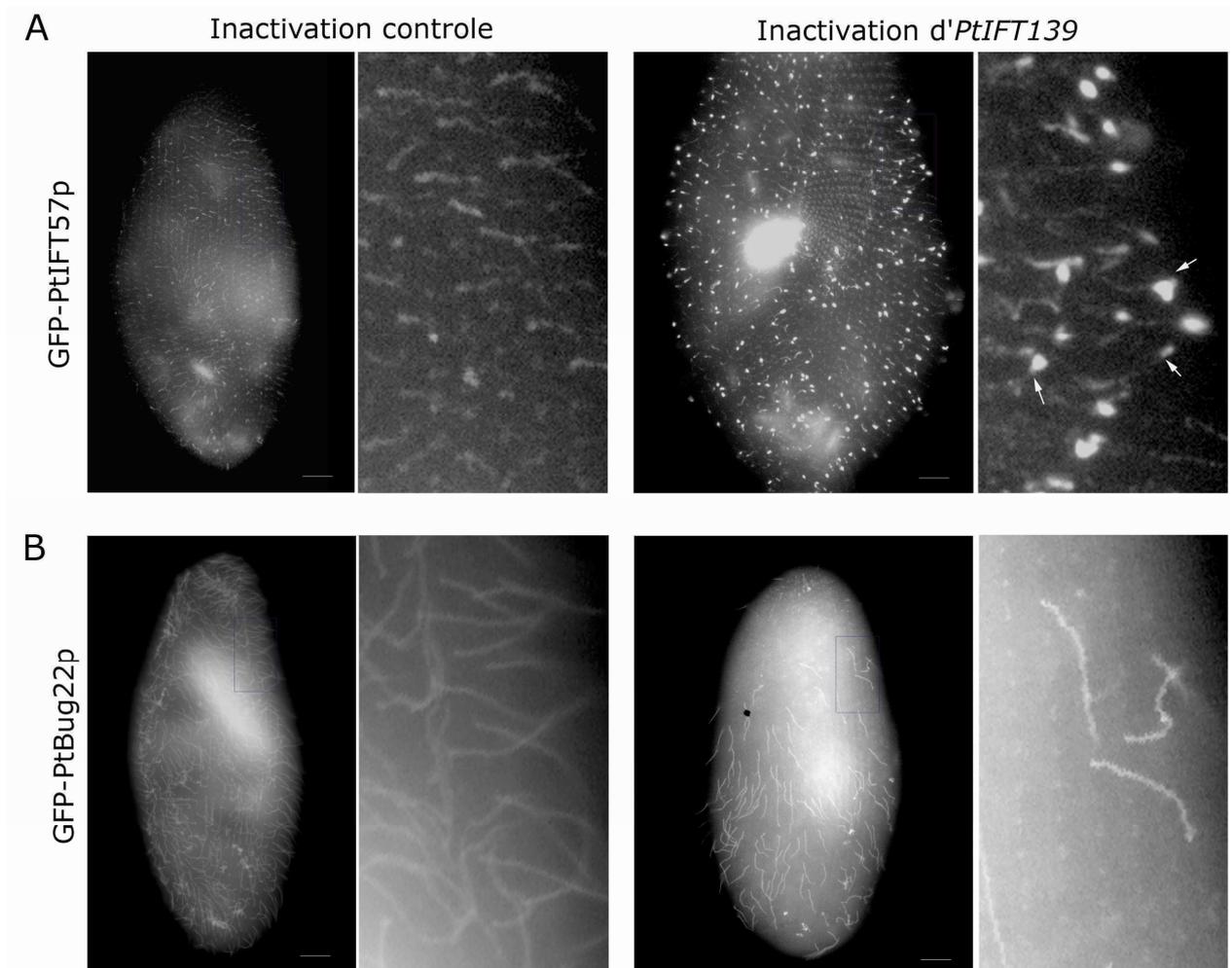
Pour tester cette hypothèse, j'ai dans un premier temps comparé la localisation de la fluorescence de paramécies exprimant GFP-PtBug22 avec celle observée sur des cellules exprimant PtQilin-GFP sur des cellules en division.

Comme on peut le constater sur la figure 18 A, alors que les cils des cellules en interphase exprimant PtQilin-GFP sont faiblement fluorescents, lors de la division cellulaire la fluorescence est très accentuée au niveau de la zone équatoriale du cortex. Cette région correspond à celle dans laquelle de nombreux nouveaux corps basaux et cils se forment au cours de la division (Iftode et al., 1989). Elle est visualisée sur la figure 18 B grâce à un marquage avec l'anticorps TAP952 qui reconnaît les tubulines monoglycylées et permet le marquage des cils en croissance aussi bien que ceux en maintenance. La différence d'intensité de fluorescence observée avec la PtQilin-GFP traduit le fait que la quantité de protéines de l'IFT participant au renouvellement des composants ciliaires durant l'interphase est moindre par rapport à celle participant à leur biogénèse au cours de la division. On n'observe pas ces différences de fluorescence dans les cellules en division exprimant la protéine GFP-PtBug22 (figure 18 A). PtBug22p, contrairement aux protéines de l'IFT, ne semble donc pas essentielle à la croissance ciliaire et pourrait n'être adressée aux cils que tardivement.

### *Insertion de PtBug22p dans le cil au cours de la ciliogénèse*

Pour confirmer l'intégration tardive de PtBug22 dans le cil au cours de la biogénèse ciliaire, j'ai comparé la localisation de la fluorescence sur des cellules exprimant GFP-PtBug22 en division avec le marquage de l'anticorps TAP952.

Comme on peut le constater sur la figure 18 C, alors que l'anticorps marque des cils très courts correspondant à des cils en début de développement, aucune fluorescence



**Figure 19 : Comparaison de la localisation de GFP-PtIFT57 et GFP-PtBug22 pendant l'inactivation de *PtIFT139*.**

A. Paramécies exprimant GFP-PtIFT57. B. Paramécies exprimant GFP-PtBug22. Chacune inactivées pour le gène contrôle (*PtND7*) et pour *PtIFT139*, impliqué dans le transport IFT rétrograde. La fluorescence est observée directement au microscope à fluorescence.. La protéine GFP-PtIFT57 s'accumule à la pointe quand le gène *PtIFT139* est inactivé, contrairement à GFP-PtBug22 dont la localisation ciliaire reste inchangée le long du cil. Barres d'échelles : 10µm.

indiquant la présence de PtBug22p n'est observée dans ces cils. Ceci indique que la protéine PtBug22p n'a pas encore pénétré dans le cil, ce qui est incompatible avec la fonction IFT. Plus tard au cours de la croissance ciliaire, on observe un co-marquage de la GFP avec l'anticorps TAP952 qui commence à la base, puis s'étend le long des cils en croissance et s'interrompt avant l'extrémité distale marquée uniquement par l'anticorps. L'absence de PtBug22p dans l'extrémité distale des cils qui correspond à la région dans laquelle s'effectue l'échange des molécules des particules de l'IFT B vers l'IFT A, aussi bien dans des cils matures que des cils en cours de ciliogénèse, est donc un argument supplémentaire indiquant que PtBug22p n'est pas un constituant de l'IFT. L'absence de marquage GFP à la base des cils matures observée sur la figure s'explique probablement par un artefact dû à la réaction immunologique. En effet lorsque les cellules exprimant GFP-PtBug22 sont observées après une simple fixation, ce marquage est présent.

#### **Localisation de GFP-PtBug22 et de GFP-PtIFT57 après inactivation d'IFT139**

Les mutations ou la déplétion des protéines du complexe l'IFT A, impliqué dans le transport rétrograde des protéines ciliaires, conduisent généralement à une accumulation des protéines de l'IFT B, par exemple IFT57p à la pointe ciliaire (Tsao et Gorovsky, 2008). Donc pour confirmer que PtBug22p n'est pas un composant du complexe IFT, j'ai déplété la protéine PtIFT139p, qui fait partie du complexe l'IFT-A, chez des transformants exprimant la protéine GFP-PtBug22.

La figure 19 permet de comparer la fluorescence observée sur des cellules en interphase exprimant GFP-PtBug22 et PtIFT57-GFP, obtenues après 48h d'inactivation génique *PtIFT139*. Si la perturbation du transport intra-flagellaire rétrograde induit bien l'accumulation de la fluorescence à la pointe des cils pour IFT57-GFP, on n'observe pas d'accumulation de la protéine PtBug22p, indiquant qu'une fois intégrée dans la structure ciliaire, elle ne s'y déplace pas.



### Conclusion – discussion

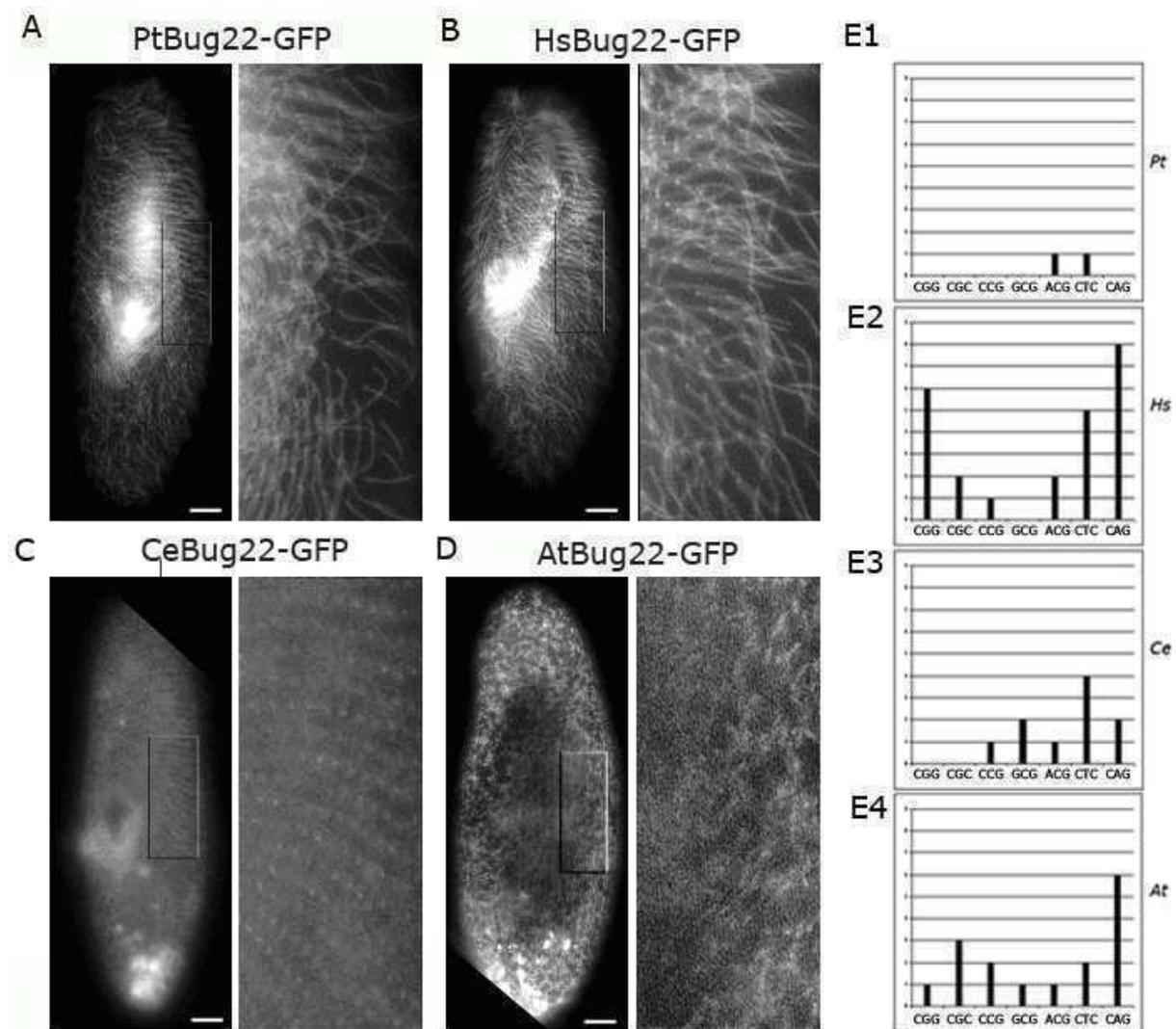
En conclusion, l'ensemble de ces données montre que la protéine PtBug22p n'est pas un composant de l'IFT. Il semble même que, comme la polyglycylation des tubulines, son incorporation nécessite un allongement minimum de l'axonème. Cette conclusion est compatible avec les résultats de l'inactivation de PtCen2p et PtFor20p sur des cellules exprimant GFP-PtBug22 qui montrent que l'ancrage correct des corps basaux au cortex est une étape nécessaire pour que PtBug22p puisse s'y localiser.

On peut d'ores et déjà noter que, tout comme l'incorporation de PtBug22p, l'incorporation de polyglycines dans les microtubules axonémaux est un processus qui se produit tardivement, après le début de formation du cil.

### Un site d'adressage ciliaire intrinsèque à la séquence protéique de Bug22p

La comparaison des séquences protéiques Bug22p codées par des organismes portant des cils (motiles et non motiles) et des centrioles avec celles provenant d'espèces dépourvues de cils et de centrioles, nous avait permis de définir un possible motif d'adressage ciliaire composé de 7 acides aminés : [KR] – x (7) – [Tln] – x (6) – [LScq] – x (9) – [S] – x (10) – [Krden] – [KRdeq] – x (44) – [Tn] (voir l'article). Nous avons voulu vérifier cette hypothèse en comparant la localisation dans la paramécie des protéines de plante et de nématode fusionnées à la GFP avec celles des protéines de paramécie et de l'homme.

Selon notre hypothèse, nous nous attendions à ne pas voir de fluorescence au niveau des cils et des corps basaux après transformation avec la séquence provenant de la plante *Arabidopsis*. Aucune prédiction ne pouvait être faite pour la localisation de la protéine CeBug22p correspondant à la séquence de la protéine trouvée chez le nématode.



**Figure 20 : Localisation dans la paramécie d'homologues de Bug22p de quatre espèces fusionnés à la GFP**

Visualisation de la localisation de quatre gènes *BUG22*, venant du génome de la paramécie (*PtBUG22*), de l'homme (*HsBUG22*), du nématode (*CeBUG22*), et d'*Arabidopsis* (*AtBUG22*), chacun fusionné à la GFP positionnée en C-ter du gène. Chacun est exprimé sous contrôle des séquences régulatrices de la calmoduline pour permettre leur expression constitutive dans la paramécie. Les quatre protéines fluorescentes présentent des localisations différentes : aux cils et corps basaux pour *PtBug22-GFP* (A) et pour *HsBug22-GFP* (B), aux corps basaux pour *CeBug22-GFP* (C) et cytoplasmique mais non homogène pour *AtBug22-GFP* (D). Barres d'échelles : 10µm. E1-E4 : Présence des codons codés le plus rarement dans la paramécie dans les quatre séquences exprimées. Nous constatons que c'est dans le gène *HsBUG22* que l'on retrouve le plus de codons rares.

Les premières expériences de localisation de Bug22p avaient été réalisées avec les protéines de paramécie et humaine étiquetée à la GFP dans leur partie N-terminale (figure 2 de l'article). Pour éliminer l'hypothèse qu'une absence de fluorescence dans le cil puisse résulter d'une traduction incomplète des protéines de plante et de nématode fusionnées à la GFP, et non pas d'un défaut d'adressage, j'ai construit quatre nouveaux vecteurs permettant chacun l'expression des transgènes d'intérêt fusionnés au gène de la GFP dans leur partie C-terminale cette fois. J'ai aussi vérifié que le nombre de codons rares (Salim et al., 2008) présents dans les ADNc *d'Arabidopsis* et de *Caenorhabditis* n'était pas supérieur à celui présent dans le ADNc humain (figure 20, E1 – E4), ce qui aurait pu également expliquer une baisse de l'expression des protéines fusions. Nous constatons qu'il n'y a pas plus de codons rares dans la séquence des gènes *AtBUG22* (E4) et *CeBUG22* (E3) que dans la séquence du gène *HsBUG22* (E2).

La figure 20 permet de comparer la fluorescence observée après transformation des paramécies avec chacun de ces vecteurs. Comme les protéines GFP-PtBug22 et GFP-HsBug22, les protéines de paramécie, PtBug22-GFP, et humaine, HsBug22p-GFP, se localisent au niveau des corps basaux et le long des cils des transformants (figures 20, A et B).

Deux types de clones ont été observés après transformation avec le vecteur permettant l'expression du gène de nématode. Les premiers présentaient un cycle de croissance normal et un phénotype de nage sauvage. La fluorescence, dans ce type de clones, était localisée au niveau des corps basaux (figure 20 C) mais pas au niveau des cils, ni du noyau. Le second type de clones présentait une fluorescence au niveau des cils après deux ou trois divisions suivant la transformation. La vitesse de nage des paramécies était réduite et leur cycle de division ralenti. Puis, après 3 ou 4 divisions, ils reprenaient un phénotype sauvage, ceci s'accompagnant de la perte complète de la fluorescence. Dans le même temps, ces cellules ont rapidement déclenché un phénomène d'autogamie qui s'accompagne de la dégradation complète de l'ADN du noyau somatique (macronoyau)



dans lequel l'ADN transformant est injecté. Nous n'avons donc pu vérifier si l'absence de fluorescence était due à une perte de l'ADN transformant ou à la dégradation de la protéine hybride. En tout état de cause, ces résultats suggèrent que, si la protéine de nématode peut être adressée aux cils, sa présence y est néfaste pour la cellule. Ce qui n'est pas le cas lorsqu'elle est associée au corps basal.

Toutes les cellules transformantes exprimant la protéine AtBug22-GFP (figure 20 D) présentent une fluorescence cytoplasmique indiquant, bien que nous ne l'ayons pas quantifiée que la protéine hybride est exprimée. Bien qu'associée préférentiellement au cortex cellulaire, la fluorescence n'est localisée ni aux corps basaux, ni aux cils, montrant que la molécule de plante est incapable d'y être adressée. Les paramécies transformées ne présentent, dans ce cas, aucun phénotype de surexpression (nage et cycle de division comparables à ceux des cellules sauvages).

### **Conclusion – discussion**

Malgré sa grande conservation en séquence avec la protéine de paramécie (75% d'identité), la protéine AtBug22p de plante semble incapable d'être adressée au corps basal et de pénétrer dans le cil, ce qui nous conforte dans notre hypothèse selon laquelle les acides aminés différant entre les séquences consensus de plantes et d'organismes ciliés pourraient constituer un site essentiel permettant l'adressage de Bug22p au cil. Nous envisageons de l'étayer en vérifiant que la modification des acides aminés spécifiques de la séquence consensus ciliaire présente dans la protéine de paramécie par des acides aminés consensus de plante entraîne un défaut de son adressage aux cils. Nous pourrions également tester si les modifications inverses permettraient de faire pénétrer la protéine de plante dans les cils de paramécie.

L'importance de ces acides aminés consensus dans la localisation de la protéine semble confirmée par le fait que la protéine de *Caenorhabditis*, qui ne contient qu'une seule



substitution par rapport aux consensus des protéines Bug22p des organismes contenant des cils motiles ne pénètre pas ou peu dans les cils de paramécie. Nous n'avons actuellement aucune donnée concernant CeBug22p chez *Caenorhabditis*, si ce n'est qu'une séquence de type « X-box » est présente en aval du gène qui la code, indiquant qu'il est exprimé grâce à un facteur de transcription de type RFX. Il se pourrait néanmoins que, contrairement à la protéine de paramécie, CeBug22p ne soit pas adressée aux cils immotiles, seules structures ciliaires présentes chez cet organisme. Nous pouvons toutefois souligner que l'axonème des cils non motiles de *Caenorhabditis* a une structure particulière et qu'il n'est pas ancré à la membrane par un corps basal classique mais par une zone dite de transition de structure très distincte (Inglis et al., 2007).

L'effet délétère observé dans les paramécies sur-exprimant la protéine de *Caenorhabditis* et qui mime l'effet de l'extinction génique (ralentissement de la nage et du cycle cellulaire) n'a jamais été observé avec la protéine humaine. Il pourrait résulter d'une compétition entre les protéines endogènes et exogènes. En effet, si la protéine CeBug22-GFP est capable de pénétrer dans le cil motile lorsqu'elle est surexprimée dans la paramécie, elle pourrait être incapable d'interagir avec tout ou partie des partenaires de PtBug22p.

Enfin, l'absence de fluorescence dans le noyau des cellules transformées par les plasmides exprimant les protéines de *Caenorhabditis* ou *d'Arabidopsis* confirme que le passage dans le noyau de la protéine PtBug22p n'est pas un artefact de surexpression mais résulte des propriétés intrinsèques de la protéine.



## Chapitre II. Analyse de la fonction de Bug22p chez les plantes terrestres

Pour comprendre la fonction de Bug22p, il est important de prendre en compte tous les aspects fonctionnels de cette protéine. Sa conservation dans des organismes non ciliés montre qu'elle a une fonction additionnelle à sa fonction dans la motilité ciliaire. Nous avons essayé d'analyser cette fonction dans les plantes terrestres. Les deux modèles utilisés ont été *Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana benthamiana*.

### Analyse fonctionnelle de la protéine Bug22p

#### *Etude de mutants insertionnels*

Il existe plusieurs banques de mutants d'insertion d'*Arabidopsis thaliana* qui résultent d'insertions aléatoires d'ADN-T ou de transposons dans le génome de la plante. Dans aucune d'elles, nous n'avons trouvé de clone contenant une insertion dans la séquence codante d'*AtBUG22*. Cette absence de mutants pourrait s'expliquer par la taille du gène qui est petite et donc que la probabilité d'insertion à l'intérieur de la région codante est faible. Cela peut aussi signifier que toute insertion dans sa séquence codante pourrait être létale. Par contre, nous avons trouvé huit lignées contenant des insertions d'ADN-T dans le promoteur d'*AtBUG22*. Quatre proviennent de la collection du SALK Institute Genomic Analysis Laboratory ; Alonso et al., 2003), et quatre autres de la collection SAIL (Syngenta Arabidopsis Insertion Library ; Sessions et al., 2002). Les insertions trouvées dans la collection SALK touchent potentiellement l'expression d'un gène voisin d'*AtBUG22*, nous avons donc choisi de ne pas les utiliser. Parmi les 2 lignées de la collection SAIL qui contiennent une insertion dans le promoteur d'*AtBUG22*, nous



avons choisi d'étudier celle dont l'insertion est la plus proche du codon d'initiation de traduction (28 nucléotides de l'ATG) et qui est donc la plus susceptible d'entraîner une altération de l'expression d'*AtBUG22*.

Les graines reçues du stock center (lignée SAIL\_283\_H09) correspondent à la descendance de plantes hétérozygotes pour l'insertion et sont donc hétérogènes. Nous avons semé 28 graines qui ont donné des plantes dont certaines avaient une croissance ralentie et qui auraient donc été susceptibles de contenir un allèle *AtBUG22* mutant. Ces plantes ont été génotypées par PCR afin de distinguer celles susceptibles de porter l'insertion à l'état homozygote ou hétérozygote. Pour cela, l'ADN de chaque plantule a été extrait et testé par PCR. Deux couples d'oligonucléotides ont été utilisés pour réaliser ces PCRs : un couple permettant l'amplification de l'allèle sauvage d'*AtBUG22* et l'autre l'allèle contenant l'insertion de l'ADN-T.

Sur les 28 plantes, 13 étaient de génotype homozygote sauvage, 11 étaient hétérozygotes et 4 homozygotes mutantes (résultats non montrés) pour le gène *AtBUG22*. Cependant, il n'y avait aucune corrélation entre le phénotype de croissance observé et le génotype : les plantes homozygotes pour l'insertion avaient un phénotype normal et les plantes à croissance ralentie ne portaient pas la mutation. L'insertion SAIL\_283\_H09 ne semble donc pas affecter le développement de la plante. Toutefois, il faudrait tester la quantité de protéines ou d'ARN produits afin de vérifier que l'expression de la protéine d'intérêt est bien affectée par la mutation insertionnelle de cette lignée.

### **Etude par extinction génique**

Nous avons donc tenté de dépléter la protéine AtBug22p chez *Arabidopsis thaliana* afin de pouvoir effectuer une analyse fonctionnelle tout au long de la croissance de l'organisme. La technique d'ARNi chez *Arabidopsis thaliana* consiste à intégrer dans son génome, grâce à une infection par *Agrobacterium tumefaciens*, un ADN-T porteur d'une



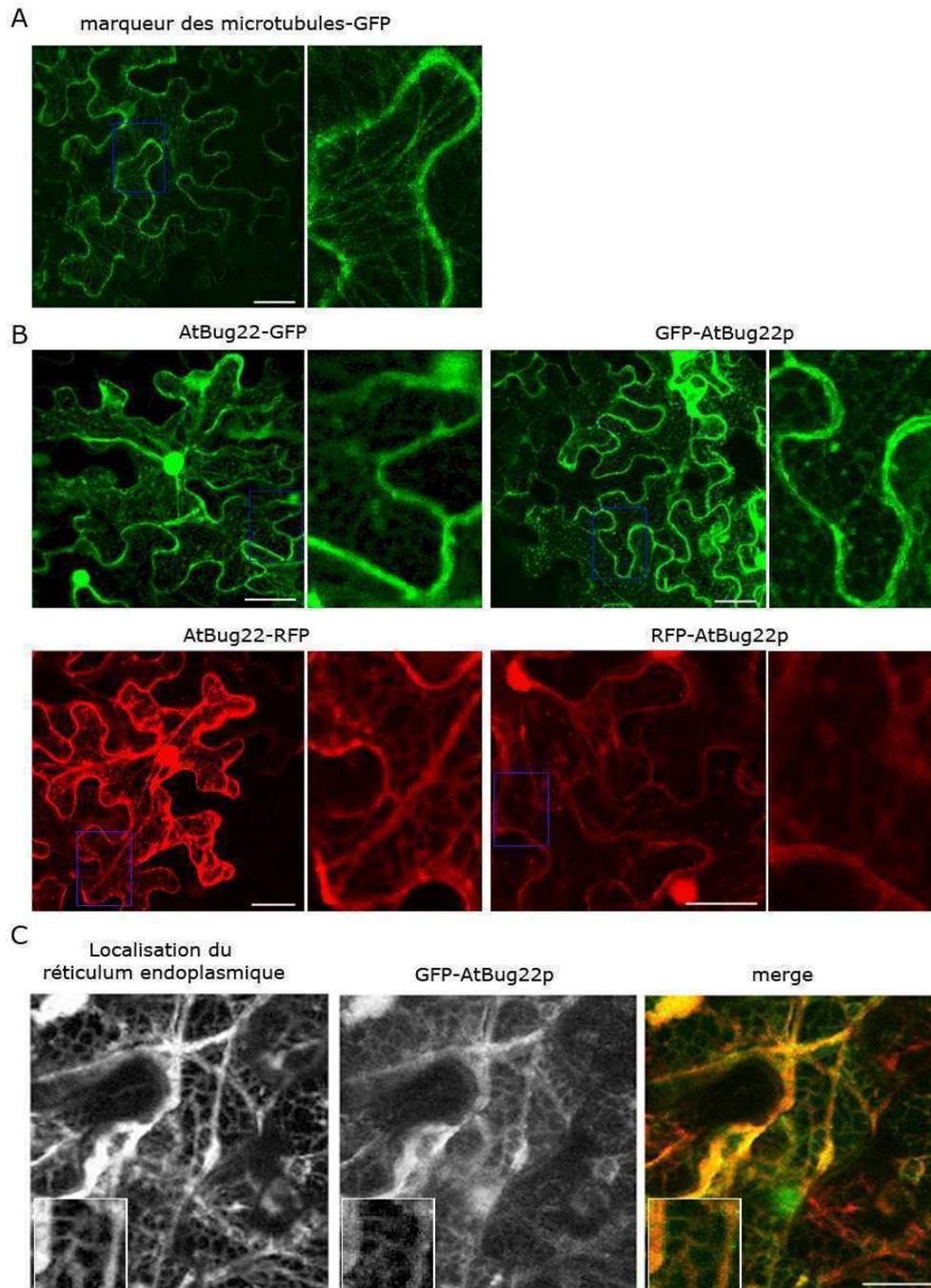
séquence codant un ARN capable de former une structure dite en épingle à cheveux et contenant tout ou partie de la séquence du gène correspondant au gène à inactiver (Eamens et al., 2008).

J'ai donc amplifié par PCR un fragment de 540 pbs correspondant à l'ADNc du gène *AtBUG22* s'étendant du nucléotide 30 au nucléotide 570 et cloné ce fragment en palindrome dans le vecteur pKANNIBAL (Helliwell et Waterhouse, 2003) derrière le promoteur qui permet son expression en ARN et la formation d'une structure ARN en épingle à cheveu chez la plante (Eamens et al., 2008). Le fragment d'intérêt contenant le promoteur et les fragments de l'ADNc *AtBUG22* en palindrome a ensuite été transféré dans l'ADN-T porté par le plasmide pGREEN, ce plasmide ayant été utilisé ensuite pour transformer *A. tumefaciens*. Malheureusement, malgré trois tentatives de culture, la construction était incompatible avec la croissance de la bactérie et nous n'avons pu réaliser la transformation d'*A. thaliana*.

### **Localisation de la protéine Bug22p**

Nous avons également entrepris de localiser la protéine AtBug22p dans les plantes terrestres. Nous avons pour cela utilisé deux méthodes distinctes : transformation avec des protéines AtBug22p fluorescentes et marquage de la protéine endogène avec l'anticorps GTL3 qui reconnaît la protéine Bug22p chez l'homme et la paramécie.

Nous avons construit, puis utilisé, quatre plasmides d'expression différents: le plasmide, pGWB6 qui permet l'expression de protéine AtBug22p fusionnée à la GFP en N-terminale ; le plasmide pGWB5, qui permet la localisation de la protéine par fusion GFP en C-terminale. Nous avons aussi construit deux plasmides permettant l'expression de la protéine AtBug22p fusionnée à la RFP en C-terminal et en N-terminal. Ces constructions ont été réalisées dans les vecteurs pH7WGR2 qui permettent, l'expression des protéines-



**Figure 21. Localisation d'AtBug22p dans *N. benthamiana*.**

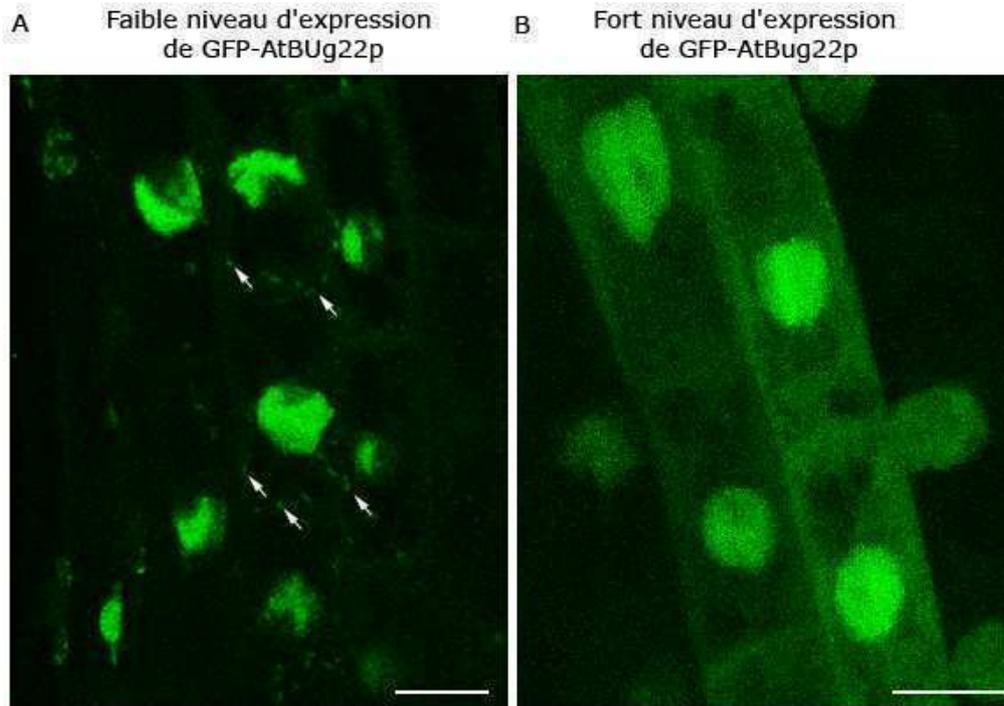
Observation en microscopie confocale de cellules de tabac. A. Marqueur microtubulaire fusionné à la GFP. B. Localisation de la protéine AtBug22p fusionnée à la GFP et à la RFP. Les marqueurs sont positionnés chaque fois en N-ter et en C-ter de la protéine d'intérêt. Nous constatons que les différentes constructions AtBug22p se localisent de la même manière dans les cellules, ce marquage ne correspond pas au marquage des microtubules. C. Co-localisation de la protéine GFP-AtBug22 avec un marqueur du réticulum endoplasmique fusionné à la RFP. Barre d'échelle : 20µm.

fusion sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur qui est un promoteur constitutif fort. Nous avons procédé en deux étapes : (1) l'expression transitoire des protéines fusions par infiltration de feuilles de *N. benthamiana* dans des cellules différenciées ; (2) la transformation stable d'*A. thaliana* afin de pouvoir suivre la protéine fusion dans des cellules en division.

### **Localisation dans *N. benthamiana*.**

L'utilisation de *N. benthamiana* pour l'expression transitoire de protéines offre l'avantage de la rapidité. En effet, s'il faut attendre plus de deux mois pour obtenir une lignée *Arabidopsis* exprimant une construction donnée, seul deux ou trois jours suffisent entre la transfection par infiltration et l'observation au microscope dans le cas d'une expression transitoire chez le tabac. Nous avons donc utilisé ce modèle afin de tester les plasmides construits.

La première étape a été de visualiser la protéine AtBug22p dans des cellules différenciées de feuilles du tabac. Des plants de *N. benthamiana* ont été cultivés puis infectés par des clones de *A. tumefaciens* porteurs de chacun des plasmides permettant l'intégration de T-ADN dirigeant l'expression des protéines AtBug22p couplées à la RFP ou la GFP. Les résultats observés chez la paramécie suggérant une possible association de PtBug22p avec les microtubules nous avons également réalisé des transfusions avec un plasmide qui permet l'expression d'une protéine associée aux microtubules (Martine Pastuglia, communication personnelle). Les plantes, après transfection, ont été observées en microscopie confocale. Les résultats sont présentés sur la figure 21. Chez le témoin exprimant la protéine associée aux microtubules, la fluorescence apparaît sous forme de faisceaux qui se croisent et créent ainsi un maillage non uniforme dans la cellule (figure 21 A). Aucun marquage de ce type n'est observé chez les plantes exprimant les quatre protéines fusions AtBug22p (figure 21 B). Comme chez la paramécie nous pouvons noter



**Figure 22. Localisation de la protéine GFP-AtBug22p dans *A. thaliana*.**

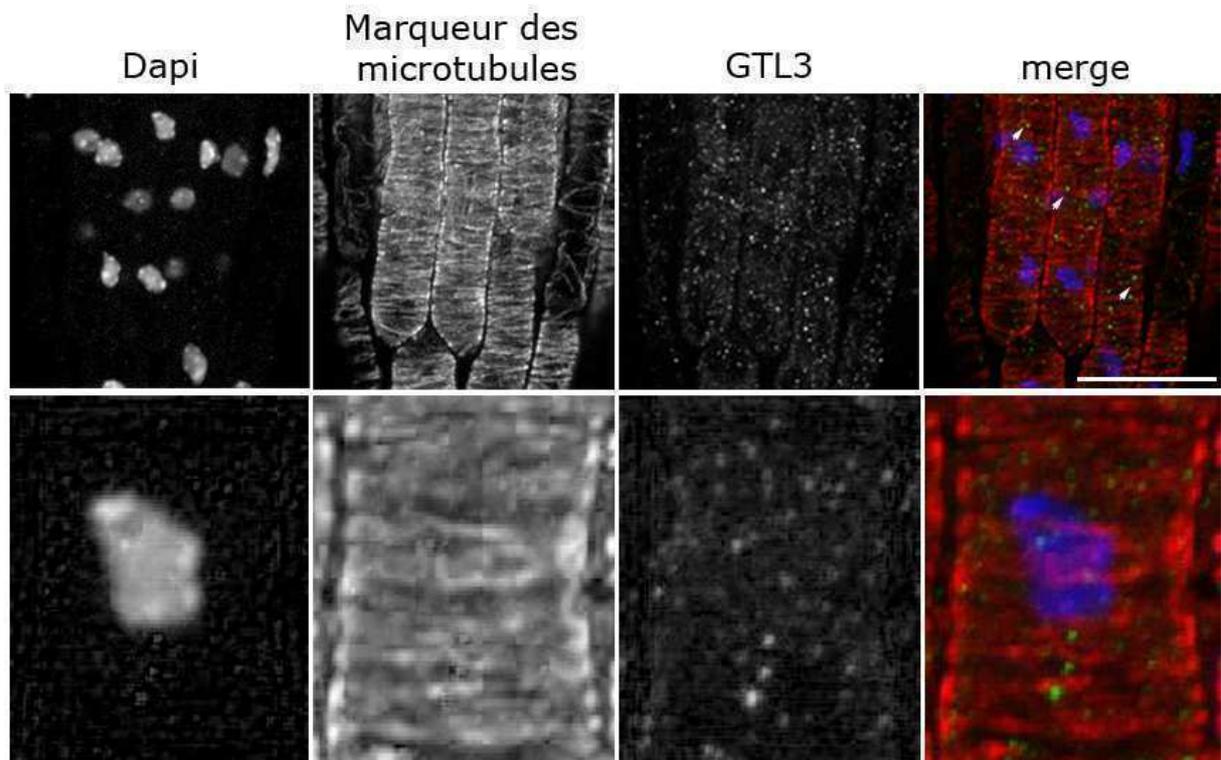
Observation en microscopie confocale de cellules racinaires en croissance d'*A. thaliana*. La localisation de la protéine AtBug22p est effectuée grâce à une fusion GFP en N-ter de la protéine d'intérêt. A. Localisation nucléaire et sous forme d'agrégats (flèches) dans les cellules d'un plant exprimant faiblement la protéine GFP-AtBug22p B. Localisation nucléaire et cytoplasmique de la protéine GFP-AtBug22p dans les cellules d'un plant exprimant fortement la protéine. Barres d'échelles : 20μm.

toutefois que leur noyau est fluorescent et ce, quelque soit le vecteur utilisé. Nous constatons en plus la présence d'une fluorescence cytoplasmique ainsi que l'apparition d'un maillage réticulé interconnecté par des jonctions à trois branches sur l'ensemble de la cellule. Chez les plantes comme chez les animaux, ce type de maillage pourrait tout à fait correspondre à la description faite du réticulum endoplasmique (Ridge et al. 1999 ; Zheng et al. 2004). Pour tester cette hypothèse, nous avons effectué une co-transfection de la protéine AtBug22p fusionné à la GFP en N-terminal avec un marqueur du réticulum endoplasmique (communication personnelle). Le résultat présenté figure 21 C montre une co-localisation des deux marquages indiquant qu'AtBug22p se localise le long du réticulum endoplasmique.

### **Localisation dans *A. thaliana***

Nous avons ensuite transformé, de façon stable, *A. thaliana* avec le plasmide pGWB6 contenant le gène *AtBUG22* afin de localiser la protéine fluorescente dans des cellules en prolifération. Nous avons choisi d'utiliser ce seul plasmide puisque les résultats observés lors des expériences menées chez le tabac *N. benthamiana* était identiques quelque soit le vecteur utilisé.

La figure 22 présente les résultats observés sur des cellules racinaires et montre que la protéine fusion se localise de manière différente selon son taux d'expression dans la plante. Les cellules de huit lignées dans lesquelles le taux d'expression de la protéine fusion apparaissait le plus faible présentaient une fluorescence essentiellement au niveau du noyau et de quelques agrégats cytoplasmiques. Dans sept lignées où la protéine fusion paraissait très exprimée, la fluorescence se localisait au niveau des noyaux ainsi que dans le cytoplasme de manière uniforme.



**Figure 23. Localisation de la protéine AtBug22p endogène dans *N. benthamiana***

Observation en microscopie confocale de cellules de racine co-marquées avec un anticorps anti-tubuline (en rouge) et l'anticorps GTL3 (en vert) spécifique de la protéine AtBug22p. Les noyaux sont marqués au DAPI. Barre d'échelle : 20µm. (Katia Belcram, communication personnelle).

### Localisation de la protéine AtBug22p endogène dans Arabidopsis par immunocytochimie.

Enfin, nous avons tenté de localiser la protéine AtBug22p endogène avec l'anticorps GTL3 dont on sait qu'il reconnaît, en Western Blot, la protéine humaine, de la paramécie (Laligné et al., 2010) et du nématode (résultat non publié). Il y a 77% d'identité entre les protéines AtBug22p et Hsbug22p, protéine contre laquelle l'anticorps a été fabriqué et cet anticorps reconnaît la protéine de paramécie, ce qui laisse supposer que l'anticorps pourrait reconnaître la protéine de plante.

Ces expériences ont été réalisées par Katia Belcram. Des racines d'*Arabidopsis* ont été immuno-marquées par la technique de wholemount avec un anticorps permettant le marquage spécifique des microtubules et avec l'anticorps GTL3. La figure 23 montre que GTL3 marque divers agrégats dans des régions internes des cellules et plus finement toute leur surface. Ce dernier marquage, qui semble former des alignements, pourrait laisser penser qu'AtBug22p suit des structures filamenteuses toutefois, il ne co-localise pas avec le marqueur microtubulaire. AtBug22p ne suit donc pas les microtubules. Le marquage GTL3 pourrait correspondre à un marquage sur le réseau d'actine. Aucun marquage au niveau du noyau n'a pu être observé.

### Conclusion – discussion

La protéine AtBug22p fusionnée aux marqueurs fluorescents se localise au noyau aussi bien des cellules racinaires en croissance d'*Arabidopsis thaliana* que dans le noyau de cellules différenciées des feuilles du tabac *N. benthamiana*. Cette observation, en accord avec ce que nous avons déjà observé avec la protéine de paramécie, plaide plutôt en faveur d'un marquage spécifique. Nous n'avons, par contre, pas observé de marquage nucléaire en

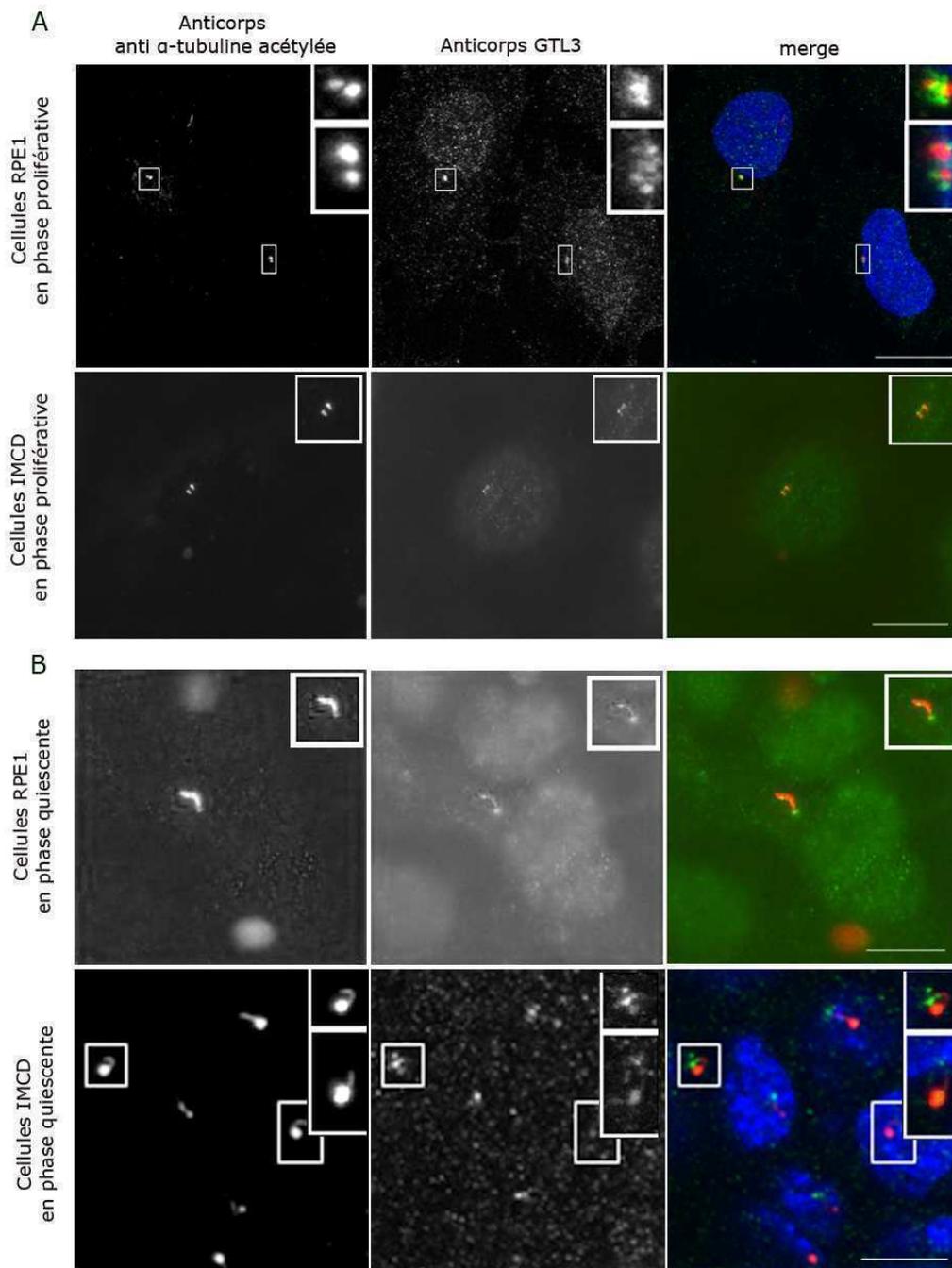


utilisant l'anticorps GTL3 sur des cellules *d'Arabidopsis*. Néanmoins, il serait important de vérifier que l'anticorps GTL3 reconnaît bien la protéine de plante.

Nous avons par ailleurs observé des marquages cytoplasmiques aussi bien avec GTL3 qu'avec les protéines fluorescentes dans les deux organismes. Cependant ces marquages étaient différemment localisés selon la méthode et les cellules utilisées ainsi que selon le taux d'expression des protéines recombinantes : alors que les protéines fluorescentes se localisent tout le long du réticulum endoplasmique dans les cellules différenciées de *N. benthamiana*, elles forment des agrégats chez *Arabidopsis*.

L'anticorps reconnaît des points qui semblent alignés et pourraient correspondre à des marquages sur des filaments. Pour tester cette hypothèse, il faudrait effectuer un co-marquage AtBug22p avec les réseaux d'actine à l'aide de la phalloïdine et vérifier que le marquage disparaît lorsque les cellules sont traitées par diverses drogues qui entraîne une déstabilisation de ce réseau.

Les résultats concernant la localisation de la protéine sont préliminaires et doivent être affinés. En particulier il sera important de réaliser l'expression des protéines-fusion sous contrôle des régulateurs endogènes d'AtBug22p.



**Figure 24: Localisation de la protéine HsBug22p dans des cellules de mammifères en culture (RPE1 et IMCD) après fixation à la paraformaldéhyde.**

Observation de cellules marquées avec l'anticorps spécifique de l' $\alpha$ -tubuline acétylée (en rouge) et avec l'anticorps GTL3 (en vert). A. Cellules en phase proliférative de types RPE1 (microscopie confocale) et IMCD (microscopie à fluorescence). Les deux anticorps se localisent au niveau du centrosome sans parfaitement être co-localisés. B. Cellules en phase quiescente de types RPE1 (microscopie à fluorescence) et IMCD (microscopie confocale). Les marquages co-localisent le long des cils primaires et le marquage GTL3 (vert) semble marquer le corps basal. Barres d'échelles : 15 $\mu$ m.

## **Chapitre III. Analyse de la fonction de Bug22p dans les cellules de mammifère en culture**

### **Localisation de Bug22p dans les cellules de mammifère en culture**

Dans notre publication, nous avons montré que HsBug22p se localise au niveau du centrosome des cellules HeLa en phase proliférative. Nous avons voulu savoir d'une part si c'était également le cas dans des types cellulaires susceptibles de développer des cils et d'autre part si, bien qu'impliquée dans la motilité ciliaire, elle se localisait également au niveau des cils primaires non motiles. Pour cela nous avons réalisé des marquages avec l'anticorps GTL3 spécifique de Bug22p et réalisé des transfections de cellules de mammifères avec le plasmide permettant l'expression de GFP-HsBug22. Les résultats présentés ici, obtenus récemment, sont encore incomplets. Je vais néanmoins les décrire car ils apportent des données intéressantes sur la protéine Bug22p qui pourront ensuite être approfondies.

### **Localisation de la protéine endogène avec l'anticorps GTL3.**

Sur la figure 22, nous visualisons la localisation de HsBug22p grâce à des marquages avec l'anticorps GTL3 sur des cellules de type RPE1 et IMCD fixées en paraformaldéhyde. Un co-marquage avec un anticorps spécifique de l' $\alpha$ -tubuline acétylée permet de mettre en évidence les cils et les centrioles.



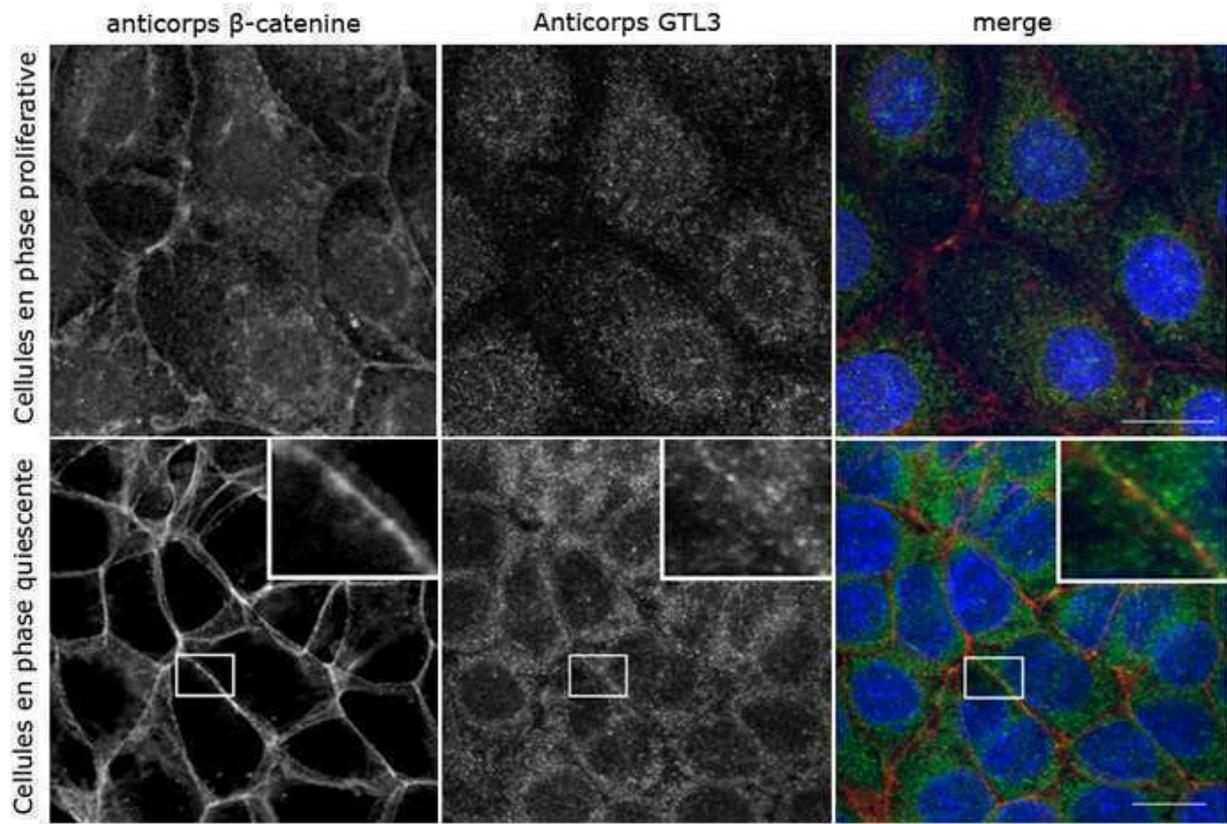
Sur les deux types cellulaires observés en phase proliférative (figure 24 A), l'anticorps GTL3 et l'anticorps anti  $\alpha$ -tubuline acétylée marquent la région du centrosome sans que ces marquages ne soient parfaitement co-localisés. Alors que les anticorps anti-tubuline et GTL3 montrent un marquage chevauchant, GTL3 marque en plus une région entre les deux centrioles suggérant que HsBug22p pourrait faire partie du matériel péricentriolaire.

Sur les cellules en phase quiescente (figure 24 B), GTL3 marque une extrémité des cils qui n'est pas marquée avec l'anti- $\alpha$ -tubuline et qui correspond vraisemblablement au corps basal, tandis que les deux anticorps co-localisent le long des cils primaires qui se sont développés. Le renflement obtenu avec le marquage anti-tubuline aux extrémités ciliaires est fréquemment rencontré dans les cellules IMCD lors de la formation du cil (Flora Legendre et Alexandre Benmerah, communication personnelle). Curieusement on n'observe qu'un seul point de marquage au niveau du corps basal, ce qui pourrait signifier que le corps basal fils perd HsBug22p au cours de la ciliogénèse. Toutefois, cette observation aurait besoin d'être confirmée par un système de visualisation plus résolutif.

L'anticorps GTL3 marque également de façon pointillée le noyau des cellules en phase proliférative, ce marquage nucléaire étant moins clair dans les cellules en phase quiescente.

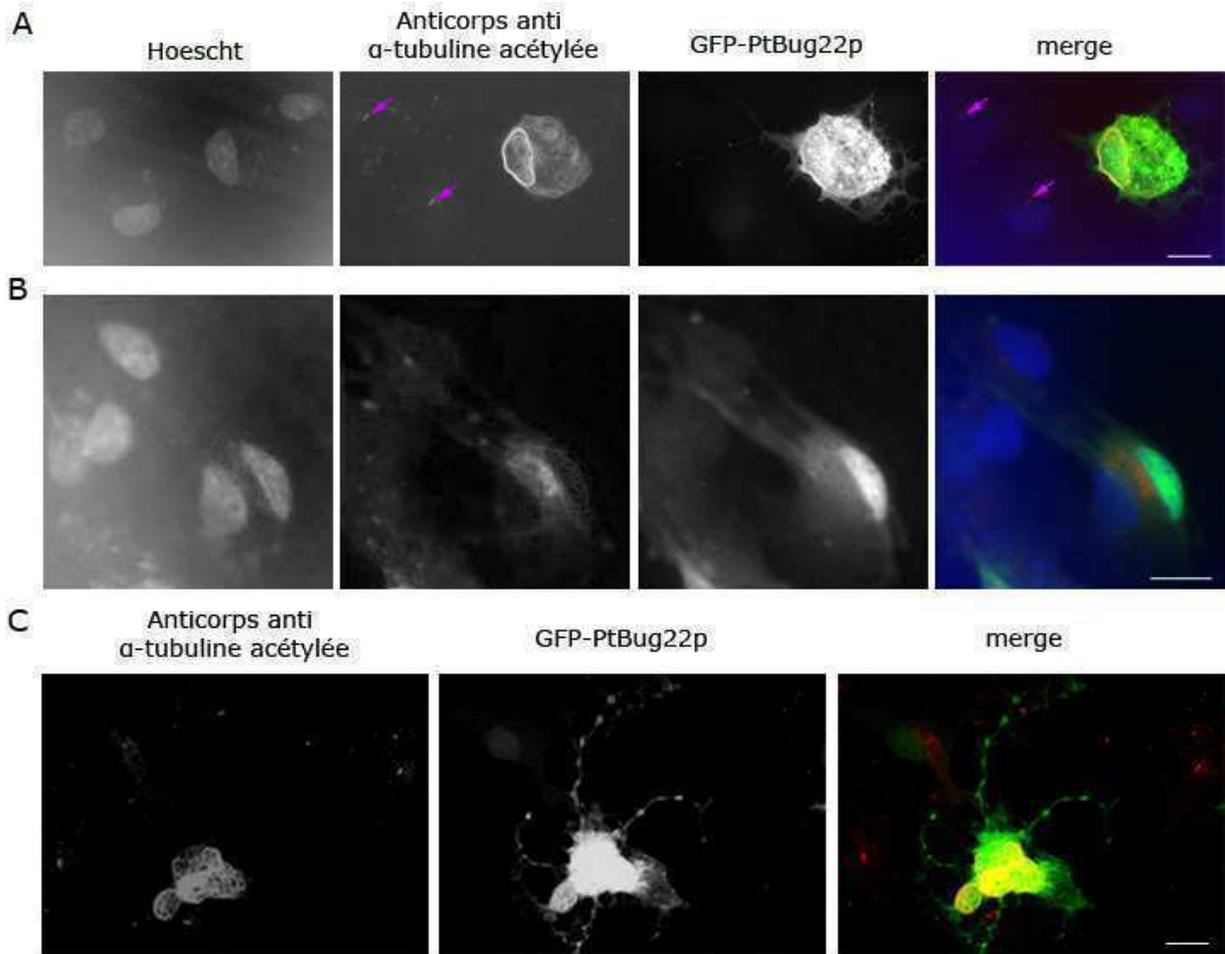
Contrairement aux cellules rétinienne de type RPE1 qui ont la capacité de nucléer un cil sans formation de jonctions cellulaires, la formation du cil dans les cellules épithéliales rénales de type IMCD nécessite la mise en place de jonctions cellulaires à l'arrivée en phase quiescente. Cette transition entre phase proliférative et phase quiescente s'accompagne d'une relocalisation de certaines protéines ciliaires au niveau de ces jonctions cellulaires telles que NPHP1 (Donaldson et al., 2000 ; Fliegauf et al., 2006) ou NPHP4 (Delous et al., 2009 ; Mollet et al., 2005). Nous avons voulu savoir s'il en était de même pour HsBug22p. Nous avons donc effectué des doubles marquages en utilisant GTL3





**Figure 25. Localisation de GFP-HsBug22 et de la  $\beta$ -caténine dans des cellules IMCD après fixation au méthanol**

Des cellules de type IMCD sont observées au microscope confocal. Elles sont co-marquées par l'anticorps anti- $\beta$ -caténine permettant une visualisation des jonctions membranaires (rouge) et avec l'anticorps GTL3 spécifique de Bug22p (vert). Dans des cellules en phase proliférative, HsBug22p ne co-localise pas avec l'anticorps anti- $\beta$ -caténine, mais présente une localisation cytoplasmique non homogène, plus concentrée autour du noyau. Dans des cellules arrivées en phase quiescente, HsBug22p est relocalisée et co-localise partiellement avec l'anticorps anti- $\beta$ -caténine aux jonctions membranaires. Barres d'échelles : 15 $\mu$ m.



**Figure 26. Observation de cellules RPE1 qui expriment GFP-HsBug22.**

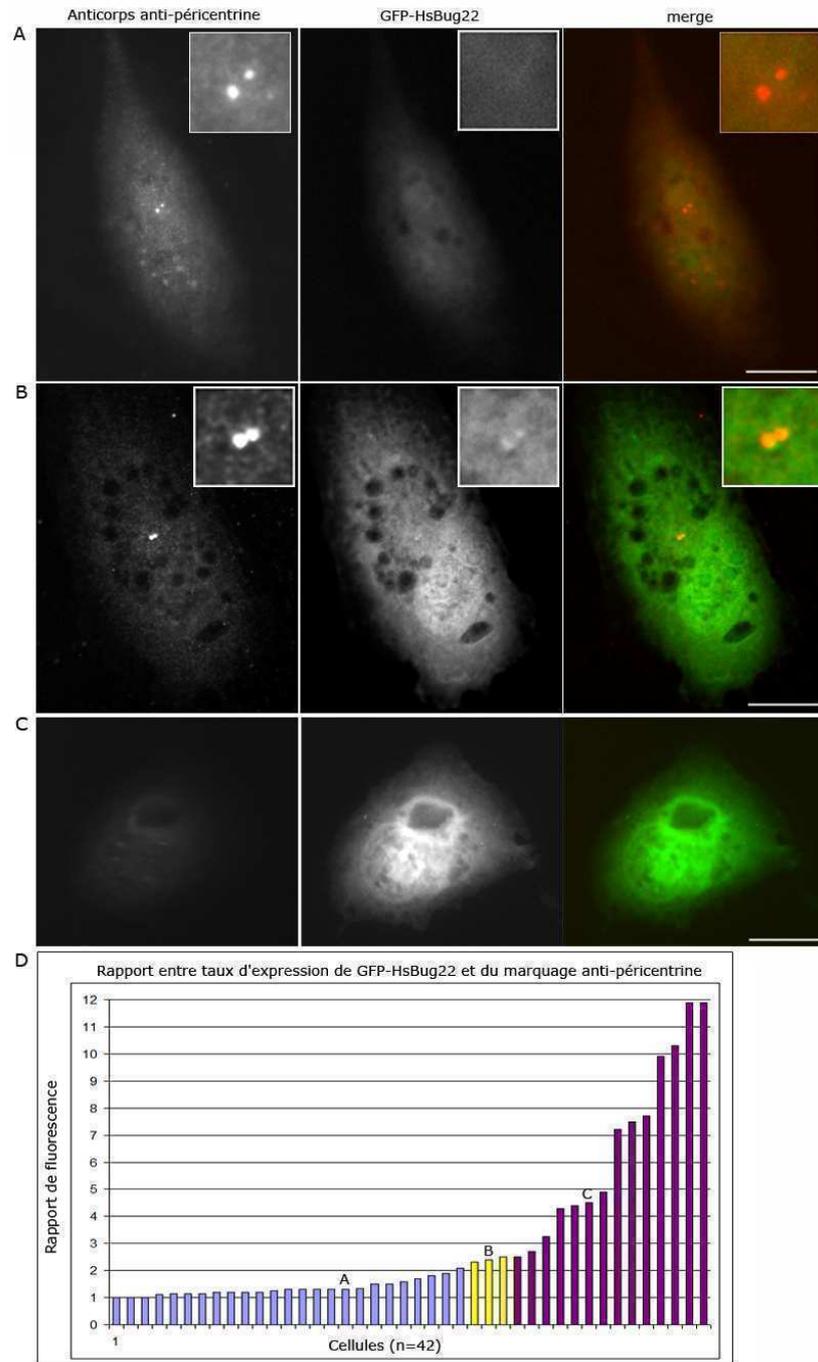
Observation de la localisation de GFP-HsBug22 (en vert) dans des cellules RPE1, transfectées avec le plasmide pD2EGFP contenant le gène *HsBUG22* et marquées avec un anticorps spécifique de l' $\alpha$ -tubuline acétylée (en rouge). A et B. Les cellules exprimant GFP-HsBug22 montrent un réseau de tubuline acétylée très développé et n'ont pas développé de cils, pourtant visibles dans les cellules non transfectées (flèches). La fluorescence GFP se localise au noyau (B). C. Les cellules exprimant fortement GFP-HsBug22 forment des extensions cellulaires contenant la protéine fusion. Le corps cellulaire est réduit et contient également la protéine fluorescente. La surexpression de HsBug22p semble donc réguler positivement le réseau de microtubules et leur acétylation. Barres d'échelles 15 $\mu$ m.

et un anticorps spécifique de la  $\beta$ -caténine sur des cellules IMCD fixées au méthanol. La  $\beta$ -caténine est une protéine impliquée dans la voie Wnt et se localise aux jonctions cellulaires lors de la phase quiescente. Dans les cellules en phase proliférative, le marquage avec GTL3 est non uniforme dans le cytoplasme : peu concentré près de la membrane plasmique, il marque de façon intense le pourtour du noyau. Dans les cellules arrivées à phase quiescente, le marquage GTL3 au noyau décroît tandis que l'anticorps marque de façon intense les jonctions cellulaires suggérant, qu'il y a translocation de HsBug22p (figure 25).

### **Localisation de HsBug22p par fusion à la GFP et effet de la surexpression**

Pour confirmer la localisation de HsBug22p dans les cils primaires, des cellules de type RPE1 ont été transfectées avec le plasmide pD2EGFP ayant déjà permis l'expression du gène *HsBUG22* fusionné à la GFP dans des cellules humaines (HeLa) sous le contrôle d'un promoteur constitutif (Laligné et al., 2010). La figure 26 permet de visualiser la fluorescence sur des cellules RPE1 exprimant la protéine hybride qui ont été amenées à confluence et qui étaient donc susceptibles de développer un cil primaire. Ces cellules ont été marquées avec l'anticorps anti- $\alpha$ -tubuline acétylée. Sur des cellules non fluorescentes, on voit des cils, ce qui indique que la culture cellulaire était bien à confluence et capable de développer de telles structures.

On observe sur les cellules exprimant peu la protéine hybride un signal GFP au niveau du noyau (figure 26 A et B). Ce marquage ne permet pas de détecter de signal au niveau de structures pouvant correspondre aux cils ou centrioles, qui ne sont pas non plus visualisables avec l'anticorps anti- $\alpha$ -tubuline acétylée dans cette expérience. Par contre, cet anticorps révèle un abondant réseau de microtubules acétylés cytoplasmiques, non détectables dans les cellules non transformées.

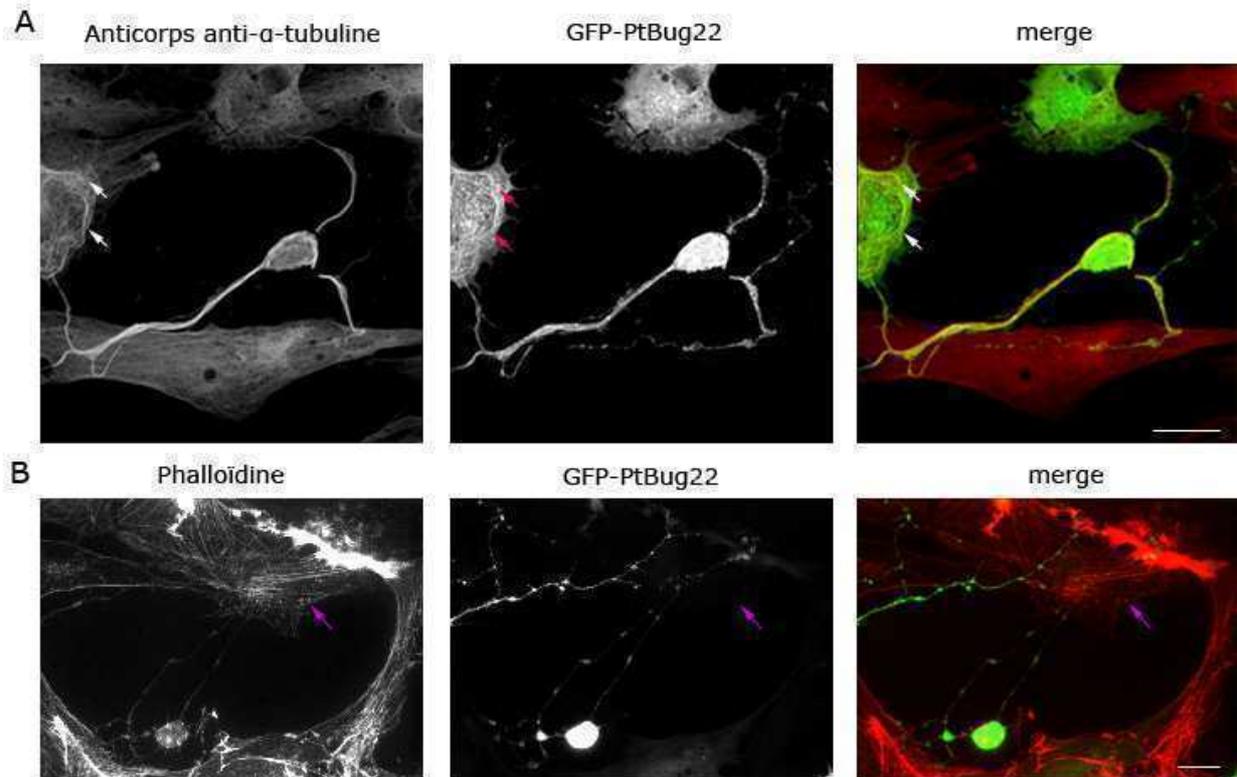


**Figure 27 : Marquage anti-péricentrine dans des cellules exprimant GFP-HsBug22**

Des cellules transformées exprimant GFP-HsBug22 (vert) sont marquées avec un anticorps péricentrine (rouge). A. Marquage anti-péricentrine sur une cellule exprimant très faiblement GFP-HsBug22. B. co-localisation entre la protéine fusion et le marqueur péricentrine. C. Absence de marquage anti-péricentrine dans une cellule exprimant fortement GFP-HsBug22. Barres d'échelles : 15  $\mu$ m. D. Corrélation entre taux d'expression de GFP-HsBug22 et présence du marquage anti-péricentrine. La quantité de fluorescence est estimée par le rapport de l'intensité de fluorescence des cellules et du fond. Bleu : les cellules présentent un marquage anti-péricentrine et n'expriment pas GFP-HsBug22 ; Jaune : co-localisation du marquage anti-péricentrine et de GFP-HsBug22 ; Violet : les cellules expriment GFP-HsBug22 et le marquage anti-péricentrine n'est pas visible. Les cellules présentées en A, B et C sont reportées sur le graphique. GFP-HsBug22 est capable de se localiser au centrosome mais sa surexpression compromet son intégrité.

Dans les cellules exprimant fortement la protéine hybride, le signal GFP recouvre le cytoplasme et dissimule le signal nucléaire s'il existe (figure 26 C). Ces cellules présentent des formes atypiques évoquant des défauts de morphogénèse. Elles présentent un cytoplasme réduit et développent des projections qui ressemblent à des filopodes et contiennent le signal GFP, mais pas ou peu le signal de tubuline acétylée. Il est également impossible de détecter la présence de centrioles ou de cil car, si ces structures subsistent, elles sont masquées par un réseau de microtubules acétylés, anormalement dense, et qui forme une pelote autour du noyau et envahit le cytoplasme. Ces défauts ne semblent pas dus à des déclenchements d'apoptose : la mortalité cellulaire dans les clones transformés par GFP-HsBug22 semblait identique à celle des clones transformés par l'ADN témoin (vecteur d'expression contenant la GFP seule) bien que nous ne l'ayons pas quantifiée et, aucune dégradation de leurs noyaux n'a été notée après marquage au DAPI. Les mêmes phénotypes ont été observés sur des cellules en phase proliférative (résultats non montrés).

Comme pour les cellules en phase quiescente, l'augmentation d'intensité du marquage avec l'anticorps anti-tubuline acétylée observée sur des cellules exprimant fortement GFP-HsBug22 ne permet pas de distinguer les centrioles qui sont habituellement spécifiquement marqués par cet anticorps. Nous avons donc essayé de les visualiser avec un anticorps anti-péricentrine. Sur la figure 27 B, nous pouvons constater un enrichissement de la fluorescence GFP-HsBug22 au niveau du marquage anti-péricentrine, la protéine GFP-HsBug22 est donc capable de se localiser aux centrioles. Nous avons estimé, sur 42 cellules, l'intensité de fluorescence provoquée par l'expression de la protéine fusion, pour cela nous avons effectué un rapport entre l'intensité mesurée dans les cellules avec celle provoquée par l'auto-fluorescence de la lame et nous avons corrélé ces rapports d'intensité à la présence du marquage anti-péricentrine ainsi qu'à une éventuelle co-localisation des deux marquages (figure 27 D). Nous pouvons constater que seules trois cellules sur les 42 présentent une co-localisation des deux marquages. Ces cellules présentaient une fluorescence 2,3 ou 2,5 supérieure à l'auto-fluorescence de la lame. Nous pouvons constater que 25 des cellules observées présentaient une intensité de



**Figure 28. Extensions cellulaires dans les cellules qui surexpriment GFP-HsBug22.**

A. Co-localisation entre l'anticorps anti- $\alpha$ -tubuline et GFP-HsBug22 (Flèches). Les extensions cellulaires qui apparaissent contiennent de l' $\alpha$ -tubuline. B. Les extensions cellulaires contiennent aussi des filaments d'actine, le réseau est désorganisé comparé à celui de la cellule non transformée (flèche). Barres d'échelles : 15 $\mu$ m.

fluorescence faible (avec une fluorescence jusqu'à 2 fois supérieure à l'auto-fluorescence). Ces cellules présentaient toutes un marquage anti-péricentrine mais pas de co-localisation avec GFP-HsBug22 (figure 27 A). L'hypothèse la plus probable est que le taux d'expression de la protéine d'intérêt est trop faible pour être visualisable. Enfin, les 14 cellules qui présentaient le plus fort niveau de fluorescence GFP ne présentaient pas de marquage anti-péricentrine (figure 27 C). Il semble alors que la surexpression de la protéine fusion entraîne une déstabilisation du centrosome. Ces deux dernières données expliqueraient pourquoi nous n'observons la co-localisation des deux marqueurs que sur un petit nombre de cellules.

Afin de préciser la nature du réseau cytosquelettique constituant les extensions cellulaires se développant dans les cellules surexprimant GFP-HsBug22, j'ai réalisé des marquages avec les anticorps anti-actine et anti- $\alpha$ -tubuline. La figure 28 permet de constater que ces anticorps marquent tous deux ces projections cellulaires suggérant qu'elles contiennent microtubules et filaments d'actine. L'apparition de ces extensions s'accompagne par ailleurs de la désorganisation du réseau d'actine cytoplasmique corrélé à une désorganisation de l'appareil de Golgi (résultats non montrés).

### Conclusion – discussion

Bien qu'encore préliminaires, l'ensemble de ces expériences suggèrent fortement, grâce à l'utilisation de l'anticorps anti-Bug22p, GTL3, que la protéine HsBug22p est localisée au niveau du centrosome dans les cellules de mammifères de type RPE1 et IMCD en phase proliférative, comme nous l'avions déjà observé dans les cellules de types HeLa. Cette localisation au niveau du centrosome n'a pas pu être clairement confirmée par transformation avec la protéine fusionnée à la GFP. Néanmoins lorsque les cellules expriment suffisamment GFP-HsBug22 pour être détectable et pas de façon excessive permettant ainsi la conservation de l'intégrité du centrosome, on observe bien une co-



localisation de GFP-HsBug22 avec le marquage de l'anticorps péricentrine. Il serait intéressant de préciser cette localisation notamment en faisant des doubles marquages avec GTL3 et des anticorps dirigés contre des protéines spécifiques des extrémités distales (la centrine 2 ou CP110 par exemple), proximales (gamma-tubuline ou SAS6) des centrioles et contre le matériel pericentriolaires (pericentrine) De même, des observations en microscopie électronique sur des cellules marquées avec GTL3 devraient permettre de préciser si des structures particulières localisées autour des centrioles contiennent HsBug22p.

Le marquage des cils primaires par l'anticorps GTL3 montre que la protéine HsBug22p se localise dans des cils, même non motiles. Les relations entre PtBug22p et motilité observées chez la paramécie ne représentent donc pas l'unique fonction de cette protéine. Elle doit avoir un autre rôle dans la biogenèse ou le fonctionnement des cils, indépendant de la motilité.

Nous avons observé que la surexpression de GFP-HsBug22 dans le cil provoque une augmentation de l'acétylation des réseaux de microtubules internes et l'apparition d'extensions cellulaires contenant actine et tubuline. Ces résultats pourraient indiquer que HsBug22p ait une action sur la stabilisation des réseaux de microtubules. D'autres protéines ciliaires jouent un rôle dans la régulation de la stabilité des microtubules et surtout la régulation de modifications post-traductionnelles dans le corps cellulaire. BBIP10 a une action au sein du BBSome mais elle a aussi pour fonction d'inhiber la désacétylase HDAC6 au sein du corps cellulaire (Loktev et al., 2008). L'hypothèse que l'action de BBIP10 sur l'acétylase est aussi recrutée par le cil a été émise car la résorption du cil primaire demande l'intervention d'une désacétylase. Il serait intéressant de connaître les divers interactants de Bug22p dans le cil et dans les autres compartiments cellulaires pour pouvoir émettre quelques hypothèses quant à sa ou ses fonctions. Des expériences de co-immunoprécipitations dans le but d'effectuer des analyses de protéomiques ont été menées au cours de ma thèse mais n'ont pas été conclusives à ce jour. Nous devons, pour



vérifier l'hypothèse d'une implication de PtBug22p dans les modifications post-traductionnelles de types acétylation, polyglutamylation et polyglycylation, quantifier celle-ci par western blot sur des extraits totaux de protéines.

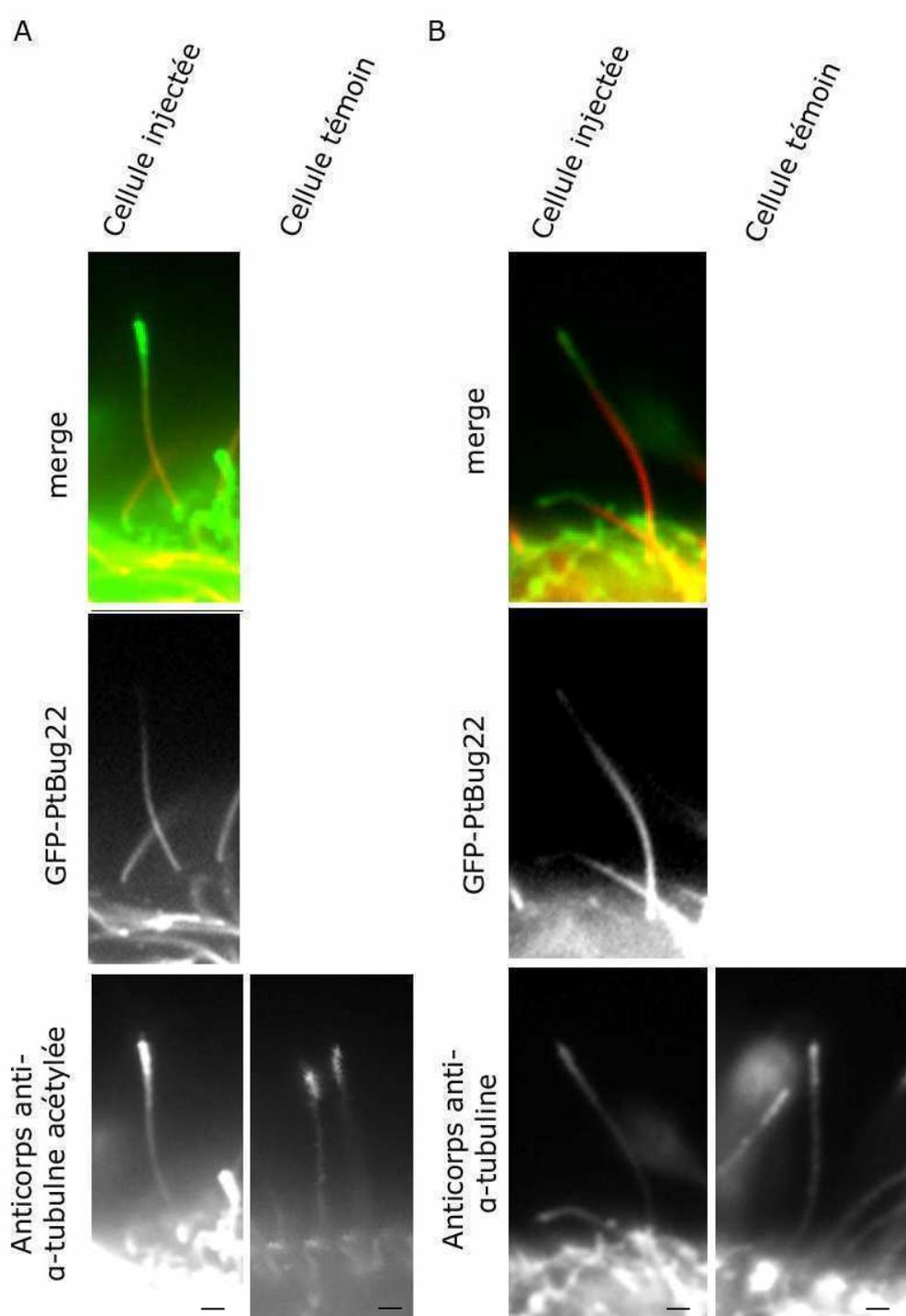
Lorsque les cellules de type IMCD arrivent à confluence, les cellules entrent en phase quiescente et nucléent un cil primaire. Nous avons constaté que HsBug22p est alors relocalisée du cytoplasme vers les jonctions cellulaires. Nous avons vérifié cette relocalisation dans des cellules épithéliales de tube distal de reins de type MDCK et la protéine semble se comporter de la même manière. Malheureusement les double-marquages avec la  $\beta$ -caténine n'ont pas fonctionné et l'expérience doit être reproduite. D'autres protéines présentent aussi cette double localisation, aux cils et aux jonctions cellulaires, notamment différentes protéines impliquées dans des maladies kystiques rénales humaines telles que NPHP1 (Donaldson et al., 2000 ; Fliegauf et al., 2006), PC-1/2 (Roitbak et al. 2004 ; Yoder et al. 2002) ou NPHP4 (Delous et al., 2009 ; Mollet et al., 2005). Une hypothèse est que ces protéines interviennent dans la communication cellule-cellule permettant ainsi la détection de la phase quiescente et le déclenchement des mécanismes de nucléation du cil primaire. Bug22p pourrait donc, elle aussi, intervenir dans l'interaction cellule-cellule permettant l'arrêt de la croissance à l'arrivée à phase quiescente par exemple. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait laisser croître des cellules transformées de manière stable afin d'observer leur comportement après la phase proliférative. L'observation du comportement des cellules après inactivation génique pourrait aussi permettre de mettre en évidence un éventuel rôle de HsBug22p dans la mise en place de la transition entre phase proliférative et phase quiescente et des jonctions cellulaires.

Nous avons également pu constater que l'anticorps GTL3 décorait le noyau des cellules IMCD ou RPE1 en phase quiescente. Ceci est à rapprocher des observations obtenues chez la paramécie et *Arabidopsis* (voir chapitres précédents) et dans des cellules de drosophile (Teresa Maia et Renata Basto, communication personnelle). Le lien possible



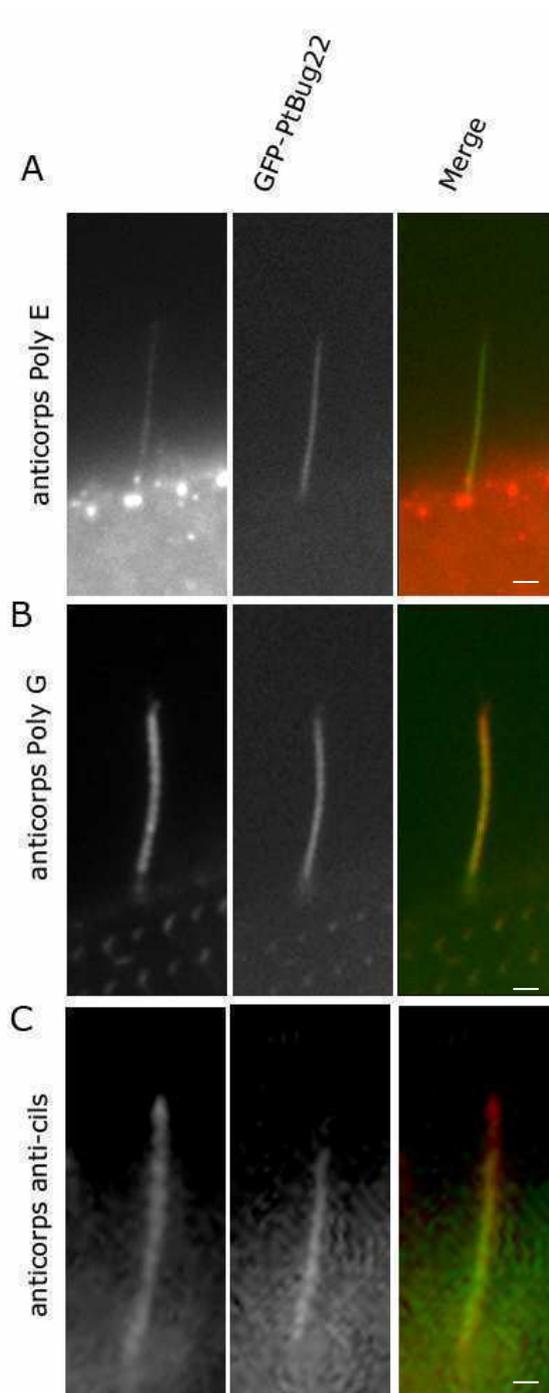
entre localisation et fonction partagées par Bug22p au sein du cil et du noyau sera discuté dans la Discussion Générale.





**Figure 29 : Localisation de GFP-PtBug22 comparée à la tubuline acétylée dans les cils de paramécie**

A. Marquage avec l'anticorps anti  $\alpha$ -tubuline acétylée (en vert) d'un cil contenant GFP-PtBug22 (en rouge). B. Marquage avec l'anticorps anti  $\alpha$ -tubuline (en vert) d'un cil contenant GFP-PtBug22 (en rouge). La protéine fusion se localise sous forme d'un gradient le long du cil, elle est absente de la pointe ou les deux anticorps utilisés marquent plus intensément le cil. Observation au microscope confocal. Barres d'échelles : 2  $\mu$ m.



**Figure 30 : Comparaison entre la localisation de GFP-PtBug22 et des modifications post traductionnelle glutamylation et polyglycylation dans les cils de la paramécie.**

Localisation GFP-PtBug22 (en vert) au microscope à fluorescence. A. Co-localisation avec l'anticorps polyE (en rouge) spécifique de la polyglutamylation. B. Co-localisation avec l'anticorps polyG (en rouge) spécifique des longues chaines de polyglycines. C. L'anticorps anti-cils (en rouge) marque le cil sur une plus grande longueur que la protéine GFP-PtBug22. Barres d'échelles : 2 $\mu$ m.

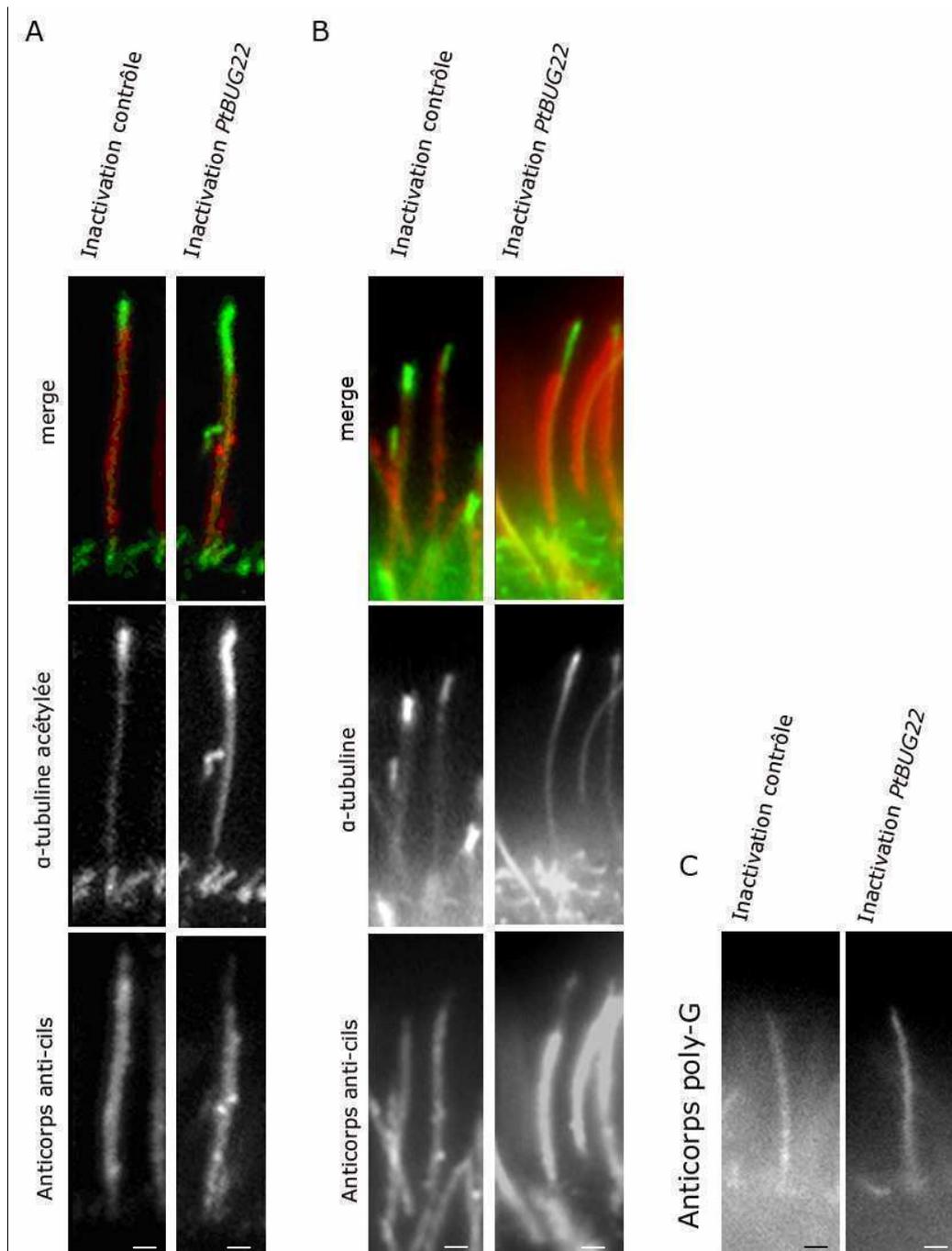
## **Chapitre IV. PtBug22p et les modifications post-traductionnelles des tubulines chez la paramécie**

Les expériences réalisées sur les cellules de mammifères ont soulevé un fait nouveau à savoir que la surexpression de GFP-HsBug22 est corrélée à une hyperacétylation des microtubules. Nous avons recherché si la déplétion et la surexpression de la protéine GFP-PtBug22 avaient des effets similaires sur ces modifications post-traductionnelles des microtubules chez la paramécie. Nous avons également testé l'implication de PtBug22p sur la polyglycylation et la polyglutamylolation.

### **Surexpression**

Nous avons réalisés des marquages avec un anticorps anti- $\alpha$ -tubuline (qui permet de marquer les cils sur toute leur longueur) et anti-tubuline-acétylée (TEU348) sur des cellules transformantes exprimant GFP-PtBug22. Des marquages avec un anticorps dit anti-cils qui reconnaît les tubulines contenant des chaînes longues de 4 à 32 glycines et deux anticorps reconnaissant les longues chaînes polyglycylées (polyG) et polyglutamylées (PolyE) ont également été réalisés. Les spécificités des anticorps utilisés dans l'étude des modifications post-traductionnelles sont présentées tableau 3 dans les matériels et méthodes.

Les figures 29 et 30 montrent les différents résultats obtenus sur les structures ciliaires. Comme on peut le constater, aucune différence significative des niveaux d'acétylation, de glycylation ou de glutamylolation des microtubules ne sont observées sur les transformants. Contrairement aux anti- $\alpha$ -tubulines, les anticorps anti-cils, PolyG et



**Figure 31 : Niveaux des modifications post-traductionnelles dans les cils de la paramécie après inactivation de *PtBUG22*.**

Observation de cils de la paramécie au microscope à fluorescence après 48H d'inactivation génique *PtBUG22*. A. Marquage anti  $\alpha$ -tubuline acétylée (en vert) et anti-cils (en rouge). La longueur du marquage anti-cils diminue après inactivation génique *PtBUG22*. Les niveaux de polyglycylation semblent donc diminuer. B. Marquage anti  $\alpha$ -tubuline (en vert) et anti-cils (en rouge). Le marquage présente les mêmes différences que dans le cas de l'anticorps anti  $\alpha$ -tubuline acétylée. C. Marquage avec l'anticorps polyG, on ne voit pas de différence avec et sans inactivation. Barres d'échelles : 2  $\mu$ m.

PolyE ne marquent pas la pointe des cils (Cohen et al., 1982; Shang et al., 2002 ; Duan et Gorovsky, 2002), indiquant que les parties distales des microtubules axonémaux sont dépourvus de chaînes de glycines et d'acide glutamique.

Si le signal GFP chez les transformants co-localise parfaitement avec le marquage PolyG et PolyE (figure 30 A et B) dans la partie proximale des cils, toute la partie distale marquée par les anticorps anti- $\alpha$ -tubuline acétylée (figure 29 A), et anti- $\alpha$ -tubuline (figure 29 B) n'est pas fluorescente, confirmant nos premiers résultats et montrant que PtBug22p n'est pas présent à la pointe ciliaire. La co-localisation parfaite de la fluorescence GFP avec les marquages PolyG et PolyE pourrait suggérer que PtBug22p interagit directement ou indirectement avec les microtubules contenant soit l'une soit l'autre de ces modifications post-traductionnelles.

Pourtant, alors que l'anticorps anti-cils reconnaît, comme l'anticorps polyG, l'addition de chaînes polyglycylés sur les tubulines, le signal GFP ne co-localise pas exactement avec le marquage de cet anticorps (figure 30 C). La fluorescence GFP-PtBug22 est absente de la partie distale de la région reconnue par l'anticorps, contrairement à ce qui est observé avec polyG où les deux signaux co-localisent parfaitement (figure 30 B). Cette observation pourrait renforcer l'hypothèse d'une interaction de PtBug22p avec des microtubules polyglutamylés et non polyglycylés. Néanmoins il existe une différence de spécificité de reconnaissance entre les anticorps polyG et anti-cils. Ainsi, alors que l'anti-cils peut reconnaître des chaînes courtes de glycines (à partir de 4), ce n'est pas le cas de polyG. Une interaction de PtBug22p avec des microtubules contenant seulement de longues chaînes de glycines pourrait expliquer les différences observées. La partie ne contenant pas GFP-PtBug22 et marquée par l'anticorps anti-cils pourrait correspondre à une région de l'axonème constituée de tubulines contenant de courtes chaînes de glycine.



## Inactivation

Nous avons effectué des co-marquages avec ces différents anticorps sur des cellules déplétées pour PtBug22p.

Sur les témoins, l'anti-tubuline acétylée TEU348 (figure 31) marque les cils sur toute leur longueur, le signal s'intensifiant vers la partie apicale, tandis que l'anti-cil ne marque pas la pointe, confirmant que l'extrémité distale des microtubules axonémaux ne contient pas de longues chaînes de poly-glycines. La différence d'intensité du marquage observée avec l'anticorps TEU348 entre les parties distales et proximales des cils peut s'expliquer par la présence de la gaine de glycines qui entoure les microtubules dans ces régions et modifie l'accès de l'anticorps anti  $\alpha$ -tubuline (Fleury et al., 1995).

Dans les cellules inactivées pour *PtBUG22*, l'étendue de l'extrémité distale reconnue par l'anticorps TEU348 augmente, cette augmentation s'accompagnant d'une diminution de la zone proximale des microtubules reconnue par l'anticorps anti-cils (figure 31 A). Deux hypothèses peuvent expliquer ces modifications. Une hypothèse simple serait que PtBug22p induise, comme la surexpression de GFP-HsBug22 dans les cellules RPE1, une réelle augmentation de l'acétylation des tubulines. Une autre hypothèse serait que la déplétion de PtBug22p induise une baisse de la glycylation. Cette déplétion conduirait à la disparition complète des glycines dans la région proximale de l'axonème contenant de courtes chaînes et à un simple raccourcissement de la longueur de ces chaînes de glycines dans la région proximale. L'absence des glycines en partie distale rendrait cette région non détectable par l'anticorps anti-cils, mais plus accessible au marquage par TEU348 qui apparaîtrait donc augmenté.

Pour essayer de trancher entre ces hypothèses, j'ai réalisé des co-marquages avec l'anticorps anti-cils et avec l'anti  $\alpha$ -tubuline. Si l'inactivation induit bien une modification de la polyglycylation, la partie distale du cil plus accessible à l'anticorps anti- $\alpha$ -tubuline



devrait être plus longue que dans les témoins comme observé avec TEU348. Dans le cas où l'inactivation de PtBug22p induirait une augmentation de l'acétylation, on s'attend à ce que la polyglycylation ne soit pas modifiée et donc que l'accessibilité de la partie distale des microtubules axonéaux à l'anticorps soit identique dans le témoin et les cellules inactivées. La figure 31 B montre les résultats obtenus, qui sont tout à fait comparables à ceux observés avec le co-marquage TEU348 et anti-cils, laissant supposer que la déplétion de PtBug22p s'accompagne bien de l'inhibition de la glycylation des microtubules axonéaux.

Le marquage avec l'anticorps polyG ne montre aucune modification des forts niveaux de glycylation sur les microtubules axonéaux de cellules inactivées par rapport aux témoins dans les conditions utilisées (figure 31 C). Il faudrait néanmoins faire des marquages en utilisant des concentrations variables d'anticorps. En effet l'utilisation des anticorps anti-modifications post-traductionnelles de tubuline à de fortes concentrations peut masquer des variations de ces modifications.

Bien que nous n'ayons pas été en mesure de le valider de manière quantitative, il nous semble que la déplétion de PtBug22p entraîne une hyper-acétylation du réseau de microtubules internes.

### Conclusion - discussion

Ces résultats montrent que Bug22p n'est pas localisé de façon homogène dans l'axonème et que la protéine fusionnée à la GFP est absente de la pointe ciliaire, ils suggèrent aussi que son inactivation a des conséquences sur les modifications post-traductionnelles des microtubules.



Il a aussi été montré que l'inactivation de TTLL (tubulines tyrosines-ligases-like) qui permettent la mise en place des modifications post-traductionnelles telles que polyglycylation et polyglutamylaton, entraîne des modifications du mouvement ciliaire. Chez le poisson zèbre, l'inactivation de TTLL3 (une polyglycylase) entraîne la modification du battement ciliaire. L'inactivation de TTLL6 (une polyglutamylase) entraîne, elle aussi, une altération de la forme du battement. De plus, la co-inactivation de TTLL3 et TTLL6 entraîne une paralysie totale du battement (Pathak et al., 2011) montrant que les deux modifications ont un mode d'action additionnel permettant la mise en place d'un battement ciliaire efficace.

L'inactivation génique de PtBug22p entraîne une diminution de la polyglycylation le long de l'axonème associée à une hausse du marquage anti-tubuline acétylée. Il semblerait aussi que le réseau interne de microtubules soit hyper-acétylé. Malheureusement, nous n'avons pas pu émettre de conclusions définitives sur les éventuelles différences de taux d'acétylation des protéines à cause des problèmes d'accessibilité de l'anticorps pour sa cible au niveau de l'axonème et pour des questions de difficulté de quantification de fluorescence dans le cas de la fluorescence cytoplasmique. Il serait intéressant de vérifier les quantités de polyglutamylaton grâce à un marquage avec l'anticorps polyE. Chez *Tetrahymena*, l'augmentation du taux de polyglutamylaton augmente la quantité et la stabilité des microtubules du corps cellulaire. Par contre, les microtubules axonémaux sont déstabilisés et deviennent plus courts. L'élongation des chaînes glycyliées semble stabiliser les microtubules par recrutement de MAPs. De plus, il a été montré *in vitro* que la glutamylaton des tubulines affecte la liaison de certaines MAPs structurelles et de protéines motrices (Bonnet et al., 2001 ; Boucher et al., 1994 ; Larcher et al., 1996).

Ces différentes données montrent l'importance des modifications post-traductionnelles de l'axonème dans la mise en place du battement et renforcent notre hypothèse que Bug22p puisse être impliquée dans la régulation de ces processus. Les



marquages GFP, polyE (anti-polyglutamylation) et polyG (anti-polyglycylation) co-localisent parfaitement sur la longueur de l'axonème, tous trois sont absents de la pointe ciliaire. Ce résultat, est d'une part, en faveur d'un lien entre PtBug22p et ces modifications post-traductionnelles et, d'autre part, pourrait indiquer un rôle de Bug22p dans la régionalisation longitudinale du cil. Le corps du cil est constitué de 9 doublets externes de microtubules. A la pointe ciliaire, l'un des doublets s'arrête et on observe une zone constituée de 9 'singlets' externes. La localisation de la protéine PtBug22p pourrait alors correspondre à la zone des doublets et pourrait être absente de la zone des 'singlets'. Pour le vérifier, des observations en microscopie électronique seraient nécessaires, bien qu'il soit très difficile d'observer la pointe du cil en règle générale. La pointe ciliaire est importante pour la détermination de la forme du mouvement ciliaire. Pour permettre le battement, les microtubules de paires adjacentes doivent être capables de glisser les uns par rapport aux autres. Pour permettre ce glissement et ainsi faciliter la torsion que doit subir le cil lors de son battement, les microtubules sont perpétuellement dépolymérisés et repolymérisés au niveau de la pointe ciliaire. Si cette dynamique de la pointe est modifiée, le battement s'en trouve altéré. La régionalisation longitudinale de l'axonème permet la localisation non uniforme de différentes protéines telles que les dynéines. Cette localisation différentielle le long de l'axonème est déterminante pour la forme du battement. La pointe est aussi la région du cil qui contient le plus de récepteurs, elle est donc essentielle à la réception efficace de signaux.

Si PtBug22p est essentiel à la détermination du battement ciliaire, quel rôle a cette protéine au sein du cil primaire ?

Dans les cellules de mammifères en culture sur-exprimant GFP-HsBug22, nous avons observé une stabilisation des microtubules avec l'apparition d'extensions cellulaires contenant actine et tubuline, associée à une hyper-acétylation des microtubules. Les modifications post-traductionnelles dans ces cellules sont essentielles pour la maintenance ciliaire. Comme précédemment, pour vérifier cette hypothèse, il faudrait vérifier les



quantités de polyglutamylation, polyglycylation et acétylation sur des extraits protéiques par western-blot dans des cellules en phase prolifératives et dans des cellules arrivées à phase quiescente. De plus, des expériences en immunofluorescence *in situ* nous permettraient de vérifier la localisation cellulaire des polyglutamylation et polyglycylation dans un contexte de surexpression de GFP-PtBug22 comme nous l'avons fait pour l'acétylation.

Un rôle de PtBug22p dans les mécanismes qui régulent ces modifications pourraient expliquer sa grande conservation dans l'évolution. Chez les plantes terrestres, la nature des modifications post-traductionnelles sont encore très méconnues mais il semble qu'au moins l'une d'entre elles soit conservée. On retrouve en effet une séquence proche des séquences protéiques de type TTLL. Il semble que cette séquence soit l'homologue de *TTLL12* qui coderait pour une protéine dont la séquence se rapproche de la séquence de polyglutamylases. Il est intéressant de noter que tout comme *BUG22*, *TTLL12* est retrouvée dans le génome des plantes terrestres mais, est absent de celui des champignons.



# Discussion



## Discussion générale

Au cours de ce travail, je me suis intéressée à la protéine Bug22p, conservée au cours de l'évolution, retrouvée dans différentes études protéomiques et transcriptomiques ciliaires et flagellaires, mais aussi détectée chez les plantes terrestres qui ne possèdent pourtant ni cils ni centrioles.

Je me suis en particulier attachée à préciser la localisation cellulaire de cette protéine dans différents modèles cellulaires, la paramécie, les cellules humaines en culture en phase proliférative et quiescente et dans les cellules de plantes). Pour cela j'ai réalisé des immunomarquages avec l'anticorps GTL3 dirigé contre la protéine humaine et transformé les cellules de ces organismes avec Bug22p fusionnée à des protéines fluorescentes. J'ai ainsi démontré, que dans un même organisme Bug22p pouvait avoir plusieurs localisations intra-cellulaires.

Dans tous les modèles cellulaires que j'ai analysés, j'ai détecté sa présence dans le compartiment nucléaire. Elle se localise également dans les cils (motiles et immotiles) des deux modèles ciliés analysés, la paramécie et les cellules de mammifère en phase quiescente. Dans ces deux organismes, elle est également présente au niveau des structures centriolaires : centrosome dans les cellules en phase proliférative et corps basal non cilié chez la paramécie. Enfin, dans les cellules épithéliales rénales utilisées, on la retrouve au niveau des jonctions cellulaires et, chez les plantes, au niveau d'une structure correspondant au réticulum endoplasmique.

Les analyses fonctionnelles effectuées chez la paramécie et dans les cellules de mammifère en culture suggèrent par ailleurs que Bug22p pourrait avoir une fonction sur la régulation des modifications post-traductionnelles de type acétylation ou polyglycylation.



J'ai discuté les différents résultats au fil du manuscrit et j'essayerai ici de discuter certains points de façon plus globale

### **Bug22p, une protéine ciliaire localisée aussi au noyau**

La localisation de Bug22p fusionnée à la GFP au sein des noyaux des différentes espèces étudiées indique, bien que ce ne soit pas une preuve absolue, que Bug22p pourrait avoir une fonction nucléaire. Cette hypothèse est également étayée par le fait qu'elle est aussi observée dans le noyau de cellules de drosophile (Teresa Maia, Renata Basto, communication personnelle). Trois arguments supplémentaires sont en faveur d'une réelle localisation de Bug22p au noyau,

1- HsBug22p endogène est reconnue dans le noyau des cellules de mammifères en culture par l'anticorps GTL3.

2- Bug22p, aussi appelée fSAP 23 (functional spliceosome-associated protéine), a été trouvée dans deux analyses protéomiques indépendantes du spliceosome chez l'homme (Zhou et al., 2002) et chez la drosophile (Herold et al., 2009), complexe macromoléculaire localisé dans le noyau.

3- Deux partenaires de Bug22p, trouvés par une analyse en double hybride à haut débit effectuée pour les protéines de drosophile, sont Su(w<sup>a</sup>) et la Qilin, protéines liées à la fonction nucléaire. Su(w<sup>a</sup>) est une protéine impliquée dans l'épissage des messagers et la Qilin, qui est un composant essentiel du complexe IFT B, est aussi capable de se localiser au noyau dans des cellules cancéreuses et chez la paramécie (Houssein Chaloub ; communication personnelle). Chez la paramécie, nous avons testé l'interaction de Bug22p et de la Qilin et, nous avons pu montrer que les deux protéines ne sont pas interdépendantes pour leur localisation ciliaire, mais que la Qilin intervient dans la localisation nucléaire de Bug22p.



La localisation nucléaire de Bug22p et de la Qilin n'est pas surprenante. En effet, ce ne sont pas les seules protéines ciliaires à présenter cette double localisation. IFT57p, protéine ciliaire composante de l'IFT B, est aussi connue sous le nom de HIPPI qui a un rôle au niveau du noyau où elle interagit avec un promoteur de la caspase (Majumder, 2007a ; 2007b). IFT57p a donc deux fonctions apparemment bien distinctes, dans le noyau et dans le cil. Evc2 est une protéine localisée aux centrioles, au corps basal et dans le cil primaire. Son inactivation entraîne une diminution de la réponse de la voie Hedgehog via Smo montrant qu'Evc2 est un régulateur positif de cette voie de signalisation. Cependant, il a aussi été montré que Evc2 se localise au noyau dans des cellules de mammifère en culture, suggérant un mouvement de Evc2 entre le cil et le noyau (Blair et al., 2011). PF20 est également une protéine essentielle de l'appareil central de l'axonème chez *Chlamydomonas* (Adams et al., 1981 ; Dutcher et al., 1984). Il existe chez la souris, deux homologues de PF20 : Spag16L qui est également un composant de l'axonème (Zhang et al., 2002) dont la présence est essentielle à la motilité du spermatozoïde (Zang et al., 2006) et Spag16S qui est retrouvée spécifiquement dans la lignée germinale mâle mais aussi dans les noyaux (Zhang et al., 2004). Certaines données suggèrent que Spag16S pourrait réguler l'expression de gènes impliqués dans la spermatogénèse et notamment dans l'expression de Spag16L (Nagarkatti-Gude et al., 2011).

La double localisation de protéines dans le cil et dans le noyau commence à trouver des explications possibles dans le contexte des hypothèses récentes qui supposent que cil et noyau pourraient avoir une origine commune. En effet, la ressemblance structurale entre protéines associées aux vésicules recouvertes (COPI) impliquées dans le transport membranaire et des protéines du complexe IFT suggère que l'origine du compartiment ciliaire serait une spécialisation de ce transport membranaire en relation avec le recrutement de microtubules (Jekely et Arendt, 2006). De même, la ressemblance structurale entre la clathrine recouvrant des vésicules de transport membranaire et certaines nucléoporines suggère une évolution des pores nucléaires, et donc l'apparition du noyau, à partir de ces mêmes mécanismes de transport membranaire chez les eucaryotes primitifs (Devos et al., 2004). La notion de pore flagellaire (FPC : Flagellar pore



complex) comme zone de tri pour l'entrée des protéines dans le cil analogue au pore nucléaire, initialement introduite par Rosenbaum et Witman (2002), a trouvé un support expérimental dans les travaux de Dishinger et al. (2010) sur le transport des protéines vers le cil et vers le noyau. Les signaux de localisation ciliaire (CLS) et les signaux de localisation nucléaire (NLS) sont de courtes séquences d'acides aminés basiques tout-à-fait similaires et les mécanismes d'import reposent, dans les 2 cas, sur l'interaction de ces séquences avec une importine beta et sur la régulation de cette interaction par le gradient Ran-GTP / Ran-GDP, qui existe entre cil ou noyau et cytoplasme. Par ailleurs, dans beaucoup d'organismes unicellulaires, il existe une association structurelle entre le noyau et l'appareil ciliaire. Chez les ancêtres des eucaryotes, le noyau et l'appareil flagellaire ont été envisagés comme un seul organite, le karyo-mastigont. Cet organite rassemblait le noyau, le corps basal ainsi que l'appareil de Golgi (Chapman et al., 2000).

Nous avons évoqué une co-évolution de Bug22p avec les centrines de type 2 (Laligné et al., 2010). Si les centrines sont connues pour être associées aux structures centrioles/axonèmes/corps basaux dans beaucoup d'espèces, la centrine 2 est connue pour avoir une expression ubiquitaire chez l'homme. En plus de sa localisation au centrosome, elle est aussi retrouvée au cytoplasme et dans le noyau (Paoletti et al., 1996). Chez le Xénope et dans des cellules de mammifères de type HeLa, la centrine 2 est associée aux nucléoporines, protéines constituant le pore nucléaire. De plus, des mutations dans la centrine 2 entraînent des défauts dans l'export nucléaire des ARNm (Resendes et al., 2008). Cette donnée montrerait une possible implication de Bug22p et de la centrine dans une même voie permettant, par exemple, la maturation puis l'export des ARNm du noyau vers le cytoplasme.

### **Plusieurs localisations cellulaires de Bug22p.**

Si nous avons pu localiser Bug22p au sein des cils, centrioles et noyaux, nous avons également observé sa présence dans le réticulum endoplasmique des plantes et les

	Hs	Dm	Ce	Pp	At
<b>Bug22p</b> GSPATP00007012001	91	91	78	87	74
<b>A-tubuline</b> GSPATP00021912001	83	83	79	86	86
<b>B-tubuline</b> GSPATP00021361001	86	84	85	88	86
<b>histone</b> GSPATP00035465001	83	83	82	84	85

**Tableau 8 : Conservation de la séquence protéique de Bug22p dans l'évolution**

Tableau présentant la conservation de Bug22p en pourcentage d'identité protéique entre la séquence retrouvée dans la paramécie et les homologues trouvés dans cinq espèces différentes: *H. sapiens*, *C. elegans*, *D. melanogaster*, *P. patens* et *A. thaliana*. Ces taux de conservation sont comparés aux taux retrouvés pour des protéines dont la conservation, tant en séquence qu'en fonction, est communément admise. Les taux de conservation ont été trouvés par blast obtenus par la plateforme CILDB.

jonctions cellulaires des cellules de mammifère en culture. Ces localisations multiples pourraient expliquer sa grande conservation protéique au cours de l'évolution.

Nous avons noté que Bug22p est une protéine très conservée en séquence, avec des pourcentages d'identité en acides aminés entre orthologues de différentes espèces aussi élevés que pour les tubulines ou les histones (tableau 8). Cette protéine est de structure non encore résolue et constitue à elle seule le domaine DUF667, de fonction inconnue. Chez la paramécie, les quatre gènes *PtBUG22* ont divergé en séquence nucléotidique, mais codent pour des protéines 100% identiques. Cette conservation montre une forte contrainte évolutive dont on ignore la nature. Sa présence dans différents compartiments cellulaires pourrait expliquer cette contrainte. En effet, cette observation implique soit que Bug22p interagit avec plusieurs partenaires différents, soit qu'elle doit maintenir des propriétés compatibles avec des environnements intracellulaires divers. Dans les deux hypothèses, toute mutation dans sa séquence protéique risque d'empêcher la reconnaissance de certains partenaires du complexe ou le fonctionnement dans certains contextes intracellulaires. De plus, dans le cas de *BUG22*, il n'existe dans le génome de nombreuses espèces séquencées qu'une seule version de la protéine. Un dysfonctionnement, même léger, de celle-ci introduit par des mutations au cours de l'évolution ne peut donc être compensé par l'action d'un paralogue.

Tout comme Bug22p, plusieurs protéines ciliaires et centrosomales semblent avoir des fonctions dans d'autres compartiments cellulaires. Elles peuvent être retrouvées dans l'appareil de Golgi (par exemple IFT20 ; Follit et al., 2006), le noyau (par exemple IFT57/HIPPI ; Majumder, 2007a ; 2007b) ou dans le cas de IFT20, IFT57 et IFT52 à l'extrémité synaptique des photorécepteurs (Sedmak et Wolfrum, 2010). Les fonctions de ces protéines dans chacun de ces compartiments ne sont pas élucidées. Il est pourtant fondamental de les analyser si l'on veut déterminer dans leur globalité tous les mécanismes impliqués dans les pathologies associées à des dysfonctionnements ciliaires.



## Les modifications post-traductionnelles : une fonction commune de Bug22p dans différents compartiments cellulaires ?

Lors de mon étude de la localisation de Bug22p dans des cellules de mammifères et chez la paramécie, j'ai mis en évidence un lien entre Bug22p et la régulation de certaines modifications post-traductionnelles. Son inactivation chez la paramécie entraîne une diminution de la polyglycylation des protéines axonémales et une augmentation probable de l'acétylation des microtubules dans le corps cellulaire (résultats non montrés). Dans les cellules de mammifères, sa surexpression entraîne une hausse de l'acétylation des microtubules cytoplasmiques.

Les microtubules axonémaux sont sujets à des modifications post-traductionnelles incluant l'acétylation, la polyglutamylation et la polyglycylation (Westermann and Weber, 2003). Les microtubules cytoplasmiques et du centrosome sont aussi acétylés, cette modification se mettant en place après la polymérisation des microtubules et s'accumulant sur les microtubules les plus stables (Maruta et al., 1986). La fonction exacte de l'acétylation des tubulines est encore peu comprise à l'heure actuelle. La polyglutamylation est préférentiellement détectée aux centrioles et corps basaux dans beaucoup de cellules de mammifères, parfois le long de l'axonème, par exemple chez la paramécie ou *Tetrahymena*. La polyglycylation est aussi présente aux centrioles, aux corps basaux et le long de l'axonème. Les niveaux de polyglutamylation et de polyglycylation des tubulines modulent la liaison aux microtubules des protéines MAPs et des moteurs moléculaires permettant une activité distincte selon les microtubules (Bonnet et al., 2001 ; Reed et al., 2006 ; Verhey and Gaertig, 2007). Ce sont des modifications importantes pour la motilité ciliaire et la stabilité du centrosome (Bobinnec et al., 1998 ; Gagnon et al., 1996 ; Wloga et al., 2010 et Pathak et al., 2011).



Mais les tubulines ne sont pas les seules protéines susceptibles d'être modifiées post-traductionnellement par acétylation ou polyglycylation. Dans le noyau, les histones présentent plusieurs sites d'acétylation au niveau des lysines. La régulation de cette acétylation module leur charge et leur affinité à l'ADN, entraînant des modifications de structure de la chromatine et en conséquence de l'accessibilité des facteurs de transcription. Ces modifications des histones sont donc très importantes pour la régulation de l'expression des gènes. En plus des histones, un certain nombre de substrats nucléaires sont acétylés, notamment, les récepteurs nucléaires, l'estrogène receptor alpha, l'androgène receptor, le Steroidogenic factor1, le glucocorticoïde receptor, le thyroïde hormone receptor (Wang et al., 2010). Il a également été montré que la localisation nucléaire du récepteur HNF-4 (Hepatocyte nuclear factor-4) nécessite son acétylation. En son absence, la protéine reste dans le cytoplasme en raison d'un export actif en dehors du noyau (Soutoglou et al., 2000).

La polyglycylation touche également d'autres molécules que les tubulines. En particulier la protéine du nucléosome NAP1 qui est polyglycylée par la glycylyse TTLL10 (Ikenagi et al., 2008). Chez *Giardia duonalis*, il a été démontré que la protéine 14-3-3g était polyglycylée par TTLL3 et que son niveau de polyglycylation pouvait influencer sa localisation cellulaire (Lalle et al., 2006 ; 2011). Chez *Tetrahymena* enfin, l'homologue de la protéine Hsp70/grp170 localisée dans le lumen du réticulum endoplasmique, est également polyglycylée (Xie et al., 2007).

Une action directe ou indirecte de Bug22p sur les modifications post-traductionnelles de type acétylation ou polyglycylation pourrait donc expliquer sa présence au sein de différents compartiments cellulaires, en particulier dans le noyau, et sa conservation chez les plantes. Il serait donc intéressant de vérifier si la présence de Bug22p influence l'état des modifications post-traductionnelles de protéines autres que les tubulines notamment par inactivation génique de *PtBUG22* chez la paramécie.



## Conclusion perspectives

Les observations que j'ai effectuées au cours de ce travail sur la localisation et la fonction de Bug22p ouvrent de nouveaux champs d'étude, même si de nombreux points restent encore à préciser et si certaines expériences doivent être reproduites. Si la fonction principale de Bug22p est en rapport avec les modifications post-traductionnelles, s'agit-il d'un rôle direct ? Bug22p agit-elle comme cofacteur ? Ou de façon encore plus indirecte au sein de complexes ? La protéine Bug22p existe chez les plantes terrestres et l'on peut supposer qu'elle y ait une fonction similaire. Il serait donc intéressant de caractériser les modifications post-traductionnelles chez les plantes terrestres, car elles sont encore peu explorées, et d'étudier une possible implication de Bug22p dans leur régulation afin d'aborder les raisons de sa conservation chez les végétaux.



# **Bibliographie**



## Bibliographie

Adams GM, Huang B, Piperno G, Luck DJ. Central-pair microtubular complex of *Chlamydomonas* flagella: polypeptide composition as revealed by analysis of mutants. *J. Cell Biol.* 1981;91(1):69-76.

Adolphe C, Hetherington R, Ellis T, Wainwright B. Patched1 functions as a gatekeeper by promoting cell cycle progression. *Cancer Res.* 2006;66(4):2081-2088.

Afzelius BA. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science.* 1976;193(4250):317-319.

Akella JS, Wloga D, Kim J, et al. MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature.* 2010;467(7312):218-222.

Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, et al. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science.* 2003;301(5633):653-657.

Anderson RG, Brenner RM. The formation of basal bodies (centrioles) in the Rhesus monkey oviduct. *J. Cell Biol.* 1971;50(1):10-34.

Arnaiz O, Cain S, Cohen J, Sperling L. ParameciumDB: a community resource that integrates the *Paramecium tetraurelia* genome sequence with genetic data. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Database issue):D439-444.

Arnaiz O, Goût J-F, Bétermier M, et al. Gene expression in a paleopolyploid: a transcriptome resource for the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *BMC Genomics.* 2010;11:547.

Arnaiz O, Malinowska A, Klotz C, et al. Cildb: a knowledgebase for centrosomes and cilia. *Database (Oxford).* 2009;2009:bap022.

Aury J-M, Jaillon O, Duret L, et al. Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Nature.* 2006;444(7116):171-178.

Azimzadeh J, Nacry P, Christodoulidou A, et al. *Arabidopsis* TONNEAU1 proteins are essential for preprophase band formation and interact with centrin. *Plant Cell.* 2008;20(8):2146-2159.

Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N. The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2006;7:125-148.

Baker MA, Hetherington L, Reeves G, Müller J, Aitken RJ. The rat sperm proteome characterized via IPG strip prefractionation and LC-MS/MS identification. *Proteomics.* 2008;8(11):2312-2321.

Banerjee M, Datta M, Majumder P, Mukhopadhyay D, Bhattacharyya NP. Transcription regulation of caspase-1 by R393 of HIPPI and its molecular partner HIP-1. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(3):878-892.



- Bartolini F, Gundersen GG. Generation of noncentrosomal microtubule arrays. *J. Cell. Sci.* 2006;119(Pt 20):4155-4163.
- Bechtold N, Ellis J, Pelletier G: In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C R Acad Sci Paris, Life Sciences* 1993, 316:1194-1199.
- Beisson J, Wright M. Basal body/centriole assembly and continuity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003;15(1):96-104.
- Benzing T, Schermer B. Transition zone proteins and cilia dynamics. *Nat. Genet.* 2011;43(8):723-724.
- Berbari NF, Lewis JS, Bishop GA, Askwith CC, Mykytyn K. Bardet-Biedl syndrome proteins are required for the localization of G protein-coupled receptors to primary cilia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105(11):4242-4246.
- Bergmann C, Fliegauf M, Brüche NO, et al. Loss of nephrocystin-3 function can cause embryonic lethality, Meckel-Gruber-like syndrome, situs inversus, and renal-hepatic-pancreatic dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 2008;82(4):959-970.
- Bertelli E, Regoli M. A morphological study of the primary cilia in the rat pancreatic ductal system: ultrastructural features and variability. *Acta Anat (Basel).* 1994;151(3):194-197.
- Betleja E, Cole DG. Ciliary trafficking: CEP290 guards a gated community. *Curr. Biol.* 2010;20(21):R928-931.
- Blacque OE, Perens EA, Boroevich KA, et al. Functional genomics of the cilium, a sensory organelle. *Curr. Biol.* 2005;15(10):935-941.
- Blair HJ, Tompson S, Liu Y-N, et al. Evc2 is a positive modulator of Hedgehog signalling that interacts with Evc at the cilia membrane and is also found in the nucleus. *BMC Biol.* 2011;9:14.
- Bloodgood RA. Protein targeting to flagella of trypanosomatid protozoa. *Cell Biol. Int.* 2000;24(12):857-862.
- Bobinnec Y, Moudjou M, Fouquet JP, et al. Glutamylation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 1998;39(3):223-232.
- Bonnet C, Boucher D, Lazereg S, et al. Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation. *J. Biol. Chem.* 2001;276(16):12839-12848.
- Boucher D, Larcher JC, Gros F, Denoulet P. Polyglutamylation of tubulin as a progressive regulator of in vitro interactions between the microtubule-associated protein Tau and tubulin. *Biochemistry.* 1994;33(41):12471-12477.
- Brightman MW, Palay SL. The FINE Structure of Ependyma in the Brain of The Rat. *J. Cell Biol.* 1963;19:415-439.



- Broadhead R, Dawe HR, Farr H, et al. Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature*. 2006;440(7081):224-227.
- Callen AM, Adoutte A, Andrew JM, et al. Isolation and characterization of libraries of monoclonal antibodies directed against various forms of tubulin in Paramecium. *Biol. Cell*. 1994;81(2):95-119.
- Cantagrel V, Silhavy JL, Bielas SL, et al. Mutations in the cilia gene ARL13B lead to the classical form of Joubert syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 2008;83(2):170-179.
- Cao Y, Park A, Sun Z. Intraflagellar Transport Proteins Are Essential for Cilia Formation and for Planar Cell Polarity. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2010;21(8):1326 -1333.
- Carvalho-Santos Z, Machado P, Branco P, et al. Stepwise evolution of the centriole-assembly pathway. *Journal of Cell Science*. 2010;123(9):1414 -1426.
- Cavalier-Smith T. Basal body and flagellar development during the vegetative cell cycle and the sexual cycle of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell. Sci.* 1974;16(3):529-556.
- Chan J, Calder GM, Doonan JH, Lloyd CW. EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in Arabidopsis. *Nat. Cell Biol.* 2003;5(11):967-971.
- Chang JP, Mayahara H, Yoloyama M, Ubukata A, Moller PC. An ultrastructural study of morphogenesis of fibrogranular complex and centriole in ductuli efferentes of Chinese hamster. *Tissue Cell*. 1979;11(3):401-412.
- Chapman MJ, Dolan MF, Margulis L. Centrioles and kinetosomes: form, function, and evolution. *Q Rev Biol*. 2000;75(4):409-429.
- Cheung HO-L, Zhang X, Ribeiro A, et al. The kinesin protein Kif7 is a critical regulator of Gli transcription factors in mammalian hedgehog signaling. *Sci Signal*. 2009;2(76):ra29.
- Chiang AP, Beck JS, Yen H-J, et al. Homozygosity mapping with SNP arrays identifies TRIM32, an E3 ubiquitin ligase, as a Bardet-Biedl syndrome gene (BBS11). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(16):6287 -6292.
- Cole DG, Cande WZ, Baskin RJ, et al. Isolation of a sea urchin egg kinesin-related protein using peptide antibodies. *J. Cell. Sci.* 1992;101 ( Pt 2):291-301.
- Cole DG, Chinn SW, Wedaman KP, et al. Novel heterotrimeric kinesin-related protein purified from sea urchin eggs. *Nature*. 1993;366(6452):268-270.
- Cole DG, Diener DR, Himmelblau AL, et al. *Chlamydomonas* kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons. *J. Cell Biol.* 1998;141(4):993-1008.
- Collet J, Spike CA, Lundquist EA, Shaw JE, Herman RK. Analysis of *osm-6*, a gene that affects sensory cilium structure and sensory neuron function in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1998;148(1):187-200.



- Craige B, Tsao C-C, Diener DR, et al. CEP290 tethers flagellar transition zone microtubules to the membrane and regulates flagellar protein content. *J. Cell Biol.* 2010;190(5):927-940.
- Dawe HR, Farr H, Gull K. Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *J. Cell. Sci.* 2007;120(Pt 1):7-15.
- Delaval B, Bright A, Lawson ND, Doxsey S. The cilia protein IFT88 is required for spindle orientation in mitosis. *Nat. Cell Biol.* 2011;13(4):461-468.
- Delous M, Hellman NE, Gaudé H-M, et al. Nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are required for epithelial morphogenesis and associate with PALS1/PATJ and Par6. *Hum. Mol. Genet.* 2009;18(24):4711-4723.
- Dentler WL. Structures linking the tips of ciliary and flagellar microtubules to the membrane. *J. Cell. Sci.* 1980;42:207-220.
- Dentler WL. Attachment of the cap to the central microtubules of Tetrahymena cilia. *J. Cell. Sci.* 1984;66:167-173.
- Dentler WL, Rosenbaum JL. Flagellar elongation and shortening in Chlamydomonas. III. structures attached to the tips of flagellar microtubules and their relationship to the directionality of flagellar microtubule assembly. *J. Cell Biol.* 1977;74(3):747-759.
- Devos D, Dokudovskaya S, Alber F, et al. Components of coated vesicles and nuclear pore complexes share a common molecular architecture. *PLoS Biol.* 2004;2(12):e380.
- Dippell RV. The development of basal bodies in paramecium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1968;61(2):461-468.
- Dirksen ER. Centriole morphogenesis in developing ciliated epithelium of the mouse oviduct. *J. Cell Biol.* 1971;51(1):286-302.
- Dishinger JF, Kee HL, Jenkins PM, et al. Ciliary entry of the kinesin-2 motor KIF17 is regulated by importin-beta2 and RanGTP. *Nat. Cell Biol.* 2010;12(7):703-710.
- Donaldson JC, Dempsey PJ, Reddy S, et al. Crk-associated substrate p130(Cas) interacts with nephrocystin and both proteins localize to cell-cell contacts of polarized epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 2000;256(1):168-178.
- Duan J, Gorovsky MA. Both Carboxy-Terminal Tails of [alpha]- and [beta]-Tubulin Are Essential, but Either One Will Suffice. *Current Biology.* 2002;12(4):313-316.
- Dubruille R, Laurençon A, Vandaele C, et al. Drosophila regulatory factor X is necessary for ciliated sensory neuron differentiation. *Development.* 2002;129(23):5487-5498.
- Dupuis-Williams P, Fleury-Aubusson A, de Loubresse NG, et al. Functional role of epsilon-tubulin in the assembly of the centriolar microtubule scaffold. *J. Cell Biol.* 2002;158(7):1183-1193.
- Dutcher SK, Huang B, Luck DJ. Genetic dissection of the central pair microtubules of the flagella of Chlamydomonas reinhardtii. *J. Cell Biol.* 1984;98(1):229-236.



- Dutcher SK. Elucidation of basal body and centriole functions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Traffic*. 2003;4(7):443-451
- Dute R, Kung C. Ultrastructure of the proximal region of somatic cilia in *Paramecium tetraurelia*. *J. Cell Biol.* 1978;78(2):451-464.
- Eamens A, Wang M-B, Smith NA, Waterhouse PM. RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiol.* 2008;147(2):456-468.
- Eckert R. Bioelectric control of ciliary activity. *Science*. 1972;176(34):473-481.
- Edwards DF, Patton CS, Kennedy JR. Primary ciliary dyskinesia in the dog. *Probl Vet Med.* 1992;4(2):291-319.
- Efimenko E, Bubb K, Mak HY, et al. Analysis of *xbx* genes in *C. elegans*. *Development*. 2005;132(8):1923-1934.
- Fan Z-C, Behal RH, Geimer S, et al. *Chlamydomonas* IFT70/CrDYF-1 Is a Core Component of IFT Particle Complex B and Is Required for Flagellar Assembly. *Mol Biol Cell*. 2010;21(15):2696-2706.
- Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. *Dev. Biol.* 1975;44(2):394-436.
- Fisch C, Dupuis-Williams P. Ultrastructure of cilia and flagella - back to the future! *Biol. Cell*. 2011;103(6):249-270.
- Fischer T, Rodríguez-Navarro S, Pereira G, et al. Yeast centrin Cdc31 is linked to the nuclear mRNA export machinery. *Nat. Cell Biol.* 2004;6(9):840-848.
- Fliegauf M, Horvath J, von Schnakenburg C, et al. Nephrocystin specifically localizes to the transition zone of renal and respiratory cilia and photoreceptor connecting cilia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006;17(9):2424-2433.
- Flock A, Duvall AJ 3rd. The Ultrastructure of the Kinocilium of the Sensory Cells in the Inner Ear and Lateral Line Organs. *J. Cell Biol.* 1965;25:1-8.
- Follit JA, Tuft RA, Fogarty KE, Pazour GJ. The intraflagellar transport protein IFT20 is associated with the Golgi complex and is required for cilia assembly. *Mol. Biol. Cell*. 2006;17(9):3781-3792.
- Gaertig J, Iftode F. Rearrangement of the cytoskeleton and nuclear transfer in *Tetrahymena thermophila* cells fused by electric field. *J. Cell. Sci.* 1989;93 ( Pt 4):691-703.
- Gagnon C, White D, Cosson J, et al. The polyglutamylated lateral chain of alpha-tubulin plays a key role in flagellar motility. *J. Cell. Sci.* 1996;109 ( Pt 6):1545-1553.
- Galvani A, Sperling L. RNA interference by feeding in *Paramecium*. *Trends Genet.* 2002;18(1):11-12.
- Gardiner J, Marc J. Putative microtubule-associated proteins from the *Arabidopsis* genome. *Protoplasma*. 2003;222(1-2):61-74.



- Gardiner J, Marc J. Arabidopsis thaliana, a plant model organism for the neuronal microtubule cytoskeleton? *J. Exp. Bot.* 2011;62(1):89-97.
- Garreau de Loubresse N, Ruiz F, Beisson J, Klotz C. Role of delta-tubulin and the C-tubule in assembly of Paramecium basal bodies. *BMC Cell Biol.* 2001;2:4.
- Geimer S, Melkonian M. The ultrastructure of the Chlamydomonas reinhardtii basal apparatus: identification of an early marker of radial asymmetry inherent in the basal body. *J. Cell. Sci.* 2004;117(Pt 13):2663-2674.
- Gerdes JM, Davis EE, Katsanis N. The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell.* 2009;137(1):32-45.
- Gerdes JM, Katsanis N. Ciliary function and Wnt signal modulation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2008;85:175-195.
- Gilula NB, Satir P. The ciliary necklace. A ciliary membrane specialization. *J. Cell Biol.* 1972;53(2):494-509.
- Ginger ML, Portman N, McKean PG. Swimming with protists: perception, motility and flagellum assembly. *Nat. Rev. Microbiol.* 2008;6(11):838-850.
- Giot L, Bader JS, Brouwer C, et al. A protein interaction map of Drosophila melanogaster. *Science.* 2003;302(5651):1727-1736.
- Gluezn E, Höög JL, Smith AE, et al. Beyond 9+0: noncanonical axoneme structures characterize sensory cilia from protists to humans. *FASEB J.* 2010;24(9):3117-3121.
- Gogondeau D, Hurbain I, Raposo G, et al. Sas-4 proteins are required during basal body duplication in Paramecium. *Mol. Biol. Cell.* 2011;22(7):1035-1044.
- Gogondeau D, Klotz C, Arnaiz O, et al. Functional diversification of centrins and cell morphological complexity. *J. Cell. Sci.* 2008;121(Pt 1):65-74.
- González-Perrett S, Kim K, Ibarra C, et al. Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca<sup>2+</sup>-permeable nonselective cation channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001;98(3):1182-1187.
- Hagiwara H, Shibasaki S, Ohwada N. Ciliogenesis in the human oviduct epithelium during the normal menstrual cycle. *J Electron Microsc (Tokyo).* 1992;41(5):321-329.
- Han Y-G, Spassky N, Romaguera-Ros M, et al. Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 2008;11(3):277-284.
- Hagiwara H, Shibasaki S, Ohwada N. Ciliogenesis in the human oviduct epithelium during the normal menstrual cycle. *J Electron Microsc (Tokyo).* 1992;41(5):321-329.
- Han Y-G, Spassky N, Romaguera-Ros M, et al. Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 2008;11(3):277-284.



- Helliwell C, Waterhouse P. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods*. 2003;30(4):289-295.
- Herold N, Will CL, Wolf E, et al. Conservation of the protein composition and electron microscopy structure of *Drosophila melanogaster* and human spliceosomal complexes. *Mol. Cell Biol*. 2009;29(1):281-301.
- Hildebrandt F, Benzing T, Katsanis N. Ciliopathies. *N. Engl. J. Med*. 2011;364(16):1533-1543.
- Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, et al. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature*. 2003;426(6962):83-87.
- Iftode F, Fleury-Aubusson A. Structural inheritance in *Paramecium*: ultrastructural evidence for basal body and associated rootlets polarity transmission through binary fission. *Biol. Cell*. 2003;95(1):39-51.
- Ikegami K, Horigome D, Mukai M, et al. TTLL10 is a protein polyglycylase that can modify nucleosome assembly protein 1. *FEBS Lett*. 2008;582(7):1129-1134.
- Ikegami K, Setou M. TTLL10 can perform tubulin glycylation when co-expressed with TTLL8. *FEBS Lett*. 2009;583(12):1957-1963.
- Inaba K. Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Mol. Hum. Reprod*. 2011;17(8):524-538.
- Inglis PN, Ou G, Leroux MR, Scholey JM. The sensory cilia of *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*. 2007:1-22.
- Insinna C, Besharse JC. Intraflagellar transport and the sensory outer segment of vertebrate photoreceptors. *Dev. Dyn*. 2008;237(8):1982-1992.
- Ishikawa H, Marshall WF. Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2011;12(4):222-234.
- Jacobs CW, Adams AE, Szaniszlo PJ, Pringle JR. Functions of microtubules in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol*. 1988;107(4):1409-1426.
- Janke C, Rogowski K, van Dijk J. Polyglutamylation: a fine-regulator of protein function? « Protein Modifications: beyond the usual suspects » review series. *EMBO Rep*. 2008;9(7):636-641.
- Jékely G, Arendt D. Evolution of intraflagellar transport from coated vesicles and autogenous origin of the eukaryotic cilium. *Bioessays*. 2006;28(2):191-198.
- Jerka-Dziadosz M, Gogendeau D, Klotz C, et al. Basal body duplication in *Paramecium*: the key role of Bld10 in assembly and stability of the cartwheel. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2010;67(3):161-171.
- Kalnins VI, Chung CK, Turnbull C. Procentrioles in ciliating and ciliated cells of chick trachea. *Zellforsch Mikrosk Anat*. 1972;135(4):461-471.



- Karmous-Benailly H, Martinovic J, Gubler M-C, et al. Antenatal presentation of Bardet-Biedl syndrome may mimic Meckel syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 2005;76(3):493-504.
- Keller LC, Romijn EP, Zamora I, Yates JR 3rd, Marshall WF. Proteomic analysis of isolated chlamydomonas centrioles reveals orthologs of ciliary-disease genes. *Curr. Biol.* 2005;15(12):1090-1098.
- Kitagawa D, Vakonakis I, Olieric N, et al. Structural basis of the 9-fold symmetry of centrioles. *Cell.* 2011;144(3):364-375.
- Klotz C, Ruiz F, Garreau de Loubresse N, et al. Gamma-tubulin and MTOCs in Paramecium. *Protist.* 2003;154(2):193-209.
- Koblenz B, Schoppmeier J, Grunow A, Lechtreck K-F. Centrin deficiency in Chlamydomonas causes defects in basal body replication, segregation and maturation. *J. Cell. Sci.* 2003;116(Pt 13):2635-2646.
- Koenig R. Bardet-Biedl syndrome and Usher syndrome. *Dev Ophthalmol.* 2003;37:126-140.
- Konishi Y, Setou M. Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nat. Neurosci.* 2009;12(5):559-567.
- Kozminski KG, Beech PL, Rosenbaum JL. The Chlamydomonas kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane. *J. Cell Biol.* 1995;131(6 Pt 1):1517-1527.
- Kozminski KG, Johnson KA, Forscher P, Rosenbaum JL. A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993;90(12):5519-5523.
- Laligné C, Klotz C, de Loubresse NG, et al. Bug22p, a conserved centrosomal/ciliary protein also present in higher plants, is required for an effective ciliary stroke in Paramecium. *Eukaryotic Cell.* 2010;9(4):645-655.
- Lalle M, Camerini S, Cecchetti S, et al. Giardia duodenalis 14-3-3 protein is polyglycylated by a tubulin tyrosine ligase-like member and deglycylated by two metalloproteases. *J. Biol. Chem.* 2011;286(6):4471-4484.
- Lalle M, Salzano AM, Crescenzi M, Pozio E. The Giardia duodenalis 14-3-3 protein is post-translationally modified by phosphorylation and polyglycylation of the C-terminal tail. *J. Biol. Chem.* 2006;281(8):5137-5148.
- Lancaster MA, Louie CM, Silhavy JL, et al. Impaired Wnt-beta-catenin signaling disrupts adult renal homeostasis and leads to cystic kidney ciliopathy. *Nat. Med.* 2009;15(9):1046-1054.
- Larcher JC, Boucher D, Lazereg S, Gros F, Denoulet P. Interaction of kinesin motor domains with alpha- and beta-tubulin subunits at a tau-independent binding site. Regulation by polyglutamylation. *J. Biol. Chem.* 1996;271(36):22117-22124.
- Laurençon A, Dubruille R, Efimenko E, et al. Identification of novel regulatory factor X (RFX) target genes by comparative genomics in Drosophila species. *Genome Biol.* 2007;8(9):R195.



- Lee E, Sivan-Loukianova E, Eberl DF, Kernan MJ. An IFT-A protein is required to delimit functionally distinct zones in mechanosensory cilia. *Curr. Biol.* 2008;18(24):1899-1906.
- Leitch CC, Zaghoul NA, Davis EE, et al. Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat. Genet.* 2008;40(4):443-448.
- Lemullois M, Boisvieux-Ulrich E, Laine MC, Chailley B, Sandoz D. Development and functions of the cytoskeleton during ciliogenesis in metazoa. *Biol. Cell.* 1988;63(2):195-208.
- Levilliers N, Fleury A, Hill AM. Monoclonal and polyclonal antibodies detect a new type of post-translational modification of axonemal tubulin. *J. Cell. Sci.* 1995;108 ( Pt 9):3013-3028.
- Liang L, Flury S, Kalck V, Hohn B, Molinier J. CENTRIN2 interacts with the Arabidopsis homolog of the human XPC protein (AtRAD4) and contributes to efficient synthesis-dependent repair of bulky DNA lesions. *Plant Mol. Biol.* 2006;61(1-2):345-356.
- Lindemann CB, Lesich KA. Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible. *J. Cell. Sci.* 2010;123(Pt 4):519-528.
- Liu Q, Tan G, Levenkova N, et al. The proteome of the mouse photoreceptor sensory cilium complex. *Mol. Cell Proteomics.* 2007;6(8):1299-1317.
- Loktev AV, Zhang Q, Beck JS, et al. A BBSome Subunit Links Ciliogenesis, Microtubule Stability, and Acetylation. *Developmental Cell.* 2008;15(6):854-865.
- Machemer H, Ogura A. Ionic conductances of membranes in ciliated and deciliated Paramecium. *J. Physiol. (Lond.).* 1979;296:49-60.
- Majumder P, Chattopadhyay B, Sukanya S, et al. Interaction of HIPPI with putative promoter sequence of caspase-1 in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;353(1):80-85.
- Majumder P, Choudhury A, Banerjee M, Lahiri A, Bhattacharyya NP. Interactions of HIPPI, a molecular partner of Huntingtin interacting protein HIP1, with the specific motif present at the putative promoter sequence of the caspase-1, caspase-8 and caspase-10 genes. *FEBS J.* 2007;274(15):3886-3899.
- Mans DA, Voest EE, Giles RH. All along the watchtower: is the cilium a tumor suppressor organelle? *Biochim. Biophys. Acta.* 2008;1786(2):114-125.
- Marshall WF. Basal bodies platforms for building cilia. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2008;85:1-22.
- Maruta H, Greer K, Rosenbaum JL. The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J. Cell Biol.* 1986;103(2):571-579.
- Mazia D. Centrosomes and mitotic poles. *Exp. Cell Res.* 1984;153(1):1-15.
- McGrath J, Somlo S, Makova S, Tian X, Brueckner M. Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell.* 2003;114(1):61-73.



- Menco BP, Bruch RC, Dau B, Danho W. Ultrastructural localization of olfactory transduction components: the G protein subunit Golf alpha and type III adenylyl cyclase. *Neuron*. 1992;8(3):441-453.
- Meyer E, Garnier O. Non-Mendelian inheritance and homology-dependent effects in ciliates. *Adv. Genet.* 2002;46:305-337.
- Middendorp S, Küntziger T, Abraham Y, et al. A role for centrin 3 in centrosome reproduction. *J. Cell Biol.* 2000;148(3):405-416.
- Molinier J, Ramos C, Fritsch O, Hohn B. CENTRIN2 modulates homologous recombination and nucleotide excision repair in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2004;16(6):1633-1643.
- Mollet G, Silbermann F, Delous M, et al. Characterization of the nephrocystin/nephrocystin-4 complex and subcellular localization of nephrocystin-4 to primary cilia and centrosomes. *Hum. Mol. Genet.* 2005;14(5):645-656.
- Morris RL, English CN, Lou JE, et al. Redistribution of the kinesin-II subunit KAP from cilia to nuclei during the mitotic and ciliogenic cycles in sea urchin embryos. *Dev. Biol.* 2004;274(1):56-69.
- Murayama T, Toh Y, Ohshima Y, Koga M. The dyf-3 gene encodes a novel protein required for sensory cilium formation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* 2005;346(3):677-687.
- Nachury MV, Seeley ES, Jin H. Trafficking to the ciliary membrane: how to get across the periciliary diffusion barrier? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2010;26:59-87.
- Nachury MV, Loktev AV, Zhang Q, et al. A Core Complex of BBS Proteins Cooperates with the GTPase Rab8 to Promote Ciliary Membrane Biogenesis. *Cell*. 2007;129(6):1201-1213.
- Nagarkatti-Gude DR, Jaimez R, Henderson SC, et al. Spag16, an axonemal central apparatus gene, encodes a male germ cell nuclear speckle protein that regulates SPAG16 mRNA expression. *PLoS ONE*. 2011;6(5):e20625.
- Nakamura M, Ehrhardt DW, Hashimoto T. Microtubule and katanin-dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the acentrosomal Arabidopsis cortical array. *Nat. Cell Biol.* 2010;12(11):1064-1070.
- 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.* 2007;17(24):2169-2174.
- Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, et al. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat. Genet.* 2003;33(2):129-137.
- Nishimura DY, Searby CC, Carmi R, et al. Positional cloning of a novel gene on chromosome 16q causing Bardet-Biedl syndrome (BBS2). *Hum. Mol. Genet.* 2001;10(8):865-874.
- Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y, et al. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell*. 1998;95(6):829-837.



- Nonaka S, Shiratori H, Saijoh Y, Hamada H. Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature*. 2002;418(6893):96-99.
- Nonaka S, Yoshida S, Watanabe D, et al. De novo formation of left-right asymmetry by posterior tilt of nodal cilia. *PLoS Biol*. 2005;3(8):e268.
- Ocbina PJR, Anderson KV. Intraflagellar Transport, Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling: Analysis in Mouse Embryonic Fibroblasts. *Dev Dyn*. 2008;237(8):2030-2038.
- Orozco JT, Wedaman KP, Signor D, et al. Movement of motor and cargo along cilia. *Nature*. 1999;398(6729):674.
- Otto EA, Loeys B, Khanna H, et al. Nephrocystin-5, a ciliary IQ domain protein, is mutated in Senior-Loken syndrome and interacts with RPGR and calmodulin. *Nat. Genet*. 2005;37(3):282-288.
- Otto EA, Schermer B, Obara T, et al. Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nat. Genet*. 2003;34(4):413-420.
- Ou G, Blacque OE, Snow JJ, Leroux MR, Scholey JM. Functional coordination of intraflagellar transport motors. *Nature*. 2005;436(7050):583-587.
- Ou G, Koga M, Blacque OE, et al. Sensory Ciliogenesis in *Caenorhabditis elegans*: Assignment of IFT Components into Distinct Modules Based on Transport and Phenotypic Profiles. *Mol. Biol. Cell*. 2007;18(5):1554-1569.
- Pan X, Ou G, Civelekoglu-Scholey G, et al. Mechanism of transport of IFT particles in *C. elegans* cilia by the concerted action of kinesin-II and OSM-3 motors. *J. Cell Biol*. 2006;174(7):1035-1045.
- Paoletti A, Moudjou M, Paintrand M, Salisbury JL, Bornens M. Most of centrin in animal cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. *J. Cell. Sci*. 1996;109 ( Pt 13):3089-3102.
- Parisi MA, Bennett CL, Eckert ML, et al. The NPHP1 gene deletion associated with juvenile nephronophthisis is present in a subset of individuals with Joubert syndrome. *Am. J. Hum. Genet*. 2004;75(1):82-91.
- Pathak N, Austin CA, Drummond IA. Tubulin tyrosine ligase-like genes *tll3* and *tll6* maintain zebrafish cilia structure and motility. *J. Biol. Chem*. 2011;286(13):11685-11695.
- Pazour GJ, Dickert BL, Witman GB. The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly. *J. Cell Biol*. 1999;144(3):473-481.
- Pazour GJ, Agrin N, Leszyk J, Witman GB. Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *J. Cell Biol*. 2005;170(1):103-113.
- Pearson CG, Winey M. Basal body assembly in ciliates: the power of numbers. *Traffic*. 2009;10(5):461-471.



- Perkins LA, Hedgecock EM, Thomson JN, Culotti JG. Mutant sensory cilia in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 1986;117(2):456-487.
- Piel M, Tran PT. Cell shape and cell division in fission yeast. *Curr. Biol.* 2009;19(17):R823-827.
- Piperno G, Mead K. Transport of a novel complex in the cytoplasmic matrix of *Chlamydomonas* flagella. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997;94(9):4457-4462.
- Pugacheva EN, Jablonski SA, Hartman TR, Henske EP, Golemis EA. HEF1-Dependent Aurora A Activation Induces Disassembly of the Primary Cilium. *Cell.* 2007;129(7):1351-1363.
- Redeker V, Levilliers N, Schmitter JM, et al. Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science.* 1994;266(5191):1688-1691.
- Reed NA, Cai D, Blasius TL, et al. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr. Biol.* 2006;16(21):2166-2172.
- Reese TS. Olfactory Cilia in the Frog. *J. Cell Biol.* 1965;25(2):209-230.
- Resendes KK, Rasala BA, Forbes DJ. Centrin 2 localizes to the vertebrate nuclear pore and plays a role in mRNA and protein export. *Mol. Cell. Biol.* 2008;28(5):1755-1769.
- Ridge RW, Uozumi Y, Plazinski J, Hurley UA, Williamson RE. Developmental transitions and dynamics of the cortical ER of *Arabidopsis* cells seen with green fluorescent protein. *Plant Cell Physiol.* 1999;40(12):1253-1261.
- Roitbak T, Ward CJ, Harris PC, et al. A polycystin-1 multiprotein complex is disrupted in polycystic kidney disease cells. *Mol. Biol. Cell.* 2004;15(3):1334-1346.
- Roll-Mecak A, Vale RD. Making more microtubules by severing: a common theme of noncentrosomal microtubule arrays? *J. Cell Biol.* 2006;175(6):849-851.
- Romio L, Fry AM, Winyard PJD, et al. OFD1 is a centrosomal/basal body protein expressed during mesenchymal-epithelial transition in human nephrogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004;15(10):2556-2568.
- Rompolas P, Patel-King RS, King SM. An Outer Arm Dynein Conformational Switch Is Required for Metachronal Synchrony of Motile Cilia in Planaria. *Mol Biol Cell.* 2010;21(21):3669-3679.
- Rosenbaum JL, Witman GB. Intraflagellar transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002;3(11):813-825.
- Ruiz F, Dupuis-Williams P, Klotz C, et al. Genetic evidence for interaction between eta- and beta-tubulins. *Eukaryotic Cell.* 2004;3(1):212-220.
- Ruiz F, Garreau de Loubresse N, Klotz C, Beisson J, Koll F. Centrin deficiency in *Paramecium* affects the geometry of basal-body duplication. *Curr. Biol.* 2005;15(23):2097-2106.
- Sale WS, Satir P. The termination of the central microtubules from the cilia of *Tetrahymena pyriformis*. *Cell Biol. Int. Rep.* 1977;1(1):45-49.



- Salim HMW, Ring KL, Cavalcanti ARO. Patterns of codon usage in two ciliates that reassigned the genetic code: *Tetrahymena thermophila* and *Paramecium tetraurelia*. *Protist*. 2008;159(2):283-298.
- Salisbury JL, Baron AT, Sanders MA. The centrin-based cytoskeleton of *Chlamydomonas reinhardtii*: distribution in interphase and mitotic cells. *J. Cell Biol.* 1988;107(2):635-641.
- Salisbury JL, Suino KM, Busby R, Springett M. Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr. Biol.* 2002;12(15):1287-1292.
- Sarpal R, Todi SV, Sivan-Loukianova E, et al. *Drosophila* KAP interacts with the kinesin II motor subunit KLP64D to assemble chordotonal sensory cilia, but not sperm tails. *Curr. Biol.* 2003;13(19):1687-1696.
- Satir P, Christensen ST. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu. Rev. Physiol.* 2007;69:377-400.
- Saunier S, Calado J, Heilig R, et al. A novel gene that encodes a protein with a putative src homology 3 domain is a candidate gene for familial juvenile nephronophthisis. *Hum. Mol. Genet.* 1997;6(13):2317-2323.
- Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, et al. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*. 2006;311(5761):629-632.
- Sayer JA, Otto EA, O'Toole JF, et al. The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4. *Nat. Genet.* 2006;38(6):674-681.
- Schneider L, Clement CA, Teilmann SC, et al. PDGFR $\alpha$  signaling is regulated through the primary cilium in fibroblasts. *Curr. Biol.* 2005;15(20):1861-1866.
- Scholey JM. Intraflagellar transport. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2003;19:423-443.
- Scholey JM. Intraflagellar transport motors in cilia: moving along the cell's antenna. *J. Cell Biol.* 2008;180(1):23-29.
- Scholey JM, Anderson KV. Intraflagellar transport and cilium-based signaling. *Cell*. 2006;125(3):439-442.
- Sedjaj F, Acquaviva C, Chevrier V, et al. Control of ciliogenesis by FOR20, a novel centrosome and pericentriolar satellite protein. *J. Cell. Sci.* 2010;123(Pt 14):2391-2401.
- Sedmak T, Wolfrum U. Intraflagellar transport molecules in ciliary and nonciliary cells of the retina. *J. Cell Biol.* 2010;189(1):171-186.
- Sessions A, Burke E, Presting G, et al. A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *Plant Cell*. 2002;14(12):2985-2994.
- Shang Y, Li B, Gorovsky MA. *Tetrahymena thermophila* contains a conventional  $\gamma$ -tubulin that is differentially required for the maintenance of different microtubule-organizing centers. *The Journal of Cell Biology*. 2002;158(7):1195-1206.



- Sharma N, Bryant J, Wloga D, et al. Katanin regulates dynamics of microtubules and biogenesis of motile cilia. *J. Cell Biol.* 2007;178(6):1065-1079.
- Shaw SL, Kamyar R, Ehrhardt DW. Sustained microtubule treadmilling in Arabidopsis cortical arrays. *Science.* 2003;300(5626):1715-1718.
- Shida T, Cueva JG, Xu Z, Goodman MB, Nachury MV. The major alpha-tubulin K40 acetyltransferase alphaTAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;107(50):21517-21522.
- Si Y, Okuno M. The sliding of the fibrous sheath through the axoneme proximally together with microtubule extrusion. *Exp. Cell Res.* 1993;208(1):170-174.
- Signor D, Wedaman KP, Orozco JT, et al. Role of a class DHC1b dynein in retrograde transport of IFT motors and IFT raft particles along cilia, but not dendrites, in chemosensory neurons of living *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 1999;147(3):519-530.
- Skouri F, Cohen J. Genetic approach to regulated exocytosis using functional complementation in *Paramecium*: identification of the ND7 gene required for membrane fusion. *Mol. Biol. Cell.* 1997;8(6):1063-1071.
- Smahel M, Smahelová J, Tejklová P, Tachezy R, Jelínek F. Analysis of tumor progression by transcriptional profiling of mouse MK16 cell lines transformed with human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes and activated H-ras. *Oncol. Rep.* 2005;14(6):1665-1674.
- Smertenko A, Blume Y, Viklický V, Opatrný Z, Dráber P. Post-translational modifications and multiple tubulin isoforms in *Nicotiana tabacum* L. cells. *Planta.* 1997;201(3):349-358.
- Snow JJ, Ou G, Gunnarson AL, et al. Two anterograde intraflagellar transport motors cooperate to build sensory cilia on *C. elegans* neurons. *Nat. Cell Biol.* 2004;6(11):1109-1113.
- Sonneborn TM. [Ciliate morphogenesis and its bearing on general cellular morphogenesis]. *Tsitologia.* 1974;16(9):1063-1088.
- Sorokin SP. Centriole formation and ciliogenesis. *Aspen Emphysema Conf.* 1968;11:213-216.
- Sorokin SP. Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *J. Cell. Sci.* 1968;3(2):207-230.
- Sotelo JR, Trujillo-Cenoz O. Electron microscope study on the development of ciliary components of the neural epithelium of the chick embryo. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1958;49(1):1-12.
- Soutoglou E, Katrakili N, Talianidis I. Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Mol. Cell.* 2000;5(4):745-751.
- Steinman RM. An electron microscopic study of ciliogenesis in developing epidermis and trachea in the embryo of *Xenopus laevis*. *Am. J. Anat.* 1968;122(1):19-55.



- Stemm-Wolf AJ, Morgan G, Giddings TH Jr, et al. Basal body duplication and maintenance require one member of the Tetrahymena thermophila centrin gene family. *Mol. Biol. Cell.* 2005;16(8):3606-3619.
- Stewart M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007;8(3):195-208.
- Stolc V, Samanta MP, Tongprasit W, Marshall WF. Genome-wide transcriptional analysis of flagellar regeneration in *Chlamydomonas reinhardtii* identifies orthologs of ciliary disease genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005;102(10):3703-3707.
- Stoppin V, Vantard M, Schmit AC, Lambert AM. Isolated Plant Nuclei Nucleate Microtubule Assembly: The Nuclear Surface in Higher Plants Has Centrosome-like Activity. *Plant Cell.* 1994;6(8):1099-1106.
- Stubbs JL, Oishi I, Izpisua Belmonte JC, Kintner C. The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Nat. Genet.* 2008;40(12):1454-1460.
- Suetsugu N, Yamada N, Kagawa T, et al. Two kinesin-like proteins mediate actin-based chloroplast movement in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;107(19):8860-8865.
- Sun Z, Amsterdam A, Pazour GJ, et al. A genetic screen in zebrafish identifies cilia genes as a principal cause of cystic kidney. *Development.* 2004;131(16):4085-4093.
- Suryavanshi S, Eddé B, Fox LA, et al. Tubulin glutamylation regulates ciliary motility by altering inner dynein arm activity. *Curr. Biol.* 2010;20(5):435-440.
- Swoboda P, Adler HT, Thomas JH. The RFX-type transcription factor DAF-19 regulates sensory neuron cilium formation in *C. elegans*. *Mol. Cell.* 2000;5(3):411-421.
- Tabish M, Siddiqui ZK, Nishikawa K, Siddiqui SS. Exclusive expression of *C. elegans* *osm-3* kinesin gene in chemosensory neurons open to the external environment. *J. Mol. Biol.* 1995;247(3):377-389.
- Takahashi M, Lin Y-M, Nakamura Y, Furukawa Y. Isolation and characterization of a novel gene CLUAP1 whose expression is frequently upregulated in colon cancer. *Oncogene.* 2004;23(57):9289-9294.
- Tanaka H, Shigenobu K. Pathophysiological significance of T-type Ca<sup>2+</sup> channels: T-type Ca<sup>2+</sup> channels and drug development. *J. Pharmacol. Sci.* 2005;99(3):214-220.
- Tayeh MK, Yen H-J, Beck JS, et al. Genetic interaction between Bardet-Biedl syndrome genes and implications for limb patterning. *Human Molecular Genetics.* 2008;17(13):1956-1967.
- Thisse B, Heyer V, Lux A, et al. Spatial and temporal expression of the zebrafish genome by large-scale in situ hybridization screening. *Methods Cell Biol.* 2004;77:505-519.
- Thomas J, Morlé L, Soulavie F, et al. Transcriptional control of genes involved in ciliogenesis: a first step in making cilia. *Biol. Cell.* 2010;102(9):499-513.



- Tsao C-C, Gorovsky MA. Tetrahymena IFT122A is not essential for cilia assembly but plays a role in returning IFT proteins from the ciliary tip to the cell body. *Journal of Cell Science*. 2008;121(4):428-436.
- Verhey KJ, Gaertig J. The tubulin code. *Cell Cycle*. 2007;6(17):2152-2160.
- Vincensini L, Blisnick T, Bastin P. 1001 model organisms to study cilia and flagella. *Biol. Cell*. 2011;103(3):109-130.
- Wang C, Tian L, Popov VM, Pestell RG. Acetylation and nuclear receptor action. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2011;123(3-5):91-100.
- Ward CJ, Hogan MC, Rossetti S, et al. The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat. Genet.* 2002;30(3):259-269.
- Ward CJ, Yuan D, Masyuk TV, et al. Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. *Hum. Mol. Genet.* 2003;12(20):2703-2710.
- Wasteney GO. Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *J. Cell. Sci.* 2002;115(Pt 7):1345-1354.
- Wehland J, Weber K. Turnover of the carboxy-terminal tyrosine of alpha-tubulin and means of reaching elevated levels of detyrosination in living cells. *J. Cell. Sci.* 1987;88 ( Pt 2):185-203.
- Wessels MW, den Hollander NS, Willems PJ. Mild fetal cerebral ventriculomegaly as a prenatal sonographic marker for Kartagener syndrome. *Prenat. Diagn.* 2003;23(3):239-242.
- Westermann S, Weber K. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003;4(12):938-947.
- Williams CL, Li C, Kida K, et al. MKS and NPHP modules cooperate to establish basal body/transition zone membrane associations and ciliary gate function during ciliogenesis. *J. Cell Biol.* 2011;192(6):1023-1041.
- Wloga D, Dave D, Meagley J, et al. Hyperglutamylation of Tubulin Can either Stabilize or Destabilize Microtubules in the Same Cell. *Eukaryot Cell*. 2010;9(1):184-193.
- Wloga D, Gaertig J. Post-translational modifications of microtubules. *J. Cell. Sci.* 2010;123(Pt 20):3447-3455.
- Xie R, Clark KM, Gorovsky MA. Endoplasmic reticulum retention signal-dependent glycylation of the Hsp70/Grp170-related Pgp1p in Tetrahymena. *Eukaryotic Cell*. 2007;6(3):388-397.
- Xiong H, Chen Y, Yi Y, et al. A novel gene encoding a TIG multiple domain protein is a positional candidate for autosomal recessive polycystic kidney disease. *Genomics*. 2002;80(1):96-104.
- Yen H-J, Tayeh MK, Mullins RF, et al. Bardet-Biedl syndrome genes are important in retrograde intracellular trafficking and Kupffer's vesicle cilia function. *Human Molecular Genetics*. 2006;15(5):667-677.



Yoder BK, Hou X, Guay-Woodford LM. The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002;13(10):2508-2516.

Yu X, Ng CP, Habacher H, Roy S. Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. *Nat. Genet.* 2008;40(12):1445-1453.

Zachar Z, Chou TB, Kramer J, Mims IP, Bingham PM. Analysis of autoregulation at the level of pre-mRNA splicing of the suppressor-of-white-apricot gene in *Drosophila*. *Genetics.* 1994;137(1):139-150.

Zhang Z, Kostetskii I, Moss SB, et al. Haploinsufficiency for the murine orthologue of *Chlamydomonas* PF20 disrupts spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101(35):12946-12951.

Zhang Z, Kostetskii I, Tang W, et al. Deficiency of SPAG16L causes male infertility associated with impaired sperm motility. *Biol. Reprod.* 2006;74(4):751-759.

Zhang Z, Sapiro R, Kapfhamer D, et al. A sperm-associated WD repeat protein orthologous to *Chlamydomonas* PF20 associates with Spag6, the mammalian orthologue of *Chlamydomonas* PF16. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22(22):7993-8004.

Zheng H, Kunst L, Hawes C, Moore I. A GFP-based assay reveals a role for RHD3 in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Plant J.* 2004;37(3):398-414.

Zhou, Z., Licklider, L.J., Gygi, S.P., and Reed, R. 2002. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* 419: 182–185.

