



Caractérisation fonctionnelle de deux nouveaux gènes ciliaires pendant le développement des vertébrés

Julie Jerber

► To cite this version:

Julie Jerber. Caractérisation fonctionnelle de deux nouveaux gènes ciliaires pendant le développement des vertébrés. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10049 . tel-00995319

HAL Id: tel-00995319

<https://theses.hal.science/tel-00995319>

Submitted on 23 May 2014

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.

N° d'ordre 49 - 2014

Année 2014

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE BMIC

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 19 mars 2014

par

Julie JERBER

TITRE :

**Caractérisation fonctionnelle de deux nouveaux gènes
ciliaires pendant le développement des vertébrés**

Membres du jury :

M. VERMOT Julien	Rapporteur
M. BASTIN Philippe	Rapporteur
Mme VESQUE Christine	Examinatrice
Mme RUGGIERO Florence	Présidente du jury
Mme DURAND Bénédicte	Directrice de thèse
Mme THOMAS Joëlle	Co-directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie
Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et
Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Directeur : M. N. SIAUVE

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : Mme S. FLECK

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. C. VITON

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de ce jury qui ont accepté d'évaluer mes travaux de recherche. Merci à M. Philippe Bastin, M. Julien Vermot, Mme Christine Vesque et Mme Florence Ruggiero pour le temps consacré à la lecture de ce manuscrit.

Je remercie très chaleureusement Madame Sylvie Pomaret, d'avoir créé le prix Line Pomaret-Delalande grâce auquel j'ai pu réaliser ce doctorat. Merci pour votre soutien.

J'adresse un grand MERCI à ma directrice de thèse, Bénédicte Durand, sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Merci de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse et de m'avoir fait confiance à moi l'expatriée de Paris. Merci pour ta passion débordante de la recherche maintenant mienne, pour ton savoir, ta rigueur, ton aide et ton soutien. Merci pour ces années si riches passées en ta compagnie.

Je remercie très sincèrement Joëlle pour son attention de tout instant, ses conseils avisés et son écoute. Merci pour ta disponibilité, ta franchise et tes remarques qui m'ont permis d'atteindre les objectifs nécessaires à la réalisation de ce doctorat. Merci à toi, la reine de la « Bio Mol » pour tout ce que tu m'as enseigné dans l'art de cette discipline. Je te remercie également pour ton soutien, ton aide précieuse et pour tous ces bons moments.

Merci à Dominique, partenaire de choc avec les petits poissons. Merci d'avoir partagé avec moi toutes ces années d'expérience acquises sur ce modèle. Merci pour ton aide et ta disponibilité au jour le jour qui m'ont énormément simplifié les choses. Merci d'avoir réalisé avec moi toutes ces expériences un peu farfelues qui souvent, nous ont fait venir au labo à des moments où notre corps aurait préféré dormir ! Merci pour ces discussions passionnées et pas toujours très scientifique et bien évidemment merci pour tes recettes de pain d'épice et de petits gâteaux aux noix !

Je tiens à remercier du fond du cœur, Elisabeth, pour tous les moments partagés. Merci pour ta présence au quotidien, pour ta patience, ton aide, tes astuces et surtout ta gentillesse.

Je souhaite remercier spécialement Jennifer pour son amitié et ses conseils avisés.

Merci aux membres de l'équipe, Marie, Amélie, Jean-Luc et Laurette, pour leur bonne humeur et leur convivialité. Je tiens à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler avec vous. Merci également à Jérôme et à la douce mélodie associée à son jeu favori qu'est le casse brique et qui m'ont bien détendu pendant ces moments passé à squatter dans ton bureau lors de la rédaction de ce manuscrit.

Merci à Christophe, Yves, Denis et Claire pour leur aide dans le développement des techniques de microscopie nécessaires aux défis lancés par l'analyse des cils chez le poisson zèbre. Merci tout particulièrement à Yves et Christophe pour leur passion et leur enthousiasme.

Merci à Christine pour son aide précieuse lors de mon initiation au modèle du poisson zèbre et tout au long de cette thèse. Merci pour tes conseils avisés et ces conversations toujours très enrichissantes. Merci également à Sylvie Schneider-Maunoury pour l'accueil dans son laboratoire ainsi qu'à toute son équipe avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à échanger.

Merci aux membres du plateau technique du PRECI, Laure, Robert et Bernard qui ont su prodigué les soins nécessaires au bien être des petits poissons et merci bien évidemment à tous les poissons sacrifiés sur l'autel de la science !

Ce travail n'aurait pu aboutir sans le soutien de mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont laissé libre de mes choix. Merci pour leur soutien inconditionnel, leur encouragement et leur amour. Merci également à mon frère et mes sœurs pour tous ces moments de bonheur.

Résumé

Les cils et les flagelles sont des organites cellulaires très conservés des protozoaires aux mammifères où ils assurent des fonctions essentielles au cours du développement et dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. Chez l'Homme, les défauts d'assemblage des cils et des flagelles conduisent à de multiples pathologies connues sous le terme de ciliopathies. Afin de comprendre comment se forment et fonctionnent les cils, j'ai analysé la fonction, chez les vertébrés, de deux nouveaux gènes potentiellement impliqués dans la ciliogenèse et identifiés comme cible des facteurs de transcription de ciliogenèse RFX. Dans un premier temps je me suis focalisée sur le gène *CCDC151*, évolutivement conservé dans les espèces possédant des cils motiles. J'ai pu montrer que *CCDC151* est associée aux cils motiles dont la formation est dépendante du transport intraflagellaire et que cette protéine est nécessaire à la perception sensorielle chez la drosophile. L'absence de *Ccdc151* chez le poisson zèbre conduit à des défauts d'asymétrie droite gauche et à des kystes rénaux, deux phénotypes résultants de défauts de battement des cils motiles. Plus précisément, *CCDC151* est nécessaire à la motilité des cils en contrôlant l'assemblage des bras de dynéine. Par ailleurs, j'ai également montré que cette protéine possède des fonctions cellulaires additionnelles puisqu'elle est requise pour l'orientation correcte des plans de division cellulaire et qu'elle est impliquée dans la régulation de la taille du cil primaire chez les mammifères.

Je me suis ensuite intéressée au gène *LRRC48*, orthologue de FAP134 ou DRC3 chez *Chlamydomonas*. *LRRC48* est également conservée dans les espèces possédant des cils motiles et les résultats obtenus montrent que cette protéine est nécessaire à la motilité des flagelles de spermatozoïdes et des cils des neurones sensoriels en 9+0 chez la drosophile. De plus *LRRC48* est indispensable au développement des vertébrés puisque son absence chez le poisson zèbre conduit à l'hydrocéphalie, des œdèmes cardiaques et des kystes rénaux et des défauts de motilité des cils. *LRRC48* est également essentielle au fonctionnement de l'oreille chez les animaux puisque cette protéine est impliquée dans la formation des kinocils et la biogenèse des otolithes chez le poisson zèbre et dans la réponse auditive chez la drosophile.

En conclusion, ces travaux montrent que la protéine *CCDC151* qui est impliquée dans le transport dépendant de l'IFT des bras de dynéine chez les animaux et *LRRC48* qui joue un rôle essentiel dans la motilité des cils, sont deux nouveaux acteurs de la ciliogenèse potentiellement impliqués dans les pathologies ciliaires chez l'Homme. Plus globalement, ce travail aura des retombées en recherche médicale puisqu'il apporte de nouvelles connaissances pour la compréhension et le diagnostic des ciliopathies.

Summary

Cilia are highly conserved structures found from protozoa to mammals where they play essential physiological and developmental functions and cilia dysfunction leads to various syndromes in humans known as ciliopathies. To understand cilia formation and function, I performed functional analysis of two new target genes of the RFX ciliogenic transcription factors that are potentially implicated in ciliogenesis. First, I focused on CCDC151 that is evolutionary conserved in motile ciliated species. In *Drosophila*, I showed that CCDC151 is associated with motile cilia which formation is IFT dependent and required for geotaxis behavior of adult flies. In zebrafish, depletion of Ccdc151 leads to left-right asymmetry defects and kidney cysts, two phenotypes resulting from impaired ciliary beating. More precisely CCDC151 is essential for the assembly of outer and inner dynein arms in motile cilia showing that Ccdc151 is a novel player in the control of IFT-dependent dynein arm assembly in animals. However, I also showed that CCDC151 is also implicated in other cellular functions in vertebrates as it is involved in proper orientation of cell divisions and implicated in the regulation of primary cilium length in mammalian cells.

In a second part, I studied LRRC48, the orthologue of FAP1134 or DRC3 in *Chlamydomonas*. LRRC48 is also conserved in species with motile cilia and I showed that this protein is essential for motility of flagellar spermatozooids and for motility of the 9+0 sensory cilia in drosophila. In zebrafish, morpholinos induced depletion of this protein leads to hydrocephaly, pericardial oedema, kidney cysts, inner ear abnormalities and cilia motility defects. Moreover, I found that this protein is necessary for correct ear function and/or morphogenesis in animals. More precisely this protein is required for kinocilia formation and otoliths biogenesis in zebrafish and in the auditory response in drosophila.

In conclusion, this work show that CCDC151, which is involved in the control of IFT-dependent dynein arm assembly in animals and LRRC48, which is an important player of cilia motility, are both new candidate genes potentially implicated in human ciliary diseases. Overall, this work will have important spin-offs in medical research by bringing new understandings of human diseases associated to cilia dysfunction.

Table des matières

Remerciements	3
Résumé.....	5
Summary	6
Table des matières.....	7
Abréviations.....	9
Liste des tableaux et figures	11
Introduction	13
I Les cils : aspects structuraux	14
1. Cils – flagelles : histoire et définition.....	14
2. Evolution des cils et conservation des composants.....	14
3. Corps basaux et centrioles	15
3.1 - Structure.....	15
3.2 - Appendices	16
3.2.1 - La racine ciliaire	16
3.2.2 - Le pied basal	17
3.2.3 - Les fibres de transition.....	18
3.3 - Fonctions.....	19
4. Le compartiment ciliaire.....	20
4.1 - La zone de transition.....	20
4.2 - La membrane ciliaire	21
4.3 - L'axonème.....	21
5. Composants de l'axonème associés à la motilité	22
5.1 - Les différents composants.....	23
5.1.1 - La paire centrale.....	23
5.1.2 - Les fibres radiales.....	23
5.1.3 - Les dynéines axonémales.....	24
5.1.4 - Les sites d'attachement des bras de dynéine.....	25
5.1.5 - Le complexe de régulation des dynéines.....	26
5.1.6 - La liaison entre les bras de dynéine externes et internes.....	27
5.2 - Assemblage.....	28
II La ciliogenèse	30
1. La formation du cil primaire	30
2. Le transport intraflagellaire	31
2.1 - Découverte et conservation	31
2.2 - Le transport intraflagellaire : les moteurs.....	32
2.3 - Le transport intraflagellaire : les particules	32
2.4 - Le transport intraflagellaire : les adaptateurs	33
2.5 - La régulation du transport intraflagellaire	34
2.6 - Autres fonctions	36
3. Régulation de la taille du cil.....	37
4. Contrôle transcriptionnel de la ciliogenèse	40
4.1 - Les facteurs de transcription FOXJ1 et les cils motiles	40
4.2 - Les facteurs de transcription RFX.....	41
III Fonctions ciliaires chez les vertébrés.....	43
1. Les cils motiles	43
1.1 - Les cils motiles du nœud embryonnaire	44
1.2 - La détection du flux dans le nœud embryonnaire.....	45
2. Les cils primaires.....	47

2.1 - Les cils primaires des tubules rénaux	47
3. Les cils modifiés : quelques exemples	49
3.1 - Le cil primaire des photorécepteurs de la rétine.....	49
3.2 - Cil et audition	50
1.1.1 - Fonctionnement chez les mammifères.....	50
3.2.1 - Fonctionnement chez les vertébrés inférieurs	51
3.2.2 - Fonctionnement chez la drosophile.....	52
4. Cils et voies de signalisation	53
4.1 - La voie PDGFR α	53
4.2 - La voie Hedgehog et le cil primaire	54
4.3 - La voie de signalisation Wnt et le cil primaire.....	56
4.3.1 - Le cil primaire et la voie Wnt canonique	56
4.3.1 - La voie Wnt non canonique	58
4.3.2 - Le cil primaire et la voie Wnt non canonique	60
4.3.3 - La voie Wnt non canonique et le cil chez le poisson zèbre	61
4.3.4 - Les épithéliums multiciliés et la voie Wnt non canonique	62
4.4 - Conclusion	64
5. Les ciliopathies.....	64
5.1 - Les dyskinésies Ciliaires Primitives	65
5.2 - Les ciliopathies dites « non motiles »	65
Objectifs de ce travail.....	68
1. Contexte	69
2. Projet	70
Résultats.....	72
1. Caractérisation fonctionnelle du gène <i>CCDC151</i>	73
1.1 - Contexte - résumé.....	73
1.2 - ARTICLE.....	74
2. Caractérisation fonctionnelle du gène <i>Lrrc48</i>	75
2.1 - Contexte.....	75
2.2 - Introduction	75
2.3 - Résultats	77
2.4 - Discussion	82
2.5 - Matériel et méthodes	87
Discussion	91
1. Le gène <i>CCDC151</i>	92
1.1 - Interaction fonctionnelle entre les protéines de l'IFT et CCDC151	93
1.2 - Ccdc151 et la régulation de la taille des cils.	95
2. Le gène <i>LRRC48</i>	96
2.1 - Localisation dans les cellules dépourvues de cils motiles	96
2.2 - Interaction entre LRRC48 et GAS8.....	97
2.3 - Un rôle dans le cycle cellulaire	98
Conclusion générale	100
Annexe.....	103
Bibliographie	104

Abréviations

APC :	Cellule Présentatrice d'Antigène
ATP :	Adénosine Tri Phosphate
BBS :	Bardet-Biedl Syndrome
BDE :	Bras de Dynéine Externe
BDI :	Bras de Dynéine Interne
CE :	Convergence Extension
<i>C.elegans</i> :	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CSF :	Fluide cérébrospinal
DNCHC2 :	Dynéine Cytoplasmique 2
Dpcd :	Deleted in primary ciliary dyskinesia
dpf :	days post fertilization
Dsh :	Dishevelled
FoxJ1 :	Forkhead box protein J1
Fz :	Frizzled
GFP :	Green Fluorescent Protein
GPCR :	G-Protein Coupled Receptor
HC :	Chaîne Lourde
Hh :	Hedgehog
hpf :	hours post fertilization
Hz :	Hertz
IC :	Chaîne intermédiaire
IFT :	Transport Intraflagellaire
JBTS :	Joubert syndrome
LC :	Chaîne légère
LCA :	Leber Congenital Amaurosis
MKS :	Meckel Gruber Syndrome
MTOC :	Microtubule Organizing Center
N-DRC :	Complexe de régulation des dynéines
NPHP :	Néphronophthise
NVP :	Nodal Vesicular Parcels
ODA-DC :	Outer Dynein Arm – Docking Complex
OID :	Outer – Inner Dynein linker

OJ :	Organe de Johnston
PC1 :	Polycystine 1
PC2 :	Polycystine 2
PCD :	Dyskinésie Ciliaire Primitive
PCP :	Polarité Planaire Cellulaire
PCM :	Matrice Peri-Centriolaire
PDGFR :	Platelet-Derived growth Factor Receptor
Pk :	Prickle
PKD :	Polykystose rénale
RFX :	Regulatory Factor X
RP :	Rétinite Pigmentaire
SHH :	Sonic Hedgehog
SE :	Segment Externe
SI :	Segment Interne
SLSN :	Senior-Loken syndrome
SMC :	Structural Maintenance of Chromosomes
SMO :	Smoothed
SNP :	Système Nerveux Périphérique
SUFU :	SUppressor of FUsed
TCR :	T-Cell Receptor
Wnt :	Wingless

Liste des tableaux et figures

- Figure 1 :** Exemples de cellules ciliées ou flagellées et schéma illustrant la différence de mouvement entre les cils et les flagelles.
- Figure 2 :** Représentation schématique d'un cil avec son corps basal et les appendices associés.
- Figure 3 :** Représentation schématique de la duplication centriolaire pendant le cycle cellulaire.
- Figure 4 :** Ultra structure du corps basal, de ses appendices et de la zone de transition.
- Figure 5 :** Modèle mécanistique du battement ciliaire.
- Figure 6 :** Organisation de la paire centrale et reconstruction 3D des fibres radiaires chez *Chlamydomonas*.
- Figure 7 :** Les bras de dynéine externes.
- Figure 8 :** Représentation schématique des sites d'attachement des bras de dynéine externes chez *Chlamydomonas*.
- Figure 9 :** Localisation des sous unités du N-DRC et modèle d'interaction.
- Figure 10 :** Les deux voies de formation du cil primaire.
- Figure 11 :** Localisation subcellulaire des protéines de l'IFT.
- Figure 12 :** Le transport intraflagellaire.
- Figure 13 :** Représentation schématique de la détermination de l'asymétrie droite-gauche.
- Figure 14 :** Comparaison des organes nécessaires à l'asymétrie chez les vertébrés.
- Figure 15 :** Deux modèles expliquant la cassure asymétrique via le flux nodal au niveau du nœud embryonnaire chez la souris. Vue transverse, côté ventral vers le haut.
- Figure 16 :** Cils des tubules rénaux et polycystines.
- Figure 17 :** Implication de la voie Wnt/PCP dans les polykystoses rénales.
- Figure 18 :** Rétine et cil connecteur.
- Figure 19 :** Structure et développement des stéréocils chez les mammifères.
- Figure 20 :** Modèle de nucléation des otolithes chez le poisson zèbre.
- Figure 21 :** L'organe de Johnston nécessaire à l'audition chez la drosophile.
- Figure 22 :** La voie de signalisation Hedgehog chez les vertébrés.
- Figure 23 :** La voie de signalisation Wnt canonique/ β -caténine.
- Figure 24 :** L'absence de cil affecte différemment la voie Wnt/ β -caténine en fonction du stade de développement observé.
- Figure 25 :** Composants de la voie Wnt/PCP dans les cellules épithéliales et mésenchymateuses.
- Figure 26 :** Phénotypes associés à des défauts de polarité planaire dans les mutants de la ciliogenèse.

- Figure 27 :** La protéine IFT88 contrôle l'orientation des divisions cellulaires indépendamment de sa fonction ciliaire.
- Figure 28 :** La signalisation PCP est nécessaire mais pas suffisante pour la polarisation du cil en réponse aux forces hydrodynamiques.
- Figure 29 :** Figure 29: Interaction fonctionnelle entre les protéines Ccdc151 et Ift57 ou Ift88.
- Figure 30 :** Localisation de la protéine LRRC48 dans les cellules de rein de souris IMCD3.
- Figure 31 :** Localisation de la protéine LRRC48 au niveau du centrosome dans les cellules IMCD3.
- Tableau 1 :** Gènes mutés dans les dyskinésies ciliaires primitives chez l'Homme.
- Tableau 2 :** Phénotypes associés aux différentes ciliopathies non motiles.

Introduction

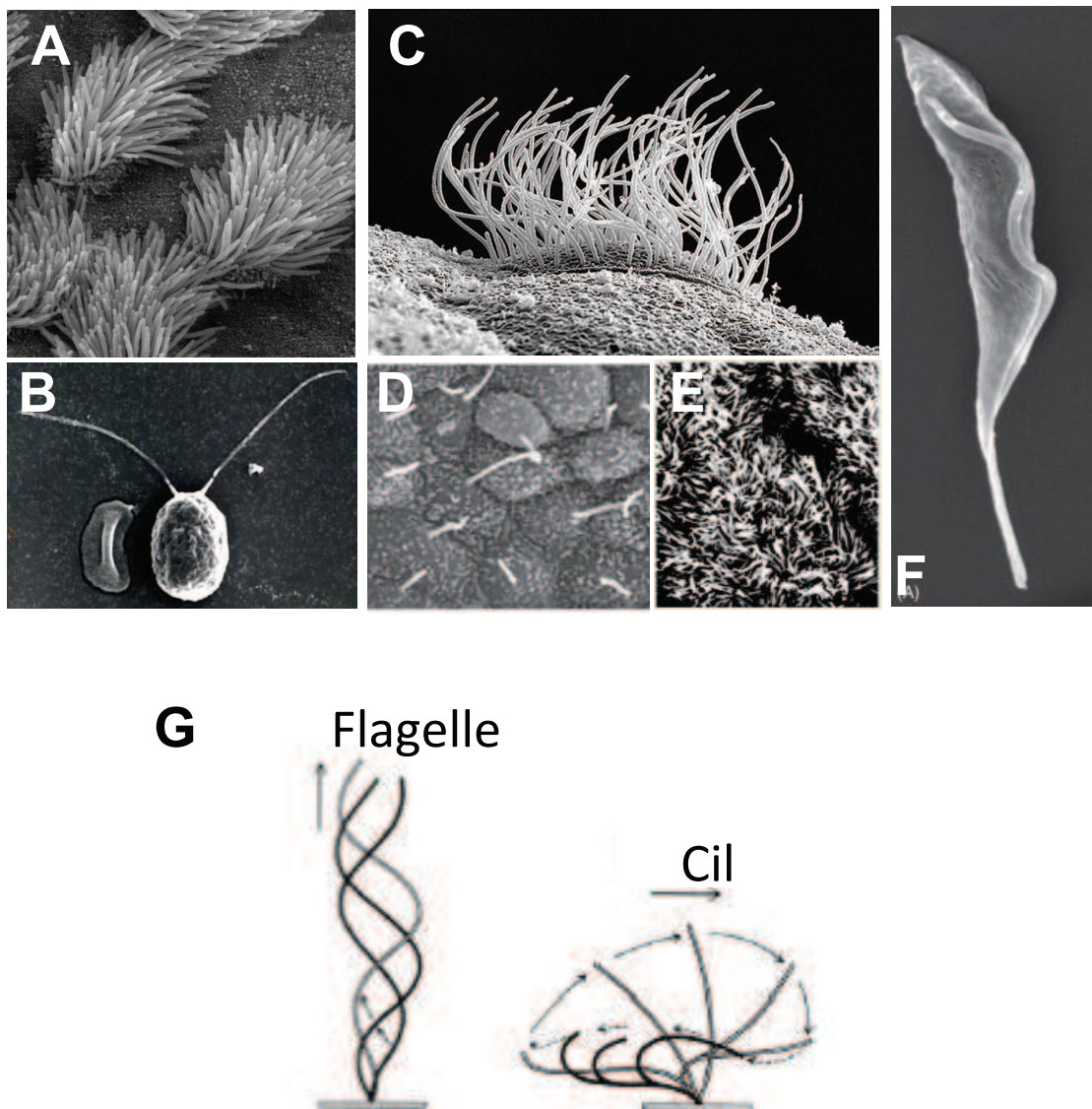


Figure 1 : Exemples de cellules ciliées ou flagellées et schéma illustrant la différence de mouvement entre les cils et les flagelles.

A- Epithélium de la trachée humaine composé de cellules multiciliées (<http://remf.dartmouth.edu/images/mammalianLungSEM/source/9.html>). **B-** *Chlamydomonas reinhardtii* une algue verte biflagellée (<http://www.uwalax.edu/biology/faculty/Howard/research.htm>) **C-** Cellule multiciliée de peau de xénope (Abitua & Wallingford). **D-** Cellules mono ciliées de l'épithélium rénal de l'Homme (Ishikawa & Marshall et al., 2011). **E-** Cellules multi ciliées tapissant l'oviducte chez la femme (Marshall et al., 2006). **F-** Trypanosome possédant un seul flagelle attaché au corps cellulaire (Julkowska et al., 2009). **G-** Les flagelles battent indépendamment et forment un mouvement ondulatoire depuis la base jusqu'à l'extrémité. Le mouvement des cils se caractérise par un mouvement rapide dans un état droit et raide suivi d'un retour à la position initiale dans un état courbé. Adapté de « How cilia move » Satir, 1974.

I Les cils : aspects structuraux

1. Cils – flagelles : histoire et définition

Les cils et les flagelles sont des organelles dont la structure est très conservée chez les espèces eucaryotes. Ils sont présents à la surface des cellules et sont composés d'un squelette de microtubule, l'axonème, nucléé à partir du centriole, lui même ancré au niveau de la membrane plasmique (on parle alors de corps basal). Le naturaliste Anthony Van Leeuwenhoek fut le premier à décrire ces structures en 1674 en observant le mouvement d'un protozoaire présent dans l'eau de pluie puis celui des flagelles de spermatozoïdes humains quelques années plus tard. Les flagelles sont généralement plus longs et moins nombreux que les cils et génèrent un battement ciliaire différent de ces derniers. Les flagelles bougent en formant des vagues d'ondulations dans le plan depuis la base jusqu'à l'extrémité, alors que les cils forment une vague en trois dimensions qui se divise en deux phases : la première phase est caractérisée par un mouvement rapide des cils qui sont droits et raides puis dans la deuxième phase, un retour à la position d'origine dans un état flexible est observé (**Figure 1**). L'intérêt porté aux cils et flagelles a longtemps été restreint à cette fonction motile, jusqu'à l'observation de cils solitaires et non motiles par Zimmerman à la fin du XIX siècle (Wheatley, 2005). Renommés cils primaires en 1968 (Sorokin, 1968), ils sont aujourd'hui l'objet de nombreuses études. En effet, il est désormais clairement établi que le cil joue un rôle sensoriel majeur dans le développement des vertébrés et l'homéostasie tissulaire (Bloodgood, 2009; Singla and Reiter, 2006). Chez l'Homme, tout dysfonctionnement ou mauvais développement des cils est à l'origine de syndromes génétiques connus sous le terme de ciliopathies (Baker and Beales, 2009; Satir, 2008).

2. Evolution des cils et conservation des composants

La phylogénie des eucaryotes révèle la présence d'un cil motile, probablement sensoriel et très proche de celui des eucaryotes actuels, chez le dernier ancêtre eucaryote commun LECA (Last Eukaryotic Common Ancestor) et une perte plus tardive chez les plantes et champignons (Jékely G, 2006). La structure des cils est extrêmement conservée entre les unicellulaires et les mammifères ce qui suggère une forte conservation fonctionnelle de ceux-ci au cours de l'évolution. Les analyses fonctionnelles réalisées dans les organismes

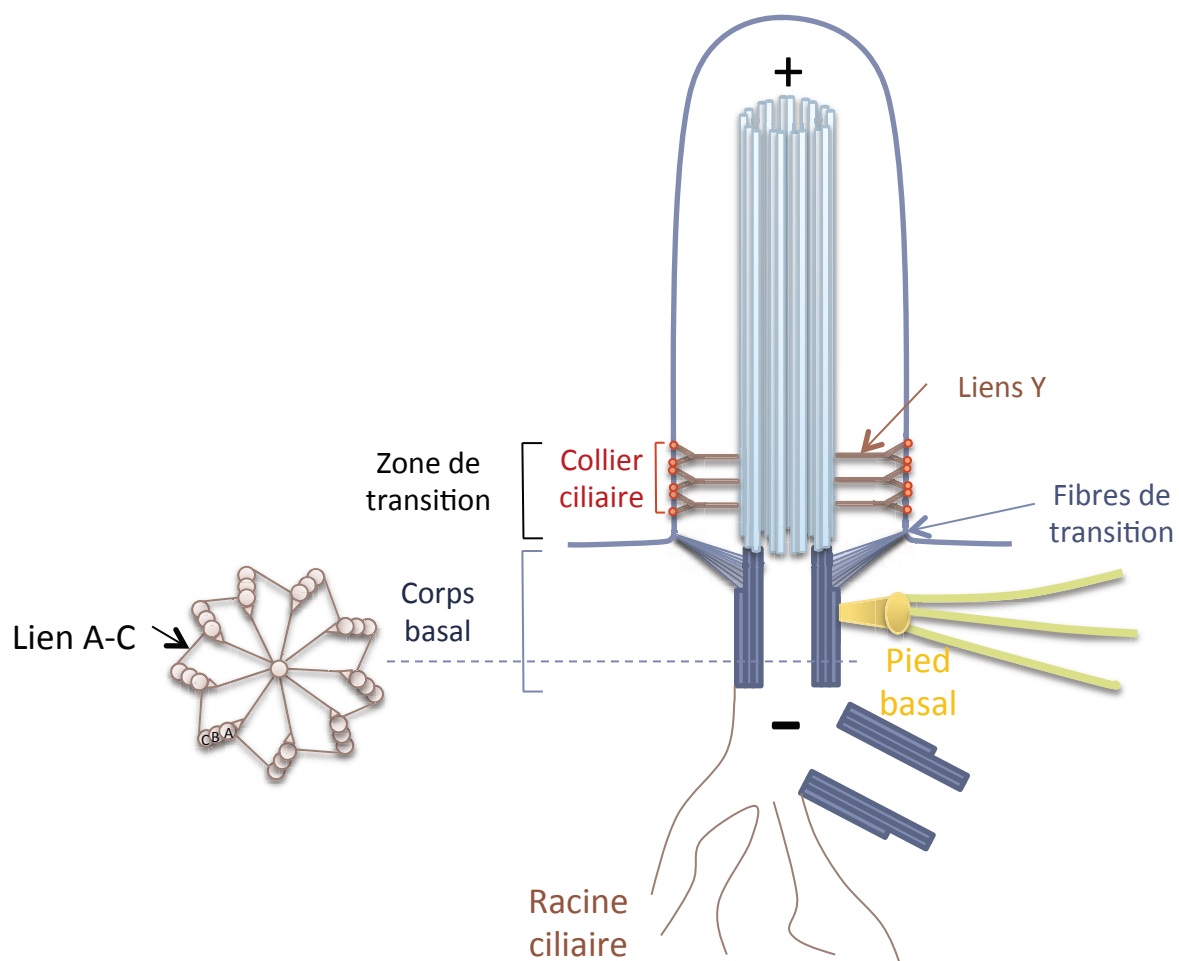


Figure 2 : Représentation schématique d'un cil avec son corps basal et les appendices associés.

unicellulaires tels que *Chlamydomonas*, *Tetrahymena* ou *Trypanosoma* ont démontré l'importance de ces différents modèles pour étudier la biogenèse, la motilité ou les fonctions sensorielles des cils et ont contribué à la compréhension des bases moléculaires des maladies ciliaires chez l'Homme (Vincensini et al., 2011). Ces études ont été complétées et renforcées chez les organismes multicellulaires, avec notamment la création de mutants murins qui reproduisent les phénotypes observés chez les patients humains atteints de ciliopathies (Norris and Grimes, 2012) et par l'analyse des fonctions sensorielles des cils chez la drosophile, *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) ou dans le cil primaire des vertébrés. Parmi les exemples les plus connus, on citera la protéine IFT88, qui joue un rôle central dans la mise en place des cils et dont l'absence empêche la biogenèse des cils et flagelles chez *Chlamydomonas* (Pazour et al., 2000a), *C.elegans* (Qin et al., 2001), le trypanosome (Kohl et al., 2003), le poisson zèbre (Huang and Schier, 2009) et la souris (Pazour et al., 2000a).

La structure des cils et des flagelles peut être divisée en trois zones en fonction de leur position depuis la base jusqu'à l'extrémité : 1- le corps basal qui est un centriole modifié et sert de centre nucléateur de l'axonème (Beisson and Wright, 2003), 2- la zone de transition (Reiter et al., 2012) et 3- l'axonème, une structure habituellement composée de neuf doublets de microtubules (Fisch and Dupuis-Williams, 2011). La zone de transition et l'axonème sont entourés d'une membrane ciliaire, continue avec la membrane plasmique mais de composition différente. La taille et le nombre des cils sont variables d'un organisme à l'autre et d'un type cellulaire à l'autre au sein d'un même organisme.

3. Corps basaux et centrioles

3.1 - Structure

Les cils sont nucléés par **le corps basal**, une structure cylindrique d'environ 200 nm de diamètre et 500 nm de long (Ou and Rattner, 2004). Il est composé de neuf triplets de microtubules (A, B et C) organisés radialement. Le microtubule A d'un triplet est connecté au microtubule C du triplet suivant, formant le lien A – C. Les doublets A et B sont continus avec les doublets périphériques de l'axonème (Ringo, 1967). La fin du tubule C marque le début de la zone de transition. Cette région comprend également les fibres de transition qui émanent des doublets externes et s'ancrent au niveau de la membrane plasmique et les liens « Y » qui connectent les doublets externes à la membrane ciliaire, au niveau d'un site appelé

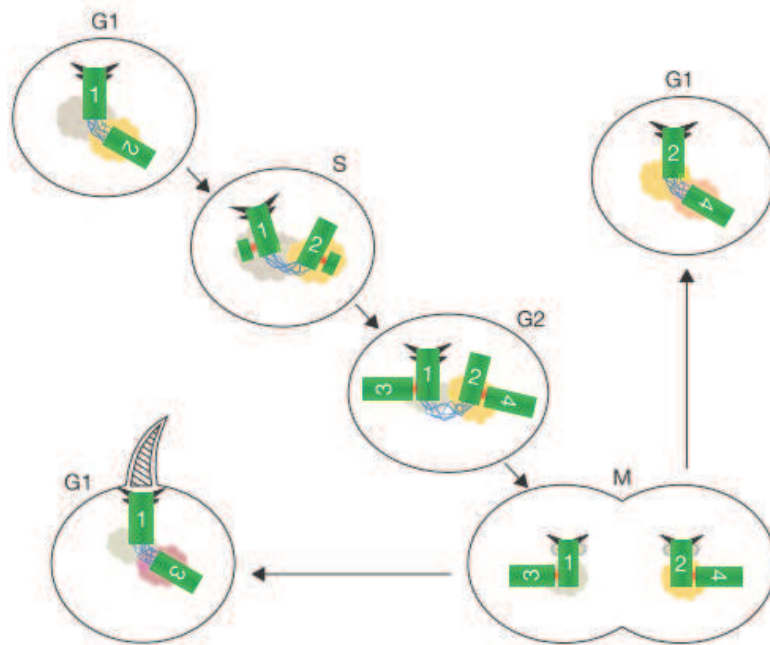


Figure 3 : Représentation schématique de la duplication centriolaire pendant le cycle cellulaire.

Le centrosome est composé du centriole 1 ou centriole père qui est le plus âgé et possède des appendices distaux et subdistaux, du centriole 2 qui est assemblé durant le cycle cellulaire en cours, en tant que pro-centriole et d'une matrice péricentriolaire. En phase S un nouveau centriole est formé à partir de chaque centriole existant (centriole 3 et 4) et ils s'allongent en phase G2. Pendant la transition G2/M le centriole 2 acquiert les appendices distaux et subdistaux et au cours de la mitose chaque cellule fille hérite d'une paire de centriole. Chaque paire de centriole est morphologiquement équivalente mais la cellule recevant le centriole père le plus âgé (centriole 1) sera en mesure de former un cil primaire avant les autres cellules. Adapté de Nigg et al., 2011.

«collier ciliaire» (ciliary necklace). Dans le cas des cils motiles, la zone de transition se poursuit jusqu'à la plaque basale où la paire centrale est nucléée (Fisch and Dupuis-Williams, 2011). Le corps basal est une structure polarisée, où la base fait face au cytoplasme et contient l'extrémité négative des microtubules et l'extrémité distale du corps basal est orientée vers la membrane plasmique (**Figure 2**). La configuration structurale de neuf triplets de microtubules des corps basaux et centrioles est fortement conservée mais il existe des exceptions comme chez *C.elegans* où il s'agit de neuf singlets de microtubules et dans les cellules somatiques chez la drosophile où le centriole est composé de neuf doublets de microtubules (Callaini et al., 1997; O'Toole et al., 2003).

Les corps basaux sont dérivés des **centrioles** (Paintrand et al., 1992). Présents en paire dans la cellule, les centrioles sont entourés d'une matrice péri-centriolaire (PCM) contenant les protéines nécessaires à la nucléation et à l'ancrage des microtubules (Azimzadeh and Bornens, 2007). Dans cet état, ils forment le centrosome, centre organisateur des microtubules (MTOC – Microtubule Organizing Center) qui dirige l'assemblage des microtubules du cytosquelette cellulaire. La paire de centriole affiche une asymétrie structurelle et fonctionnelle due à la différence d'âge entre les deux. Le plus âgé, qualifié de centriole père, est complètement mature. Il se distingue par la présence d'appendices à son extrémité distale. Le plus jeune, ou centriole fils, est en cours de formation et est légèrement plus petit que le centriole père (**Figure 3**) (Bornens, 2012).

3.2 - Appendices

Les appendices subdistaux du centriole permettent l'ancrage des microtubules aux centrioles et donnent naissance au pied basal lorsqu'on parle de corps basal. Les appendices distaux permettent le recrutement du corps basal à la membrane et correspondent aux fibres de transition lorsque l'ancrage à la membrane est effectif (Kobayashi and Dynlacht, 2011).

3.2.1 - La racine ciliaire

La racine ciliaire est une structure filamenteuse émanant de la partie proximale du corps basal et s'étendant jusqu'au noyau cellulaire (Fawcett, 1954). Le nombre et l'orientation sont variables en fonction du type cellulaire (**Figure 4**). La rootletine en est le composant

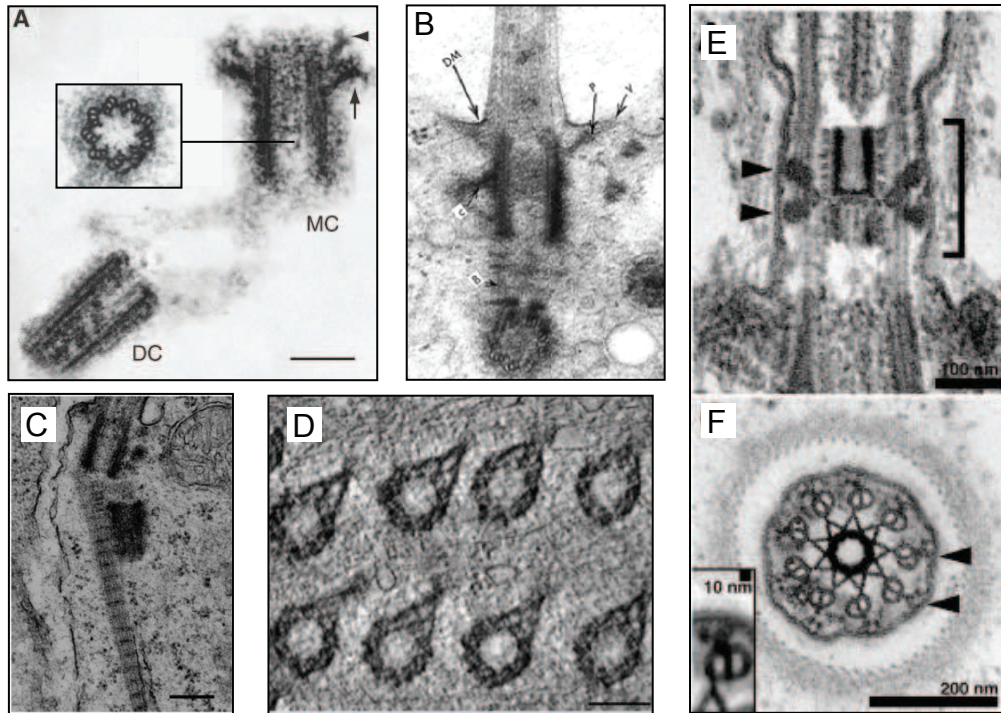


Figure 4 : Ultra structure du corps basal, de ses appendices et de la zone de transition.

A- Centrosome de lymphoblaste. Le centriole père en haut possède les appendices distaux permettant l'ancrage au niveau de la membrane plasmique (Bornens, 2012). **B-** Corps basal ancré à la membrane plasmique grâce aux fibres de transition (Pederson et al., 2008) **C-** Racine ciliaire striée émanant du corps basal d'un cil de photorécepteur chez la souris (Gilliam et al., 2012). **D-** Coupe tomographique révélant les pieds basaux tous orientés dans une même direction et associés aux corps basaux, dans les cellules de trachée chez la souris (Kunimoto et al., 2012). **E-** Coupe longitudinale d'un cil primaire révélant la zone de transition (crochets) et les liens Y qui la composent (flèche). **F-** Coupe transversale de la zone de transition avec les liens Y qui ancrent les doublets externes à la membrane plasmique (Flèche). (E,F) Craige et al., 2010.

majoritaire (Yang et al., 2002) et les souris invalidées pour la rootletine ne possèdent pas de racine ciliaire dans les cellules des photorécepteurs (Yang et al., 2005). La fonction exacte de cette structure est encore floue et de nombreuses hypothèses ont été avancées. En effet, des études menées chez la souris montre que la racine ciliaire est impliquée dans la stabilité à long terme de certains types de cils comme ceux des photorécepteurs (Jun Yang et al., 2005; Gilliam et al., 2012) ainsi que dans le transport intracellulaire, en agissant notamment en tant qu'adaptateur des vésicules cargos contenant la kinésine-1, ou en jouant un rôle dans le positionnement des organelles (Gilliam et al., 2012; Yang and Li, 2005). D'autres études démontrent son implication dans la cohésion du corps basal via son interaction avec C-Nap1 (Yang et al., 2006) ou dans l'ancrage de celui-ci au cytosquelette en interagissant avec les protéines CEP250 et (Bahe et al., 2005; Kobayashi and Hirokawa, 1988; Schröder et al., 2011). Plus récemment, il a été montré chez *C.elegans*, que CHE-10 l'orthologue de la rootletine et composant majeur des racines dans cet organisme est nécessaire au maintien de l'intégrité ciliaire en modulant l'assemblage, la motilité et le flux des particules du transport intraflagellaire (Mohan et al., 2013).

3.2.2 - Le pied basal

Le pied basal est une extension latérale située à l'extrémité subdistale du corps basal et formant un point d'attachement pour les microtubules cytoplasmiques (Anderson, 1972; Hagiwara et al., 2000). Lorsqu'il est associé au cil non motile, son orientation est aléatoire alors qu'il est toujours orienté dans la direction de l'écoulement du fluide et du battement ciliaire dans les cils motiles (**Figure 4**) (Kunimoto et al., 2012). Les appendices subdistaux et le pied basal sont composés de protéines identiques comme ODF2/CENEXIN ou KIF3A. La perte de fonction d'une isoforme de Odf2 chez la souris entraîne la disparition du pied basal dans les cellules de la trachée et le battement coordonné des cils habituellement observé, n'a plus lieu (Kunimoto et al., 2012). De la même façon les fibroblastes embryonnaires issus des souris *Kif3a*^{-/-} ne forment pas de cils et le corps basal, bien qu'ancré à la membrane plasmique, ne possède pas de pied basal (Kodani et al., 2013). Le pied basal est donc essentiel en tant que stabilisateur du cil dans le plan du battement ciliaire et tout défaut de fonctionnement, ou de biogenèse, de cette structure peut conduire à des ciliopathies (Kunimoto et al., 2012).

3.2.3 - Les fibres de transition

Les fibres de transition sont apparentées aux appendices distaux du centriole père et servent de principal point de fixation du corps basal à la membrane. Elles émanent du tubule B juste avant la disparition du tubule C et forment une structure similaire à un « moulinet » en microscopie électronique (**Figure 4**). Parmi les protéines identifiées au niveau de cette structure, la localisation de la protéine CEP164 est dépendante de ODF1, une protéine des appendices distaux du centriole. La perte de fonction d'une de ces deux protéines empêche l'ancrage du centriole père à la membrane et par conséquent la formation du cil (Graser et al., 2007; Singla et al., 2010).

Les fibres de transition jouent également le rôle de barrière physique en bloquant le transport notamment à cause de l'espace inter fibre trop étroit pour permettre le passage des vésicules (Geimer and Melkonian, 2004). Ce point d'attachement définit donc la limite où les vésicules destinées au cil peuvent fusionner. En accord avec cette fonction, de nombreuses études ont montré un enrichissement des protéines destinées au cil tels que les protéines du transport intraflagellaire, du complexe BBS (Bardet-Biedl Syndrome) mais aussi RP2, co-facteur de replie de la tubuline (Deane et al., 2001; Nachury et al., 2007; Stephan et al., 2007). La partie distale de cette région est délimitée par des liens en forme de « Y » connectant les doublets externes et la membrane ciliaire. La protéine CEP290/NPHP6 est l'un de ces composants et l'absence de cette protéine chez *Chlamydomonas* affecte la composition de l'axonème, qui devient notamment enrichi en protéine de l'IFT et du BBS (Craig et al., 2010).

Les fibres de transition, et les liens Y délimitent une **zone de transition** entre les membranes plasmique et cytoplasmique et entre le cytoplasme et le compartiment ciliaire et constituent un important site d'assemblage et d'ancrage des protéines nécessaires à la formation et la fonction des cils (Reiter et al., 2012).

3.3 - Fonctions

En interphase ou dans les cellules post mitotiques, le centrosome dicte en partie l'organisation des microtubules du cytosquelette, important pour la détermination de la forme, la polarité ou la motilité cellulaire. Dans les cellules en division, le centrosome détermine le lieu de positionnement du fuseau en interagissant avec les microtubules astraux et des sites spécifiques situés à la surface corticale de la cellule. Le positionnement du centrosome est fondamental pour l'orientation des divisions mitotiques notamment dans la morphogenèse des tissus épithéliaux où les fuseaux mitotiques sont alignés dans le plan de l'épithélium. Pourtant, dans certaines espèces, le centrosome n'est pas absolument nécessaire à la mitose même si il y participe activement. En effet, chez la souris les cinq premières divisions de l'embryogenèse se déroulent sans centriole (Calarco-Gillam et al., 1983) et chez la drosophile, il est possible de générer des mouches adultes dépourvues de centrosome. Dans ces mouches, le principal défaut est associé à l'absence de cil dans les neurones sensoriels et non à l'absence de centrosome (Basto et al., 2006).

Lorsque les centrioles ne sont pas requis pour organiser le fuseau, ils migrent à la membrane apicale où ils permettent la nucléation du cil à la surface des cellules post-mitotiques (phases G0/G1 et au début de la phase S). Les mécanismes impliqués dans cette conversion restent peu caractérisés, néanmoins des travaux ont permis d'identifier certains acteurs de ce mécanisme. Notamment la protéine centriolaire CP110 et sa partenaire de liaison CEP97 qui coopèrent pour inhiber la conversion centriole/corps basal. Plus précisément CP110 limite la longueur des triplets de microtubules centriolaires en coiffant leur extrémité distale dans les cellules en prolifération. L'absence de cette protéine au centriole père est une étape préalable pour l'élongation de l'axonème (Seeley and Nachury, 2010).

Il est intéressant de noter qu'au cours de l'évolution, la présence du centriole/corps basal est étroitement corrélée à l'apparition des cils, suggérant une pression sélective associée à la fonction du corps basal. Ainsi, le centrosome aurait acquis de nouvelles fonctions, notamment dans la division cellulaire.

4. Le compartiment ciliaire

4.1 - La zone de transition

Le passage des protéines ciliaires à l'entrée et à la sortie du compartiment ciliaire est régulé par une barrière sélective, **la zone de transition** qui comme nous l'avons vu précédemment, est délimitée par les fibres de transition et les liens Y (**Figure 4**). De nombreuses protéines localisées dans cette région sont associées à la membrane suggérant que la zone de transition est également impliquée dans la régulation de la diffusion des protéines composant la membrane ciliaire.

La zone de transition est une région complexe, dont la composition biochimique est conservée entre les espèces, mais il existe des variations inter-espèces. Des approches biochimiques ont permis de montrer que la zone de transition est organisée en grands modules protéiques, fusionnels et interconnectés : NPHP1-4-8/RPGRIP1L, NPHP5-6/CEP290 et MKS/B9. A l'exception de la protéine CEP290 localisée aux liens Y chez *Chlamydomonas* (Craigie et al., 2010), aucune localisation précise des protéines de la zone de transition n'a pu être bien définie. Sur le plan fonctionnel, les deux complexes NPHP sont essentiels à la ciliogenèse et à la régulation de la composition du compartiment ciliaire. Par exemple, l'absence des protéines NPHP1, NPHP4 ou RPGRIP1L affecte la formation des cils (Delous et al., 2009; Ghosh et al., 2012) et/ou conduit à la localisation anormale de protéines pas toujours nécessaires à la fonction ciliaire (Jauregui et al., 2008; Jiang et al., 2009; Williams et al., 2008). Le complexe NPHP5-6 est également nécessaire pour l'ancrage du corps basal au niveau de la membrane plasmique (Barbelanne et al., 2013). Enfin, les protéines du complexe MKS sont toutes impliquées dans la régulation de la voie Hedgehog et leur rôle dans la formation des cils est variable en fonction des tissus (Reiter et al., 2012).

Par ailleurs, l'absence d'un seul composant de la zone de transition n'affecte pas forcément la ciliogenèse ou le transport des protéines de l'IFT puisque le plus souvent des défauts de la zone de transition sont observés consécutivement à la déplétion simultanée de plusieurs composants (Bialas et al., 2009; Garcia-Gonzalo et al., 2011; Williams et al., 2011). Chez l'Homme, un grand nombre de maladies (ex Néphronophtise, Syndrome de Meckel-Gruber, Syndrome de Joubert) résultent de mutations dans les gènes codant les protéines localisées dans cette région ciliaire. Ainsi, bien que de nombreux composants de la zone de transition aient été identifiés, le rôle spécifique de chaque module dans les mécanismes de

régulation du transport reste à découvrir afin de comprendre comment ces défauts altèrent le développement et l'homéostasie associés aux maladies chez l'Homme.

4.2 - La membrane ciliaire

La membrane ciliaire est continue avec la membrane plasmique mais la composition lipidique et protéique y est différente. Elle est notamment enrichie en récepteurs et canaux ioniques impliqués dans la transmission des signaux dépendant du cil comme la voie Hedgehog. La composition lipidique de la membrane ciliaire reste peu caractérisée bien que la présence de sphingolipides et de stérols ait été détectée chez la paramécie, le trypanosome ou dans les cellules de mammifère (Janich and Corbeil, 2007; Kaneshiro, 1987; Tyler et al., 2009). Les protéines membranaires ne peuvent pas diffuser librement dans la membrane du cil et sont limitées par une barrière de diffusion localisée au niveau du collier ciliaire et composée de protéines appartenant à la famille des septines (Hu et al., 2010). Par ailleurs, une étude réalisée dans les cellules MDCK (cellules rénales de chien) montre que l'enrichissement ou l'exclusion des protéines de la membrane apicale dans la membrane ciliaire est médiée par un mécanisme de rétention impliquant le cytosquelette (réseau NHERF1-ERM-actine). Cette matrice de rétention empêche l'entrée des protéines de la membrane plasmique dans la membrane ciliaire indépendamment du rôle de la barrière de diffusion et contribue ainsi à la spécificité de la membrane ciliaire (Francis et al., 2011).

4.3 - L'axonème

L'axonème est très certainement la structure du cil la mieux caractérisée, notamment grâce à l'utilisation des techniques de microscopie électronique et plus récemment de cryo-électron tomographie (Fawcett, 1954; Nicastro et al., 2005). Il existe deux types de cils en fonction de leur architecture microtubulaire : les axonèmes en 9+2, présentent 9 doublets de microtubules périphériques associés à une paire centrale. La plupart sont motiles et cette catégorie regroupe tous les types de flagelles. Les axonèmes en 9+0, généralement associés aux cils primaires, ne possèdent pas la paire centrale de microtubules et sont en majorité non motiles. Tout comme les microtubules cellulaires, les microtubules ciliaires résultent de l'assemblage de monomère de tubuline α et β dont l'extrémité + est localisée à l'extrémité

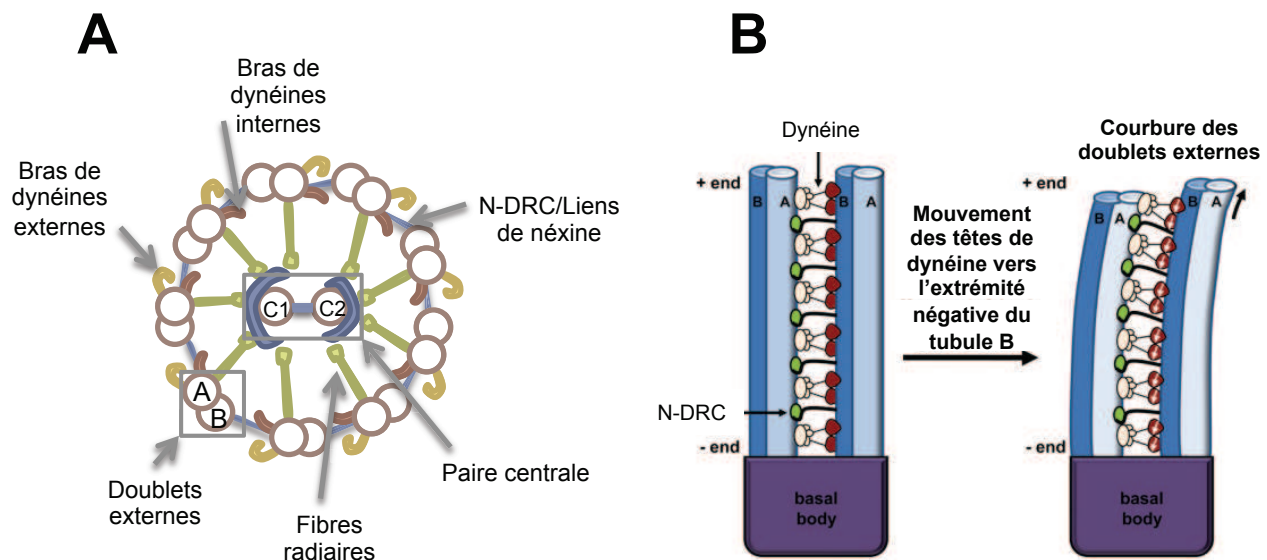


Figure 5 : Modèle mécanistique du battement ciliaire.

A- Représentation schématique d'un cil motile en coupe transversale. **B-** Modèle mécanistique du battement ciliaire. Les bras de dynéines sont ancrés aux tubules A des doublets externes et la « tête motrice » interagit de façon transitoire avec le tubule B du doublet adjacent. Le mouvement du domaine moteur est dirigé vers l'extrémité négative des microtubules (vers la base, flèche blanche sur la tête rouge des dynéines). Ceci induit le glissement d'un tubule A en direction de la base du tubule B adjacent poussant ce doublet externe vers la pointe ciliaire (Flèche noire). Ce mouvement de glissement sera convertit en courbure de l'axonème notamment parce que les doublets externes sont ancrés via leurs extrémités négatives au corps basal et parce qu'ils sont connectés par le N-DRC/lien de néxine sur toute leur longueur. Le glissement des microtubules est asynchrone. (B) Adapté de Wirshell et al., 2011.

distale du cil. Chaque doublet externe de microtubule est constitué d'un tubule « A » complet composé de 13 protofilaments, fusionné à un tubule « B » incomplet, formé de 11 protofilaments (Manton and Clarke, 1952). Dans les cils motiles, le battement ciliaire se fait par glissement des microtubules périphériques les uns contre les autres. Ce mouvement implique des acteurs supplémentaires tels que les bras de dynéine internes et externes et les liens de néxine ou N-DRC. L'ensemble de ces structures ainsi que leur mode de fonctionnement seront détaillés dans la section suivante.

Toutefois, les choses ne sont pas aussi simples et il existe bien évidemment des exceptions. Par exemple, les cils de l'épithélium olfactif des mammifères sont organisés en 9+2 mais ils ne sont pas motiles (Pifferi et al., 2008). A l'inverse, les cils du nœud embryonnaire chez la souris sont organisés en 9+0 mais ils possèdent des bras de dynéine et sont donc motiles (Caspary et al., 2007). Dans la majorité des cils, les tubules B se terminent avant les tubules A et la paire centrale, dans le cas des cils motiles. La taille de la région en singlet est variable d'une espèce à l'autre et d'un type cellulaire à l'autre mais elle apparaît conservée (Fisch and Dupuis-Williams, 2011).

5. Composants de l'axonème associés à la motilité

Le mouvement ciliaire repose sur l'action coordonnée de nombreux composants spécifiques aux axonèmes des cils motiles. Les dynéines, moteurs moléculaires à activité ATPase sont des acteurs clés dans ce processus. Attachées à chaque tubule A, elles se fixent de manière transitoire et dépendante à l'ATP, à l'extrémité négative du tubule B adjacent (c'est-à-dire vers sa base). Cette association induit le glissement des doublets les uns par rapport aux autres et sera convertie en courbure pendant le battement ciliaire. Toutes les dynéines ne sont pas activées en même temps et elles doivent être coordonnées dans l'ensemble de l'axonème pour permettre un battement efficace (Satir, 1968). Cette coordination ainsi que la conversion du glissement en courbure sont achevées via l'intégration de divers signaux générés par les autres composants associés à la motilité tels que, la paire centrale, les liens de néxine ou N-DRC et les fibres radiaires. A l'exception de la paire centrale, les différents composants motiles sont organisés en blocs répétés tous les 96 nm sur le plan longitudinal de l'axonème (**Figure 5**). L'essentiel des informations disponibles à ce jour sur les composants nécessaires à la motilité ciliaire provient de cribles génétiques affectant la motilité du flagelle réalisé chez *Chlamydomonas*, de l'analyse des patients atteints

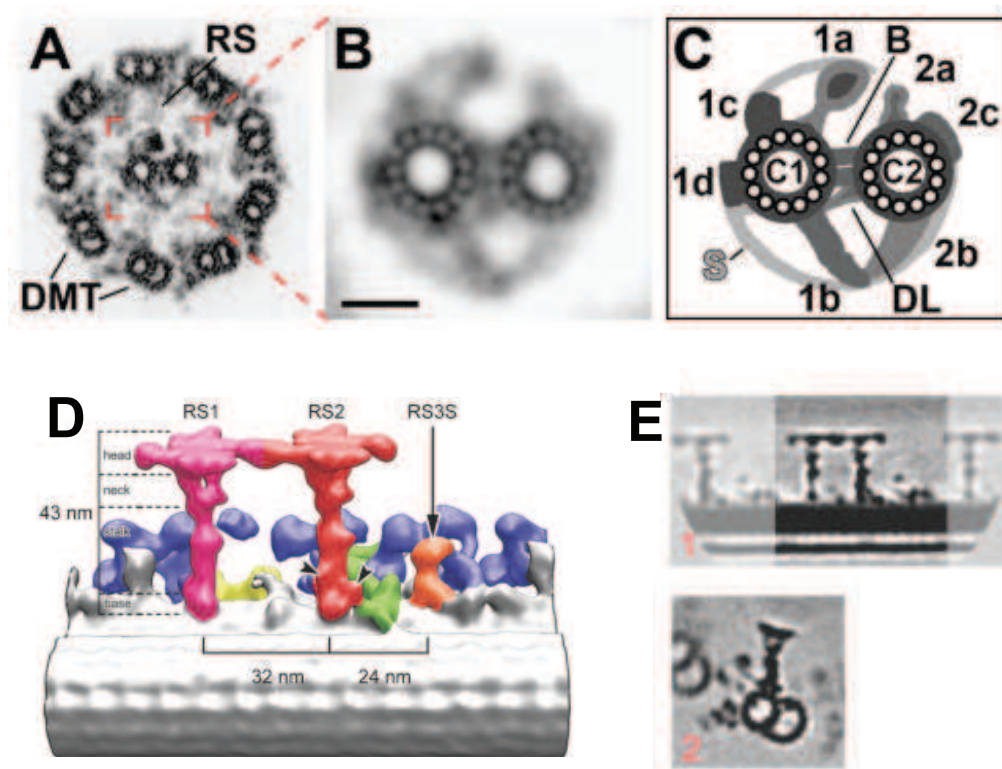


Figure 6 : Organisation de la paire centrale et reconstruction 3D des fibres radiales chez *Chlamydomonas*.

A- Coupe transversale d'un cil motile chez *Chlamydomonas* montrant la paire centrale entourée des 9 doublets externes de microtubules. **B-** La paire centrale est composée de deux singlets de microtubule C1 et C2 auxquels sont attachés des structures se projetant en direction des fibres radiales. **C-** Schéma simplifié de la paire centrale et des projections associées. **D-** Structure 3D après reconstruction tomographique des fibres radiales chez *Chlamydomonas*. Sur cette vue longitudinale, on observe la tige caractéristique des deux fibres radiales (RS1-rose et RS2-rouge) ainsi qu'une troisième plus courte apparentée à RS3 (orange). En bleu les BDI, en jaune les IC des BDI et en vert le N-DRC. La partie proximale de l'axonème est située à gauche. **E-** Section tomographique en vue longitudinale (1) et en coupe transversale (2) révélant RS1, BDI et le doublet externe de microtubule. BDI : Bras de dynéine internes, IC : Chaîne intermédiaire. (A-C) Adapté de Carbajal-González et al., 2013. (D,E) Adapté de Pigino et al., 2011.

de dyskinésie ciliaire primitive et de l'utilisation d'organismes modèles (Kobayashi and Takeda, 2012).

Dans la suite de cette partie je présenterai indépendamment chaque acteur impliqué dans le mouvement des cils, en commençant par la paire centrale, composant caractéristique des cils motiles.

5.1 - Les différents composants

5.1.1 - La paire centrale

La paire centrale s'étend depuis l'extrémité distale de la zone de transition jusqu'à l'extrémité distale du cil. Elle est composée de deux singlets de microtubules nommés C1 et C2, reliés par un ensemble de structures formant un pont. On distingue attaché à chaque singlet des structures associées qui se projettent en direction des fibres radiaires et des doublets externes de microtubules (**Figure 6**). La paire centrale est une structure qualifiée d'asymétrique car les projections associées à C1 sont structurellement et biochimiquement différentes de celles associées à C2. On distingue notamment des phosphatases telles que PP1 associée à C1 (Yang et al., 2000), des kinases comme AKAP240 ou KLP1 associées à C2 (Gaillard et al., 2001; Yokoyama et al., 2004) ou des complexes contenant de la calmoduline nécessaires à la signalisation dépendante du calcium tels que FAP54 et FAP221, composants de la projection 1d ou CPC1, composant de la projection C1b (Brown et al., 2012; DiPetrillo and Smith, 2010). Les composants de ces projections au même titre que ceux de la paire centrale sont indispensables pour le contrôle du battement ciliaire puisque toute mutation ou perte de fonction d'un de ces composants conduit à la paralysie quasi totale du cil ou du flagelle (Carbajal-González et al., 2013).

5.1.2 - Les fibres radiaires

Les fibres radiaires forment une structure en forme de T émanant des doublets externes et se projettent vers la paire centrale. La « tige » est ancrée au doublet externe du microtubule A et la « tête » interagit avec les projections associées à la paire centrale. Elles sont répétées tous les 96 nm le long de l'axonème et leur nombre est variable dans chaque

répétition en fonction des espèces. Elles sont au nombre de deux (nommées RS1 et RS2) chez *Chlamydomonas* et trois (RS1, RS2, et RS3) chez *Tetrahymena*, *Paramecium tetraurelia* ou *Trypanosoma brucei* (**Figure 6**). La purification des complexes contenant les fibres radiaires chez *Chlamydomonas* a conduit à l'identification de 23 protéines (RSP1 à RSP23) ainsi qu'à la détection d'un complexe calmoduline et d'un complexe fibre associée. Ces deux complexes se lient aux microtubules et sont essentiels pour l'ancrage des fibres. Très peu d'analyses fonctionnelles ont été réalisées sur les composants de ces fibres, mais chez *Chlamydomonas* l'absence de fibre radiaire conduit à la paralysie du flagelle et l'ajout d'une faible dose d'ATP permet de restaurer la motilité du flagelle (Omoto et al., 1996; Wakabayashi et al., 1997) (Omoto et al., 1996; Wakabayashi et al., 1997). De même, la motilité du flagelle peut être sauvée suite à des mutations dites suppressives pour les composants modulateurs de l'activité des dynéines (N-DRC ou la dynéine II) dans ces mutants ainsi que ceux de la paire centrale (Carbajal-González et al., 2013; Pigino et al., 2012). Ces expériences ont conduit à l'élaboration d'un modèle dans lequel des signaux de nature inconnus passent à travers la paire centrale et les fibres radiaires afin de réguler les dynéines et l'activité du flagelle. Dans ce modèle, le duo paire centrale/fibres radiaires agit en tant que régulateur de la motilité dont les mécanismes précis restent inconnus.

5.1.3 - Les dynéines axonémales

Les dynéines axonémales sont organisées en deux rangées le long de chaque doublet de microtubules qui sont structuralement et fonctionnellement distinctes. Il s'agit de complexes multi-protéiques organisés en chaînes lourdes, intermédiaires et légères. Elles utilisent l'énergie de l'ATP pour générer la force mécanique nécessaire à la motilité en « marchant » le long du microtubule voisin induisant ainsi le glissement des doublets l'un devant l'autre.

Les bras de dynéine externes (BDE) sont ancrés au tubule A des doublets externes en position proximale vis à vis de la membrane plasmique et sont nécessaires pour générer un battement ciliaire de haute fréquence. Ils sont répartis tous les 24 nm le long du doublet et sont agencés autour de deux ou trois chaînes lourdes (HC ; α , β , γ) qui contiennent le domaine moteur impliqué dans la génération du mouvement et la liaison aux microtubules. Les BDE sont également constitués de deux chaînes intermédiaires (IC1 et IC2) possédant

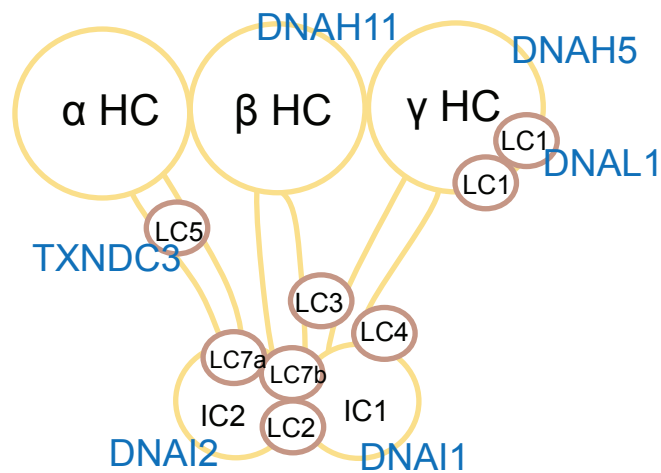


Figure 7 : Les bras de dynéine externes.

Représentation schématique d'un bras de dynéine externe chez *Chlamydomonas* indiquant les différentes chaînes lourdes (HC), intermédiaires (IC) et légères (LC). Les gènes humains mutés dans les dyskinésies ciliaires et orthologues des composants chez *Chlamydomonas* sont indiqués en bleu. Tous les composants des ODA ne sont pas listés.

des motifs WD40 impliqués dans les interactions protéines-protéines et de plusieurs chaînes légères (LC) impliquées dans l'assemblage et la régulation de la fonction motrice des dynéines (**Figure 7**) (Hozumi et al., 2006). Par exemple, chez *Chlamydomonas* LC1 interagit avec γ HC et la tubuline du tubule A et LC4 lie le calcium. Aucune protéine liant le calcium n'a été identifiée en tant que sous unité des BDE chez les métazoaires (Mohri et al., 2012; Sakakibara and Oiwa, 2011).

Les bras de dynéine internes (BDI) sont ancrés au tubule A des doublets externes en position proximale vis à vis de la paire centrale et sont nécessaires à l'amplitude du battement. Ils sont répartis tous les 96 nm le long de l'axonème et leur composition est plus diverse. Chez *Chlamydomonas*, les BDI contiennent 2 ou 3 HC réparties en sept sous types, dont six monomériques (a, b, c, d, e, f) et une dimérique (g). Chaque isoforme possède également des chaînes intermédiaires et légères. Les BDI sont organisés en trois classes, I1, I2 et I3 en fonction de leur position longitudinale vis-à-vis des fibres radiaires. I1 est situé en position proximale vis-à-vis de RS1, I2 est positionné entre RS1 et RS2 et I3 est situé en position distale vis-à-vis de RS2 (Piperno, 1990). Parmi ces isoformes, I1/f est composé de deux HC distinctes (1a et 1b), trois IC (IC40, IC138 et IC97) et quatre LC liées à celles des BDE (Tctex1, Tctex2, LC7 et LC8). L'état de phosphorylation de IC138 médié par une kinase présente dans le complexe paire centrale/fibre radiaire en réponse aux changements de motilité est un processus indispensable pour la régulation du mouvement. La composition des isoformes I2 et I3 est moins connue et varie le long de l'axonème. Ils sont notamment composés de la protéine p28, d'une molécule d'actine et de centrine, protéine liant le calcium. La fonction de ces différents composants au sein des BDI reste inconnue à ce jour (Mohri et al., 2012; Sakakibara and Oiwa, 2011).

5.1.4 - Les sites d'attachement des bras de dynéine

Le complexe d'attachement des BDE (Outer Dynein Arms – Docking Complex, ODA-DC) permet l'ancrage des BDE à l'axonème. Chez *Chlamydomonas*, il s'agit d'un mélange équimolaire de 3 polypeptides nommés DC1, DC2 et DC3. DC1 et DC2 sont des protéines à domaines coiled-coil codées par *ODA3* et *ODA1* respectivement (Casey et al., 2003; Koutoulis et al., 1997; Takada et al., 2002). DC3, codé par *ODA14*, appartient à la super famille des EF-hand, protéines liant le calcium. Chez l'Homme, le complexe ODA-DC

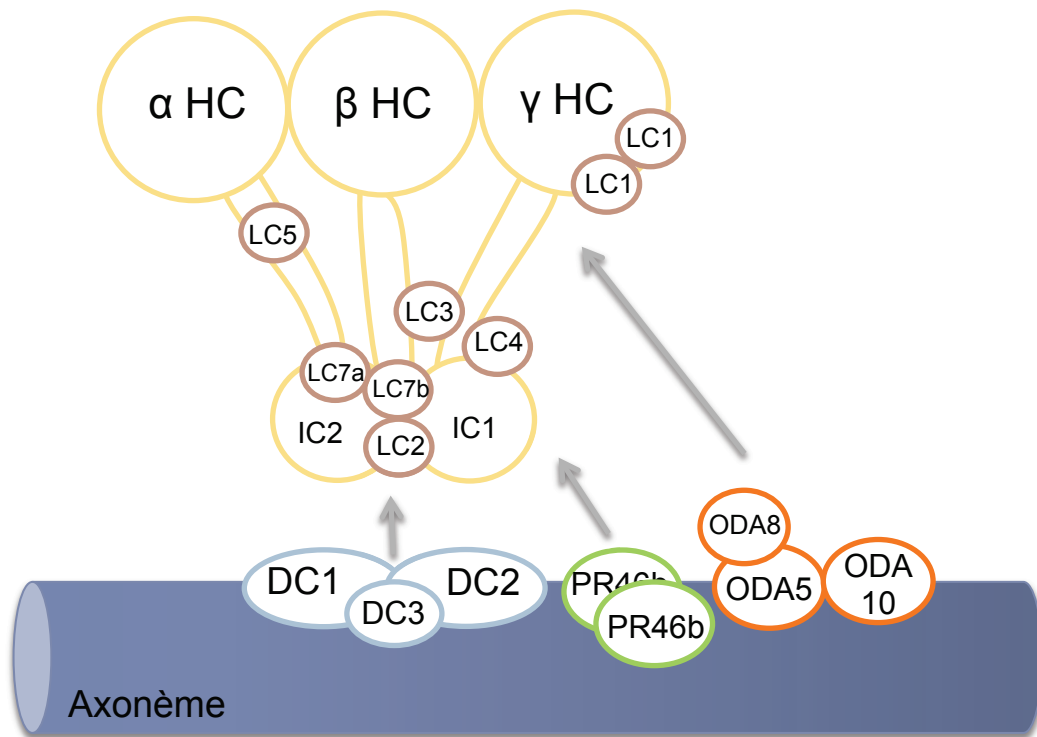


Figure 8 : Représentation schématique des sites d'attachement des bras de dynéine externes chez *Chlamydomonas*.

On distingue deux principaux complexes nécessaires à l'ancrage des BDE sur l'axonème. En bleu, le complexe ODA-DC, ancré au tubule A est composé de trois protéines DC1, DC2 et DC3. En orange, un second complexe composé des protéines ODA8, ODA5 et ODA10 s'ancrage également au tubule A. PR46b est indépendant des deux autres complexes et se fixe en mono ou dimère au tubule A de l'axonème. Il est également nécessaire pour ancrer les BDE à l'axonème.

semble structuré différemment puisqu'aucun homologue humain n'a été identifié à ce jour pour DC1/ODA3 et DC3/ODA14. Concernant DC2, l'homologue humain est le gène *CCDC114* mais il existe un second gène, *CCDC63*, qui présente également de fortes similitudes avec DC2. Chez l'Homme, *CCDC63* est proposé comme gène candidat aux fonctions redondantes à celles de *CCDC114* notamment dans les testicules où son expression est très nettement supérieure à celle de *CCDC114* (Knowles et al., 2013a; Onoufriadis et al., 2013).

Chez *Chlamydomonas*, il existe un autre complexe ODA5/ODA8/ODA10 également nécessaire pour le recrutement des bras de dynéine au niveau de l'axonème. Dans ce complexe, ODA5 est également impliqué dans l'ancrage de l'adénylate kinase à proximité des BDE, jouant ainsi un rôle dans la production des phosphates nécessaires au battement (Dean and Mitchell, 2013; Wirschell et al., 2004). Aucun homologue n'est décrit chez l'Homme pour ce complexe mais la séquence protéique de *CCDC63* présente 21% d'identité avec celle de ODA5.

Enfin, chez l'Homme, il existe une autre protéine, *CCDC103*, également nécessaire à l'ancrage des BDE mais aussi des BDI. Des expériences de fractionnement flagellaire réalisées chez *Chlamydomonas* montrent que l'orthologue, PR46b, est fortement lié à l'axonème indépendamment du complexe ODA-DC et des protéines ODA5/10. Les mutants de ce gène chez le poisson zèbre ne possèdent plus les BDE et les BDI et l'amplitude ainsi que la coordination du battement sont altérés. Des mutations dans ce gène ont été identifiées chez des patients atteints de dyskinésie ciliaire primitive (**Figure 8**) (Panizzi et al., 2012).

L'ensemble de ces données montre que ces gènes ont évolué différemment entre les espèces et l'identification des acteurs nécessaires à cette fonction chez les vertébrés est indispensable pour comprendre les défauts de motilités encore non caractérisés chez les patients.

5.1.5 - Le complexe de régulation des dynéines

Le complexe de régulation des dynéines ou liens de néxine (N-DRC) est une structure assurant la jonction entre les fibres radiaires et les BDI (**Figure 9**) (Heuser et al., 2009; Lindemann et al., 2005; Warner, 1976). Chez *Chlamydomonas*, douze polypeptides ont

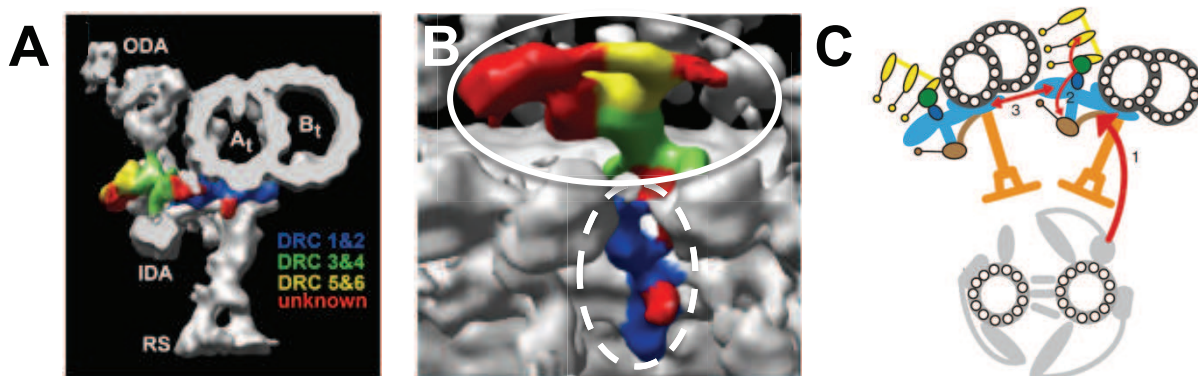


Figure 9: Localisation des sous unités du N-DRC et modèle d'interaction.

A- Coupe transversale de l'axonème de *Chlamydomonas* indiquant la localisation des différents membres du N-DRC. En rouge, sont représentés les composants encore non identifiés. **B-** Vue longitudinale par « le bas » révélant que le N-DRC se divise en deux parties. La première est attachée sous le tubule A et fait face à la paire centrale (cercle pointillé) et la seconde, s'étend du tubule A vers le tubule B du doublet voisin (cercle plein) **C-** Modèle schématique de transmission des signaux via le N-DRC. En orange, les fibres radiaires, en bleu le N-DRC, en bleu foncé DRC4, en vert IC2, en jaune les BDE et en marron les BDI. Les signaux de la paire centrale et des fibres radiaires sont transmis vers le N-DRC (Flèche 1) et le N-DRC régule les BDE et BDI (Flèche 2). Les signaux se propagent dans tout l'axonème via le N-DRC (ou lien de néxine, Flèche 3). (A,B) Adapté de Heuser et al., 2009. (C) Adapté de Oda et al., 2013

été proposés comme membre de ce complexe et sept (DRC1-5,7 et FAP61) ont de potentiels homologues dans les espèces possédant des cils motiles (Lin et al., 2011; Wirschell et al., 2013). Le produit du gène *PF2*, DRC4, est requis pour l'assemblage des autres membres du N-DRC et la motilité du flagelle chez *Chlamydomonas* (Piperno and Mead, 1994; Rupp and Porter, 2003a). Les orthologues de ce gène, *gas8/Trypanine*, sont nécessaires à la motilité ciliaire chez le poisson zèbre et le trypanosome (Colantonio et al., 2009; Yeh et al., 2002). DRC1 codé par *PF3* est nécessaire à l'intégrité du complexe N-DRC ainsi qu'à l'assemblage et à la régulation de sous catégories de BDI. Il a également été proposé comme inhibiteur du glissement des microtubules médié par les dynéines. Chez l'Homme, l'orthologue de ce gène, *CCDC164*, est nécessaire à l'intégrité du N-DRC et à la motilité ciliaire (Wirschell et al., 2013). Enfin, la protéine DRC2 est nécessaire à l'assemblage et à la maintenance des composants du N-DRC et l'absence de cette protéine chez l'Homme ou le poisson zèbre affecte le battement ciliaire (Austin-Tse et al., 2013; Horani et al., 2013a).

De plus, les gènes *CCDC39* et *CCDC40* sont potentiellement membres du N-DRC chez l'Homme puisqu'ils sont nécessaires à l'assemblage du N-DRC et des BDI. Ils ont été proposés comme composants d'un site de fixation pour le N-DRC encore non identifié (Becker-Heck et al., 2011; Merveille et al., 2011; Wirschell et al., 2013). La localisation du N-DRC suggère qu'il est impliqué dans la transmission des signaux régulateurs depuis le duo paire centrale/fibres radiaires vers les dynéines. En effet, toute mutation suppressive du N-DRC restitue la motilité du flagelle dans les mutants paire centrale/fibres radiaires suggérant que le N-DRC médie un signal inhibiteur de motilité en l'absence de ces composants (**Figure 9**) (Carbajal-González et al., 2013).

5.1.6 - La liaison entre les bras de dynéine externes et internes

Il existe une structure reliant les BDE et les BDI appelée **OID** (Outer-Inner Dynein linker). Des expériences de cross-linking couplées à de la cryo-électron tomographie réalisées chez *Chlamydomonas* révèlent que la chaîne intermédiaire IC2 des BDE interagit avec DRC4 via son extrémité N-Terminal et sont tous deux des constituants de l'OID. L'addition d'un tag biotinylé à l'extrémité N-Terminal active de manière non spécifique les BDE en initiant l'activité ATPase et perturbe également l'amplitude du battement, caractéristique d'une diminution d'activité des BDI. L'interaction BDE/N-DRC régule donc le battement du

flagelle en contrôlant à la fois l'activité des BDE et des BDI. Cette étude est la première à révéler l'existence d'une communication entre les BDE et les BDI (Oda et al., 2013).

5.2 - Assemblage

L'assemblage des bras de dynéine se déroule dans le cytoplasme et nécessite trois facteurs d'assemblage, DNAAF1 à 3 qui, lorsqu'ils sont mutés, conduisent à des dyskinésies ciliaires chez l'Homme (Duquesnoy et al., 2009; Loges et al., 2009; Mitchison et al., 2012; Omran et al., 2008). Les individus porteurs de ces mutations n'assemblent pas les BDE et les BDI. Deux étapes ont été proposées pour expliquer l'assemblage des complexes de dynéines. La première, nécessaire pour la stabilité des chaînes lourdes, pourrait faire intervenir le repliement du domaine globulaire en association avec des protéines chaperonnes. La seconde consisterait en l'assemblage d'un complexe de dynéines entre les chaînes lourdes et les autres sous unités. Dans ce modèle, DNAAF1/2 interviennent dans la première étape alors que DNAAF2 est requise pour les deux étapes (Mitchison et al., 2012). Le rôle de DNAAF3 dans ce mécanisme d'assemblage n'est pas encore caractérisé.

LRRC6 est une des protéines candidates à la fonction de chaperonne au sein de ce complexe car elle possède un domaine p23 like caractéristique des protéines de choc thermique B qui sont des chaperonnes. De plus, cette protéine est exclusivement localisée dans le cytoplasme et toute mutation dans ce gène chez l'Homme empêche l'assemblage des BDE et BDI (Horani et al., 2013b; Kott et al., 2012). En accord avec cette fonction, il apparaît que LRRC6 forme un complexe cytoplasmique avec la protéine ZMYND10 requise dans la régulation de la transcription et l'assemblage des bras de dynéine (Moore et al., 2013; Zariwala et al., 2013). Enfin, chez le poisson zèbre *Lrrc6/seahorse* interagit également avec la *Reptin/Ruvbl2*, une protéine connue pour ses fonctions dans les mécanismes de régulation transcriptionnels et épigénétiques. Cette protéine co-localise avec *Lrrc6* dans le cytoplasme et est nécessaire à l'assemblage des bras de dynéine. Elle interagit également avec PIH1D1 qui possède un domaine PIH (interaction avec Hsp90) impliquée dans l'assemblage des bras de dynéine (Zhao et al., 2013) et avec DPCD dont le gène est muté dans les modèles murins de PCD (Zariwala et al., 2004). L'ensemble de ces données démontre que la protéine LRRC6 appartient à un complexe multi-protéique requis pour l'assemblage des bras de dynéine et place la *Reptin/Ruvbl2* comme nouveau gène potentiellement muté dans les ciliopathies.

Par ailleurs, la protéine DYX1C1 est également impliquée dans l'assemblage des bras de dynéine chez l'Homme et la souris et interagit avec DNAAF2. L'interactome de cette protéine est enrichi en protéines de la famille des chaperonnes et les auteurs de cette étude proposent DYX1C1 comme un nouveau facteur d'assemblage des dynéines : DNAAF4 (Tarkar et al., 2013). Pour finir, les protéines SPAG1, HEATR2, LRRC50 et ARMC4 sont également des protéines cytoplasmiques nécessaires au pré-assemblage des bras de dynéine. Toutefois, la protéine ARMC4 est aussi présente dans l'axonème. Chez l'Homme, la localisation axonémale de ARMC4 est perdue dans les cils mutants pour le gène *CCDC114*, nécessaire à l'ancrage axonémale des BDE. En revanche, ARMC4 reste présent dans les axonèmes des cils mutants pour le gène *DNAH5*, composant structural des BDE ou pour le gène *DNAAF1* nécessaire au pré assemblage cytoplasmique des bras de dynéine. Ainsi, les auteurs de l'étude proposent que la protéine ARMC4 est requise pour l'assemblage cytoplasmique des BDE ainsi que pour leur ancrage au niveau de l'axonème (Hjeij et al., 2013; Onoufriadis et al., 2014).

L'ensemble de ces données montre que le cil est une structure complexe et qu'il existe une multitude d'acteurs impliqués dans leur composition et leur fonctionnement. Chaque acteur assure un rôle clé dans la formation du cil et le maintien de la fonction ciliaire mais les nombreux mécanismes mis en jeu sont encore peu expliqués. Ainsi, il ne fait aucun doute que de nouveaux acteurs restent à caractériser pour expliquer la biogenèse et le fonctionnement des cils.

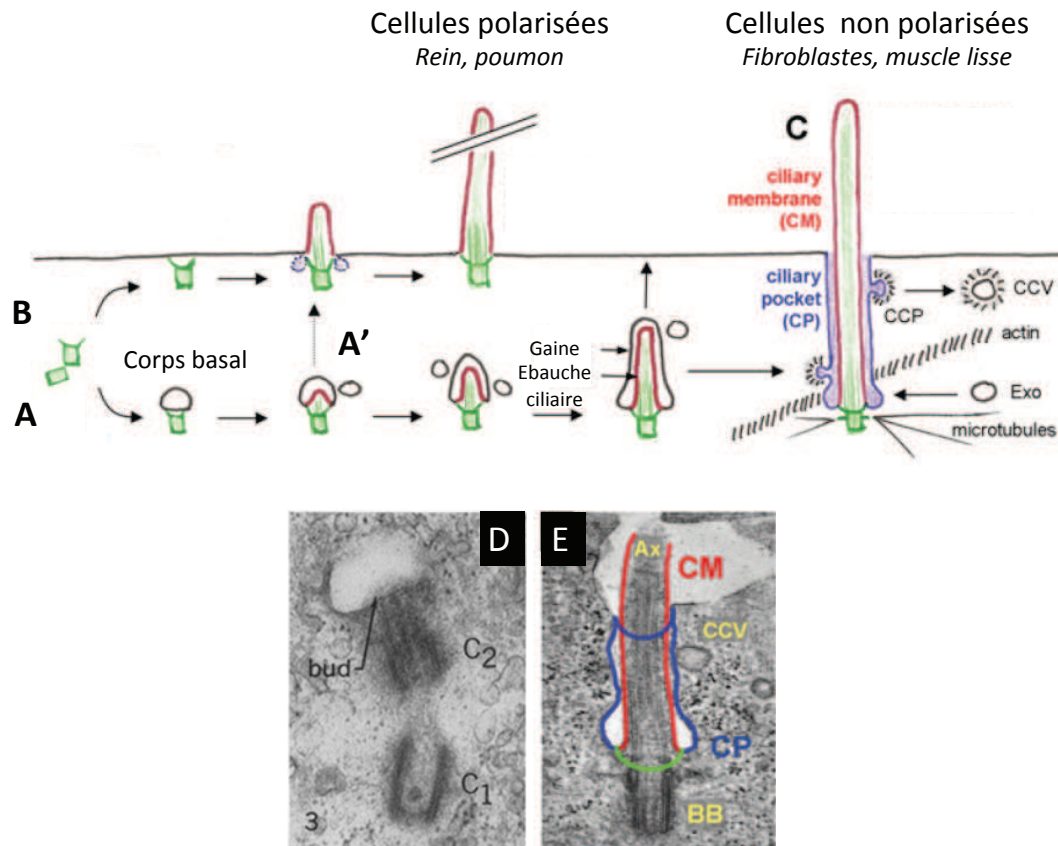


Figure 10 : Les deux voies de formation du cil primaire.

En 1962, Sorokin identifie deux voies de formation du cil primaire dépendant du type cellulaire. **A-** Dans les cellules, la ciliogenèse commence dans le cytoplasme lorsqu'une vésicule s'associe à l'extrémité distale du centriole père. L'élongation de l'axonème commence à l'intérieur de cette vésicule et s'allonge suite à la fusion de vésicules secondaires. Il se forme alors une gaine autour de l'axonème qui deviendra la future membrane du cil (rouge). **C-** La gaine fusionne ensuite à la membrane plasmique et l'extrémité distale du cil se projette dans le milieu extracellulaire. Lorsque l'extrusion du cil n'est pas totale, une poche ciliaire se forme à la base du cil. **A'-** Certaines cellules polarisées peuvent également commencer une croissance intracellulaire mais dans des temps plus courts. **B-** la voie extracellulaire est observée dans certaines situation et notamment dans les cellules épithéliales, où le centrosome migre directement vers la surface apicale de la cellule et s'ancre à la membrane plasmique grâce aux fibres de transition. La croissance du cil à partir du corps basal se fait directement dans le milieu extracellulaire. **D-** Photos de microscopie électronique à transmission montrant l'association de la vésicule avec le centriole père dans le cytoplasme. **E-** Photo de microscopie électronique à transmission du cil primaire dans des cellules de rétine où la poche ciliaire est visible en bleue, la membrane du cil en rouge et la barrière ciliaire en vert. (A-C, E) Adapté de Ghossoub et al., 2011. (D) Adapté de Sorokin, 1962.

II La ciliogenèse

1. La formation du cil primaire

Des analyses de microscopie électronique réalisées sur différents tissus en cours de ciliogenèse ont permis de proposer deux voies distinctes pour la formation du cil primaire, en fonction du type cellulaire (**Figure 10**).

La ciliogenèse commence dans le cytoplasme, lorsque l'extrémité distale du centriole père s'ancore à la membrane d'une vésicule issue de l'appareil de Golgi, très probablement grâce aux appendices distaux (Sorokin, 1968). Une fois l'ancrage effectif, l'allongement de l'axonème commence et provoque l'invagination d'une face de la vésicule. La croissance ciliaire se poursuit grâce à l'addition de vésicules secondaires qui fusionnent avec la vésicule d'origine, créant une gaine autour de l'axonème, qui deviendra la membrane du cil. L'axonème en formation dans le cytoplasme correspond très certainement à la future zone de transition (Boisvieux-Ulrich et al., 1989). Enfin, l'extrémité distale du cil se projette dans le milieu extérieur après fusion de la vésicule avec la membrane plasmique et la croissance de l'axonème se poursuit grâce à un processus de transport actif impliquant les protéines du transport intraflagellaire (IFT) et du syndrome de Bardet-Biedl (BBS) (Ghossoub et al., 2011).

Dans certaines situations et notamment dans les cellules épithéliales, le centrosome migre directement vers l'apex de la cellule et s'ancore à la membrane plasmique via les fibres de transition. La croissance du cil, à partir du corps basal, se fait directement dans le milieu extracellulaire sans association préalable avec une vésicule (**Figure 10**).

Ces deux processus au cours desquels la croissance axonémale est couplée à la croissance membranaire requièrent l'IFT et représentent la ciliogenèse compartimentée en opposition à la biogenèse cytosolique, dans laquelle l'axonème est assemblé dans le cytoplasme avant d'être inséré dans la membrane plasmique. Ce dernier processus est relativement rare et n'a été décrit à l'heure actuelle que pour les spermatozoïdes chez la drosophile et pour le flagelle chez *Plasmodium* (Briggs et al., 2004; Han et al., 2003). Ce

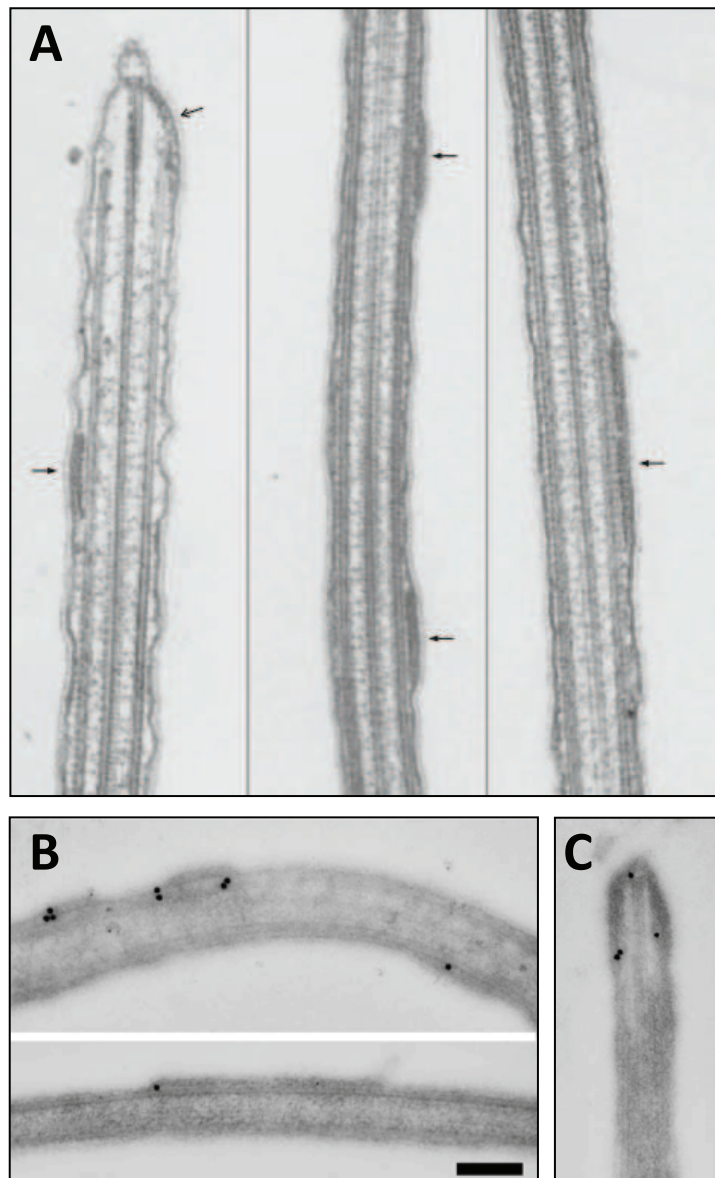


Figure 11 : Localisation subcellulaire des protéines de l'IFT.

A- Sections longitudinales en microscopie électronique à transmission montrant les trains de taille variable des particules de l'IFT localisées entre l'axonème et la membrane dans le flagelle chez *Chlamydomonas*. **B, C-** Immunocytochimie sur sections longitudinales du flagelle de *Chlamydomonas* montrant la localisation de la protéine IFT46 à l'intérieur des trains de l'IFT. (A) Adapté de Pederson et al., 2006. (B) Adapté de Pederson et al., 2008.

mode d'assemblage est donc indépendant du transport intraflagellaire et aucune protéine de l'IFT n'est présente dans les spermatozoïdes chez la drosophile ou chez *Plasmodium*

2. Le transport intraflagellaire

Le cil est une structure complexe composée de plus de 600 protéines et dont le compartiment est isolé du cytoplasme. Aucune synthèse protéique n'a lieu dans cette organelle, c'est pourquoi tous les composants nécessaires à sa synthèse et à son maintien doivent être acheminés depuis la base du cil jusqu'à l'extrémité distale. Le trafic à l'intérieur du cil est médié par un système de transport appelé transport intraflagellaire. Ce mécanisme repose sur le transit le long des microtubules axonémaux, de complexes multi protéiques qui sont chargés sur des moteurs moléculaires permettant un transport actif jusqu'à l'extrémité distale (transport antérograde) puis le retour à la base du cil (transport rétrograde) (Scholey, 2008).

2.1 - Découverte et conservation

Les protéines du transport intraflagellaire ont été découvertes chez *Chlamydomonas* (Kozminski et al., 1993). Des analyses par vidéo microscopie à contraste différentiel (DIC) ont permis l'observation du mouvement rapide et bidirectionnel d'un flux de particules (les protéines de l'IFT) le long des microtubules, dans des flagelles immobilisés chez *Chlamydomonas*. Leur vitesse de déplacement dans le sens antérograde est d'environ 2 $\mu\text{m}/\text{sec}$ contre 3,5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ dans le sens rétrograde. La localisation précise de ces protéines a été obtenue par microscopie électronique à transmission et montre qu'elles forment des trains localisés entre le doublet externe et la membrane du cil (Kozminski et al., 1993; Kozminski et al., 1995). Cette localisation axonémale a été confirmée par des marquages immuno cytochimiques (**Figure 11**) (Pedersen et al., 2006). Depuis, l'utilisation du tag GFP couplé à différents composants de l'IFT a permis de visualiser les protéines de l'IFT dans les cils de nombreux types cellulaires et organismes. Il s'agit donc d'un complexe protéique extrêmement conservé chez les espèces possédant des cils et des flagelles (Avidor-reiss et al., 2004; Pedersen and Rosenbaum, 2008).

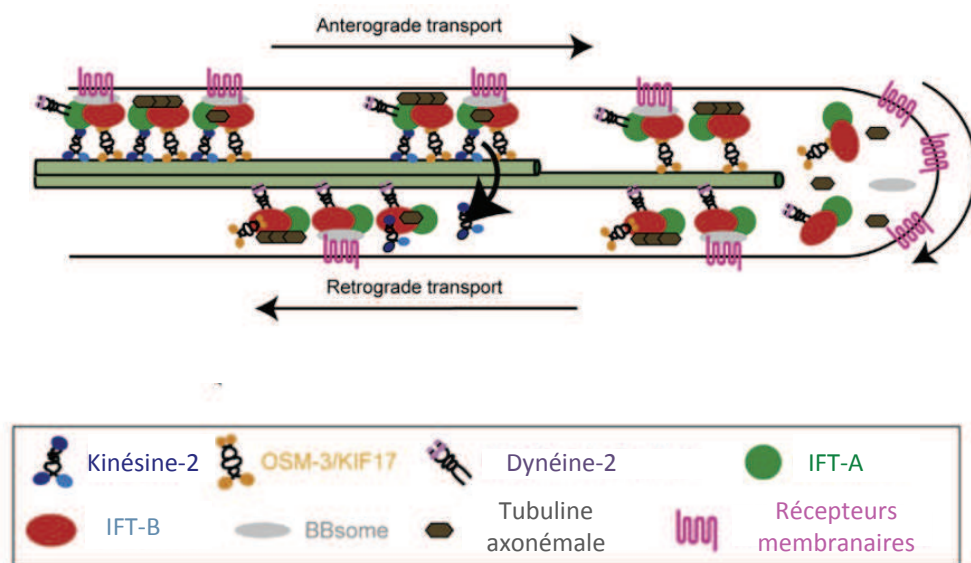


Figure 12 : Le transport intraflagellaire.

La Kinésine-2 est le moteur transportant les complexes IFT-A, IFT-B, les composants du cil et la dynéine-2 à l'extrémité du cil pendant le transport antérograde. A la pointe du cil, le complexe est réorganisé et les complexes protéiques qui doivent sortir du cil sont acheminés par la dynéine-2 lors du transport rétrograde. Dans les cils sensoriels chez *C.elegans* et dans les cils des photorécepteurs chez les vertébrés, le transport axonémal au niveau des singlets de microtubules lors du transport antérograde est assuré uniquement par le moteur OSM-3/KIF17. Adapté de Broekhuis et al., 2013.

2.2 - Le transport intraflagellaire : les moteurs

Le moteur principal impliqué dans le transport antérograde est la Kinésine-2. Il s'agit d'un complexe hétérotrimérique, composé de deux sous unités motrices, KIF3A et KIF3B et d'une sous unité non motrice, KAP3. L'absence de cette protéine bloque la formation du cil et le transport intraflagellaire dans de nombreux organismes incluant la drosophile, la souris, le poisson zèbre ou *Chlamydomonas*, mais pas chez *C.elegans* (Broekhuis et al., 2013). Chez ce dernier, il existe une kinésine supplémentaire, OSM-3 et la formation des cils des neurones sensoriels est bloquée uniquement lorsque les deux kinésines sont absentes. Des analyses *in vivo* et *in vitro* ont permis de démontrer la coopération des deux kinésines dans le transport des particules de l'IFT chez *C.elegans*. En effet la Kinésine-II et OSM-3 transitent toutes deux le long du segment médian composé de doublets de microtubules alors que OSM-3 est le seul moteur transitant à l'extrémité distale du cil, composé de singlets de microtubules (**Figure 12**) (Snow et al., 2004). La segmentation des cils sensoriels chez *C.elegans* est similaire à la structure du cil des photorécepteurs chez les vertébrés, où le cil connecteur est composé de doublets de microtubules alors que le segment externe est composé de singlets. De manière identique, la Kinésine-II est restreinte au cil connecteur alors que l'orthologue de OSM-3, KIF17 transite le long des deux segments et est nécessaire pour la formation du segment externe des photorécepteurs uniquement (Insinna et al., 2008; Insinna et al., 2009).

Le moteur moléculaire impliqué dans le transport rétrograde des protéines de l'IFT est la dynéine cytoplasmique 2 (DHC2 ou DNCHC2). Elle est composée d'une chaîne lourde homodimérique, DYNC2-H1, d'une chaîne intermédiaire, WDR34, d'une chaîne légère intermédiaire, DYNC2LI1 et d'une chaîne légère DYNLL1. La fonction motrice de ce moteur moléculaire est conservée et les mutants des différents composants de la dynéine cytoplasmique forment des cils très courts avec des bourgeons qui accumulent les particules de l'IFT dans de nombreux organismes (Broekhuis et al., 2013).

2.3 - Le transport intraflagellaire : les particules

La majorité des particules de l'IFT ont été initialement isolées chez *Chlamydomonas* (Cole et al., 1998; Piperno and Mead, 1997) mais la caractérisation du complexe a été affinée grâce à des études réalisées plus tard chez la souris et *C.elegans* (Taschner et al., 2012). Les

particules de l'IFT sont organisées en deux grand complexes : **Le complexe A** (IFT-A) est composé de six protéines IFT43, IFT121, IFT122, IFT1369, IFT140 et IFT144 et **le complexe B** (IFT-B) est constitué de neuf protéines centrales, IFT22, IFT25, IFT27, IFT46, IFT52, IFT70, IFT72/74, IFT81, et IFT88 ; associées à cinq protéines périphériques, IFT20, IFT54, IFT55/57, IFT80 et IFT172.

Les fonctions des particules de l'IFT ont été étudiées dans de nombreux organismes et de manière générale, elles ont toutes montrées que l'absence d'un des composants du complexe B inhibe l'assemblage du cil et l'absence d'un des membres du complexe A conduit à la formation de cils plus courts qui accumulent les particules du complexe B, rappelant les phénotypes obtenus en l'absence de la dynéine cytoplasmique 2. Ces différences de phénotypes ont conduit à la notion selon laquelle les IFT-A et les IFT-B sont associés respectivement au transport rétrograde et antérograde (**Figure 12**).

Les particules de l'IFT sont des protéines riches en domaines d'interaction protéines-protéines tels que les domaines WD40 TRP (Tetratricopeptide Repeat Protein) ou coiled-coil (Cole, 2003). Elles sont considérées comme les principales intermédiaires entre les moteurs moléculaires et les cargos nécessaires à la fonction ciliaire. Pourtant, très peu de cargos ciliaires ont été identifiés en tant que partenaires directs des protéines de l'IFT. Il existe par exemple, une interaction directe entre IFT74/139, les chaînes légères des dynéines et les fibres radiales, les moteurs moléculaires et la tubuline, le complexe IFT74/IFT81 et la tubuline ou entre IFT88 et la rhodopsine (Bhogaraju et al., 2013; Bhowmick et al., 2009; Qin et al., 2004). Toutefois, les fonctions précises de chaque composant restent très peu caractérisées et des travaux révèlent l'existence d'adaptateurs spécifiques assurant l'intermédiaire entre les particules de l'IFT et les cargos ciliaires.

2.4 - Le transport intraflagellaire : les adaptateurs

Comme nous venons de le voir certains composants ciliaires sont directement associés aux protéines de l'IFT pendant le transport intraflagellaire. Ce n'est pas le cas pour toutes ces protéines puisque de nouveaux acteurs qui agissent en tant qu'adaptateur entre les protéines nécessaires à la fonction du cil et les particules de l'IFT commencent à être décrits.

Par exemple, la protéine MRJ (DnaJ member chaperone) assure la liaison entre les particules de l'IFT et la protéine GC1 (Photorécepteur guanylyl cyclase 1). Une diminution de la protéine induite par ARN interférence dans les cellules murines (IMCD3) n'affecte pas la taille du cil mais la localisation ciliaire de GC1 est réduite. La localisation du récepteur Smoothed, acteur clé de la voie Hedgehog n'est pas affectée, révélant la spécificité du mode d'action (Bhowmick et al., 2009). De la même façon, chez *Chlamydomonas*, la protéine ODA16 sert d'adaptateur entre la protéine du complexe B, IFT46 et les bras de dynéine externes. Encore une fois, l'absence de la protéine ODA16 n'affecte pas la taille du cil mais empêche la localisation axonémale des BDE alors que les mutants du gène IFT46 ne forment pas de cil (Ahmed and Mitchell, 2005; Ahmed et al., 2008).

Par ailleurs, chez le poisson zèbre, la protéine B9d2 interagit directement avec les protéines du complexe B, IFT88 et Fleer (IFT70) et avec l'Inversine qui est requise pour le transport efficace de l'opsine dans le segment externe des photorécepteurs. L'inversine, n'est pas liée aux particules de l'IFT et son maintien au sein du complexe dépend de B9d2. Le transport de la Périphérine/Rds, autre composant transmembranaire du segment externe des photorécepteurs est quant à lui indépendant de ce complexe, suggérant que le mode de transport par les IFT est différent entre ces deux protéines. Ces résultats suggèrent que B9d2 assure la liaison entre les protéines de l'IFT et l'Inversine mais la topologie de ce complexe et son site d'assemblage sont encore inconnus (Zhao and Malicki, 2011).

Globalement ces résultats montrent qu'il existe des protéines associées au transport intraflagellaire qui confèrent une spécificité dans les cargos transportés. L'élucidation des partenaires assurant cette spécificité est critique pour comprendre la diversité et la sélection des fonctions ciliaires dans les différents types cellulaires et à un instant précis du développement.

2.5 - La régulation du transport intraflagellaire

Le transport intraflagellaire est un mécanisme finement régulé qui fait intervenir plusieurs acteurs à différents niveaux. Tout d'abord, la localisation des protéines de l'IFT n'est pas restreinte au compartiment ciliaire puisqu'elles sont enrichies à la base du cil dans la région du corps basal. Il existe également une co-localisation partielle entre les deux

complexes (IFT-A et IFT-B), potentiellement au niveau de la zone de transition (Deane et al., 2001; Hou et al., 2007; Reiter et al., 2012). Une étude réalisée chez *Chlamydomonas* montre que les composants du complexe B s'assemblent entre eux pour former un complexe au niveau du corps basal puis ils transloquent au niveau de la zone de transition où ils s'associent à leurs cargos incluant le complexe A. Ceci suggère que l'assemblage des trains de l'IFT semble se faire au niveau de la zone de transition et la protéine IFT88 est un acteur indispensable dans cette étape (Richey and Qin, 2012).

Le passage des trains d'IFT et plus globalement des protéines à travers la zone de transition, est encore très peu compris. Toutefois, l'utilisation d'un système de capture d'une protéine soluble diffusant dans le cil primaire a permis de montrer que les protéines solubles diffusent librement dans le compartiment ciliaire mais la diffusion est d'autant plus lente que la protéine possède un haut poids moléculaire. La perméabilité de la barrière ciliaire est similaire à un maillage avec des propriétés de tamis moléculaires rappelant les mécanismes observés pour le pore nucléaire (Mohr et al., 2009). De plus, les nucléoporines composants des pores nucléaires sont localisées à la base des cils primaires et motiles et leur inhibition bloque l'entrée du moteur de l'IFT KIF17. De même, les composants de la machinerie d'import nucléaire, les RAN GTPase et les importines régulent l'entrée de KIF17 dans le cil (Dishinger et al., 2010; Fan et al., 2007; Fan et al., 2011; Kee et al., 2012).

Les protéines du BBSome, complexe octamérique composé de huit protéines, BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8, BBS9 et BBIP10 jouent également un rôle essentiel dans la régulation du transport intraflagellaire. Les protéines BBS se déplacent le long de l'axonème à la même vitesse que les protéines motrices et les particules des complexes A et B (Blacque et al., 2004; Nachury et al., 2007; Ou et al., 2005; Ou et al., 2007). Dans les souris invalidées pour les gènes *Bbs*, la formation des cils n'est pas affectée et elle s'accompagne dans de rares cas de défauts ultra structuraux mineurs (Nishimura et al., 2004; Mykytyn et al., 2004; Ross et al., 2005; Davis et al., 2007; Zhang et al., 2012). Chez *C.elegans*, la perte de fonction de BBS1, BBS7 ou BBS8 provoque la dissociation des complexes A et B transitant chacun de leur côté avec OSM-3 et l'accumulation à la zone de transition du récepteur TRPV (Transient Receptor Potential Vanilloid, OSM-9) normalement localisé dans le cil (Ou et al., 2005; Ou et al., 2007; Tan et al., 2007). La localisation ciliaire des récepteurs SSTR3 et MCHR1 est également perdue dans les souris mutantes pour les gènes *Bbs2* et *Bbs4*. Plus récemment, il a été montré que le BBSome est nécessaire pour l'association des complexes A

et B à la base du cil et à l'extrémité lors de la transition au passage rétrograde (Wei et al., 2012). L'ensemble de ces données montre que le BBSome régule l'assemblage de l'IFT aussi bien à la base qu'à l'extrémité du cil et qu'il fonctionne comme principal organisateur de l'IFT-A, l'IFT-B, des récepteurs ciliaires membranaires et autres cargos de l'IFT en une seule unité prête au transport de l'IFT.

Enfin, le transit le long des microtubules axonémaux des complexes multi protéiques est une étape déterminante dans laquelle les tubulines axonémales sont des actrices clés. En effet, elles sont soumises à de multiples modifications post traductionnelles comme la détyrosination, la polyglutamylation ou la polyglycylation, qui influencent notamment le déplacement des moteurs de l'IFT. Par exemple, chez le nématode la protéine CCPP-1, orthologue de l'enzyme de déglutamylation CCPP-1 chez la souris, est nécessaire à la régulation des kinésines ciliaires OSM-3 et KLP6. En effet, dans les mutants pour ce gène, KLP6 s'accumule dans le cil sensoriel et la vitesse de déplacement de OSM-3 est augmentée (O'Hagan et al., 2011). De plus, OSM-3 est inactive dans les cils des mutants *dyf-1* chez *C.elegans*, l'homologue de *fleer* chez le poisson zèbre qui est nécessaire à la polyglutamylation des tubulines axonémales (Ou et al., 2005; Pathak et al., 2007).

En conclusion, les protéines de l'IFT peuvent donc être régulées à plusieurs niveaux et toute altération dans la régulation de ce mécanisme influence directement l'assemblage et le fonctionnement du cil.

2.6 - Autres fonctions

Outre leur rôle critique dans la formation et la maintenance des cils, les protéines de l'IFT sont également présentes dans les cellules non ciliées et ont été impliquées dans des processus cellulaires comme la mitose, le trafic vésiculaire intracellulaire ou la formation de la synapse immunologique (Baldari and Rosenbaum, 2010; Griffiths et al., 2010; Sedmak and Wolfrum, 2010).

La protéine IFT88, composant central du complexe B est localisée au centrosome dans les cellules en prolifération (Hela ou RPE1). La surexpression de cette protéine dans les cellules Hela qui ne forment pas de cils empêche la transition G1→S et enclenche l'apoptose.

La perte de fonction conduit à une accélération du cycle cellulaire en activant la voie du rétinoblastome (Robert et al., 2007). De plus, IFT88 est essentielle à la machinerie de division cellulaire puisque la perte de fonction de cette protéine conduit à la mauvaise orientation du fuseau mitotique avec des microtubules astraux plus courts ou absents dans les cellules Hela ou chez le poisson zèbre. Plus précisément, elle fait partie d'un complexe incluant IFT20 et IFT52, conduit par la dynéine 1. Ce complexe est chargé de transporter des groupes de microtubules contenant les protéines de nucléation des microtubules jusqu'au pôle de division permettant ainsi la formation correcte des microtubules astraux et l'orientation normale du fuseau mitotique (Delaval et al., 2011).

De manière surprenante les protéines de l'IFT sont également essentielles à l'assemblage de la synapse immunologique où la translocation du MTOC et de l'appareil de Golgi au niveau de la membrane à la jonction cellule T et APC (cellule présentatrice d'antigène) est une étape critique. Outre son rôle dans le tri des protéines ciliaires dans le réseau de l'appareil de Golgi, la protéine IFT20 est impliquée dans le recyclage polarisé des TCRs (recycling of T-cell receptors). En effet, en l'absence de cette protéine dans les cellules Jurkat (cellules lymphatiques T), l'association TCR/CD3 est perdue au niveau de la synapse immunologique et l'activation par les cellules présentatrices d'antigène n'a pas lieu (Finetti et al., 2009). Les auteurs de l'étude montrent que lors de l'engagement de la cellule T avec APC, IFT20 favorise le regroupement des TCRs au niveau de la synapse immunologique grâce au recyclage polarisé en association avec les protéines IFT57 et IFT88 (Finetti et al., 2009).

Ces résultats fournissent la première preuve impliquant les protéines de l'IFT dans le trafic membranaire des cellules ne possédant pas de cils, introduisant ainsi de nouvelles perspectives sur leurs fonctions au-delà de leur rôle dans la ciliogenèse. En effet elles pourraient plus globalement participer au trafic intracellulaire pas uniquement basé sur l'association microtubulaire mais également membranaire.

3. Régulation de la taille du cil

Un des aspects intrigant de la biologie ciliaire est le fait qu'en général les cils sont de taille constante, bien que variant considérablement d'un type cellulaire à l'autre. Par exemple, les cils des cellules en culture de mammifère mesurent environ 3 μm contre environ 50 μm

pour les cils olfactifs des mammifères. Ces observations suggèrent que la taille du cil est régulée et qu'elle est importante pour sa fonction. Ainsi, la question est de savoir quels sont les mécanismes qui régulent la taille des cils d'un type cellulaire à l'autre. Pour le moment, il n'existe aucun consensus et des acteurs aux fonctions cellulaires très variées semblent impliqués dans ce processus. Quelques exemples seront cités dans la suite de cette partie.

Pour commencer, nous pouvons mentionner les enzymes modifiant l'axonème dont l'absence peut influencer la taille du cil. Par exemple la déacétylation de la tubuline axonémale par HDAC6 induit la résorption du cil et la perte de fonction de l'acétyltransférase α TAT1 retarde l'assemblage du cil primaire (Pugacheva et al., 2007; Shida et al., 2010). Plus généralement, les travaux relatifs aux enzymes de modifications des tubulines ont montré qu'elles sont indispensables à la stabilité de l'axonème. En effet, chez la drosophile, la perte de fonction par ARN interférence chez la drosophile de la glycylase TTLL3B engendre des défauts structuraux de l'axonème des flagelles avec une déstabilisation de ceux-ci aux stades tardifs (Rogowski et al., 2009). De plus, chez *Tetrahymena* la présence de chaînes d'hyperglutamylation causées par la surexpression de Ttll6Ap provoque une déstabilisation des microtubules axonémaux (Wloga et al., 2010).

Par ailleurs, la liste des molécules impliquées dans la signalisation intracellulaire affectant la stabilité des cils ou leur taille ne cesse de s'accroître (Broekhuis et al., 2013) et comme nous l'avons vu, le rôle des protéines régulant l'entrée dans le compartiment ciliaire est également déterminant. Pourtant, au milieu de tous ces acteurs, les protéines de l'IFT apparaissent comme les principaux candidats pour réguler la taille du cil. Tout d'abord, l'assemblage du cil est clairement dépendant du transport intraflagellaire et chez *Chlamydomonas*, la quantité totale des protéines de l'IFT est la même quelque soit la taille du cil (Marshall et al., 2005). De plus, dans les petits flagelles en cours de formation les trains de l'IFT forment de longs trains qui se déplacent lentement. A l'inverse les trains de l'IFT sont petits et bougent rapidement dans les flagelles entièrement formés (Engel et al., 2009). Ces résultats ne sont pas identiques chez les mammifères. En effet, dans les cellules de rein de souris lorsque le cil est en élongation, la vitesse du transport antérograde est augmentée alors que celle du transport rétrograde n'est pas affectée et il y a une accumulation de matériel à l'extrémité du cil. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la taille du cil est la conséquence d'une élévation du nombre de précurseurs dans le cil. Toutefois, la taille des

trains de l'IFT et la quantité totale des protéines de l'IFT n'ont pas été analysées dans cette étude (Besschetnova et al., 2010).

Par ailleurs, chez *Chlamydomonas*, les mutants des MAPs Kinases, CNK2 ou LF4 forment des flagelles plus longs (Bradley and Quarmby, 2005; Ludington et al., 2013). Dans le simple mutant LF4, la vitesse des trains de l'IFT est augmentée pendant l'assemblage alors qu'elle n'est pas modifiée dans le simple mutant CNK2. Toutefois, chez ce dernier la vitesse des trains est diminuée lors de la résorption du flagelle et s'accompagne de défauts de résorption. Dans le double mutant, la vitesse des trains de l'IFT est augmentée pendant l'assemblage et lors de la résorption flagellaire et les flagelles sont très longs suggérant que la dérégulation de l'assemblage ciliaire observé dans le mutant LF4 est augmentée par une diminution de la résorption dans les mutants CNK2 (Hilton et al., 2013).

L'ensemble de ces données semble démontrer l'existence d'un mécanisme actif de détection de la taille, permettant de réguler la taille du cil probablement via une boucle de rétrocontrôle des vitesses d'assemblage et désassemblage. Un tel mécanisme n'a pour le moment pas été décrit chez les mammifères où le contrôle de la taille des cils reste très peu caractérisé. Toutefois, le rôle de la protéine KIF19A, localisée à l'extrémité des cils motiles est déterminant. En effet, KIF19A, régule la taille du cil en dépolymérisant les microtubules à l'extrémité des cils (Niwa et al., 2012). Ces résultats suggèrent que les mécanismes moléculaires contrôlant la taille des microtubules sont nécessaires pour déterminer la taille correcte des cils chez les mammifères. L'identification des facteurs se liant ou régulant KIF19A permettra probablement d'élucider certains des mécanismes moléculaires du contrôle de la taille du cil chez les mammifères.

En résumé, la régulation de la taille du cil est associée à de nombreux processus cellulaires mais les mécanismes sous jacents permettant leur fonctionnement coordonné restent très peu caractérisés. Toutefois, l'élucidation de ces mécanismes est fondamentale pour comprendre le rôle des cils au cours du développement et leur implication dans les maladies chez l'Homme.

4. Contrôle transcriptionnel de la ciliogenèse

Les cils et les flagelles sont des structures dynamiques qui peuvent croître et se résorber dans différentes conditions physiologiques, au cours du cycle cellulaire et tout au long du développement. La première étape d'une telle régulation implique la transcription des gènes impliqués dans l'assemblage du cil. Des études génétiques indépendantes, menées dans différents organismes, ont révélé plusieurs des acteurs clés contrôlant la transcription des gènes ciliaires et deux grandes familles de facteurs de transcription émergent de ces études : la famille FOXJ1 (*Forkhead Box J1*) et la famille RFX (*Regulatory Factor X*).

4.1 - Les facteurs de transcription FOXJ1 et les cils motiles

FOXJ1 appartient à la famille des facteurs de transcription *forkhead/winged-helix*. Des orthologues de FOXJ1 ont été identifiés chez les vertébrés ainsi que chez de nombreux invertébrés mais aucun orthologue n'a été identifié chez les ecdysozoaires tels que *C.elegans* et *Drosophila melanogaster* (Mazet et al., 2003).

Chez les mammifères, FOXJ1 est exprimé dans de nombreux tissus possédant des cils motiles et les souris invalidées pour *Foxj1* présentent des défauts d'asymétrie droite gauche et de l'hydrocéphalie, deux phénotypes connus comme résultant de défauts des cils motiles. Les souris *Foxj1*^{-/-} sont totalement dépourvues de cils motiles dans les épithéliums multiciliés. Ces défauts résultent de l'absence d'ancrage des corps basaux au niveau de la membrane apicale des cellules (Brody et al., 2000; Chen et al., 1998; Huang et al., 2003). Toutefois, la structure des cils motiles du nœud embryonnaire en 9+0 n'est pas altérée suggérant que seule la motilité des cils est affectée. FOXJ1 apparaît donc comme un facteur de transcription spécifique de la biogenèse des cils motiles chez la souris et cette conclusion a depuis été confirmée chez le poisson zèbre et le xénope (Stubbs et al., 2008; Yu et al., 2008).

Parmi les gènes cibles du facteur de transcription Foxj1, on distingue ceux nécessaires à la biogenèse des cils en général, comme l'IFT, les tubulines ou les enzymes de modification des tubulines ainsi que ceux nécessaires aux différents aspects fonctionnels et structuraux des cils motiles, incluant ceux impliqués dans l'assemblage, le transport et l'ancrage des bras de

dynéine, les composants du N-DRC, les fibres radiaires et la paire centrale (Thomas et al., 2010 et données non publiées).

4.2 - Les facteurs de transcription RFX

La deuxième classe de facteurs de transcription identifiés comme acteurs clés de la ciliogenèse au sein de nombreuses espèces est la famille des protéines RFX. Ces protéines possèdent un domaine de liaison à l'ADN très conservé appartenant à la famille des facteurs de transcription winged-helix (Gajiwala et al., 2000). Huit membres de la famille ont été identifiés chez les mammifères (RFX1-8), deux chez la drosophile et un seul chez la levure (SAK1 et Crt1 respectivement chez *Saccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae*) et *C.elegans* (DAF-19).

L'implication dans la ciliogenèse des protéines RFX a été mise en évidence chez *C. elegans* où *daf-19*, le seul gène RFX du nématode, est nécessaire à l'assemblage des cils sensoriels (Swoboda et al., 2000). Depuis, de nombreuses études ont été réalisées chez les métazoaires et elles ont toutes montrées la nécessité des facteurs de transcription RFX dans la mise en place et le maintien des cils primaires et motiles (Thomas et al., 2010). Chez la souris, et contrairement à ce qui a été observé chez les invertébrés, l'absence d'une protéine RFX ne conduit pas à la perte totale des cils dans les tissus examinés mais plutôt à des cils plus courts et moins nombreux.

De façon générale, les protéines RFX assurent le contrôle du transport de l'IFT en régulant la transcription des membres du complexe B, les BBS et les moteurs rétrogrades. Elles interviennent également dans le contrôle de l'expression des protéines associées au corps basal et à la zone de transition (Bialas et al., 2009; Phirke et al., 2011; Winkelbauer et al., 2005).

En résumé, FOXJ1 régule essentiellement les gènes impliqués dans la motilité ciliaire et dans le transport apical des corps basaux, alors que les protéines RFX régulent les gènes codant des protéines de l'IFT et celles requises pour l'ancrage du corps basal. FOXJ1 et RFX partagent également de nombreuses cibles communes impliquées dans la motilité ciliaire (Thomas et al., 2010). Cependant, de nombreux aspects concernant les interactions fonctionnelles entre ces deux facteurs de transcription restent à comprendre, de même que les mécanismes gouvernant la spécificité des cibles. Enfin, l'identification des gènes cibles de ces

protéines dans différents systèmes cellulaires s'est avérée très informative pour la découverte des nouveaux composants ciliaires.

D'autre part, des études récentes ont permis de révéler plusieurs des acteurs situés en amont de ces facteurs de transcription comme la protéine NOTO dans le nœud embryonnaire de souris (Alten et al., 2012; Beckers et al., 2007) ou la voie microARNs miR-449=>Notch=>multiciline pour la spécification des cellules multiciliées (Marcet et al., 2011; Stubbs et al., 2012). De plus, dans les cellules multiciliées chez la souris et le xénope, la multiciline et la protéine myb sont requises pour que les cellules développent des cils motiles (Stubbs et al., 2012; Tan et al., 2013). Plus précisément, la multiciline agit en amont de la protéine myb elle-même nécessaire à l'amplification centriolaire. De plus, elles sont toutes deux impliquées dans la régulation de Foxj1. Enfin, de nombreuses données suggèrent qu'il existe des mécanismes post-transcriptionnels pour contrôler les niveaux d'expression des gènes ciliaires dans de nombreuses conditions expérimentales et physiologiques. C'est le cas chez *Chlamydomonas* ou chez l'oursin, où les mécanismes post-transcriptionnels sont impliqués dans la régulation des gènes de la tubuline après des expériences de déciliation (Baker et al., 1986).

L'ensemble de ces données met en avant l'existence d'une régulation extrêmement fine de l'expression des gènes ciliaires par un réseau complexe de différents facteurs et démontre que la régulation des gènes ciliaires est donc une étape clé pour comprendre le développement animal.

III Fonctions ciliaires chez les vertébrés

Les cils sont présents à la surface de presque toutes les cellules chez les mammifères où ils assurent des fonctions primordiales à leur physiologie. Ainsi, il est peu surprenant que des mutations dans les gènes ciliaires provoquent des phénotypes pléiotropiques en fonction du tissu affecté. Chez l'Homme, ces maladies sont regroupées sous le terme de **ciliopathies**. Elles englobent une gamme de symptômes dont la sévérité et la gravité peuvent varier fortement en fonction de la nature et du nombre de gènes mutés.

Dans cette partie, je présenterai quelques exemples des fonctions clés assurées par les cils motiles et les cils primaires au cours du développement et chez l'adulte. Je finirai par une présentation des différentes ciliopathies.

1. Les cils motiles

Comme leur nom l'indique, les cils motiles sont impliqués dans le mouvement grâce auquel ils assurent des fonctions physiologiques essentielles. La fonction la plus connue est peut être celle des multicils de la trachée dont le battement coordonné permet l'écoulement du mucus et des débris associés loin des poumons. De la même manière, les cellules épendymaires multiciliées du cerveau facilitent l'écoulement du liquide céphalorachidien (CSF). En l'absence d'un débit correct, il y a accumulation du CSF, la pression devient excessive dans les ventricules latéraux ce qui entraîne fréquemment la mort cellulaire, avec à terme un amincissement du cortex cérébral. Finalement, les cils et les flagelles du système reproductif, essentiels pour la fertilité ont également une fonction motile. La motilité du flagelle du spermatozoïde permet le déplacement de celui-ci et tout défaut de motilité est généralement associé à la stérilité chez l'Homme. Moins connu mais tout aussi important, les cellules multiciliées tapissant les trompes de Fallope sont nécessaires au transport de l'ovocyte depuis l'ovaire jusqu'à l'utérus. Tout défaut ciliaire peut empêcher ce transport et de fait prévenir une future fécondation (Leigh et al., 2009). Les cils motiles sont donc indispensables au maintien de l'homéostasie tissulaire et à la reproduction chez l'adulte. Par ailleurs, des études initiées chez la souris ont permis de révéler le rôle essentiel de ceux ci très tôt au cours de l'embryogenèse notamment au stade gastrula dans le nœud embryonnaire pour la mise en place de la latéralité. Cette fonction sera discutée dans les deux paragraphes suivants.

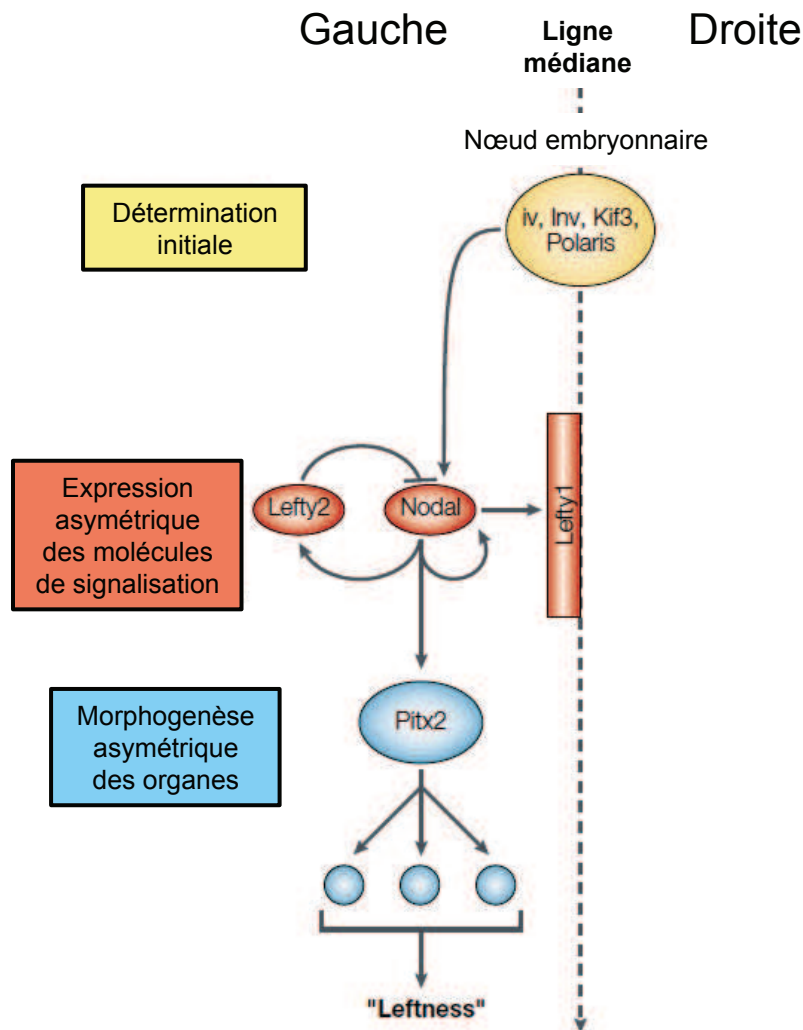


Figure 13 : Représentation schématique de la détermination de l'asymétrie droite-gauche.

La cassure initiale de l'asymétrie droite-gauche se fait dans le nœud embryonnaire ou à proximité de celui-ci. Le premier événement est l'expression de la protéine NODAL du côté gauche de l'embryon. Son domaine d'action est limité par les protéines LEFTY, en particulier au niveau de la ligne médiane dorsale. NODAL régule essentiellement PITX2, et d'autres protéines impliquées dans la morphogenèse asymétrique des organes. Adapté de Hamada et al., 2002.

1.1 - Les cils motiles du nœud embryonnaire

Les cils nodaux sont présents à la surface des cellules du nœud embryonnaire, lui-même localisé sur la surface ventrale de l'embryon. Le nœud embryonnaire est une structure qui se forme de façon transitoire au cours du développement précoce et qui est requise pour l'établissement de l'asymétrie droite gauche. Il n'y a qu'un cil par cellule comme pour les cils primaires mais contrairement à ces derniers, les cils du nœud embryonnaires sont motiles. De manière surprenante ces cils motiles sont dépourvus de paire centrale (9+0) mais possèdent les bras de dynéines nécessaires à la motilité chez la souris et les médakas. Toutefois une étude réalisée chez la souris révèle la présence d'une paire centrale sur certaines portions de l'axonème (Caspary et al., 2007). De plus, certains cils motiles du nœud embryonnaire chez le poisson zèbre (Vésicule de Kupffer) et le lapin (nœud de Hensen) sont également pourvus d'une paire centrale. Des axonèmes en 9+4 ont également été identifiés chez ce dernier (Feistel and Blum, 2006). Ainsi la présence ou l'absence de paire centrale n'apparaît pas comme essentielle à la génération du battement ciliaire. Contrairement aux autres cils motiles qui battent dans le plan, les cils du nœud embryonnaire ont un mouvement rotatoire dans le sens des aiguilles d'une montre (observation du côté ventral). Ce mouvement conduit à la création d'un flux extra embryonnaire, **le flux nodal**, élément chiral supposé, qui permet de rompre la symétrie embryonnaire en distribuant la protéine NODAL du futur côté gauche de l'embryon (Nonaka et al., 1998).

Brièvement, chez la souris, NODAL (un membre de la famille des TGF- β) est exprimé dans le nœud embryonnaire puis se restreint du côté gauche de la ligne médiane de la plaque du plancher. Son domaine d'expression s'étend dans le mésoderme latéral gauche où LEFTY 2, un antagoniste de NODAL, est ensuite activé. LEFTY 2 inhibe NODAL ce qui restreint spatialement la cascade de signalisation NODAL et fige l'asymétrie. De l'autre côté de la ligne médiane, LEFTY 1 agit en tant que barrière pour empêcher l'amplification de NODAL. Le gène *Pitx2* induit par NODAL régule l'expression asymétrique des gènes effecteurs important pour la morphogenèse des organes en développement (**Figure 13**) (Hamada et al., 2002).

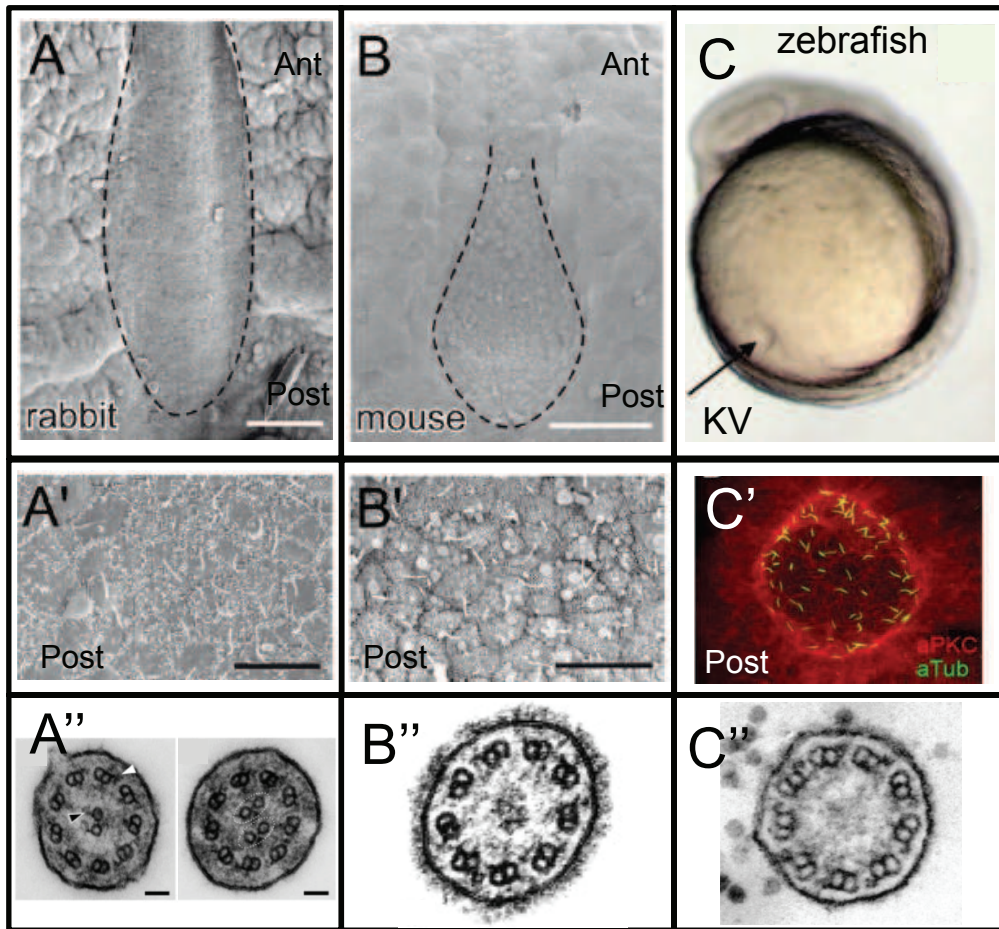


Figure 14 : Comparaison des structures nécessaires à l'asymétrie chez les vertébrés.

A- La zone pointillée délimite la plaque de la notochorde chez le lapin à 3 somites. La partie la plus postérieure appelée PNC constitue l'organe de l'asymétrie. **B-** Le nœud embryonnaire chez la souris (E8.0) est situé en position ventrale et est délimité par les pointillés. **C-** Chez le poisson zèbre, la structure permettant l'asymétrie est la vésicule de Kupffer. Elle se situe en position ventrale dans la continuité de la notochorde. **A'-C'-** Agrandissement des nœuds embryonnaires de chaque espèce révélant la présence d'un cil par cellule situé au pôle postérieur de celle-ci. **A''-C''-** Ultrastructure des cils du nœud embryonnaire. Des axonèmes en 9+2 et 9+4 sont présents chez le lapin (A') et en 9+0 ou 9+2 sont observés chez la souris (B') et le poisson zèbre (C'). (A, A', A'', B et B'') Adapté de Blum et al., 2009. (C, C') Amack lab home Page. (B'') Caspari et al., 2007. (C'') Gao et al., 2010. Ant (Antérieur) Post (Postérieur).

La connexion entre le cil et l'asymétrie droite gauche résulte probablement de l'étude des souris mutantes pour les gènes *Kif3a* et *Kif3b*. En effet, dans ces mutants, les cils du nœud embryonnaire sont absents et les souris présentent des défauts de latéralité (Nonaka et al., 1998; Takeda et al., 1999). Ces résultats ont été confortés par l'analyse des mutants murins du gène *iv* qui code une chaîne lourde des dynéines axonémales (nommée Left-right dynein - LRD) présente dans les cils motiles du nœud. Cette fois-ci la taille des cils n'est pas affectée mais ils sont immotiles et les souris présentent également des défauts d'asymétrie droite gauche (Okada et al., 1999; Supp et al., 1997; Supp et al., 1999). L'analyse des mutants du facteur de transcription ciliogénique *Rfx3* ou du gène *Dpcd* (Deleted in primary ciliary dyskinesia) renforce le lien entre cil motile et mise en place de l'asymétrie. En effet, les mutants murins de ces deux gènes possèdent des défauts d'asymétrie droite gauche. Ici, le nombre de cils nodaux est faiblement diminué (de l'ordre de 20 à 30%) par rapport aux contrôles, mais très peu sont motiles (en général deux). Ces résultats montrent que les défauts de latéralité observés pour ces deux mutants résultent en partie de l'absence de motilité des cils motiles du nœud. Pourtant, de manière surprenante Shinohara K et ses collègues ont démontré que ces deux cils motiles sont suffisants pour générer un faible flux nodal transitoire, permettant d'initier l'asymétrie. La localisation géographique de ceux-ci n'affecte en rien cette fonction (Shinohara et al., 2012).

La motilité ciliaire, le flux nodal et la cascade d'expression asymétrique des gènes sont des processus conservés puisqu'ils sont également requis pour la mise en place de la latéralité chez le poisson zèbre, le médaka, le xénope ou le lapin (**Figure 14**) (Essner et al., 2005; Hojo et al., 2007; Okada et al., 2005; Schweickert et al., 2007). Cependant, une des questions majeures reste l'identification des mécanismes qui permettent au flux nodal de générer l'asymétrie droite gauche. Actuellement deux modèles non exclusifs ont été proposés et seront discutés dans le paragraphe suivant.

1.2 - La détection du flux dans le nœud embryonnaire

Comme nous venons de le voir, la question est de savoir comment le flux nodal est « perçu » par l'embryon. Ce sujet fait l'objet de nombreuses études qui ont permis d'avancer deux modèles dépendant de la fonction ciliaire.

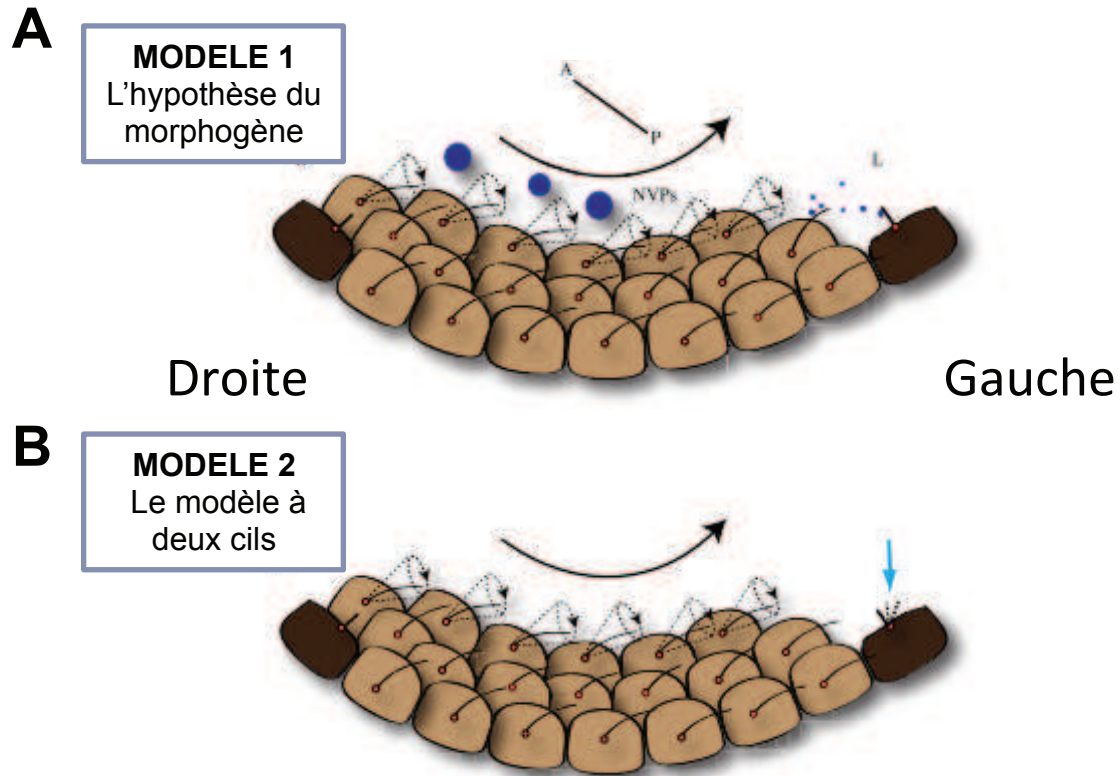


Figure 15 : Deux modèles expliquant la cassure asymétrique via le flux nodal au niveau du nœud embryonnaire chez la souris. Vue transverse, côté ventral vers le haut.

A- Le premier modèle suggère qu'un morphogène ou des particules lipidiques nommées NVPs (ronds bleus) sont transportés du côté gauche du nœud en réponse au flux nodal (flèche noire). **B-** Dans le second modèle, le flux nodal généré par le battement des cils motiles est détecté par les cils non motiles situés en périphérie du nœud (Flèche bleue, cellule marron foncée). La localisation ciliaire de la polycystine 2 est indispensable à ce processus. Dans les deux cas l'enrichissement du côté gauche conduit à la cascade d'expression asymétrique des gènes. Adapté de Babu et al., 2013.

L'hypothèse du morphogène suggère que la rotation des cils du nœud embryonnaire induit le transport unidirectionnel d'un morphogène sécrété sur le côté gauche de l'embryon. Il s'agit d'un modèle simplifié dans lequel le battement ciliaire permet l'enrichissement d'un morphogène du côté gauche au détriment du côté droit ce qui initie la cascade de signalisation à l'origine de l'asymétrie (Nonaka et al., 1998). La nature du morphogène impliqué reste non identifié mais l'observation de particules lipidiques flottant dans la cavité nodale renforce cette hypothèse. Renommées nodal vesicular parcels (NVPs), elles sont transportées du côté gauche de façon dépendante du battement ciliaire où elles se cassent et libèrent leur contenu (**Figure 15**) (Tanaka et al., 2005). Les mécanismes de rupture ne sont pas dus à leur contact avec le cil ni avec le flux, mais sont plutôt consécutifs à un processus chimique encore non identifié (Cartwright et al., 2007). Bien que très attrayant, certains éléments de ce modèle, tels que les mécanismes de libération des NVPs et la nature des morphogènes nécessitent d'être approfondis.

Le second modèle est appelé **modèle à deux cils**. Ce processus met en jeu deux populations de cils qui exercent des fonctions complémentaires au niveau du nœud embryonnaire. Le battement coordonné des cils motiles situés au centre permet de générer le flux nodal qui est ensuite détecté par les cils non motiles présents à la périphérie du nœud (**Figure 15**). Cette hypothèse ajoute un niveau de complexité en séparant la capacité de générer un flux et la capacité d'y répondre. Ce modèle fait intervenir la Polycystine-2, protéine à canal calcique localisée dans les cils motiles et non motiles du nœud. En effet les souris mutantes pour cette protéine présentent des défauts de latéralité et l'enrichissement calcique habituellement observé du côté gauche du nœud est absent (Pennekamp et al., 2002). Une très belle étude menée par Yoshida et al. en 2012 révèle que l'expression de *Pkd2* dans les cellules situées en périphérie du nœud est suffisante pour induire la cassure asymétrique. La localisation ciliaire de la Polycystine-2 est indispensable à ce processus. De plus l'application d'un flux artificiel dans le nœud embryonnaire de souris dépourvues de cils (mutant *Kif3a*) est suffisante pour initier la cascade de signalisation de latéralité. Ainsi les auteurs ont proposé un modèle dans lequel le flux nodal est détecté via les protéines Polycystines-2 localisées dans les cils non motiles des cellules présentes en périphérie du nœud initiant ensuite la cascade de signalisation nécessaire à l'établissement de l'asymétrie droite gauche (Yoshida et al., 2012). Ce modèle cadre bien avec l'hypothèse à deux cils mais les mécanismes qui permettent la détection du flux ou des morphogènes restent inconnus.

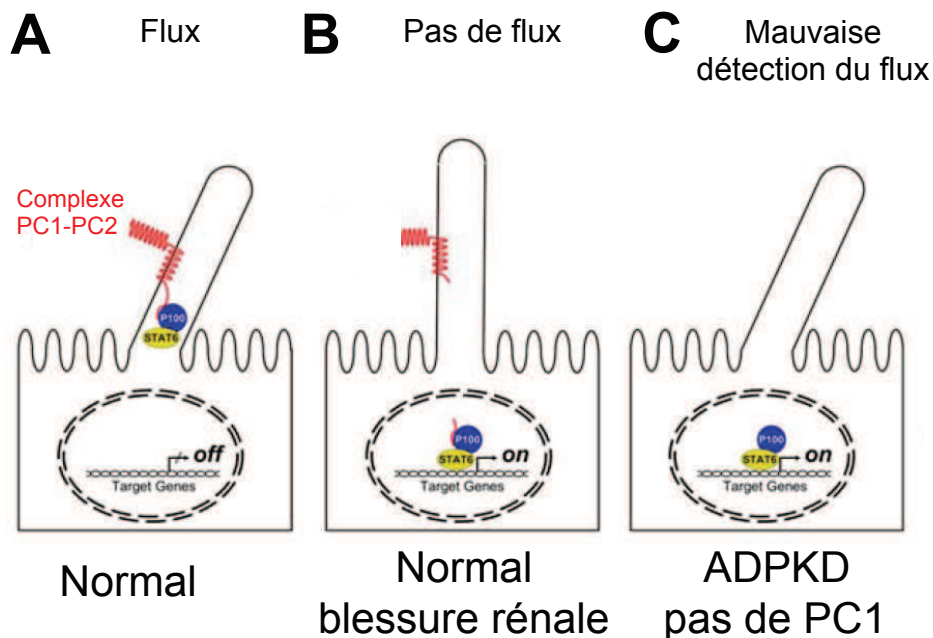


Figure 16 : Cils des tubules rénaux et polycystines

A- En condition normale, le flux urinaire induit la flexion du cil ce qui génère un influx calcique à l'intérieur de la cellule. Le complexe PC1-PC2 localisé dans le cil régule l'entrée de cette influx. Le calcium intracellulaire agit comme second messenger en régulant des voies cellulaires impliquées dans l'homéostasie ou la prolifération. **B-** En condition normale et en absence de flux, l'extrémité C-Terminal de PC1 est clivée et transloquée dans le noyau en association avec STAT6 et P100 où ils activent un programme transcriptionnel impliqué dans la réparation tissulaire des cellules épithéliales. **C-** Dans le cas d'un rein polykystique, sans PC1 ou avec une forme mutée de PC1 le complexe STA6/P100 n'est plus séquestré dans le cil activant de manière constitutive les gènes cibles. Adapté de Low et al., 2006.

Ces deux modèles ne sont pas exclusifs puisque la nature des « senseurs » moléculaires du flux reste inconnue. Toutefois, ils révèlent que la motilité des cils n'est pas l'unique facteur à prendre en compte et que la fonction sensorielle de ceux-ci apparaît comme déterminante pour la mise en place correcte de l'asymétrie droite gauche.

2. Les cils primaires

Les cils primaires sont présents à la surface de la majorité des cellules de mammifères à l'exception du lignage lymphoïde / myéloïde et des hépatocytes différenciés (<http://www.bowserlab.org/primarycilia/cilialist.html>). Ils assurent un rôle sensoriel majeur grâce aux propriétés distinctes de la membrane ciliaire. En particulier il est désormais clairement établi que plusieurs récepteurs, canaux ioniques et transporteurs sont concentrés au niveau du cil primaire. Le compartiment ciliaire est également un régulateur clé des voies de signalisation bien connues telles que Hedgehog (Hh), platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) alpha, ou Wingless (Wnt).

2.1 - Les cils primaires des tubules rénaux

La première fonction sensorielle attribuée au cil fut la mécano-sensibilité dans le contexte de la physiologie du rein. Selon le modèle actuel, le flux d'urine est détecté par les cils primaires présents à la surface de l'épithélium des tubes collecteurs. La force du courant fait plier le cil, ce qui génère un influx calcique à l'intérieur de la cellule (Praetorius HA, 2001). Cette réponse calcique est médiée par un complexe mécano-sensoriel formé des Polycystines 1 et 2 (PC1 et PC2) (Nauli et al., 2003). Ces deux protéines sont localisées dans le cil et forment un complexe à la membrane plasmique. Le domaine coiled-coil de l'extrémité C-Terminal de PC1 interagit avec PC2, canal à cation perméable au calcium. L'influx calcique induit la libération du calcium présent dans le réticulum endoplasmique après l'activation des récepteurs à Ryanodine et Inositol triphosphate (InsP3) (Li et al., 2009; Nauli et al., 2003; Samuels et al., 2010). L'augmentation locale de la concentration cytoplasmique en calcium permet de réguler les nombreux processus intracellulaires nécessaires au maintien de l'homéostasie tissulaire comme ceux impliqués dans la prolifération cellulaire (Harris and Torres, 2009). De plus, en l'absence de flux, PC1 subit un clivage protéolytique qui libère l'extrémité C-Terminal. Cette forme clivée transloque dans le

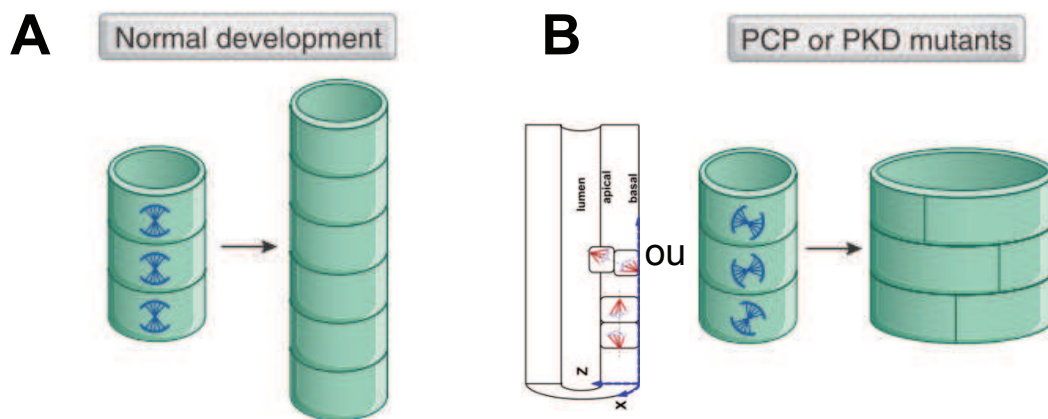


Figure 17 : Implication de la voie Wnt/PCP dans les polykystoses rénales.

A- En condition normale, les cellules du rein se divisent de manière orientée dans un même plan ce qui conduit à l'allongement du tubule. **B-** Lorsque l'orientation des divisions se fait de manière aléatoire et/ou pas dans le plan, le tubule rénal devient plus large et plus court. C'est le cas lors de mutations dans les gènes de la voie Wnt/PCP mais également pour les gènes impliqués dans la formation ou la fonction ciliaire. Adapté de McNeill et al., 2009 et Happé et al., 2011.

noyau où elle stimule un programme transcriptionnel en association avec STAT6 et P100 (Low et al., 2006). L'inactivation de STAT6 dans un modèle murin de polykystose rénale diminue la prolifération cellulaire et l'expansion kystique (**Figure 16**). Les auteurs de cette étude ont donc proposé que la voie de signalisation STAT6 est impliquée dans la réparation épithéliale du tubule rénal en initiant un programme de prolifération et de différenciation (Olsan et al., 2011).

Les polycystines 1 et 2 sont codées respectivement par les gènes *PKD1* et *PKD2*, dont les mutations sont responsables respectivement de 85% et 15% des cas de polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD Autosomal dominant polycystic kidney disease). Cette maladie génétique rénale est la plus commune chez l'Homme et elle se caractérise par l'apparition lente et progressive de kystes rénaux. D'un point de vue macroscopique, le kyste apparaît comme une dilatation présente sur le tubule. Lorsque celui-ci s'agrandit il perd ses connections avec le tubule d'origine et les cellules s'organisent pour former des structures sphériques et non plus tubulaires. Au niveau cellulaire, l'expansion kystique est la conséquence d'anomalie de différenciation et de prolifération résultant le plus souvent d'une prolifération cellulaire non régulée. La fonction sensorielle du cil apparaît comme déterminante dans la régulation de la balance proliférative notamment à travers la fonction essentielle des polycystines.

De plus, de nombreux mutants des protéines associées au cil (comme les protéines de l'IFT) ou au corps basal et qui perturbent la fonction du cil développent également des kystes. Chez le poisson zèbre par exemple, la formation de kyste est observée dans les mutants ou morphants *ift57/88*, *dnah9* (dynéine axonémale), *ldr1* (*left – right dynein related 1*) ou *wtip* (protéine associée au corps basal (Bubenshchikova et al., 2012; Essner et al., 2005; Kramer-Zucker et al., 2005).

Par ailleurs, la voie de signalisation Wingless (Wnt) joue un rôle crucial dans l'expansion kystique grâce à son rôle dans la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans la prolifération ou la différenciation (Wnt canonique) ou à celui associé à la polarisation tissulaire et plus précisément à l'orientation dans le plan des divisions cellulaires (voir chapitre 3.5). Par exemple, la voie Wnt canonique est sur-activée dans les souris invalidées pour le gène *Pkd1* (Happé et al., 2011a; Lal et al., 2008) et l'orientation des fuseaux mitotiques est altérée dans les reins pré-kystiques (Luyten et al., 2010). De même certains mutants des gènes

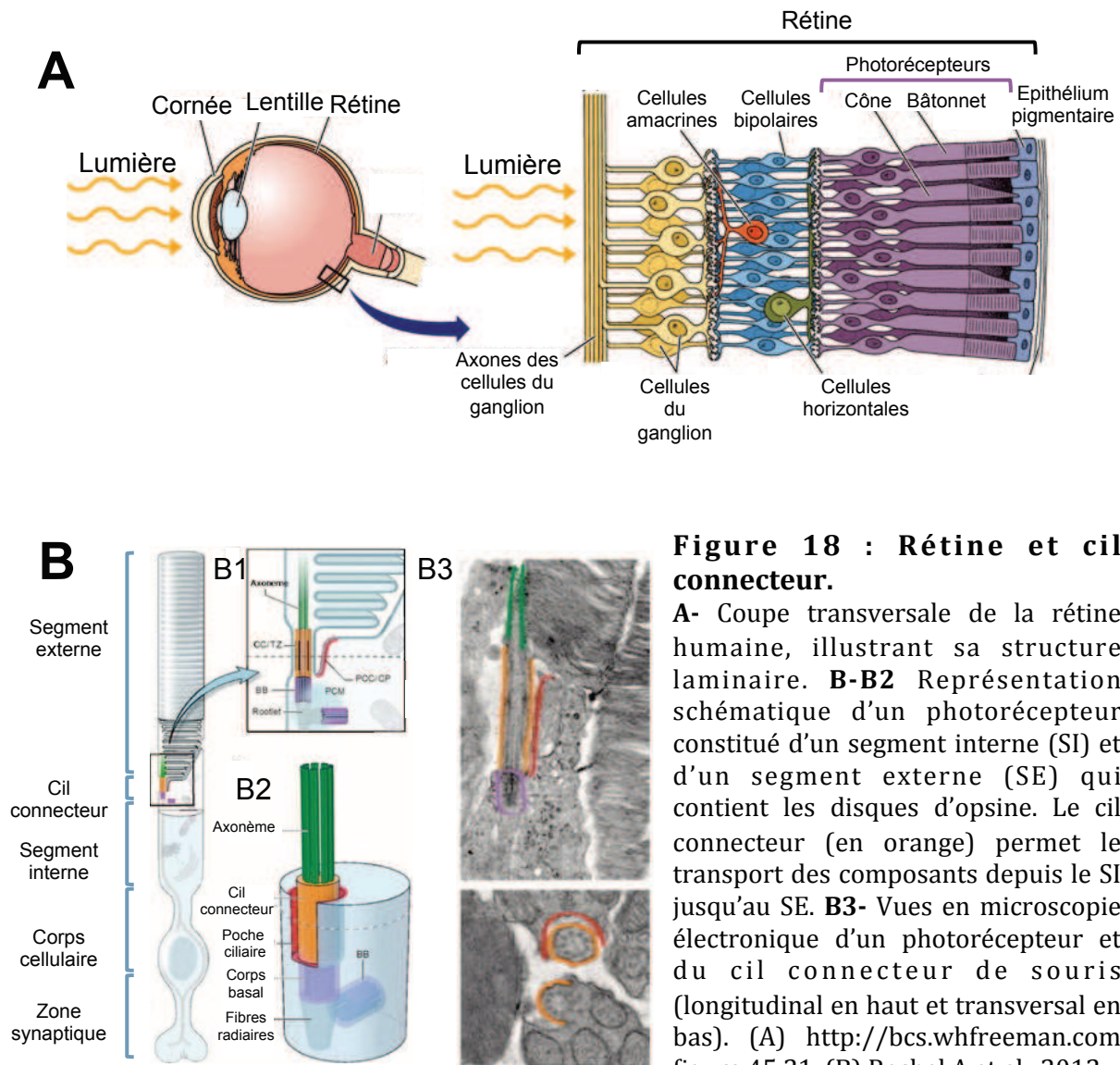


Figure 18 : Rétine et cil connecteur.

A- Coupe transversale de la rétine humaine, illustrant sa structure laminaire. **B-B2** Représentation schématique d'un photorécepteur constitué d'un segment interne (SI) et d'un segment externe (SE) qui contient les disques d'opsine. Le cil connecteur (en orange) permet le transport des composants depuis le SI jusqu'au SE. **B3-** Vues en microscopie électronique d'un photorécepteur et du cil connecteur de souris (longitudinal en haut et transversal en bas). (A) <http://bcs.whfreeman.com> figure 45.21. (B) Rachel A et al., 2012

de la voie Wnt (ex Wnt7b, Wnt 9b) développent des kystes rénaux et présentent des défauts d'orientation du fuseau mitotique (Karner et al., 2009; Yu et al., 2009). Enfin les souris mutantes pour les gènes ciliaires *Ift20* ou *Kif3a* développent des kystes et présentent des défauts d'orientation du fuseau mitotique (**Figure 17**) (Jonassen et al., 2008; Patel et al., 2008). Cependant, les défauts d'orientation des fuseaux mitotiques ne suffisent pas à expliquer l'expansion kystique, puisque la formation de kyste est observée dans des souris invalidées pour le gène *Ift40* qui ne possèdent pas ce phénotype (Jonassen et al., 2012). En résumé, la voie Wnt et le cil semble être étroitement liés, notamment dans la morphogenèse et l'homéostasie du tube rénal, mais pas seulement (Happé et al., 2011a; Takiar and Caplan, 2011). Les autres aspects reliant la voie Wnt et le cil seront discutés dans le paragraphe 3.5.

En conclusion, chez les vertébrés le rôle mécanorécepteur assuré par les cils des tubules rénaux est essentiel pour l'homéostasie tissulaire et tout dysfonctionnement est associé à la formation de kyste.

3. Les cils modifiés : quelques exemples

3.1 - Le cil primaire des photorécepteurs de la rétine

Chez les vertébrés, la rétine est composée de cinq couches de neurones empilées dans le sens radial de la surface de la rétine jusqu'au fond de l'œil. Les cellules photoréceptrices (cônes et bâtonnets) sont constituées d'un segment interne (SI) qui contient le noyau et les autres organites ainsi que d'un segment externe (SE) composé de disques membranaires. Le SE des cônes est enrichi en opsine, groupe de protéines membranaires couplées aux récepteurs à protéines G. Elles sont requises pour la conversion du message lumineux en message chimique. Le SI et le SE sont connectés entre eux par un cil particulier en 9+0 appelé **cil connecteur (Figure 18)**. Aucune synthèse protéique n'a lieu dans le SE, c'est pourquoi toutes les protéines qui y sont destinées doivent être acheminées depuis le SI via le cil. Ce processus de transport est assuré par les protéines de l'IFT. On sait par exemple qu'environ 2000 protéines d'opsine par minute se déplacent dans le cil pour compenser la perte de matériel de cet épithélium en constant renouvellement (Papermaster et al., 1986). Ainsi toute altération du cil (structure, transport) conduit à l'apoptose des photorécepteurs à l'origine de la dégénérescence rétinienne (Nachury et al., 2010).

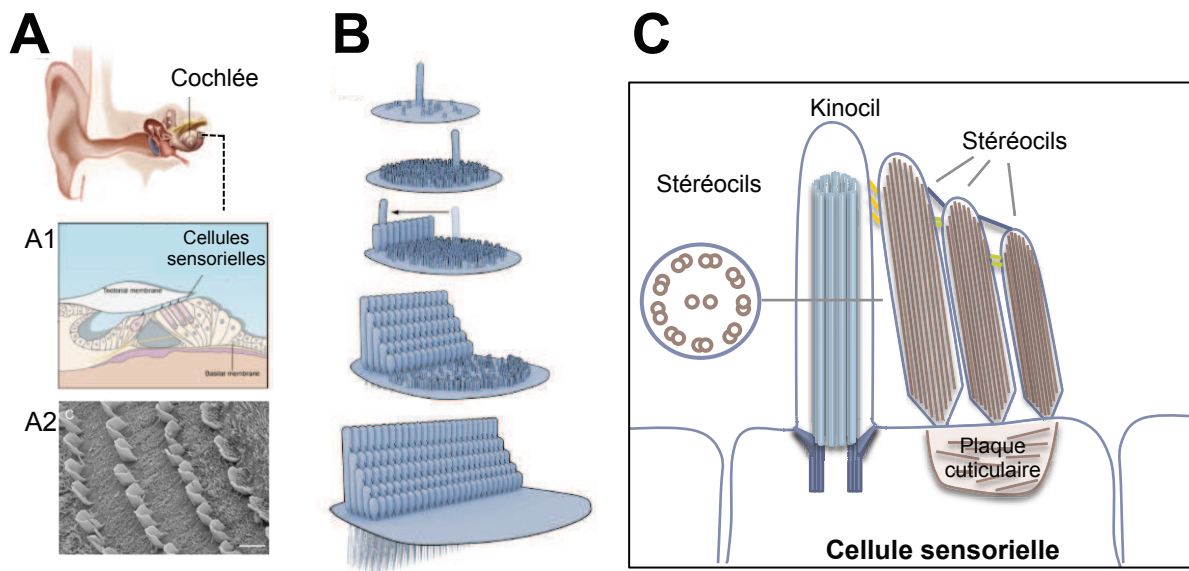


Figure 19 : Structure et développement des stéréocils chez les mammifères.

A-A1- Chez l'Homme, la cochlée est l'organe cible pour la perception du son et elle est constitué de cellules de soutien et de cellules sensorielles. **A2-** Vue par microscopie électronique à balayage des cellules sensorielles chez la souris après élimination de la membrane tectoriale. **B-** Diagramme représentant les stades de développement séquentiels des stéréocils. Au début, la surface apicale est composée de microvillis et d'un kinocil puis le kinocil migre vers le côté latéral de la cellule sensorielle et les microvillis commencent à s'allonger pour former des stéréocils de taille croissante de part et d'autre du kinocil. **C-** Coupe transversale de la partie apicale d'une cellule sensorielle illustrant le kinocil composée de microtubules et les stéréocils riches en actine. Les stéréocils sont connectés les uns aux autres ainsi qu'au kinocil via des filaments extracellulaires. Il s'agit des Tip links en bleu, des Top connectors en vert et des kinociliary links en jaune. (A-B) Adapté de Schwander et al., 2010.

3.2 - Cil et audition

1.1.1 - Fonctionnement chez les mammifères

Chez les mammifères, les mécanismes de l'audition sont assurés par l'oreille interne qui peut amplifier plus de 100 fois les vibrations sonores perçues en signaux électriques (20 Hz à 20 kHz). L'organe de Corti à l'origine de cette perception auditive est constitué de cellules mécanosensorielles et de cellules de soutien. Chaque cellule sensorielle est composée de plusieurs stéréocils d'actine organisés en rangées de taille croissante au centre desquelles est localisé un cil, **le kinocil**. Les vibrations reçues entraînent la déviation des stéréocils en direction du plus long d'entre eux (**Figure 19**). Cette déviation s'accompagne de l'ouverture des canaux mécanosenseurs présents sur les stéréocils ce qui induit la dépolarisation de la cellule sensorielle à l'origine de la transmission du signal nerveux vers le cerveau (Schwander et al., 2010). L'axonème du kinocil est organisé en 9+2 mais ce cil n'est pas motile. Toutefois, l'expression du facteur de transcription *FoxJ1b* régulateur essentiel des composants ciliaires motiles est fortement enrichi dans les cellules sensorielles en cours de développement (Yu et al., 2011).

La morphogenèse d'une cellule sensorielle suit un schéma caractéristique : au départ, le kinocil est situé au centre de la cellule où il est entouré de nombreux microvillis puis il migre vers la périphérie de la cellule. Cette migration s'accompagne de l'allongement progressif des microvillis les plus proches du kinocil, jusqu'au stade final de maturation caractérisé par un arrangement en chevrons des rangées de stéréocils autour du kinocil (**Figure 19**). Chez la souris, ce kinocil disparaît à P21 mais le corps basal persiste. Chez les mammifères, la polarisation des stéréocils est essentielle au bon fonctionnement des cellules sensorielles et la position du kinocil au cours du processus semble déterminante. Cette hypothèse fait suite aux phénotypes observés dans les souris mutantes *Bbs4* et *Bbs6/Mkks* où l'organisation des rangées de stéréocils est affectée, les stéréocils sont aplatis et le positionnement du kinocil est modifié (Ross et al., 2005). Depuis, des phénotypes similaires ont été observés dans différents mutants des composants ciliaires (MKS3, MKS5, ALMS1, KIF3A ou IFT88) (Ezan and Montcouquiol, 2013).

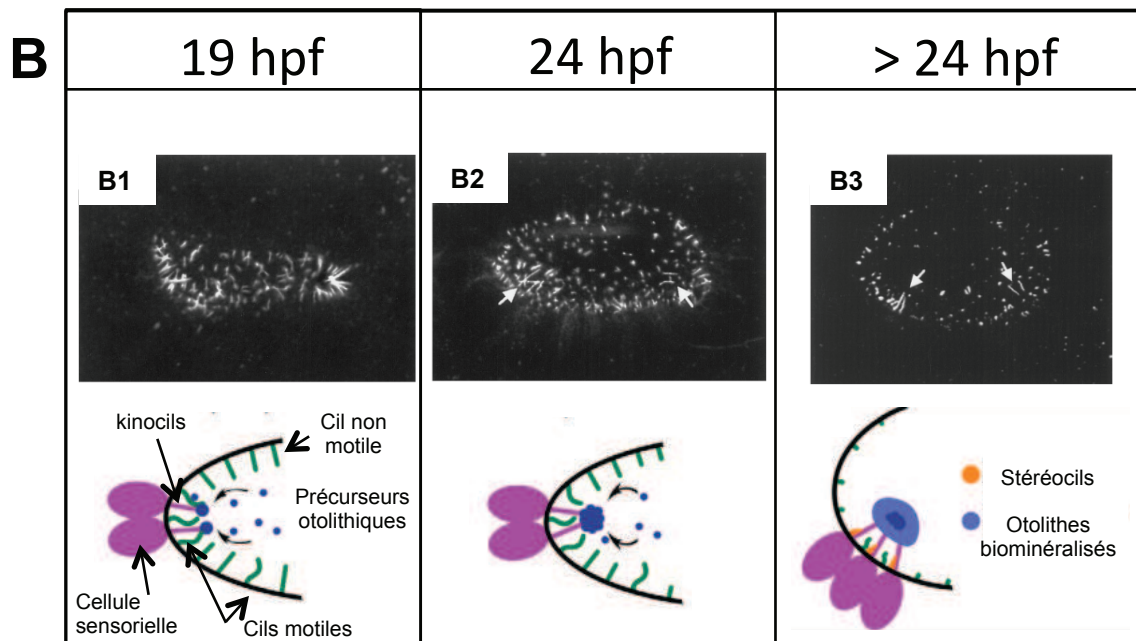
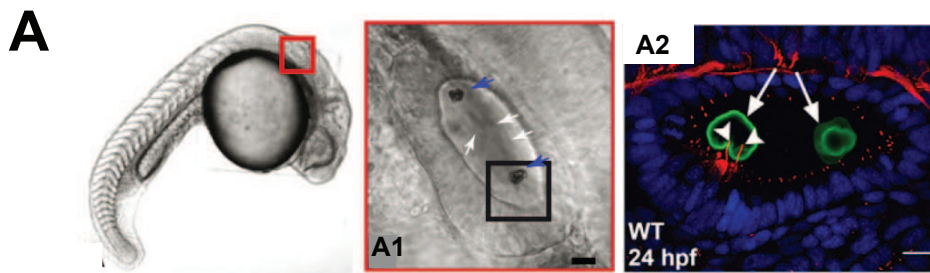


Figure 20 : Modèle de nucléation des otolithes chez le poisson zèbre.

A-A1- Chez le poisson zèbre les otolithes sont localisés dans la vésicule otique. **A2-** Exemple à 24 heures post fertilisation (hpf), d'otolithes (flèches) reposant sur les kinocils (pointes de flèches). **B1-** A 19 hpf, la vésicule otique est tapissée de cils de taille homogène. Quelques cils motiles sont présents à proximité immédiate des kinocils qui eux sont immotiles ainsi qu'au niveau des pôles de la vésicule. Les précurseurs otolithiques commencent à s'attacher aux kinocils grâce à l'écoulement assuré par les cils motiles. **B2-** A 24 hpf, les cils non motiles et motiles régressent mais ces derniers continuent à battre. Les kinocils s'allongent et l'ancrage des précurseurs se poursuit. **B3-** Au-delà de 24 hpf, les cils de la vésicule otique sont très petits et les kinocils sont aisément visualisables. La nucléation des otolithes est effective et ceux-ci reposent sur les kinocils. (A) Adapté de Wu et al., 2011 et Yu et al., 2011. (B) Adapté de Riley et al., 1997 et Stooke-Vaughan et al., 2012.

3.2.1 - Fonctionnement chez les vertébrés inférieurs

Chez le poisson zèbre et le xénope ce mécanisme est légèrement différent. L'oreille interne (ou vésicule otique) est une cavité membranaire située de part et d'autre de l'encéphale, derrière les yeux. Chez l'adulte, elle se compose notamment de trois canaux semi-circulaires terminés à leur base par trois sacs renfermant chacun un otolithe. Les otolithes sont des cristaux de carbonate de calcium capables de détecter la gravité et les accélérations linéaires. Ils reposent sur les kinocils des cellules sensorielles et toute inclinaison entraîne leur mouvement à l'origine du déplacement des cils. Ceci stimule les cellules sensorielles qui relaient un message nerveux jusqu'au cerveau et permet de déterminer l'inclinaison.

Chez le poisson zèbre la formation des otolithes débute immédiatement après la formation de la vésicule otique (Riley et al., 1997). Celle-ci est d'abord tapissée de petits cils de taille homogène, dont les kinocils, localisés aux pôles antérieur et postérieur de la vésicule. Ces cils sont immotiles mais il existe des cils motiles à proximité immédiate qui assurent l'écoulement d'un flux constant permettant la nucléation des otolithes (à partir des précurseurs) au niveau des kinocils des cellules sensorielles. Ensuite, tous les cils de la vésicule régressent à l'exception des kinocils qui s'allongent (**Figure 20**) (Stooke-Vaughan et al., 2012). Dans les embryons mutants *MZovl* (IFT88) et *iguana* qui ne possèdent pas ou peu de cils, la nucléation des otolithes au niveau des kinocils est altérée (surnuméraires, fusionnés ou plus petits) dans 86% et 44% des cas respectivement (Stooke-Vaughan et al., 2012). Il en est de même lorsque la motilité des cils est altérée dans le mutant *lrrc50* ou les morphants *gas8* et *dnaH5* (Colantonio et al., 2009; Stooke-Vaughan et al., 2012; Yu et al., 2011). Ainsi, lorsque l'on perturbe la formation des cils ou la fonction motile de ceux-ci dans la vésicule otique, ceci provoque des défauts de nucléation des otolithes. Cependant la présence d'embryons non affectés suggère qu'il existe une voie alternative nécessaire à la nucléation des otolithes chez le poisson zèbre. Par ailleurs, la présence des cellules sensorielles est indispensable à la nucléation des otolithes puisque les mutants *atoh1b* qui ne possèdent pas ces cellules n'ont pas d'otolithes (Yu et al., 2011).

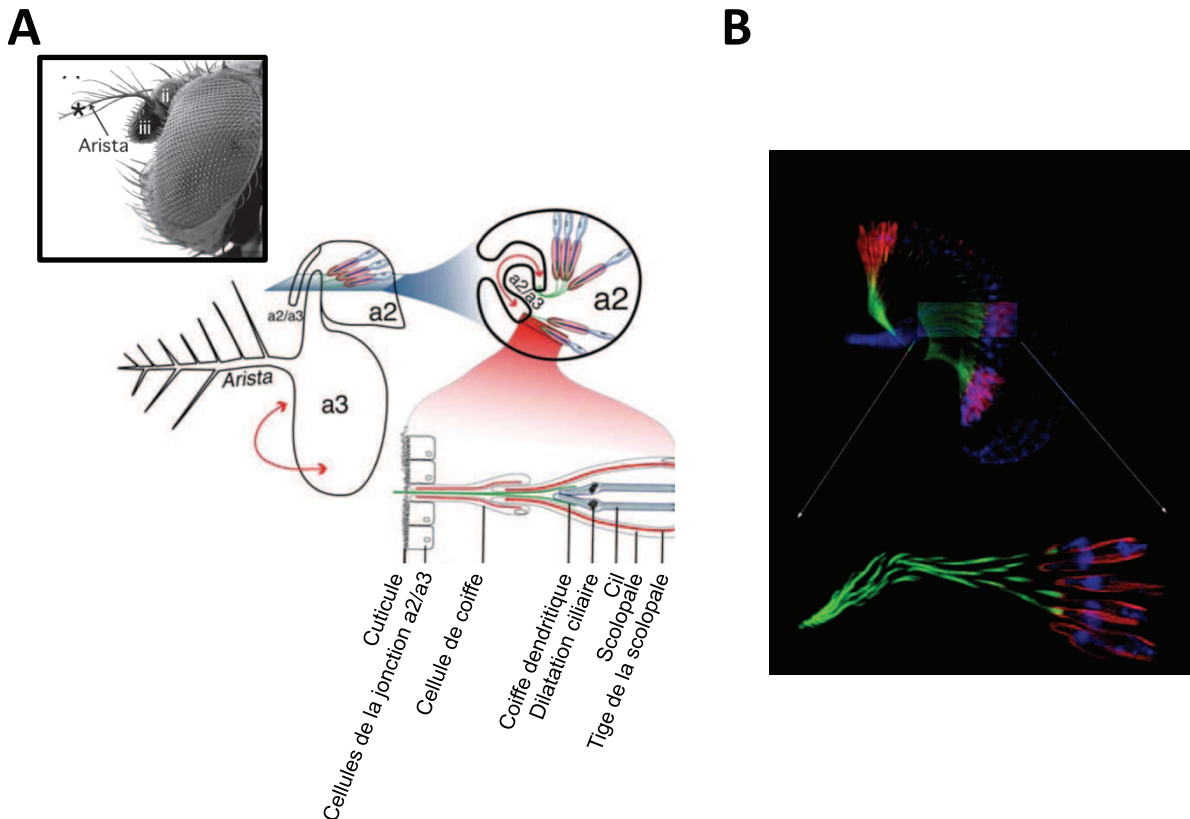
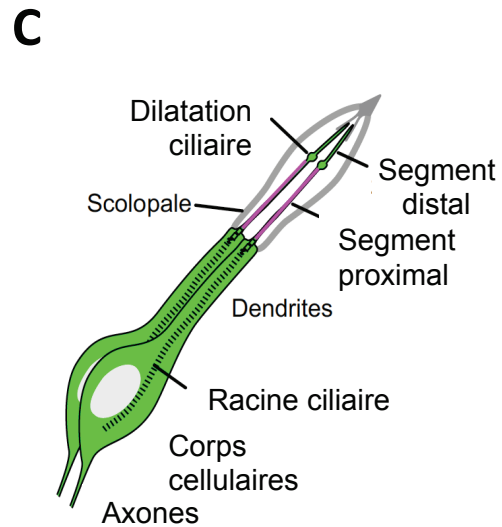


Figure 21 : L'organe de Johnston nécessaire à l'audition chez la drosophile.

A- Représentation schématique de l'organe de Johnston. La stimulation sonore de l'arista provoque la rotation du segment antennaire a3 par rapport au segment a2. Ce mouvement induit l'étirement des cils et déclenche la transduction du signal auditif. **B-** Image d'une antenne de pupe exprimant la protéine NompA-GFP (vert) localisée dans la coiffe dendritique. En rouge, le marquage Phalloïdine permet de visualiser les scolopales et les cellules de la coiffe. La membrane des neurones est marquée en bleu. **C-** Représentation schématique d'un neurone sensoriel de l'organe chordotonal. Le cil est représenté en violet. (A-B) Adapté de Eberl et al., 2007. (C) Adapté de Moore et al., 2013.



3.2.2 - Fonctionnement chez la drosophile

Chez la drosophile, les mécanismes de l'audition et de la gravitaxie sont assurés par l'organe de Johnston localisé dans l'antenne. Celle-ci est composée d'une arista qui assure la fonction de récepteur sonore et de trois segments antennaire, a1, a2 et a3. Le segment a2 (qui comprend l'organe de Johnston) est composé d'organes chordotonaux organisés en unité sensorielle (ou scolopidie) comprenant chacune 2 à 3 neurones ciliés et des cellules accessoires. Chaque neurone possède un dendrite à l'extrémité duquel s'étend un cil encapsulé dans une coiffe extracellulaire et directement connecté au récepteur sonore via des protéines de jonction extracellulaire (**Figure 21**). L'axonème du cil s'organise en 9 doublets de microtubules externes jusqu'à la dilatation ciliaire puis se poursuit en 9 singlets. Des bras de dynéine externes sont associées aux doublets de microtubules et permettent le mouvement du cil sensoriel neuronal.

L'émission des ondes sonores provoque le mouvement de l'arista et la rotation du segment a3 au niveau de la jonction a2/a3. Ce mouvement est ensuite transmis à l'organe de Johnston ce qui provoque l'étirement des cils et déclenche la transduction du signal auditif. Le mécanisme de transduction nécessite l'ouverture de canaux ioniques localisés dans le cil et indispensables à l'audition (Gong et al., 2004; Kavlie et al., 2010; Kim et al., 2003). La localisation ciliaire de ces récepteurs implique la machinerie de l'IFT (Lee et al., 2008; Lee et al., 2010). Il n'est donc pas surprenant de constater que les mutants de la machinerie de l'IFT, qui forment généralement des cils plus courts, présentent de sévères défauts d'audition. De même la perte de fonction des protéines D-PLP (Pericentrin Like Protein) et UNC (Uncoordinated) associées au centriole et au corps basal respectivement ou de la protéine NOMPA qui assure la jonction entre la partie distale du cil et la cellule de la coiffe possèdent de graves défauts d'audition (Göpfert and Robert, 2003). L'ensemble de ces études montre que le cil joue un rôle central dans les mécanismes de l'audition chez la Drosophile.

Par ailleurs, le mutant *tilb*, homologue du gène *Lrrc6* chez les vertébrés ne possède pas les bras de dynéine et les mouches entendent moins bien (Kavlie et al., 2010). Des résultats identiques sont observés dans les mutants du gène *CG11253*, homologue du gène *ZMYND10* chez l'Homme (Moore et al., 2013; Senthilan et al., 2012). Ainsi le mouvement actif du cil du neurone sensoriel de l'organe de Johnston apparaît comme un élément clé, nécessaire à

l'amplification du signal auditif chez la drosophile (Eberl et al., 2000; Göpfert and Robert, 2003; Göpfert et al., 2005).

En résumé, chez la drosophile, le cil apparaît comme l'acteur clé de la transduction des signaux auditifs, à l'inverse de ce qui est observé chez les mammifères où la fonction du cil a évolué pour assurer des fonctions dans la morphogenèse de l'appareil auditif mais il ne semble pas requis pour la perception du signal lui-même.

En conclusion, le cil primaire agit en tant qu'antenne cellulaire capable de détecter les changements extérieurs, grâce notamment, à l'enrichissement de récepteurs et canaux ioniques au niveau de la membrane du cil. Certains de ces composants sont par ailleurs impliqués dans des voies de signalisation bien connues et nécessaires pour le contrôle de la prolifération, la différenciation ou la survie cellulaire.

4. Cils et voies de signalisation

4.1 - La voie PDGFR α

Les PDGFs (Platelet-derived growth factors) interviennent dans la régulation de nombreux processus clés au cours du développement embryonnaire et post natal tels que l'angiogenèse, l'apoptose, la prolifération, la différenciation ou la survie cellulaire. Ils interviennent également dans la croissance du tissu conjonctif et la cicatrisation chez l'adulte. La signalisation PDGF fait intervenir 4 ligands PDGF (A-D) et deux récepteurs à tyrosine kinases, PDGFR α et PDGFR β . La liaison du ligand conduit à la dimérisation du récepteur, puis à la phosphorylation des résidus tyrosines au niveau de sites précis présents sur la partie intracellulaire du récepteur. Différents adaptateurs sont alors recrutés au niveau de ces sites phosphorylés ce qui induit des cascades de signalisation distinctes comme les voies AKT ou MAP kinases.

Le lien entre cil et PDGF résulte d'une étude menée par le groupe de Christensen ST. Dans cette étude les auteurs montrent que le récepteur PDGFR α est localisé au cil primaire dans les cellules NIH3T3 et MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts). Son activation, après fixation par son ligand spécifique PDGF-AA entraîne l'activation des voies AKT et MEK1/2-ERK1/2. La phosphorylation des effecteurs de ces voies (MEK1/2, AKT, ERK) se fait dans le

cil et au niveau du corps basal. Dans des fibroblastes dérivés des souris mutantes Tg737^{orpk} (IFT88) qui ne forment pas de cils, PDGFR α est localisé à la base des cils tronqués et l'entrée en mitose dépendante de PDGF-AA est bloquée. A l'inverse la signalisation médiée par PDGFR β (qui n'est pas localisé au cil) et son ligand PDGF-BB n'est pas affectée dans les fibroblastes des mutants Tg737^{orpk}. Cette étude révèle donc l'importance du cil primaire dans le contrôle de la croissance cellulaire dépendante de PDGFR α (Schneider et al., 2005; Schneider et al., 2010).

Une étude plus récente démontre que l'activation de PDGFR α dans le cil génère une cascade de signalisation impliquée dans la réorganisation du cytosquelette nécessaire pour la migration orientée, essentiellement via le transport de NHE1 au niveau du front de migration du lamellipode en formation. Dans ce processus, la signalisation via AKT est cruciale pour initier le transport et l'activation de NHE1, mais la localisation précise de NHE1 au front de migration nécessite la voie MEK1/2-ERK1/2 (Clement et al., 2013).

4.2 - La voie Hedgehog et le cil primaire

La voie de signalisation Hedgehog (Hh) est essentielle pour la mise en place du système nerveux. Pendant l'embryogenèse, elle est nécessaire à la formation du système nerveux central et en particulier, à la régulation de la polarité dorso-ventrale du tube neural. Elle est également requise pour la différenciation antéropostérieure et joue un rôle central dans le développement des membres et de nombreux organes. Chez l'adulte, elle est nécessaire à la prolifération et à la survie cellulaire ainsi qu'à l'homéostasie des cellules souches (Ingham and McMahon, 2001).

La voie Hedgehog est activée après fixation du ligand SHH au récepteur PTCH1. Cette levée de répression induit la transduction d'un signal en cascade conduisant à l'accumulation de facteurs de transcription de la famille des GLI et en particulier GLI3 qui sont redirigés vers le noyau où ils activent leurs gènes cibles. Les facteurs de transcription GLI existent sous deux formes dans la cellule. Une forme longue (GLI-FL) minoritaire, impliquée dans l'activation de la transcription et une forme courte résultant du clivage de la forme longue et impliquée dans la répression de la transcription (GLI-R). Une régulation fine

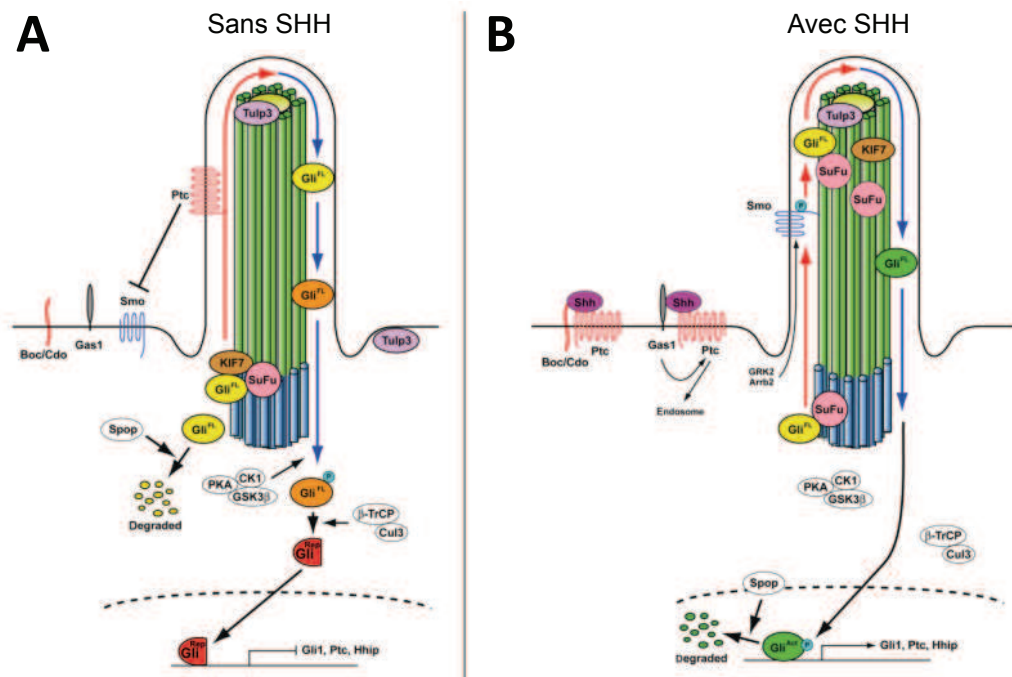


Figure 22 : La voie de signalisation Hedgehog chez les vertébrés.

Chez les vertébrés la signalisation Hedgehog a lieu dans le cil primaire. **A-** En l'absence de SHH, le récepteur PTCH1 est localisé dans le cil et inhibe l'entrée de la protéine transmembranaire SMO dans le cil. Les formes longues de GLI (GLI-FL) s'associent à SUFU et transitent dans le cil où elles acquièrent des modifications de nature inconnue mais nécessaires à la signalisation. A la sortie du cil, les protéines GLI-FL sont phosphorylées par un complexe de kinase localisée à la base du cil puis ubiquitinylées et partiellement dégradées par le protéasome. Gli-R se dissocie de SUFU et transloque dans le noyau pour exercer son activité répressive. **B-** En présence du ligand SHH, SMO est activé et rentre dans le cil. Cette activation favorise l'accumulation de SUFU et GLI-FL à la pointe du cil. La dissociation entre SUFU et GLI-FL se fait dans le cil puis les protéines GLI-FL transloquent dans le noyau où elles activent la transcription des gènes cibles (A) adapté de Sasai et al., 2012.

de ces deux formes est essentielle pour le développement normal. Chez les vertébrés, tous les composants majeurs de cette voie sont enrichis dans le cil primaire (**Figure 22**).

En l'absence de SHH, PTCH1 est localisé dans le cil et à la base de celui-ci et empêche l'accumulation du transducteur du signal, Smoothened (SMO) dans le compartiment ciliaire. Dans ces circonstances, GLI2-FL et GLI3-FL associés à SUFU (Suppressor of fused homolog) transitent dans le cil où ils acquièrent des marqueurs de nature inconnue. Ils sont ensuite phosphorylés à la base du cil par un complexe formé des protéines kinases PKA-CKI-GSK3 β puis ubiquitinylés. L'ubiquitinylation des protéines GLI2-FL et GLI3-FL induit leur dissociation de SUFU. Dès lors, ils sont partiellement clivés par le protéasome et les formes résultantes Gli2-R et Gli3-R entrent dans le noyau où ils répriment l'expression des gènes (Robbins et al., 2012).

En présence de SHH, PTCH1 sort du cil et SMO y rentre soit par un transport latéral depuis la membrane plasmique ou directement par une vésicule intracellulaire (Briscoe 2013). Les complexes SUFU/GLI3-FL et SUFU/GLI2-FL sont recrutés dans le cil et s'accumulent à la pointe de celui-ci. La dissociation de SUFU se fait dans le cil par des mécanismes peu clairs impliquant probablement la phosphorylation (Chen et al., 2011). Une fois dissociés, GLI2-FL et GLI3-FL transloquent dans le cytoplasme puis le noyau où ils assurent leur fonction d'activateurs transcriptionnels de la voie.

La relation entre cil et voie Hh fut établie suite à un crible réalisé par mutagenèse à l'ENU chez la souris afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la régionalisation de l'embryon. De nombreux mutants présentant des défauts de régionalisation compatibles avec une altération de la voie Hh, dont la perte des types cellulaires ventraux dans le tube neural normalement spécifiés par de hauts niveaux de SHH, ont été obtenus. Les gènes mutés codent des membres du transport intraflagellaire incluant *Ift52*, *Ift88*, *Ift172* et les moteurs moléculaires associés *Kif3a* et *Dync2h1* (Huangfu and Anderson, 2005; Huangfu et al., 2003; Liu et al., 2005). Dans ces mutants, le cil est absent ou présente des défauts structuraux et les phénotypes observés sont associés à une diminution de la signalisation Hh. Depuis, de nombreux autres acteurs de la ciliogenèse, nécessaires à la signalisation Hh ont été identifiés. On distingue notamment de nouveaux composants associés au transport intraflagellaire (IFT20/57/80/122/139) ou localisés au corps basal ou à la zone de transition telles que OFD1, MKS1, FTM/RPGRIP1L, TECTONIC ou EVC2 (Sasai and Briscoe, 2012).

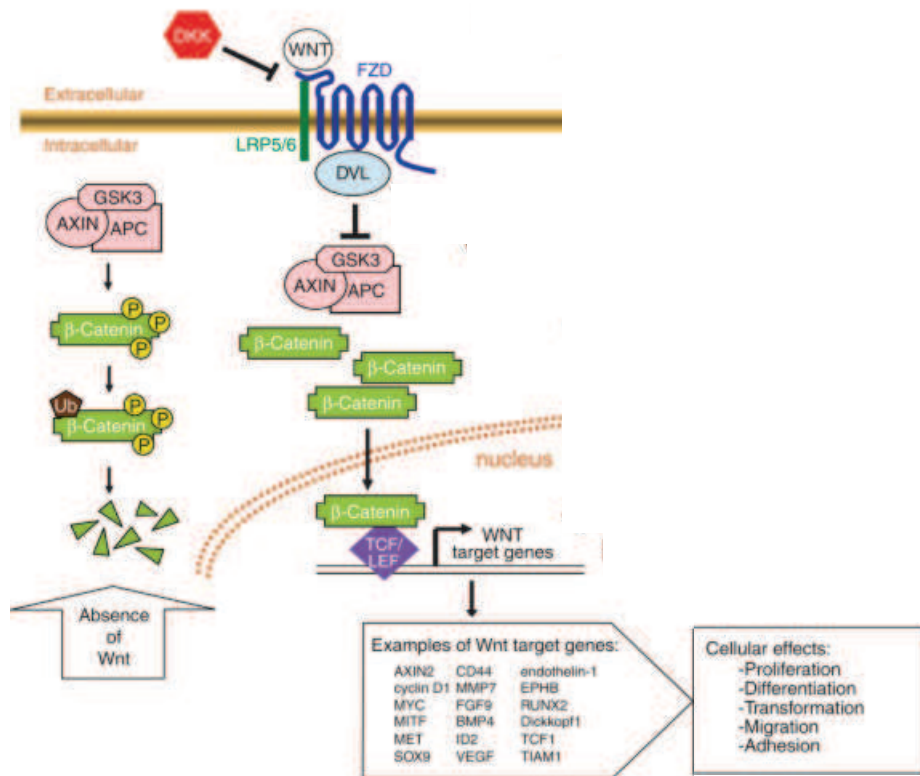


Figure 23 : La voie de signalisation Wnt canonique/ β -caténine.

A gauche : en absence de ligand Wnt, « un complexe de destruction » composé de l'Axine, de la GS3K et d'APC, phosphoryle la forme cytosolique de la β -caténine, ce qui conduit à son ubiquitynation et à sa dégradation par le protéasome. A droite : la liaison du ligand Wnt sur le récepteur Frizzled, conduit au recrutement de Dishevelled à la membrane inhibant ainsi « le complexe destructeur ». La β -caténine s'accumule dans le cytoplasme puis transloque dans le noyau où elle s'associe aux facteurs de transcription TCF/LEF pour initier la transcription des gènes cibles de la voie. Adapté de Chien et al., 2009.

En conclusion, chez les vertébrés la présence d'un cil primaire fonctionnel est indispensable pour assurer la transduction de la signalisation Hh dans de nombreux tissus au cours du développement.

4.3 - La voie de signalisation Wnt et le cil primaire

Comme nous venons de le voir, le rôle du cil dans la régulation des voies de signalisation Hedgehog et PDGFR α au cours du développement est bien établie. Cependant, le rôle du cil dans la régulation des processus associés à la transduction des signaux de la voie Wnt et plus particulièrement ceux associés à la voie non canonique ou polarité planaire cellulaire (PCP) reste controversé (Wallingford and Mitchell, 2011). Les protéines Wnt sont des morphogènes, c'est-à-dire des molécules qui diffusent selon un gradient de concentration et spécifient différents types cellulaires ou différentes régions de l'organisme en fonction de la concentration.

Elles sont nécessaires :

- 1- En tant que régulateur de la transcription des gènes cibles impliquées dans la différenciation et la prolifération cellulaire, c'est **la voie Wnt canonique**.
- 2- Pour apporter une information directionnelle en générant des signaux locaux entraînant des modifications morphologiques de la cellule nécessaires à la polarité cellulaire, c'est **la voie Wnt non canonique**.

4.3.1 - Le cil primaire et la voie Wnt canonique

La voie Wnt canonique ou voie de la β -caténine est activée lorsque les ligands de la famille des glycoprotéines Wnt se lient à leurs récepteurs à sept domaines transmembranaires, Frizzled (Fz). Cette étape s'accompagne de la phosphorylation des corécepteurs LRP5 ou LRP6 et du recrutement de l'Axin et de Dishevelled au niveau du récepteur. Ces protéines forment un complexe qui empêche la phosphorylation de la β -caténine par la GSK-3 et donc sa dégradation par le protéasome. La β -caténine est une protéine impliquée dans les jonctions intercellulaires des tissus épithéliaux et sa forme cytoplasmique n'est stabilisée qu'en réponse à la signalisation Wnt. Une fois stabilisée dans le cytoplasme, elle est transportée dans le

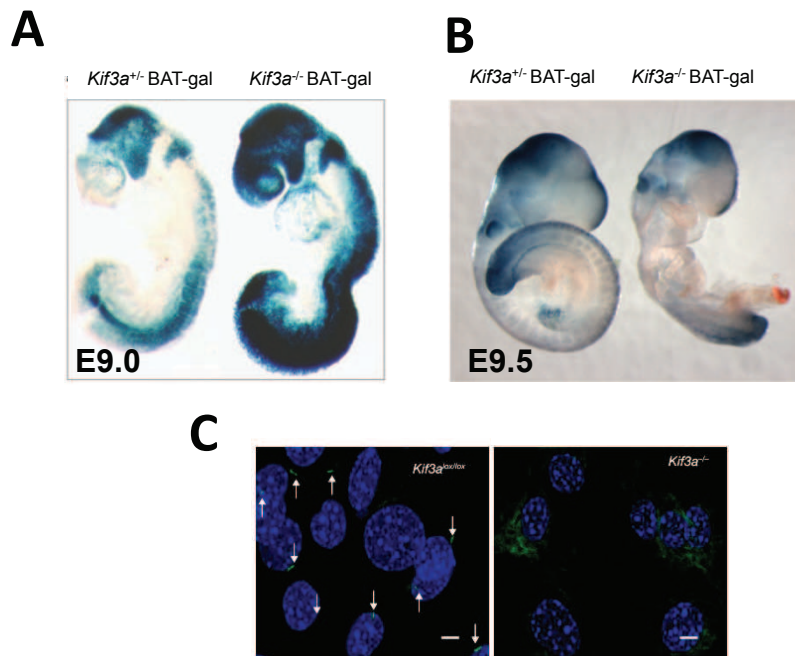


Figure 24 : L'absence de cil affecte différemment la voie Wnt/ β -caténine en fonction du stade de développement observé.

A- L'augmentation de la signalisation Wnt/ β -caténine dans les embryons mutants du gène *Kif3a* (E.9.0) est mise en évidence par le marquage du gène rapporteur de la β -galactosidase. **B-** Cette augmentation n'est pas observée dans ces mêmes mutants à E. 9.5. Il s'agit ici de deux études indépendantes. **C-** Les fibroblastes embryonnaires issus des souris invalidées pour le gène *Kif3a* ne forment pas de cils. (A,C) Adapté de Corbit et al., 2008. (B) Adapté de Ocbina et al., 2009

noyau où elle s'associe aux facteurs de transcriptions LEF/TCF et initie la transcription des gènes cibles de la voie (**Figure 23**) (Baron and Kneissel, 2013).

Plusieurs études montrent que le cil joue un rôle dans la signalisation Wnt non canonique. Par exemple, les souris invalidées pour le gène ciliaire *Kif3a* ne forment pas de cils et ont une signalisation Wnt non canonique fortement augmentée (Corbit et al., 2008). L'hyper activation de la voie est également observée dans les fibroblastes et les canaux mammaires des souris mutantes *Ift88^{orpk/orpk}* (mutant hypomorphe, cil plus courts) (**Figure 24**), les cellules souches embryonnaires dépourvues de la protéine ODF1 (protéine associée au corps basal) et dans les cellules rénales des souris mutantes pour le gène *Ift20* (Ko conditionnel, pas de cils) (Corbit et al., 2008; Jonassen et al., 2008; McDermott et al., 2010). L'hyper activation de cette voie n'est pas restreinte aux mammifères puisqu'une étude réalisée chez le poisson zèbre (perte de fonction par injection de morpholino) montre que la protéine Nphp4 réprime la voie Wnt/ β -caténine dans le cloaque du poisson zèbre où les cils sont plus courts (Burcklé et al., 2011).

L'ensemble de ces travaux présente le cil comme un régulateur négatif de la voie Wnt canonique et une étude récente révèle qu'il pourrait agir sur la signalisation en séquestrant des régulateurs positifs de la voie. La Joubérine, produit du gène *Ahil*, qui est muté dans le syndrome de Joubert (une ciliopathie) est associée au corps basal ou elle co-localise avec la β -caténine et à l'axonème. Les souris mutantes pour ce gène forment des cils de taille et d'ultrastructure normale dans le rein mais la signalisation Wnt canonique y est diminuée (Lancaster et al., 2009). Les auteurs de cette étude ont démontré que la Joubérine facilite la translocation nucléaire de la β -caténine mais qu'elle est séquestrée dans le cil lorsque celui est présent. Ils ont également démontré l'implication du transport intraflagellaire rétrograde dans la régulation de cette voie puisque dans les fibroblastes embryonnaires *Dnhn2^{-/-}* qui ne développent pas de cils, il y a un enrichissement nucléaire de la β -caténine et de la Joubérine. De plus, dans les cellules qui forment toujours un cil, la Joubérine est présente dans le compartiment ciliaire et la voie Wnt canonique est plus faible. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans les souris mutantes pour le gène *Dnchc2*. Mais l'effet sur la ciliogenèse est variable en fonction des tissus et elle est corrélée à l'activation de la voie Wnt canonique : lorsque les cils sont présents mais plus courts (membres, follicules pileux en développement ou glandes mammaires) la signalisation Wnt canonique est diminuée alors que dans les autres tissus qui ne possèdent pas de cils, la signalisation est hyper activée (Lancaster et al., 2011).

Cependant, il existe une étude dans laquelle l'analyse des mutants murins des gènes *Ift88*, *Kif3a*, et *Dnchc2* ne donne pas les mêmes résultats (Ocbina et al., 2009). En effet l'activation de la voie Wnt canonique est identique entre les souris mutantes pour ces gènes et les souris contrôles. Concernant le mutant *Kif3a*, les phénotypes ciliaires sont identiques entre les deux études mais le stade de développement des souris analysées est légèrement différent : E9.0 (Corbit et al., 2008) versus E9.5 (Ocbina et al., 2009). Pour les mutants *Ift88* et *Dnchc2*, en revanche, les phénotypes ciliaires sont différents. En effet, les mutants *Ift88* (Corbit et al., 2008) et *Dnchc2* (Ocbina et al., 2009) forment des cils de petite taille alors que l'absence de cil est observée dans certains tissus des mutants *Dnchc2* dans l'étude de Lancaster et al., 2011 et qu'aucun cil ne se forme dans les mutants *Ift88* de l'étude de Ocbina et al., 2009. De la même façon que pour le mutant *Kif3a*, les stades de développement analysés ne sont pas identiques entre les deux études : E12.5 (Corbit et al., 2008) versus E9.5 (Ocbina et al., 2009) pour le mutant *Ift88* et E9.5 (Ocbina et al., 2009) versus E11.5 (Lancaster et al., 2011) pour le mutant *Dnchc2*. Ainsi, il apparaît que le rôle du cil sur la voie Wnt soit différent en fonction du stade de développement analysé.

En conclusion, le rôle du cil primaire dans la signalisation Wnt canonique dépend du type cellulaire et de la période du développement analysé. Cependant, il semble jouer un rôle déterminant en tant que régulateur négatif de la voie, puisque son absence induit globalement une hyper activation de la voie chez les mammifères. Parmi les mécanismes impliqués on retiendra la séquestration dans le compartiment ciliaire des régulateurs positifs de la voie. Cependant, des mécanismes alternatifs et nécessaires à la régulation de cette voie ont été décrits comme la régulation de Dishevelled ou la dégradation protéosomale de la β -caténine.

4.3.1 - La voie Wnt non canonique

La voie Wnt non canonique ou polarité planaire (Wnt/PCP) est évolutivement conservée et joue un rôle essentiel dans la morphogenèse des tissus et organes au cours du développement. La PCP fait référence à l'établissement de la polarité des cellules épithéliales dans un plan orthogonal à l'axe apico-basal (Bayly and Axelrod, 2011). Parmi les manifestations visuelles de cette signalisation, il y a l'alignement directionnel des poils dans l'aile de drosophile, des écailles chez le poisson, des plumes chez les oiseaux ou encore des cellules auditives dans l'oreille interne des mammifères.

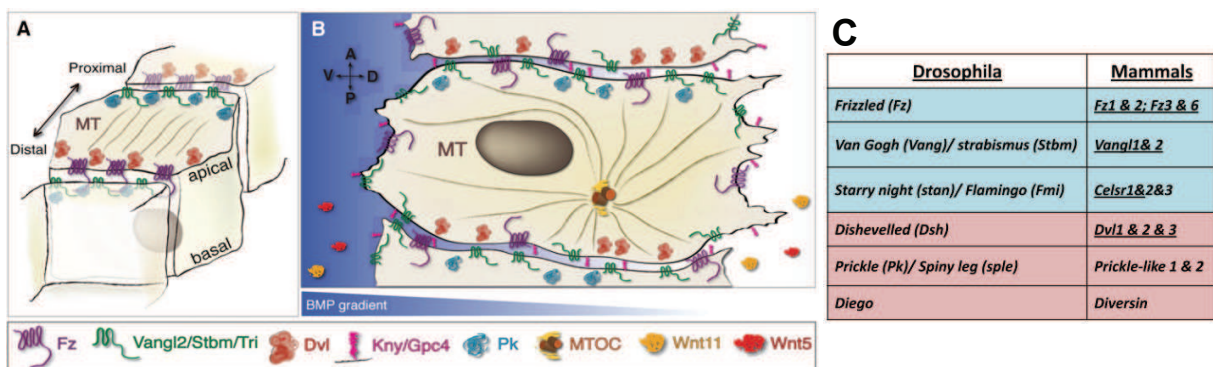


Figure 25 : Composants de la voie Wnt/PCP dans les cellules épithéliales et mésenchymateuses.

A- Localisation asymétrique des composants de la PCP dans les cellules épithéliales de drosophile : Frizzled et Dishevelled sont localisés distalement alors que Van Gogh et Prickle sont localisés du côté proximal. **B-** Les composants de la PCP dans les cellules polarisées et les cellules mésenchymateuses pendant les mouvements de convergence extension chez les vertébrés sont distribués asymétriquement. **C-** Tableau indiquant les six composants centraux de la voie Wnt/PCP chez la drosophile et leur homologue chez les mammifères. (A,B) Adapté de Gray et al., 2011. (C) Adapté de Ezan et al., 2011.

Les composants centraux de cette voie ont été identifiés chez la drosophile et regroupent les protéines transmembranaires, Frizzled (Fz), Van Gogh (Vang) et Flamingo (Fmi) et les protéines cytoplasmiques, Prickle (Pk), Diego (Dgo) et Dishevelled (Dsh) (Gray et al., 2011; Vladar et al., 2009). Les drosophiles mutantes pour l'un de ces composants présentent des phénotypes caractéristiques de défauts de polarité planaire, comme dans l'aile où l'orientation des poils devient aléatoire.

La caractéristique de cette voie repose sur la localisation subcellulaire asymétrique des différents composants lorsque la polarité planaire est établie. Chez les vertébrés, les acteurs clés de la voie sont conservés et au niveau cellulaire, ils sont initialement distribués uniformément puis, ils s'organisent en deux complexes polarisés au niveau de la membrane : d'une part Frizzled et Dishevelled et d'autre part Vangl1 et 2 (Van Gogh chez la Drosophile), Celsr 1, 2 et 3 (Flamingo chez la drosophile) et Prickle (**Figure 25**). Les mécanismes guidant la distribution asymétrique des composants centraux ainsi que les effecteurs de la voie Wnt/PCP reste très peu caractérisés mais il apparait que cette régulation ne se fasse pas au niveau transcriptionnel comme c'est le cas dans la voie Wnt canonique (Gao, 2012).

Chez la souris, le xénope ou le poisson zèbre, la PCP contrôle les mouvements de convergence extension (CE). Il s'agit d'un mécanisme qui permet aux cellules mésenchymateuses de converger et de s'intercaler, ce qui conduit à l'allongement de l'axe antéro-postérieur pendant la gastrulation et la neurulation (Gray et al., 2011; Wang and Nathans, 2007; Yin et al., 2008). Plus généralement, la signalisation PCP régule également l'orientation des plans de divisions cellulaire (Fisher E 2006). Par exemple, dans les souris mutantes pour le gène *Wnt9b* (mutant hypomorphe *Wnt9b^{neo/neo}*), le diamètre du rein est élargit et l'orientation des divisions est aléatoire (Karner et al., 2009). De même, l'orientation des plans de division cellulaire est altérée dans l'épithélium du tube collecteur du rein des souris mutantes pour le gène *Wnt7b* (Yu et al., 2009). De plus la PCP, joue un rôle essentiel dans la polarisation des stéréocils des cellules sensorielles de l'oreille interne des mammifères et l'analyse de cet épithélium constitue l'un des meilleurs modèles pour quantifier et étudier les multiples aspects de la PCP chez les mammifères (**Figure 26**) (Ezan and Montcouquiol, 2013).

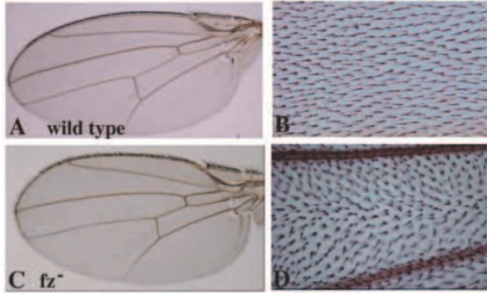
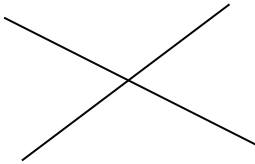
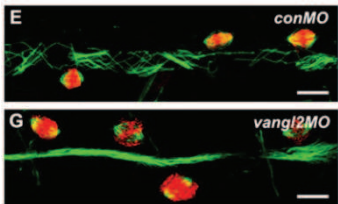
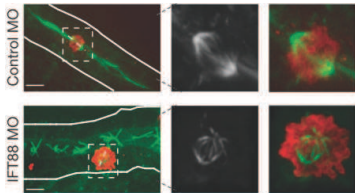
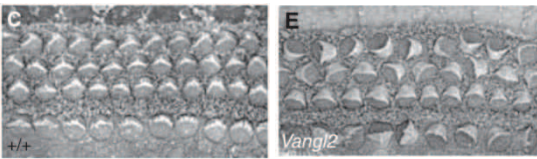
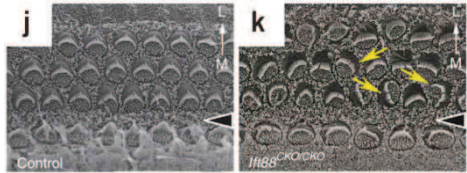
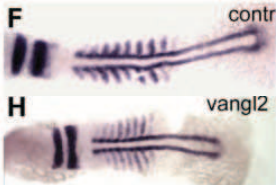
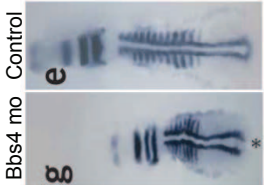
		Gènes de la PCP	Gènes ciliaires
Drosophile	Orientation des soies	 A wild type B C <i>fz</i>⁻ D Strapps et al., 2001	
	Orientation du fuseau mitotique	 E <i>conMO</i> G <i>vangl2</i> MO Bubenshchikova et al., 2012	 Control MO IFT88 MO Delaval et al., 2011
Vertébrés	Polarisation des stéréocils	 C +/+ E <i>Vangl2</i> McNeill et al., 2010 ; Montcouquiol et al., 2003	 j Control k <i>Ift88</i>^{CKO/CKO} Jones et al., 2008
	Allongement de l'axe antéro-postérieur	 F <i>contr</i> H <i>vangl2</i> Ferrante et al., 2009	 e Control b <i>Bbs4</i> mo * Gerdes et al., 2007

Figure 26 : Phénotypes associés à des défauts de polarité planaire dans les mutants de la ciliogenèse.

Chez la drosophile la voie Wnt/PCP n'implique pas le cil. Chez les vertébrés, les défauts de la voie Wnt/PCP se manifestent notamment par 1- Des défauts d'orientation des plans de divisions cellulaires. 2- Le mauvais positionnement des stéréocils de l'oreille interne. 3- Des défauts d'allongement de l'axe corporel chez les vertébrés inférieurs.

4.3.2 - Le cil primaire et la voie Wnt non canonique

Chez les vertébrés, de nombreuses analyses fonctionnelles portant sur les gènes impliqués dans la fonction ciliaire ont conduit à des phénotypes associés à des défauts de polarité planaire (**Figure 26**). Le premier argument d'un lien entre le cil et la PCP vient de l'analyse des souris mutantes pour l'*Inversine*. Cette protéine est localisée dans le cil et les souris mutantes pour ce gène présentent des phénotypes classiquement attribués à des défauts ciliaires tels que les kystes rénaux et des défauts d'asymétrie droite-gauche (Otto et al., 2003; Watanabe, 2003). Toutefois, ces mutants possèdent également des défauts d'alignement des poils, phénotype caractéristique d'un défaut de PCP. De plus, des analyses fonctionnelles réalisées chez le xénope démontrent que l'*Inversine* est nécessaire pour les mouvements corrects de convergence extension et qu'elle interagit avec les protéines de la PCP Dishevelled et Vangl2. Les auteurs ont également démontré que l'*Inversine* initie la signalisation PCP au détriment de la voie Wnt canonique. Ainsi, il a été proposé que l'*Inversine* et donc le cil régule la balance entre les deux cascades de signalisation Wnt (Simons et al., 2005).

Les protéines du BBS (BBS1, 4, et 6) ainsi que d'autres protéines localisées au corps basal ou au cil (OFD1, LRRC6 et IFT88) ont également été impliquées. Par exemple chez les mammifères, les protéines BBS1, 4 et BBS6/MKKS sont nécessaires pour le positionnement polarisé des stéréocils présents à la surface apicale des cellules sensorielles de l'organe de Corti. Cette fonction est assurée en association avec Vangl2 puisque les doubles mutants *Bbs/Vangl2* montrent une aggravation du phénotype d'orientation des stéréocils comparés aux simples mutants (Montcouquiol et al., 2003; Ross et al., 2005). Cette étude est avec celle sur l'*Inversine*, l'une des premières à avoir fait le lien entre la PCP et le cil (Ross et al., 2005).

De la même façon, les stéréocils, les centrioles et les corps basaux sont désorganisés après inactivation conditionnelle du gène *Ift88* (Absence de cil, *Ift88*^{CKO/CKO}) dans la cochlée et le mauvais positionnement des stéréocils est aggravé après croisement avec les souris mutantes pour le gène *Vangl2* (Jones et al., 2008). Cependant, les auteurs ont montré que la localisation des protéines Vangl2 et Fz3 n'est pas altérée dans les cellules sensorielles des souris *Ift88*^{CKO/CKO} (Jones et al., 2008). Ces résultats démontrent que la polarisation des composants centraux de la voie PCP précède le positionnement polarisé du cil et que la polarisation du centriole semble déterminante pour réguler la PCP.

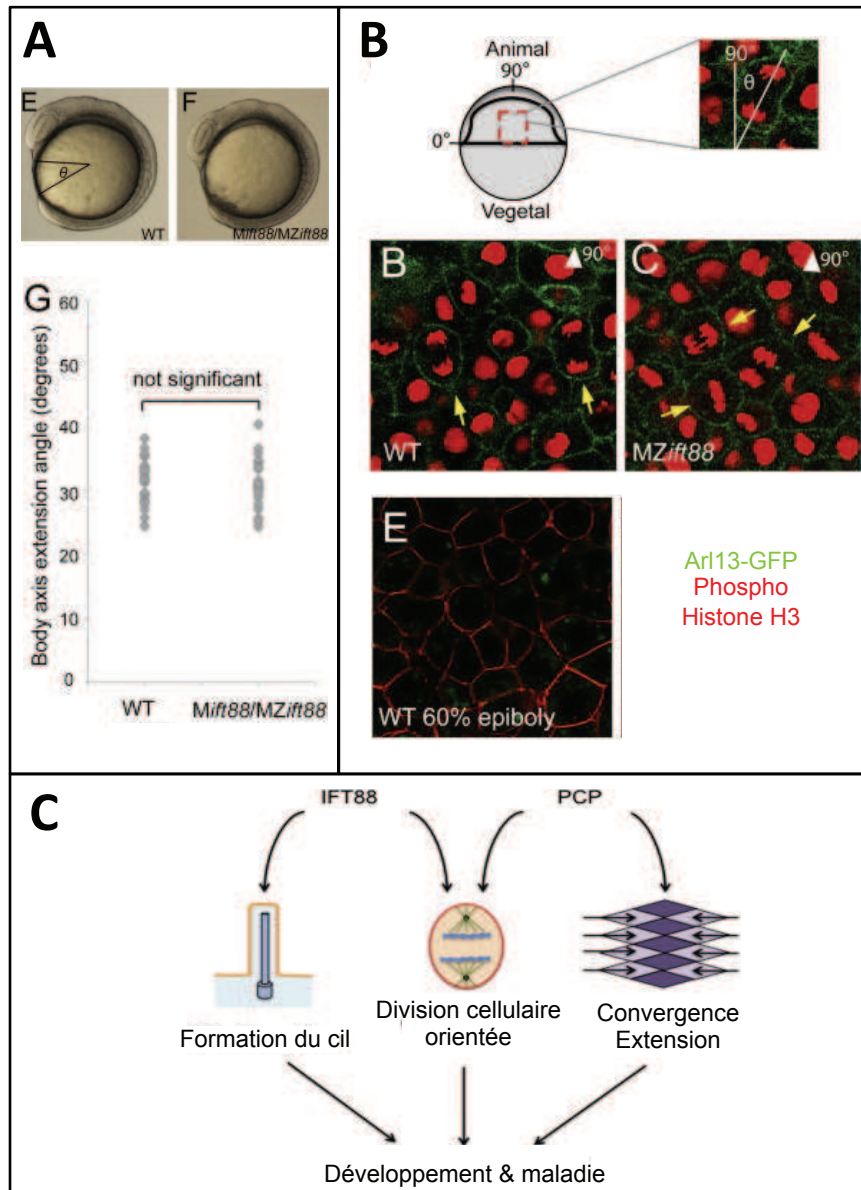


Figure 27 : La protéine IFT88 contrôle l'orientation des divisions cellulaires indépendamment de sa fonction ciliaire.

A- Les mutants *MZift88* qui ne forment jamais de cil ne présentent pas de défauts de convergence extension. **B-** L'orientation des divisions cellulaires est altérée dans les cellules de l'épiblaste dorsal des mutants *MZift88* (B-C). Au stade observé, 60% d'épiboly ces cellules ne forment pas de cil (E). **C-** Schéma simplifié montrant le rôle de la protéine IFT88 dans la formation du cil et dans l'orientation des divisions cellulaires mais indépendamment de sa fonction ciliaire. Adapté de Borovina et al., 2013.

4.3.3 - La voie Wnt non canonique et le cil chez le poisson zèbre

Plusieurs études utilisant la technologie du morpholino chez le poisson zèbre implique les protéines ciliaires (Bbs1/4/6, Odf1, Ift57, Ift88, Ift172, Lrrc6) dans les mouvements de convergence extension, souvent au détriment de la voie Wnt non canonique (Ross et al., 2005; Gerdes et al., 2007; Kishimoto et al., 2008; Ferrante et al., 2009; Cao et al., 2010; McIntyre et al., 2012). Toutefois et de manière très surprenante, aucun défaut de convergence extension n'a été décrit pour les mutants poissons zèbre des gènes de l'IFT (Sun et al., 2004; Tsujikawa and Malicki, 2004). Cette contradiction apparente entre la perte de fonction induite par le morpholino et les mutants suggèrent que certaines protéines localisées au cil ou à la base du cil peuvent avoir des fonctions dans la PCP indépendamment de leur fonction ciliaire, ou que les défauts de CE observés sont des phénotypes non spécifiques consécutifs à l'injection des morpholinos. Il est également possible que la contribution maternelle confonde l'analyse des cils et de la signalisation PCP dans les mutants de l'IFT chez le poisson zèbre. En effet les mutants dépourvus de protéines zygotiques Ift88 possèdent de hauts niveaux d'ARN maternels qui peuvent restaurer la formation des cils jusqu'à 4 dpf (days post fertilization) et ceci bien après l'achèvement de la morphogenèse axiale dépendante de la PCP (Tsujikawa and Malicki, 2004).

Deux études indépendantes ont contribué à élucider le rôle du cil dans la PCP chez le poisson zèbre. Dans la première, les auteurs ont utilisé des embryons de poisson zèbre dépourvus des protéines Ift88 maternelles et zygotiques (*MZift88*). Ces embryons ne forment pas de cils et développent des œdèmes cardiaques, de l'hydrocéphalie, des kystes rénaux et ont un tronc courbé (Huang and Schier, 2009). Toutefois, les auteurs n'ont constaté aucun défaut dans les mouvements de convergence extension dans ces embryons, ce qui suggère que le cil n'est pas requis pour la voie Wnt non canonique chez le poisson zèbre. Dans la seconde étude, les auteurs ont comparé les phénotypes des poissons zèbres dépourvus de protéine maternelle Ift88 (*Mift88*), qui se développe normalement aux poissons dépourvus des protéines Ift88 maternelles et zygotiques (*MZift88*) (Borovina and Ciruna, 2013). Là encore, ils n'ont constaté aucun défaut associé à une altération de la voie PCP chez le poisson zèbre mais cette fois-ci, les auteurs ne se sont pas limités à l'analyse de la CE puisqu'ils ont également observé le positionnement du corps basal, l'élongation médio-latérale en réponse à des signaux PCP ou la migration de la plaque préchordale. Ils ont ainsi révélé des défauts d'orientation du fuseau mitotique dans les cellules de l'épiblaste dorsal qui ne forment pas de

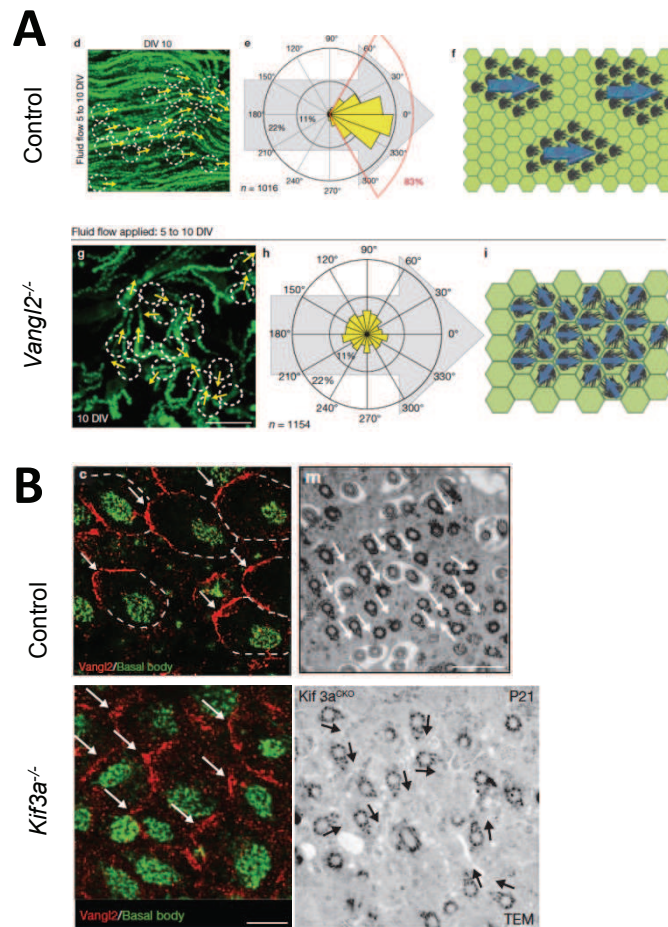


Figure 28 : La signalisation PCP est nécessaire mais pas suffisante pour la polarisation du cil en réponse aux forces hydrodynamique.

A- Un flux externe appliqué sur des cellules épendymaires permet l'orientation des corps basaux dans le sens de propagation du flux. Dans les souris mutantes *Vangl2*^{LP/LP} l'orientation des corps basaux est aléatoire et le battement des cils est non coordonné entre chaque cellule. **B-** La localisation asymétrique de *Vangl2* n'est pas altérée dans les mutants du gène *Kif3a* qui ne forment pas de cil mais l'orientation des corps basaux est aléatoire. Adapté de Guirao et al., 2010.

cil (**Figure 27**) (Borovina et al., 2010). Ces défauts d'orientation sont plus prononcés dans les mutants *MZift88*. En résumé, cette étude montre que les cils ne sont pas requis pour établir la PCP mais que la protéine IFT88 contrôle l'orientation des divisions cellulaires de façon indépendante à sa fonction dans la ciliogenèse.

Ainsi, il est possible que les défauts de PCP observés dans les mutants des gènes requis pour la ciliogenèse résultent en réalité de l'altération initiale du positionnement du centriole/corps basal et non d'un problème de cil.

4.3.4 - Les épithéliums multiciliés et la voie Wnt non canonique

L'étude de la polarisation des épithéliums multiciliés permet également d'étudier le lien entre le cil et la PCP. En effet, la force du battement des multicils permet l'écoulement du liquide à l'échelle d'un tissu. Ce processus implique le battement coordonné des cils et donc l'orientation de ceux-ci dans une même direction, celle de l'écoulement des fluides. Dans les épithéliums multiciliés le battement coordonné des cils fait intervenir deux types de polarité. Premièrement, **la polarité translationnelle** qui fait référence au positionnement des corps basaux au niveau de la membrane apicale. La seconde, **la polarité rotationnelle** concerne l'orientation des pieds basaux des corps basaux dans une même direction.

Une étude menée par le groupe de Nathalie Spassky démontre que les forces hydrodynamiques en association avec la PCP jouent un rôle prépondérant pour la coordination du battement (Guirao et al., 2010). Dans leur étude, les auteurs montrent que les forces hydrodynamiques exercées sur des cils soumis à un flux dirigé conduit à leur orientation dans le sens de propagation du flux. De manière intéressante, si le flux externe est appliqué sur des cellules plus matures aucune réorientation n'est observée. La même expérience réalisée sur des cultures de cellules issues des mutants du gène *Vangl2* montre que les cils de ces cellules ne produisent pas de battement orienté dans une même direction. En accord avec ce phénotype, la polarité rotationnelle est fortement affectée dans ces cellules. Ces données montrent que la polarisation rotationnelle implique l'action coordonnée de la PCP et des forces hydrodynamiques. Les auteurs montrent également que dans les cellules épendymaires qui ne forment pas de cils (*Kif3a*^{CKO/CKO} et *Ifi88*^{CKO/CKO}), les corps basaux sont distribués aléatoirement mais la localisation de *Vangl2* n'est pas affectée (**Figure 28**). L'ensemble de ces résultats montre que la distribution asymétrique des composants de la PCP

se fait avant la polarisation des cils et qu'elle n'est pas suffisante pour l'orientation polarisée des corps basaux à l'échelle cellulaire et tissulaire.

La question qui se pose suite à cette étude est de savoir quels sont les mécanismes par lesquels la signalisation PCP oriente les cils ? Parmi les possibilités, l'implication du cytosquelette cellulaire apparaît déterminante. En effet, le traitement de cellules multiciliées de la trachée avec du nocodazole, qui dépolymérise les microtubules cellulaires, empêche la localisation asymétrique correcte des composants centraux de la PCP (Vangl1, Pk2) à la membrane apicale. Ce résultat suggère un rôle dans le transport des composants de la PCP par les microtubules. De plus, la dépolymérisation des microtubules dans des cellules matures diminue la polarisation rotationnelle et l'espacement entre les corps basaux n'est plus aussi régulier. Dans ce modèle cellulaire, les microtubules partent du pied basal en direction des jonctions apicales où Fz et Dsh1/3 sont localisés et des marquages par immunofluorescence montrent que l'extrémité positive des microtubules est enrichi asymétriquement de ce même côté. La localisation asymétrique de ces microtubules dépend directement de Fz6 et de son interaction avec Vangl1 dans la cellule voisine (Vladar et al., 2012). En conclusion de leurs travaux, les auteurs proposent que les microtubules qui partent du pied basal assurent un lien direct entre le corps basal et la PCP aux jonctions cellulaires, jouant ainsi le rôle d'effecteurs de la signalisation PCP à l'origine de l'orientation des corps basaux.

En conclusion, c'est le centriole/corps basal qui apparaît comme médiateur clé des signaux de la voie Wnt/PCP et non le cil. Le corps basal et l'axonème sont deux organites avec des rôles distincts et de nombreuses protéines impliquées dans la ciliogenèse localisent à la fois au corps basal et au cil. Ainsi, il est possible que la fonction assurée par une protéine au corps basal soit indépendante de celle assurée au cil et que les effets sur la signalisation Wnt soient donc distincts. Cependant une question demeure : Comment et qui est requis en premier ? La voie PCP doit elle être intacte pour permettre le positionnement correct du centrosome, ou est ce l'inverse ? Néanmoins, ces deux événements semblent être requis en parallèle pour permettre la mise en place de la polarité dans un tissu.

4.4 - Conclusion

Le rôle central assuré par le cil ou le corps basal dans les voies de signalisations nécessaires à l'embryogenèse, la morphogenèse ou la prolifération, telles que les voies PDGFR α , Hedgehog et Wntless, apparaît comme évident. Toutefois, des études récentes montrent l'implication du cil ou du corps basal dans des voies de signalisations additionnelles. Par exemple, certains composants de la voie Notch, essentielle dans la différenciation, sont enrichis dans le cil primaire et l'absence de cil diminue l'activité de la voie dans l'épiderme de souris. Plus précisément, le cil apparaît comme l'élément assurant la balance entre la signalisation, la prolifération et la différenciation (Ezratty et al., 2011). De plus, la protéine Hamartin (TSC1), composante de la voie mTOR nécessaire à la croissance, la prolifération et la survie cellulaire, est présente au corps basal. Mais le meilleur lien entre cette voie et le cil provient des études menées sur le rein et montre la diminution de l'activité de la voie dans les cellules rénales qui ne forment pas de cils. De même, l'utilisation d'inhibiteurs de cette voie sur des animaux modèles des ciliopathies donne des résultats très prometteurs (Wang and Dong, 2013).

Globalement les mécanismes moléculaires de la transduction des signaux assurant la liaison avec le cil ou le corps basal restent peu caractérisés mais il est évident que l'enrichissement des composants de ces voies au niveau de ces structures n'est pas anodin. De plus, il est important de rappeler que chez les invertébrés comme la drosophile, les signalisations Hedgehog et Wnt/PCP ne requièrent pas le cil. Ainsi, l'étude de ces voies dans de tels organismes pourrait conduire à l'identification des propriétés particulières assurées par le cil et le corps basal dans la transduction des signaux.

5. Les ciliopathies

Comme nous venons de le voir, les cils jouent un rôle primordial au cours du développement où ils assurent des fonctions motiles aussi bien que sensorielles. Les kystes rénaux et les maladies hépatiques sont des phénotypes communs à toutes les ciliopathies, mais les manifestations cliniques de ces maladies restent très variées d'un syndrome à l'autre. Généralement les ciliopathies sont divisées en deux grandes classes : 1- Les syndromes dits

Composant	Gène Humain	Localisation	Fonction	Phénotype	Référence
Bras de dynéines externes	<i>DNAH5</i>	Axonème	Composant structural des BDE	Absence des BDE	<i>Omran H et al., 2000</i> <i>Olbrich H et al., 2002</i> <i>Hornef N et al., 2006</i>
	<i>DNAH11</i>	Axonème	Composant structural des BDE	Ultra structure normale	<i>Bartoloni L et al., 2002</i> <i>Schwabe GC et al., 2008</i> <i>Pifferi 2010</i>
	<i>DNAI1</i>	Axonème	Composant structural des BDE	Absence des BDE. BDE raccourcis	<i>Pennarun G et al., 1999</i> <i>Guichard C et al., 2001</i>
	<i>DNAI2</i>	Axonème	Composant structural des BDE	Absence des BDE	<i>Loges NT et al., 2008</i>
	<i>TXNDC3</i>	Axonème	Composant structural des BDE	Absence des BDE. BDE raccourcis	<i>Duriez B et al., 2007</i>
	<i>DNAL1</i>	Axonème	Composant structural des BDE	Absence des BDE. BDE raccourcis	<i>Mazor M et al., 2011</i>
Facteurs d'assemblage et de stabilité	<i>ARMC4</i>	Cytoplasme + Axonème	Transport et ancrage des BDE	Absence partielle des BDE	<i>Hjej R et al., 2013</i>
	<i>C21ORF59</i>	Corps basal + Matrice axonémale	Adaptateur pour le transport des BDE & BDI ?	Absence des BDE & BDI. Désorganisation des microtubules	<i>Austin-Tse et al., 2013</i>
	<i>CCDC103</i>	Cytoplasme + Axonème (Chlamydomonas)	Ancrage des BDE	Absence des BDE & BDI	<i>Panizzi JR et al., 2012</i>
	<i>CCDC114</i>	Axonème	Ancrage des BDE	Absence des BDE	<i>Onoufriadis A et al., 2013</i> <i>Knowles MR et al., 2013</i>
	<i>DNAAF1/LRRC50</i>	Cytoplasme	Assemblage des bras de dynéines	Absence des BDE & BDI	<i>Duquesnoy P et al., 2009</i> <i>Loges NT et al., 2009</i>
	<i>DNAAF2/C14orf104</i>	Cytoplasme	Assemblage des bras de dynéines	Absence des BDE. Diminution des BDI	<i>Omran H et al., 2008</i>
	<i>DNAAF3</i>	Cytoplasme	Assemblage des bras de dynéines	Absence des BDE & BDI	<i>Mitchison HM et al., 2012</i>
	<i>DNAAF4/ DYX1C1</i>	Cytoplasme	Assemblage des bras de dynéines	Absence des BDE & BDI	<i>Tarkar A et al., 2013</i>
	<i>HEATR2</i>	Cytoplasme	?	Absence des BDE. Absence ou diminution des BDI	<i>Horani A et al., 2012</i>
	<i>LRRC6</i>	Cytoplasme	Assemblage des bras de dynéines	Absence des BDE & BDI	<i>Kott E et al., 2012</i> <i>Horani A et al., 2013</i>
	<i>SPAG1</i>	Cytoplasme ?	Assemblage des bras de dynéines	Absence des BDE & BDI	<i>Knowles M et al., 2013</i>
	<i>ZMYND10</i>	Cytoplasme	Assemblage des bras de dynéines	Absence des BDE & BDI	<i>Zariwala M et al., 2013</i> <i>Moore DJ et al., 2013</i>
Fibres radiaires	<i>RSPH1</i>	Axonème	Composant structural des fibres radiaires	Absence partielle de la paire centrale. Pas de fibres radiaires si absence de paire centrale	<i>Kott E et al., 2013</i>
	<i>RSPH4A</i>	Axonème	Composant structural des fibres radiaires	Absence partielle de la paire centrale. Pas de fibres radiaires si absence de paire centrale	<i>Castelman VH et al., 2009</i> <i>Zietkiewicz E et al., 2012</i> <i>Kott E et al., 2013</i>
	<i>RSPH9</i>	Axonème	Composant structural des fibres radiaires	Absence partielle de la paire centrale. Pas de fibres radiaires si absence de paire centrale	<i>Castelman VH et al., 2009</i> <i>Alsaadi M et al., 2012</i> <i>Kott E et al., 2013</i>
Membres du N-DRC	<i>CCDC39</i>	Axonème	Ancrage du N-DRC ?	Absence des BDI. Paire centrale absente ou surnuméraire. Fibres radiaires et N-DRC anormaux	<i>Merveille AC et al., 2011</i>
	<i>CCDC40</i>	Axonème	Ancrage du N-DRC ?	Absence des BDI. Fibres radiaires et N-DRC anormaux	<i>Becker-Heck A et al., 2011</i>
	<i>CCDC65</i>	Cytoplasme + Axonème	Assemblage et maintenance du N-DRC	Diminution des BDI et du N-DRC. Désorganisation des microtubules	<i>Horani A et al., 2013</i> <i>Austin-Tse et al., 2013</i>
	<i>CCDC164</i>	Axonème	Assemblage du N-DRC	Ultrastructure anormale du N-DRC	<i>Wirschell M et al., 2013</i>
Paire centrale	<i>HYDINE</i>	Axonème		Absence de la projection C2b	<i>Olbrich H et al., 2012</i>

Tableau 1 : Gènes mutés dans les dyskinésies ciliaires primitives chez l'Homme.

immotiles regroupés sous le terme de Dyskinésie Ciliaire Primitive (PCD). 2- Les syndromes affectant les fonctions de sensorialité des cils primaires ou ciliopathies non motiles.

5.1 - Les dyskinésies Ciliaires Primitives

Les **Dyskinésies Ciliaires Primitives** (PCD) sont des maladies génétiques rares à transmission autosomale récessive dont la prévalence est estimée à 1/20 000 (Afzelius, 1998; Barbato et al., 2009; Bush et al., 2007). Elles résultent de défauts de motilité du cil (immotilité, battement non coordonné, fréquence diminuée ou aplasie). Les symptômes cliniques reflètent la distribution tissulaire des cils motiles et incluent les infections respiratoires, l'hydrocéphalie, le situs inversus (plus de 50% des patients, on parle alors de syndrome de Kartagener) et la stérilité des hommes. Les défauts observés par microscopie électronique sont extrêmement variables et affectent les composants motiles de l'axonème. Vingt six gènes ont été identifiés comme responsables de PCD mais la majorité code des composants des bras de dynéines externes (DNAH5, DNAH11, DNAI1, DNAI2 TXNDC3, DNAL1) ou nécessaires à leur assemblage ou à leur stabilité (LRRC50/DNAAF1, KTU/DNAAF2, DNAAF3, CCDC103, CCDC114, HEATR2, LRRC6, ZMYND10, DYX1C1, ARMC4, SPAG1 et C21ORF59). Ainsi plus de 65% des patients ne possèdent plus les bras de dynéines externes, à l'exception de DNAH11 où les BDE sont toujours présents. Des mutations dans les gènes codant les fibres radiaires (RSPH1, RSPH4A et RSPH9) le N-DRC/Liens de nexine (CCDC39, CCDC40, CCDC65 et CCDC164) et la paire centrale (Hydine) ont également été identifiées (**Tableau 1**).

5.2 - Les ciliopathies dites « non motiles »

Les **ciliopathies dites « non motiles »** font références aux maladies affectant uniquement la fonction non motile du cil. Cette liste ne cesse de s'agrandir et illustre l'importance fonctionnelle du cil primaire. Dans ce contexte il est devenu possible de diviser cette catégorie en deux sous groupes basés sur les manifestations cliniques et excluant les phénotypes rénaux et hépatiques. On distingue ainsi les ciliopathies affectant le squelette et les autres (**Tableau 2**). D'une manière générale, elles présentent des signes cliniques très variés qui se recoupent partiellement : formation de kystes rénaux, dégénérescence de la rétine, malformation du cerveau ou du système nerveux, polydactylie ou obésité en sont

Symptômes	BBS	MKS	JBTS	NPHP	SLSN	JATD	OFD1	EVC	ALMS	PKD	BHD
Kystes rénaux	x	x	x	x	x	x	x			x	x
Maladie hépatobiliaire	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x
Défauts de latéralité	x	x		x		x					
Polydactylie	x	x	x			x	x	x			
Agénésie du corps calleux	x	x	x			x	x				
Défauts cognitifs	x	x	x			x	x	x			
Dégénérescence rétinienne	x	x	x		x	x			x		
Encéphalocèle	x	x	x			x		x			
Malformations osseuses		x				x	x	x			
Obésité	x								x		
Surdité						x					
Fissure du palais		x									

BBS : Bardet-Biedl Syndrom, MKS : Meckel Grüber Syndrome, JBTS : Joubert Syndrome, NPHP : Néphronophtisis, SLSN : Senior-Loken Syndrome, JATD : Jeune Syndrome, OFD1 : Oro-Facial-Digital syndrome type 1, EVC : Ellis Van Creveld syndrome, ALMS : Alström Syndrome, PKD : Polycystic kidney disease, BHD : Birt-Hogg-Dube syndrome

Tableau 2 : Phénotypes associés aux différentes ciliopathies non motiles.

quelques exemples. Il est tout à fait habituel de classer ces maladies en fonction des organes les plus sévèrement touchés. Ainsi les nephronophtisis (NPHP) et les Polykystoses rénales (PKD) sont deux ciliopathies caractérisées par des kystes rénaux alors que le LCA (Leber Congenital Amaurosis), au même titre que les rétinites pigmentaires (RP), sont définis par des phénotypes de dégénérescence pigmentaires. Le syndrome de Bardet-Biedl (BBS) est associé à plusieurs phénotypes incluant l'obésité, les kystes rénaux et les RP alors que les syndromes de Meckel-Gruber (MKS) et de Joubert (JBTS) sont caractérisés par des malformations du cerveau. Cependant, cette redondance est en partie artificielle puisqu'un même gène peut être muté dans plusieurs syndromes. C'est le cas de CEP290 muté dans les syndromes de LCA, NPHP, JBTS, MKS, BBS et Senior-Loken (SLSN). De plus de nombreuses protéines impliquées dans ces syndromes agissent en complexes telles que les protéines du BBS, les NPHP ou les MKS (Chih et al., 2012; Mollet et al., 2005; Nachury et al., 2007; Sang et al., 2011) et des mutations différentes dans un même gène peuvent conduire à des manifestations cliniques diverses.

Le lien entre le cil primaire et les maladies génétiques a été établi par des travaux menés sur le gène *Ift88* essentiel au transport intraflagellaire et à la formation du flagelle chez *Chlamydomonas*. En effet, ce gène est muté dans une lignée de souris modèle des polykystoses rénales (Tg737orpk). Cette mutation entraîne la synthèse d'une protéine anormale ce qui conduit à un phénotype hypomorphe. Les cils du rein sont absents ou très courts dans ces souris, tout comme les flagelles des mutants IFT88 chez *Chlamydomonas* (Pazour et al., 2000b). Ces travaux ont été déterminants puisqu'ils ont révélé l'implication de l'IFT dans les polykystoses rénales et par conséquent celle du cil primaire et de son rôle essentiel dans le développement de divers tissus chez les vertébrés.

Dans l'ensemble, les recherches relatives à la biologie des cils ont permis de démontrer l'importance physiologique des cils au cours du développement et dans les maladies chez l'Homme. Étonnamment, les fonctions des protéines ciliaires ne sont pas restreintes à leur rôle dans la ciliogenèse puisque de nombreux travaux ont montré leur implication dans des processus biologiques fondamentaux indépendant de la fonction ciliaire. Ces recherches ont également révélé la complexité et la diversité des mécanismes moléculaires sous-jacents et les analyses fonctionnelles à venir ou en cours des protéomes / transcriptomes / interactomes des cils / flagelles et corps basaux permettront, sans aucun doute, d'améliorer nos connaissances encore partielle de ces mécanismes.

A terme, ces avancées permettront très certainement la mise en place de stratégies thérapeutiques essentiellement focalisées sur la thérapie génique ou l'administration de drogues. Ces stratégies devront pouvoir faire face à la pénétrance multi tissulaire et à la sévérité variable en fonction des tissus affectés (McIntyre et al., 2013).

Objectifs de ce travail

1. Contexte

L'ensemble des données présentées dans l'introduction démontre le rôle central assuré par le duo corps basal/cil pendant l'embryogenèse et pour le maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. Pourtant les mécanismes permettant leur mise place, au même titre que les acteurs structuraux et fonctionnels qui sont impliqués dans leur fonctionnement restent peu compris.

Afin de caractériser les acteurs impliqués et leurs rôles précis dans la ciliogenèse, de nombreuses approches ont été développées. Il s'agit essentiellement de méthodes à large échelle comme l'analyse des transcriptomes (ex Keller et al., 2005; Chen et al., 2006; Ross et al., 2007) et protéomes (ex Andersen et al., 2003; Pazour et al., 2005; Ishikawa and Marshall, 2013) des cils et corps basaux de nombreuses espèces. Ces études ont permis d'établir des listes exhaustives des composants des cils, mais la validation fonctionnelle reste à réaliser pour bon nombre de candidats. Toutefois, il ne fait aucun doute qu'il s'agit d'avancées majeures pour la connaissance de ce système.

Dans l'équipe nous avons tiré profit de la présence de la boîte-X, localisée dans le promoteur de nombreux gènes ciliaires et cible des facteurs de transcription de la famille des RFX, afin d'identifier de nouveaux acteurs de la ciliogenèse. Plus précisément, les séquences de fixation à l'ADN ont été recherchées simultanément dans deux espèces de drosophile : *Drosophila melanogaster* et *Drosophila pseudoobscura*. En ne sélectionnant que les gènes conservés entre ces deux espèces relativement distantes, nous avons pu établir une liste de 462 gènes candidats à la fonction ciliaire (Laurençon et al., 2007).

Afin d'obtenir une liste plus stringente, plusieurs étapes de sélection ont par la suite été appliquées :

- 1- Le gène doit être conservé chez les vertébrés. Il s'agit d'un critère clé, mettant en évidence sa conservation fonctionnelle au cours de l'évolution et donc son importance biologique.
- 2- La pression de conservation des composants motiles. En effet chez *C.elegans*, il n'existe qu'un seul type de cils, les cils sensoriels qui ne sont pas motiles. Or les

animaux plus évolués possèdent de nombreux cils motiles. Une contre sélection a été effectuée afin de sélectionner les gènes absents chez *C.elegans*.

- 3- La confrontation aux études à large échelle déjà publiées qui ont donné lieu à plusieurs listes de gènes plus au moins stringentes.

En parallèle, nous avons également réalisé des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine à partir de culture primaires de cellules épendymaires de cerveau issus des souris invalidées pour les gènes *RFX1* et *RFX3* versus des allèles de souris sauvages. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'équipe de Walter Reith à Genève et nous ont permis d'obtenir une liste de gènes cibles des facteurs de transcription RFX1/3 chez la souris et donc potentiellement impliqués en ciliogenèse.

L'ensemble de ces travaux nous a permis d'établir une liste de gène candidats à la fonction ciliaire certainement très fiable. Parmi ceux-ci, bon nombre ont déjà été vérifié expérimentalement. C'est notamment le cas pour ceux impliqués dans le transport intraflagellaire ou les gènes du syndrome de Bardet-Biedl. Toutefois, on retrouve un grand nombre de gènes dont la fonction n'a pour le moment pas été décrite.

2. Projet

Dans ce contexte, les objectifs de ma thèse sont de comprendre la fonction chez les vertébrés de deux gènes identifiés comme cible de RFX, aux fonctions inconnues mais potentiellement impliqués dans la ciliogenèse.

- Le premier gène candidat est *CCDC151*. Ce gène code une protéine à domaine coiled-coil partageant des origines communes avec la protéine ODA1/DC2, nécessaire à l'ancrage des bras de dynéine externes sur le flagelle de *Chlamydomonas* (Takada et al., 2002). La caractérisation fonctionnelle de ce gène a été réalisée essentiellement chez le poisson zèbre mais elle a été complétée par des études réalisées chez la drosophile et dans des cellules de rein de souris (IMCD3). Ceci a permis de montrer la spécificité d'action et l'évolution de sa fonction chez les mammifères.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans le journal Human Molecular Genetics.

- Le second gène candidat est *LRRC48*. Chez trypanosome, ce gène est nécessaire à la motilité du flagelle (Baron et al., 2007) et des travaux réalisés chez *Chlamydomonas*

montrent qu'il appartient au complexe du N-DRC, élément clé nécessaire à la motilité des cils et flagelles (Lin 2011). Aucune donnée fonctionnelle n'existe pour ce gène. J'ai donc initié la caractérisation de sa fonction en utilisant la technologie du morpholino chez le poisson zèbre. Les résultats obtenus seront associés à l'article présentant les cibles des facteurs de transcription RFX1 et RFX3 chez la souris en collaboration avec l'équipe de Walter Reith.

Ainsi dans la partie résultat de ce manuscrit, je commencerai par présenter mes travaux relatifs au gène *CCDC151* puis, dans une deuxième partie, je traiterai ceux concernant *LRRC48*. L'ensemble des résultats ayant permis de décrire l'implication de nouveaux gènes dans la mise en place et la fonction des cils seront ensuite discutés dans la dernière partie de ce manuscrit.

Résultats

1. Caractérisation fonctionnelle du gène *CCDC151*

1.1 - Contexte - résumé

Le point de départ de cette étude provient des données de l'équipe montrant que la protéine CCDC151 est une cible du facteur de transcription des gènes ciliaires, RFX3 chez la souris. Aucune autre donnée relative à la localisation ou à la fonction de ce gène n'a été décrite avant le début de ces travaux.

Dans cette étude, nous montrons que le gène *CCDC151* est évolutivement conservé dans les espèces possédant des cils motiles et qu'il partage des origines communes avec le gène *ODA1/DC2*, nécessaire à l'assemblage des bras de dynéine externes du flagelle de *Chlamydomonas* (Takada et al., 2002). Chez la drosophile, nous montrons que la protéine CG14127/*CCDC151* est associée aux cils motiles dont la construction est dépendante du transport intraflagellaire et qu'elle est nécessaire pour le comportement de géotaxie des mouches adultes. Chez le poisson zèbre, *ccdc151* est exprimé dans les tissus possédant des cils motiles et la perte de fonction par injection de morpholino conduit à des défauts d'asymétrie droite gauche et à des kystes rénaux. De plus, nous montrons que *Ccdc151* est requis pour le fonctionnement correct des cils motiles de la vésicule de Kupffer et du rein, en contrôlant l'assemblage des bras de dynéine. *Ccdc151* est donc un nouvel acteur impliqué dans le transport dépendant de l'IFT des bras de dynéine chez les animaux. Par ailleurs, nous avons également observé l'implication de *Ccdc151* dans des fonctions cellulaires additionnelles chez les vertébrés. Chez le poisson zèbre, *Ccdc151* est requis pour l'orientation correcte des plans de division cellulaire dans le rein et interagit génétiquement avec *Prickle1* dans ce processus. De plus la perte de fonction par ARN interférence dans des cellules de mammifères montre que *CCDC151* est impliquée dans la régulation de la taille du cil.

L'ensemble de ces travaux montre que le gène *CCDC151* est un nouvel acteur de la ciliogenèse requis pour la fonction motile des cils chez les animaux et qu'il a acquit des fonctions additionnelles chez les vertébrés.

1.2 - ARTICLE

The coiled-coil domain containing protein CCDC151 is required for the function of IFT-dependent motile cilia in animals

Julie Jerber¹, Dominique Baas², Fabien Soulavie¹, Brigitte Chhin¹, Elisabeth Cortier¹, Christine Vesque^{3,4}, Joëlle Thomas^{1,†} and Bénédicte Durand^{1,†,*}

¹Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 5534 CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne 69622, France, ²Equipe Différenciation Neuromusculaire, Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, CNRS UMR 5239/ENS Lyon, Université de Lyon, IFR128 Biosciences Lyon-Gerland, 46, allée d'Italie, 69364 Lyon cedex 07, France, ³Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 7622, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U969, Paris 75005, France and ⁴Université Pierre et Marie Curie, Paris 75005, France

Received July 11, 2013; Revised September 4, 2013; Accepted September 7, 2013

Cilia are evolutionarily conserved organelles endowed with essential physiological and developmental functions. In humans, disruption of cilia motility or signaling leads to complex pleiotropic genetic disorders called ciliopathies. Cilia motility requires the assembly of multi-subunit motile components such as dynein arms, but mechanisms underlying their assembly pathway and transport into the axoneme are still largely unknown. We identified a previously uncharacterized coiled-coil domain containing protein CCDC151, which is evolutionarily conserved in motile ciliated species and shares ancient features with the outer dynein arm-docking complex 2 of *Chlamydomonas*. In *Drosophila*, we show that CG14127/CCDC151 is associated with motile intraflagellar transport (IFT)-dependent cilia and required for geotaxis behavior of adult flies. In zebrafish, *Ccdc151* is expressed in tissues with motile cilia, and morpholino-induced depletion of *Ccdc151* leads to left–right asymmetry defects and kidney cysts. We demonstrate that *Ccdc151* is required for proper motile function of cilia in the Kupffer's vesicle and in the pronephros by controlling dynein arm assembly, showing that *Ccdc151* is a novel player in the control of IFT-dependent dynein arm assembly in animals. However, we observed that CCDC151 is also implicated in other cellular functions in vertebrates. In zebrafish, *ccdc151* is involved in proper orientation of cell divisions in the pronephros and genetically interacts with *prickle1* in this process. Furthermore, knockdown experiments in mammalian cells demonstrate that CCDC151 is implicated in the regulation of primary cilium length. Hence, CCDC151 is required for motile cilia function in animals but has acquired additional non-motile functions in vertebrates.

INTRODUCTION

Cilia or flagella are highly conserved structures implicated in fundamental functions from protozoa to mammals. Cilia are involved in cell and fluid motility and serve sensory and signaling functions. Cilia or flagella are built around a core microtubule skeleton composed of nine microtubule doublets, with additional features varying between motile and sensory cilia. In motile cilia, specific components are observed and required

for motility, which includes inner dynein arms (IDA) and outer dynein arms, nexin links and most often a central pair of microtubules linked to the peripheral doublets by radial spokes.

In humans, cilia dysfunction leads to various syndromes with complex symptoms that can be due to defects either in cilia motility or in signaling (1,2). Defects in cilia motility lead to a characteristic pathology called primary ciliary dyskinesia (PCD). Whereas 21 genes (*DNAH5*, *DNAH11*, *DNAI1*, *DNAI2*, *TXNDC3*, *DNALI1*, *CCDC103*, *CCDC114*, *KTU*, *LRR50*,

*To whom correspondence should be addressed at: CGphiMC UMR 5534, Université Lyon-1, Bâtiment Gregor Mendel, 16 rue Dubois, 69622 Villeurbanne, France. Tel: +33 472431326; Fax: +33 472432685; Email: benedicte.durand@univ-lyon1.fr

†Co-senior authors.

LRRC6, *HEATR2*, *DNAAF3*, *RPGR*, *OFD1*, *RSPH9*, *RSPH4A*, *HYDIN*, *CCDC39*, *CCDC40*, *CCDC164*) responsible for this disease have already been described, many remain to be identified to explain all PCD cases (3). A majority of the genes identified to date are involved in the assembly of axonemal dynein arms or motile features such as radial spokes or the central pair of microtubules. Studies in *Chlamydomonas* provided essential information on the components required for cilia motility. A mutagenesis screen for paralyzed or slowed flagella allowed the characterization of several classes of mutants affecting different structures of the axoneme such as axonemal dynein arms (4). This led to the identification of several components of the axonemal dynein complexes or assembly pathway (reviewed in 5). In addition, genetic studies in zebrafish and human ciliopathies uncovered novel components of the assembly pathway and yielded insights into its conservation throughout evolution (6–12; reviewed in 13).

Dynein arm assembly is initiated in the cytoplasm and requires at least three dynein assembly factors, DNAAF1 to 3, which, when mutated, give rise to PCD in humans (7,10,14,15). Dynein arms are then transported along the axoneme by the intraflagellar transport (IFT) machinery. A few proteins playing a specific role in the transport of motile components have been described. For example, ODA16/WDR69 is a protein specifically required for the assembly of outer dynein arms and directly interacts with the IFT machinery (16,17). Outer dynein arms were shown to be transported by IFT46 into *Chlamydomonas* flagella (18). Attachment of dynein arms to the microtubule templates requires the dynein docking complex, first described in *Chlamydomonas*. In the green algae, at least three proteins—DC1/ODA3, DC2/ODA1 and DC3/ODA14—were identified as components of the outer dynein arm-docking complex that interact with both tubulin and dynein arms (19–22). In humans, mutations in the ODA1/DC2 component CCDC114 lead to PCD (11,12). Several other proteins are required for the recruitment of dynein arms to the axonemes, such as the ODA5/ODA8/ODA10 complex identified in *Chlamydomonas* (23). In addition, two coiled-coil proteins—CCDC39 and CCDC40—emerged from studies of PCD patients, dog and zebrafish mutants (8,9). These proteins function in the assembly of IDA. Recently, mutations in the gene encoding CCDC103 were found in PCD patients and this protein was shown to be tightly bound to the axoneme and required for IDA and outer dynein arms attachment (6). Finally, CCDC164, identified in *Chlamydomonas* and humans as a component of the dynein regulatory complex (DRC, or nexin link), is also involved in PCD (24).

Despite this growing number of data on actors of cilia motility, several aspects of the dynein assembly pathway are not understood. Evidence suggests the existence of still unidentified IFT cargoes required to transport dynein arms or components of the DRCs into the axoneme (16). The specificity and coordination of the outer dynein arm versus IDA transport constitute another important and unresolved issue. In non-motile cilia, adapters seem to exist to couple specific ciliary cargoes to IFT, thus playing an important role in the regulation of cilium length and ciliary signal transduction (reviewed in 25,26).

We show here that CCDC151, initially identified as a target gene of the ciliogenic transcription factor RFX in *Drosophila* (27), is an evolutionarily conserved protein that is specific to species with motile cilia. CCDC151 shares ancestral features

with ODA1/DC2 from *Chlamydomonas* and with several members of the ODA1 family of proteins in mammals that includes CCDC114 and CCDC63 in mice and humans. In *Drosophila*, we show that CG14127/CCDC151 is specifically associated with motile IFT-dependent sensory cilia but not with flagellar axonemes that do not require IFT for their assembly (28–30). This suggests that CCDC151 is not a structural component of the motile axoneme in *Drosophila*. In zebrafish, we show that *ccdc151* is strongly expressed in motile ciliated tissues, where it is required for dynein arm assembly and for the transport of the docking complex CCDC114. These results identify CCDC151 as a novel regulator of motile cilia function. In addition, we show that the function of CCDC151 is not restricted to cilia motility. Indeed, we demonstrate in zebrafish that *ccdc151* is also involved in the control of cell division orientations and functionally interacts with the planar cell polarity (PCP) pathway component *prickle1* in this process. Moreover, knockdown of *Ccdc151* in IMCD3 mouse cells results in a deregulated ciliary length. These results prompt us to propose that CCDC151 has a more general function related to IFT-dependent transport of ciliary components.

RESULTS

CCDC151 is evolutionarily conserved in motile ciliated species

We previously identified CG14127 as an X-Box-containing gene in *Drosophila*, suggesting a potential ciliary function (27). CG14127 and CCDC151 orthologs in vertebrates belong to a coiled-coil family of proteins related to ODA1/DC2, a docking complex protein (5,11,12,20), and ODA5 (23), both involved in the assembly of outer dynein arms in *Chlamydomonas*. Two subgroups can be distinguished in the family (Fig. 1A): (i) the first one includes CG14127 and its CCDC151 orthologs in vertebrates and CCDC151 paralogs (KIAA1984) in mammals; (ii) the second one contains two *Drosophila* genes: CG14905 and CG17083 and their orthologs in mammals, CCDC63 and CCDC114, the latter being involved in dynein arm assembly in humans (11,12). Only one ortholog, *Ccdc114*, is present in zebrafish. Even though these two subgroups share ancient features with *Chlamydomonas* ODA1 or ODA5, the best reciprocal hit of ODA1 or ODA5 in *Drosophila* is CG14905 from the second subgroup and not CG14127 from the CCDC151 subgroup. Both subgroups have likely evolved separately. Whereas observations in humans show that CCDC114 has conserved a function in docking dynein arms to the axoneme, no functional data exist for the CCDC151 subgroup.

We examined the conserved domains of CCDC151 proteins from humans, mice, zebrafish and *Drosophila* by alignments of the protein sequences (Supplementary Material, Fig. S1) and determined the position of the conserved coiled-coil domains (Fig. 1B). Next, we searched for CCDC151 occurrence in various ciliated species and found potential orthologs only in species with motile cilia (Fig. 1C). For example, no ortholog could be identified in *Caenorhabditis elegans*, which lacks motile cilia, whereas members of the ODA1 family were identified in various ciliated protozoa species such as *Tetrahymena thermophila* (Fig. 1A and C). No ortholog was found in *Plasmodium falciparum*, in which motile flagella assembly takes place

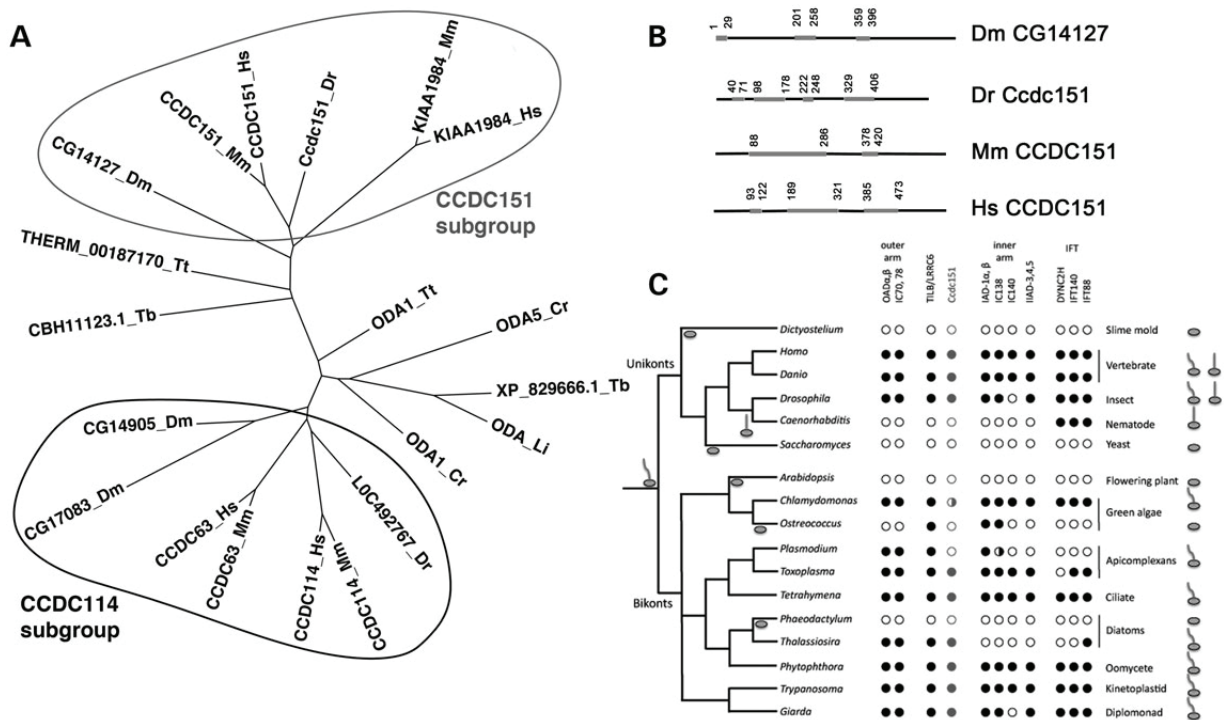


Figure 1. CCDC151 family members share conserved evolutionary features with ODA1. (A) Phylogenetic analysis of the proteins related to *Chlamydomonas* ODA1 in *Drosophila*, zebrafish, mouse, humans, *Trypanosoma brucei* and *L. donovani*. Two main branches can be distinguished. The CCDC151 subgroup presents only one ortholog in *Drosophila* (Dm, CG14127, NP_648520) and zebrafish (Dr, CCDC151, NP_001070837) and two paralogs in mice (Mm, CCDC151, NP_084215 and KIAA1984, NP_084135) and humans (Hs, CCDC151, NP_659482 and KIAA1984, NP_001034463). The second subgroup includes several members in animals including two members in *Drosophila* (CG14905, NP_650569 and CG17083, NP_651139), one member in the zebrafish (LOC492767, NP_001007409) and two members in mouse (CCDC63, NP_899130 and CCDC114, NP_001028415) and humans (CCDC63, NP_689804 and CCDC114, NP_653178). Tt, *T. thermophila* (ODA1, XP_001011849); Cr, *Chlamydomonas reinhardtii* (ODA1, XP_001701436; ODA5, AAS10183); Tb, *T. brucei* (XP829666); Li, *L. donovani* (ODA, ACT22628). (B) Position of the coiled-coil domains (gray) in *Drosophila*, zebrafish, mouse and human proteins. (C) Occurrence of CCDC151 proteins in the eukaryotic kingdom. No CCDC151 orthologs can be found in species with no cilia or non-motile cilia. Reciprocal Best Hits in PSI-Blast run 2 with human CCDC151 as input sequence are noted as gray circles. When no Reciprocal Best Hit was obtained by PSI-Blast run 2, hemi-gray circles were attributed. *Danio rerio*: Ccdc151 (e-value = 0); *Drosophila melanogaster*: CG14127 (e-value = $2e - 91$); *C. reinhardtii*: ODA1 (e-value = $6e - 30$); *Toxoplasma gondii*: TGME49_082030 (e-value = $6e - 77$); *T. thermophila*: TTHERM_00187170 (e-value = $3e - 69$); *Phytophthora infestans*: XP_002898111 (e-value = $7e - 82$); *T. brucei*: XP_847271 (e-value = $2e - 19$); *Giardia intestinalis*: GL50581_118 (e-value = $1e - 35$); *Thalassiosira pseudomonas*: XP_002289840 (e-value = $6e - 76$).

inside the cytoplasm and hence does not rely on IFT (31). All these observations suggest that CCDC151 may play an important function in motile cilia that rely on IFT for their assembly.

CCDC151 is associated with motile IFT-dependent cilia in animals

To address the function of *Ccdc151*, we first characterized its expression profile and subcellular distribution in several model organisms. In mice, *Ccdc151* expression is strongly induced during *in vitro* differentiation of motile cilia of ependymal cells (Fig. 2A). *Ccdc151* expression was down-regulated in ependymal cells obtained from *Rfx3*^{-/-} mice (not shown) (32,33). We designed an antibody directed against the mouse CCDC151 protein (Antibody 1, see Materials and Methods and Supplementary Material, Fig. S2). In mouse ependymal primary cell culture, CCDC151 is associated with motile cilia (Fig. 2B). Identical results were obtained with a commercial antibody directed against the human CCDC151 protein that cross-reacts with the mouse CCDC151 protein (Antibody 2, Supplementary Material, Fig. S2; not shown). Next, we

constructed transgenic *Drosophila* expressing a GFP-tagged version of CG14127/CCDC151 under the regulation of its own promoter (see Materials and Methods). In *Drosophila* embryos, we observed CG14127-GFP only in ciliated sensory neurons of the peripheral nervous system (PNS) (Fig. 2C). In addition, GFP expression was restricted to a subset of the ciliated neurons, namely the chordotonal neurons, the only neurons with motile 9 + 0 cilia in *Drosophila* (28,34,35). In these cells, CG14127-GFP was found in the cell body and associated with the ciliary rootlet inside the dendrite and present within the ciliary ending at the tip of the dendrite (Fig. 2C). Importantly, there was no apparent expression of CG14127-GFP in external sensory neurons that have non-motile ciliated endings. Moreover, GFP labeling was absent within motile flagella of spermatozooids. In *Drosophila*, unlike other species, sperm flagellum assembly does not require IFT, whereas sensory cilia do (29,30). Therefore, CG14127/CCDC151 protein expression is restricted to motile cilia that require IFT for their assembly in *Drosophila*.

In zebrafish, we analyzed the expression profile of *ccdc151* during embryonic and larval development. By RT-PCR

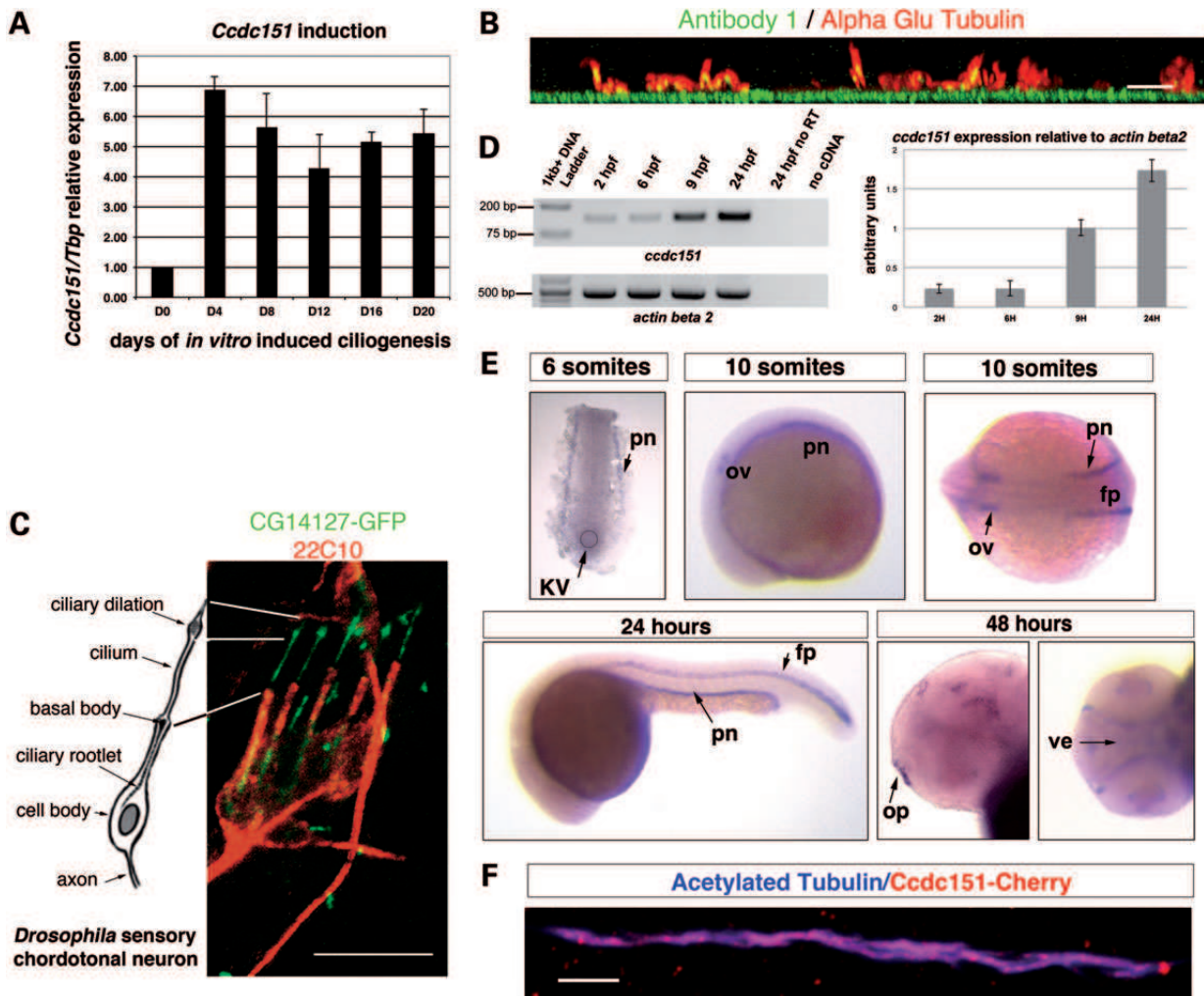


Figure 2. CCDC151 expression is restricted to ciliated cells in animals. (A) *Ccdc151* expression is strongly enhanced during *in vitro* ciliogenesis of mouse ependymal cells. Ciliogenesis was induced by serum deprivation at day 0 and *Ccdc151* mRNAs were quantified by real-time RT-PCR and normalized to *Thp* expression. Results are expressed relative to values at day 0. (B) Antibodies directed against mouse CCDC151 protein (Antibody 1) label motile cilia of *in vitro* differentiated mouse ependymal cells as observed on Y projections of confocal images. Cilia are labeled with anti-Alpha Glu Tubulin (red). (C) Scheme of an embryonic ciliated neuron of a *Drosophila* chordotonal organ and associated CG14127/CCDC151-GFP expression in transgenic *Drosophila* embryos (stage 17). GFP expression is restricted to the chordotonal organs as observed in the five lateral organs of the larval segments. GFP staining is concentrated in the entire ciliated ending and is also found along the ciliary rootlet inside the dendrite and in the cell body. The PNS (red) is labeled with an anti-Futsch antibody (22C10). (D) Maternal and zygotic expression of *ccdc151* in zebrafish. PCR was performed on cDNA from wild-type embryos of 2, 6, 9 and 24 h.p.f. with primers F12 and R13 (left upper panel). Size of the PCR product: 132 bp. Left lower panel: *actin beta 2* control PCR with primers F-actin and R-actin. Right panel: *ccdc151* expression relative to *actin beta 2*. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 3$). (E) *In situ* hybridization of zebrafish embryos with *ccdc151* antisense probe. *ccdc151* signal is already detected at six-somite stage in the KV. At 10-somite stage, a strong *ccdc151* expression is observed in the lateral mesoderm corresponding to prospective pronephros territory (pn), the otic vesicle (ov) and the floor plate (fp) as observed on a dorsal view or a lateral view (upper panel). At 24 h, a strong signal is observed in the pronephros (pn) and the floor plate (fp) (lower panel). At 48 h, signal is also observed in the olfactory pit (op) and the cerebral ventricles (ve) (lower panel). (F) Immunofluorescence on 24 h.p.f. embryos injected with mRNAs coding for a Cherry-tagged version of Ccdc151 (Ccdc151-Cherry). Ccdc151 is localized in motile cilia of the pronephros. Cilia are labeled with anti-Acetylated Tubulin (blue). Bars: (B) 5 μ m; (C and F) 10 μ m.

amplification, we first detected *ccdc151* mRNAs as early as 2 h post-fertilization (2 h.p.f.), suggesting a maternal expression of this gene. However, strong expression of *ccdc151* mRNAs started after 6 h.p.f., when zygotic transcription has already been turned on. Levels of *ccdc151* expression increased till 24 h.p.f., the last stage analyzed by this approach (Fig. 2D). By *in situ* hybridization, we first detected *ccdc151* mRNAs in Kupfer's vesicle (KV) (Fig. 2E, upper panel). *ccdc151* mRNAs were later observed in several structures harboring motile cilia, among which are the pronephros (pn), the floor plate (fp) of the neural

tube and the otic vesicles (ov) (Fig. 2E, upper panel). Expression in these structures was maintained at later developmental stages, and *ccdc151* mRNAs could also be detected in the olfactory pit (op) and cerebral ventricles (ve), which all present motile cilia (Fig. 2E, lower panel). To examine Ccdc151 subcellular distribution in the zebrafish, we injected cherry-tagged *ccdc151* mRNAs. Ccdc151-Cherry was found to be associated with the axoneme of motile cilia in the pronephros (Fig. 2F). Altogether, these results suggest that, like in mice and *Drosophila*, Ccdc151 is associated with motile cilia in zebrafish.

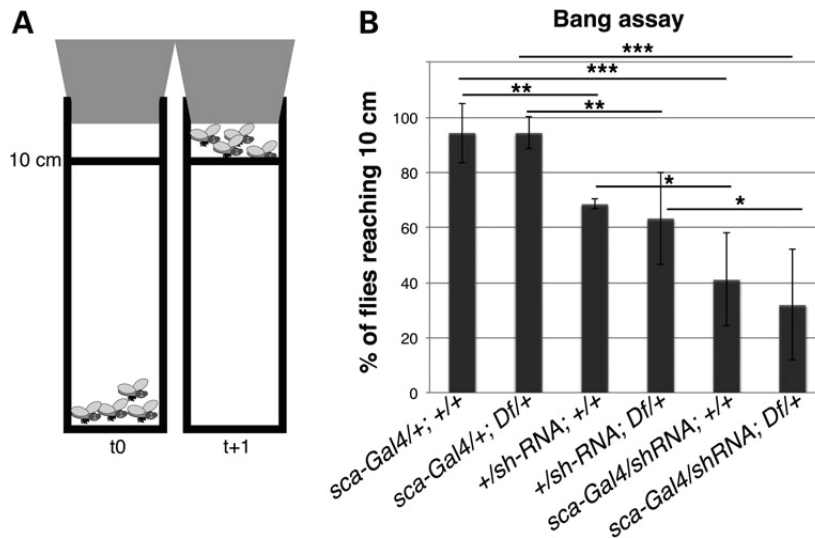


Figure 3. CG14127/CCDC151 depletion in *Drosophila* sensory neurons leads to behavioral defects. (A) Scheme of the bang assay used to evaluate fly coordination. (B) The percentage of flies that climb >10 cm are scored during 1 min after tapping the test tube. Flies carrying *scabrous-Gal4* (*sca-Gal4*) driver and *UAS-shRNA* targeting *CG14127* show a reduced score compared with flies carrying only the *sca-Gal4* driver. No significant differences were observed with the deletion *Df(3L)Exel6115*. All flies carry Dicer-2 on the X chromosome. Two-tailed paired Student's *t*-test analysis was performed to evaluate significant variations. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

CG14127/CCDC151-depleted *Drosophila* show defective coordination and geotaxis behaviors

In *Drosophila*, we investigated the function of CG14127 by driving expression of shRNAs in chordotonal neurons of the PNS by using the UAS-GAL4 system. Chordotonal neurons are required for coordinated movement, geotaxis and hearing in *Drosophila* (36,37). Defects in chordotonal neuron function can be assessed by a simple geotaxis behavioral test called bang assay. Flies are tapped to the bottom of a test tube and recorded for 1 min after the bang. The percentage of flies that are able to climb above 10 cm during this first minute is quantified (Fig. 3A). One hundred percent of control flies with the *sca-Gal4* driver only (expressing Gal4 in all PNS neurons) showed negative geotaxis and moved quickly upward in the test tube (Fig. 3B). No significant difference could be observed between these control flies and flies heterozygous for a complete deletion of *CG14127* (*Df(3L)Exel6115*). In contrast, flies harboring an shRNA transgene targeting *CG14127* were less prone to climb on vertical surfaces and the phenotype was significantly more severe in the presence of the *sca-Gal4* driver. The severity of the phenotype in flies heterozygous for a complete deletion of *CG14127* (*Df(3L)Exel6115*) and expressing the shRNA was similar to the one exhibited by flies which only express the shRNA, demonstrating that shRNA silencing was very efficient. These results show that CG14127 is required for proper function of chordotonal neurons in *Drosophila* adults.

Ccdc151-depleted zebrafish show left–right asymmetry defects and kidney cysts

To gain insights into *ccdc151* function in vertebrates, we performed a morpholino (Mo) knockdown approach in zebrafish. We designed two Mos targeted to the translation start site or the second exon-splicing site of the *ccdc151* transcript

(exon2–intron2 junction, Supplementary Material, Fig. S3). Both Mos induced similar phenotypes. Rescue experiments with zebrafish full-length *ccdc151* mRNAs, not targeted by the splicing Mo, attest for the specificity of the phenotypes. We therefore present only the results obtained with the splicing Mo. Mo injections led to a characteristic curved-tail phenotype [Fig. 4A, 37% of curved tail in *ccdc151* Mo-injected embryos (*n* = 216), 8% in rescued embryos (*n* = 208) and no curved tail in control embryos, *n* = 180] that is associated with several mutations in genes required for zebrafish cilia assembly or function (38–40). Forty-two percent of *Ccdc151*-depleted embryos present a reverted cardiac rotation and 24% had no cardiac rotation as visualized by *cmhc2* *in situ* hybridization (Fig. 4B), demonstrating that *Ccdc151* is required for left–right asymmetry specification. This phenotype was confirmed by aberrant *southpaw* (*spaw*) expression at early stages of left–right embryonic patterning (Fig. 4C). When targeting the Mos specifically into the dorsal forerunner cells (DFC), the precursors of the KV (41–43), we observed an identical phenotype (Fig. 4D), showing that *Ccdc151* is required in the KV cells for proper left–right asymmetry specification.

We also observed pronephros dilation and small kidney cysts in 33% of Mo-injected embryos (*n* = 216) that were never seen in control embryos (*n* = 180) (Fig. 4E and F) and rescued by the injection of full-length *ccdc151* mRNAs (11% of embryos with kidney cysts, *n* = 208). However, even the highest doses of injected Mos did not provoke large kidney cysts. We observed hydrocephalus sporadically (1%, Supplementary Material, Fig. S4). We did not observe obvious defects of the otoliths (not shown), nor of the otic kinocilia (Supplementary Material, Fig. S5), even though *ccdc151* mRNAs are present in the otic vesicle (Fig. 2) and that *Ccdc151*-Cherry can be found in cilia of the otic vesicle (Supplementary Material, Fig. S5).

Altogether, these macroscopic observations show that *Ccdc151* plays a critical function in both the KV and the pronephros.

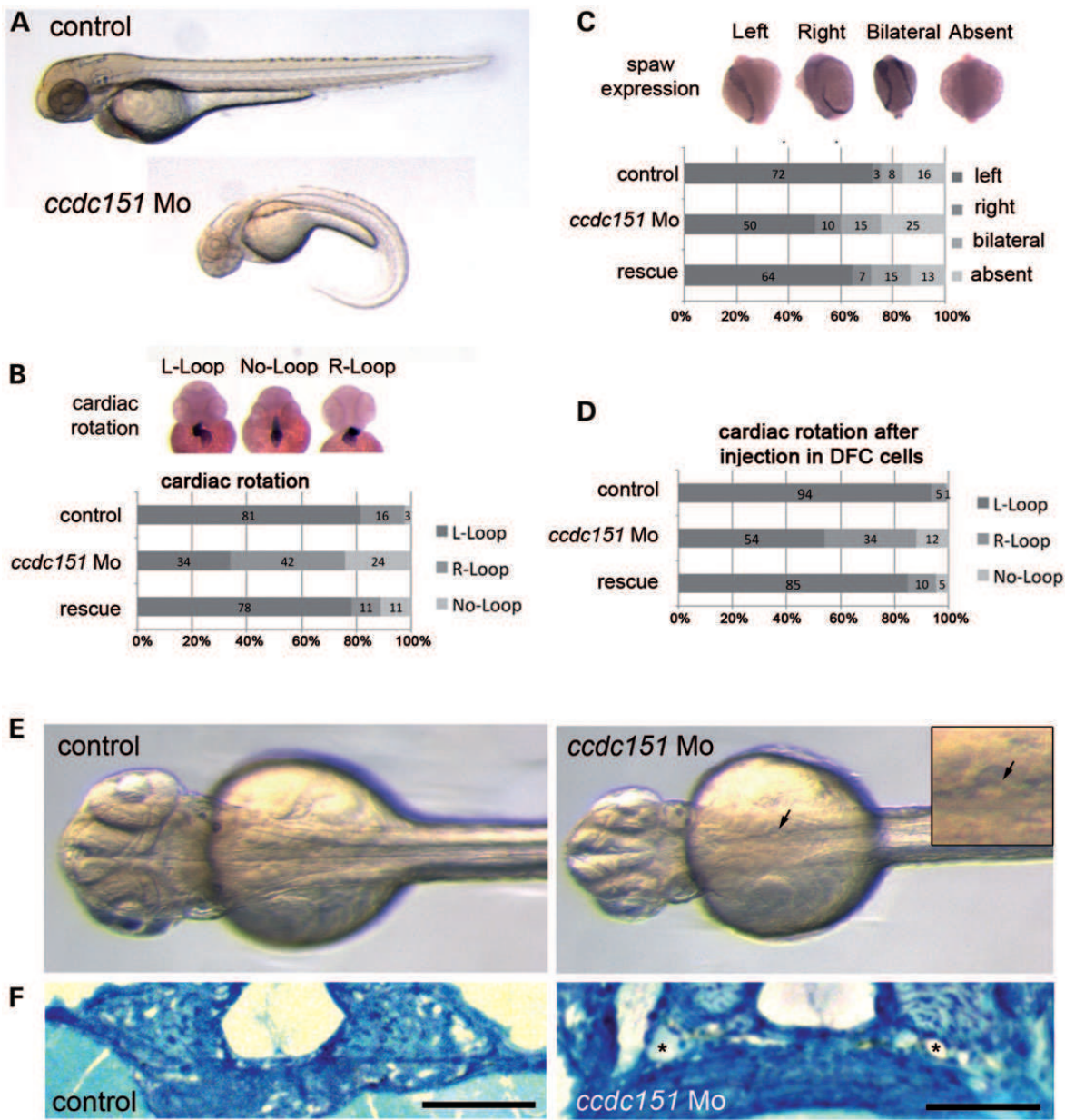


Figure 4. Ccdc151 depletion leads to curved-tail, left–right asymmetry defects and kidney cysts. (A) At 48 h.p.f., *ccdc151* morphants exhibit an abnormal ventral axis curvature compared with control embryos. (B) *In situ* hybridization of control and *ccdc151* morphants with *cmlc2* probe illustrating the three laterality classes of cardiac loop rotation observed in control or injected embryos. The percentage of each class in control, morphant and rescue embryos is reported on the graph after injection at one-cell stage (four independent experiments, control: *n* = 579, *ccdc151* Mo: *n* = 478, rescue: *n* = 216). (C) *In situ* hybridization of control and *ccdc151* morphants showing the four different classes associated with *southpaw* expression in the lateral mesoderm. The percentage of each class in control, morphant and rescue embryos is reported on the graph (three independent experiments, control: *n* = 291, *ccdc151* Mo: *n* = 321, rescue *n* = 121). (D) Percentage of the three laterality classes of cardiac loop rotation, observed by *in situ* hybridization with *cmlc2* probe, in control, morphant or rescue embryos after targeting DFC only (four independent experiments, control: *n* = 128, *ccdc151* Mo: *n* = 142, rescue: *n* = 254). (E) *ccdc151* morphants exhibit kidney cysts (arrows). Enlarged view of the cyst is presented in the inset. (F) Cross-sections of control and *ccdc151* morphant pronephros at 2.5 d.p.f. showing cyst formation (stars). Scale bars: 100 μ m

Ccdc151 is required for efficient cilia motility in the zebrafish

To understand the function of Ccdc151, we analyzed the number, distribution and length of cilia in the KV and the pronephros by immunostaining in control and morphant embryos. Cilia length was similar in the presence or in the absence of Ccdc151 (Fig. 5A and C). However, morphants exhibit

morphogenesis defects with an enlarged KV with more monociliated cells compared with control embryos (Fig. 5A and B). To assess cilia motility in the KV, we performed live imaging of the fluid flow. Control KV produced an efficient leftward flow, which is visualized by the movement of particles within the vesicle. In contrast, no flow was observed in the morphant KVs and most particles remained immotile (Fig. 5D,

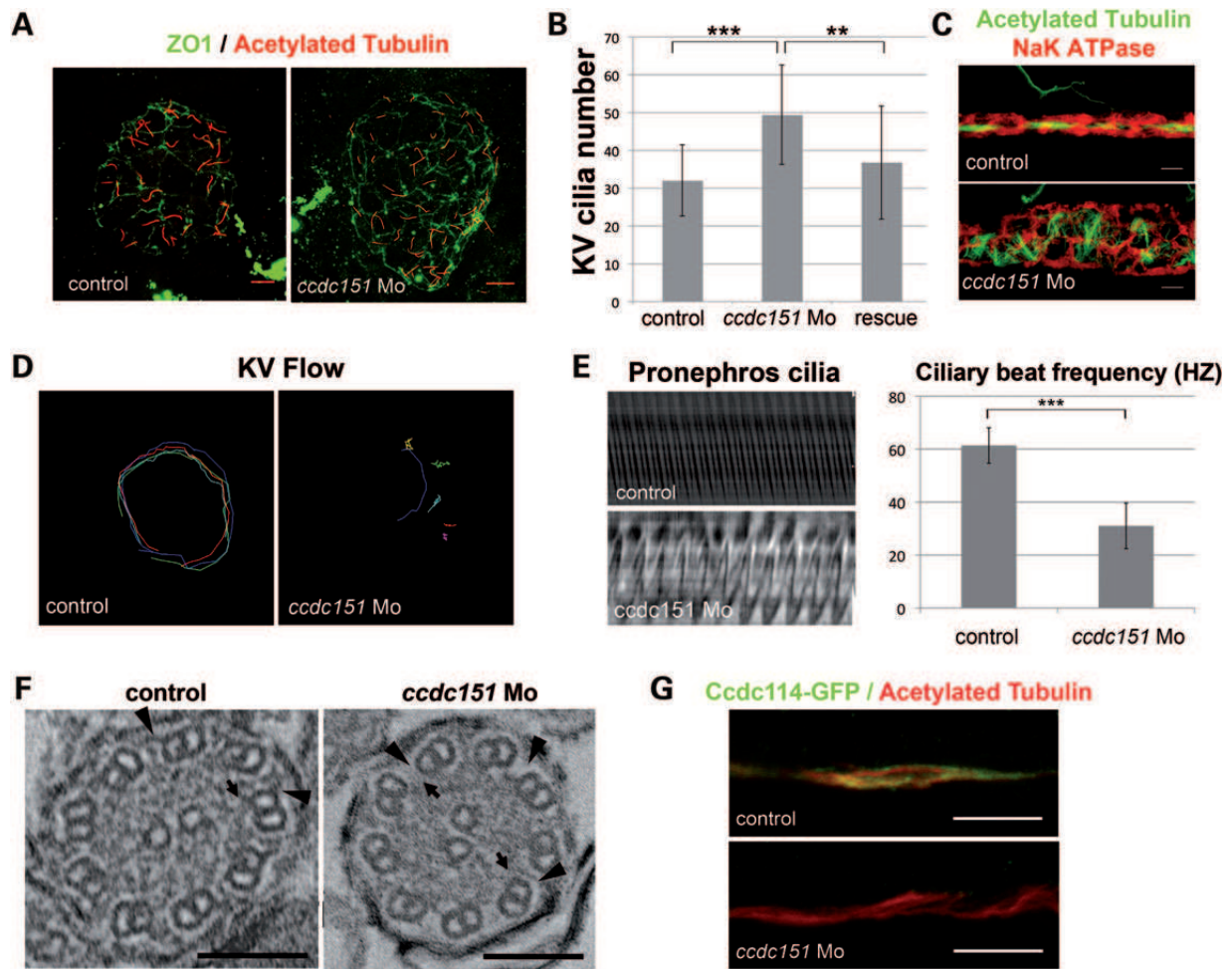


Figure 5. *Ccdc151* is required for efficient cilia motility and axonemal dynein assembly on the axoneme. (A) 9–10-somite stage *ccdc151* morphants exhibit a larger KV compared with control embryos. Cilia are labeled with anti-Acetylated Tubulin (red) and cell junctions with anti-ZO1 (green). (B) The number of ciliated cells is increased but cilia length is not affected in the morphants (two independent experiments, control: $n = 17$, *ccdc151* Mo: $n = 28$, rescue: $n = 14$). (C) Immunostaining of the pronephric duct at 48 h.p.f. showing tubule dilation in *ccdc151* morphants compared with control. Cilia are labeled with anti-Acetylated Tubulin (green) and cell membranes with anti-NaK ATPase (red). (D) Particle movements were tracked in live control and *ccdc151* morphants at five- to six-somite stages. A counterclockwise circular movement is observed in control KV but no particle movement is observed in the KV of *ccdc151* morphants (control: $n = 6$, *ccdc151* Mo: $n = 7$). (E) Line scan analysis of cilia beating movement in control and *ccdc151* morphants at 2.5 d.p.f. The graph indicates the average beating frequency in control and morphants. (F) Cross-sections of pronephros motile cilia in control or *ccdc151* morphants. In *ccdc151* morphants, axonemes do not assemble a full complement of IDA and outer dynein arms (arrows and arrowheads) (control: $n = 40$ cilia from 5 embryos, *ccdc151* Mo: $n = 45$ cilia from 9 embryos). (G) *Ccdc114*-GFP (green) localizes in motile cilia of the pronephros in control embryos, whereas in *ccdc151* morphants this localization is lost. Cilia are labeled with anti-Acetylated Tubulin (red). (B and E) Two-tailed paired Student's *t*-test analysis was performed to evaluate significant variations relative to control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Bars: (A, C and G) 10 μ m, (F) 100 nm.

Supplementary Material, Movies S1 and S2). We can thus conclude that beating of the cilia is either absent or not efficient. We performed high-speed video recording of pronephros cilia in morphant versus control embryos at later stages and observed a reproducible difference in the beating frequencies of motile cilia (Fig. 5E, Supplementary Material, Movies S3 and S4). Altogether, *Ccdc151* is required for efficient motility of cilia in the KV and the pronephros in zebrafish.

***Ccdc151* is required for proper assembly of dynein arms in the pronephros**

To gain insights into the molecular mechanisms that underlie the motility defects, we analyzed the ultrastructure of pronephric

cilia from *ccdc151* morphants. We observed reproducible defects in the number of axonemal dynein arms. This was clearly visualized at the level of the outer dynein arms (Fig. 5F, arrowheads). We also observed a reduced number of IDAs in all embryos analyzed (Fig. 5F, arrows) that was not quantified because of the difficulty to detect IDAs.

Because CG14127/CCDC151 is not a structural component of the *Drosophila* sperm flagella, we hypothesize that it could directly or indirectly be involved in the transport of motile cilia components to the axoneme. We looked for the distribution of *Ccdc114*, a component of the outer dynein arm-docking complex required for dynein arm attachment onto the axoneme (Fig. 1A) (11,12). We injected *gfp*-tagged *ccdc114* mRNAs in zebrafish together or not with *ccdc151* Mos. *Ccdc114*-GFP

localized mainly within the axoneme of motile cilia in the pronephros of control embryos. However, in *ccdc151* morphants, the amount of Ccdc114-GFP was strongly reduced (Fig. 5G). Hence, these observations show that Ccdc114 accumulation inside cilia relies on Ccdc151. Altogether, these observations support the requirement of Ccdc151 for targeting dynein arms and the dynein arm-docking complex to the axoneme.

CCDC151 proteins show cellular functions not associated with motile cilia in vertebrates

In zebrafish, *ccdc151* is expressed at stages preceding motile cilia appearance (Fig. 2D). In addition, Ccdc151-Cherry was also found to be associated with basal bodies in zebrafish embryos, as clearly visualized in the floor plate (Fig. 6A).

In agreement with these observations, we detected several phenotypes in *ccdc151* zebrafish morphants that cannot be explained by cilia motility defects. In floor plate cells, where *ccdc151* is strongly expressed, basal bodies were mislocalized in the morphants compared with controls (Fig. 6B and C). In control embryos, basal bodies were found mostly at the posterior side of the cells, whereas in the morphants, basal bodies were sometimes observed in the center or anterior part of the cell (Fig. 6B and C, white arrowheads).

The mislocalization of basal bodies observed in Ccdc151-depleted embryos could reflect either a primary function of Ccdc151 in cell polarity or a secondary cell polarity defect due to improper ciliary beating. However, we also observed altered orientation of cell divisions in the pronephros of *ccdc151* morphants compared with control (Fig. 6D and E). Such cell division orientation defects have been described for PCP components and in particular for *prickle1*, known also to genetically interact with IFT components (44,45). Hence, we investigated whether *ccdc151* could functionally interact with *prickle1* in zebrafish. When co-injecting suboptimal doses of *Mos* against *prickle1* and *ccdc151*, we indeed observed synergistic effects as shown by the increase in the number of cysts in the pronephros, compared with the absence or weak effects of each individual *Mo* (Fig. 6F). As we also observed a synergistic interaction on the orientation of cell divisions that cannot solely be explained by combined effect on cilia motility (Fig. 6G), these observations show that *ccdc151* function is not restricted to cilia motility in the zebrafish. Thus, Ccdc151 plays also a role in the acquisition or maintenance of several aspects of cell polarity such as basal body positioning and mitotic spindle orientation.

CCDC151 was also found to be associated with mouse non-motile cilia. In IMCD3 cells serum-starved to induce primary cilia growth, we observed CCDC151 localization in primary cilia (Fig. 7A). In dividing IMCD3 cells, CCDC151 was enriched at the centrioles as observed using two different specific antibodies (Fig. 7B1–2). By methanol fixation, CCDC151 was also observed at basal bodies of serum-starved IMCD3 (Fig. 7B3). We investigated the function of CCDC151 in mouse primary ciliated cells by siRNA transfection. Knockdown of *Ccdc151* using siRNA #1 in IMCD3 cells that efficiently reduced *Ccdc151* expression (Supplementary Material, Fig. S6) leads to the formation of longer primary cilia compared with cells transfected with a control siRNA after 24 h of serum starvation (Fig. 7C and D). The same results were obtained using siRNA #2 (data not

shown). Altogether these observations indicate that CCDC151 has a general function in cilia biogenesis in mammalian cells.

DISCUSSION

We have characterized the functions of CCDC151, a target of the RFX ciliogenic transcription factors. Our evolutionary analysis identified CCDC151-encoding gene only in species with IFT-dependent motile cilia. We performed loss-of-function experiments, which demonstrate that CCDC151 is required for the function of motile cilia, as revealed by geotaxis behavioral defects in *Drosophila* adults, on the one hand, and left–right asymmetry defects and kidney cysts in zebrafish embryos, on the other hand. In addition, we show that CCDC151 controls dynein arm assembly and regulates the amount of the dynein arm-docking component CCDC114. Furthermore, several of our observations in zebrafish and in mouse cell culture suggest additional cellular functions for CCDC151. Strikingly, *ccdc151* is required in the pronephros to control the orientation of cell division and interacts with *prickle1* in this process. In mammalian cells, CCDC151 is required for cilia length control.

CCDC151 is a functional component of IFT-dependent motile cilia

The homology between CCDC151 and ODA1 and ODA5 in *Chlamydomonas* suggests a function as a structural component of the outer dynein arm-docking complex (20,23). However, evolutionary comparisons and analysis of its expression in animals show that CCDC151 is likely not a structural component of the axoneme, the dynein arms or dynein docking complexes. Indeed, CCDC151 cannot be considered as the true ortholog of the *Chlamydomonas* proteins because several other proteins related to ODA1 or ODA5 can be found in vertebrates and flies. In particular, in *Drosophila*, the best reciprocal hit of ODA1 or ODA5 is CG14905 and not CG14127/CCDC151. Besides, unlike CG14127/CCDC151, CG14905 is highly expressed in the testis (46), suggesting a structural role in dynein arm assembly in *Drosophila*. This idea is supported by recent studies demonstrating that *Ccdc114* deficiency in humans causes a complete absence of ciliary ODAs resulting in immotile cilia (11,12). CCDC114 and its paralog CCDC63 are found to be, by best reciprocal hit analysis, the true orthologs of ODA1/DC2. One of the two studies in human patients suggests that they play a redundant function in the testis. It is thus tempting to consider that the CG14905/CCDC114 and CCDC63 subgroup of this family of proteins has conserved a motile function as an associated component of the axoneme, whereas CG14127/CCDC151 has evolved toward a function in IFT-dependent transport of motile components of the axoneme. In support of this hypothesis, we found that the localization of Ccdc114 in zebrafish motile pronephric cilia is strongly reduced in *ccdc151* morphants (Fig. 5G), thereby showing that CCDC151 is required for ciliary localization of CCDC114. Moreover, CCDC151 distribution in fly chordotonal neurons is not restricted to the proximal part of the ciliary endings where dynein arms are located (35), but is also found in the ciliary dilation and distal part of the cilia along the ciliary rootlet, like IFT components. It is also interesting to note that several components required for cilia motility that play a

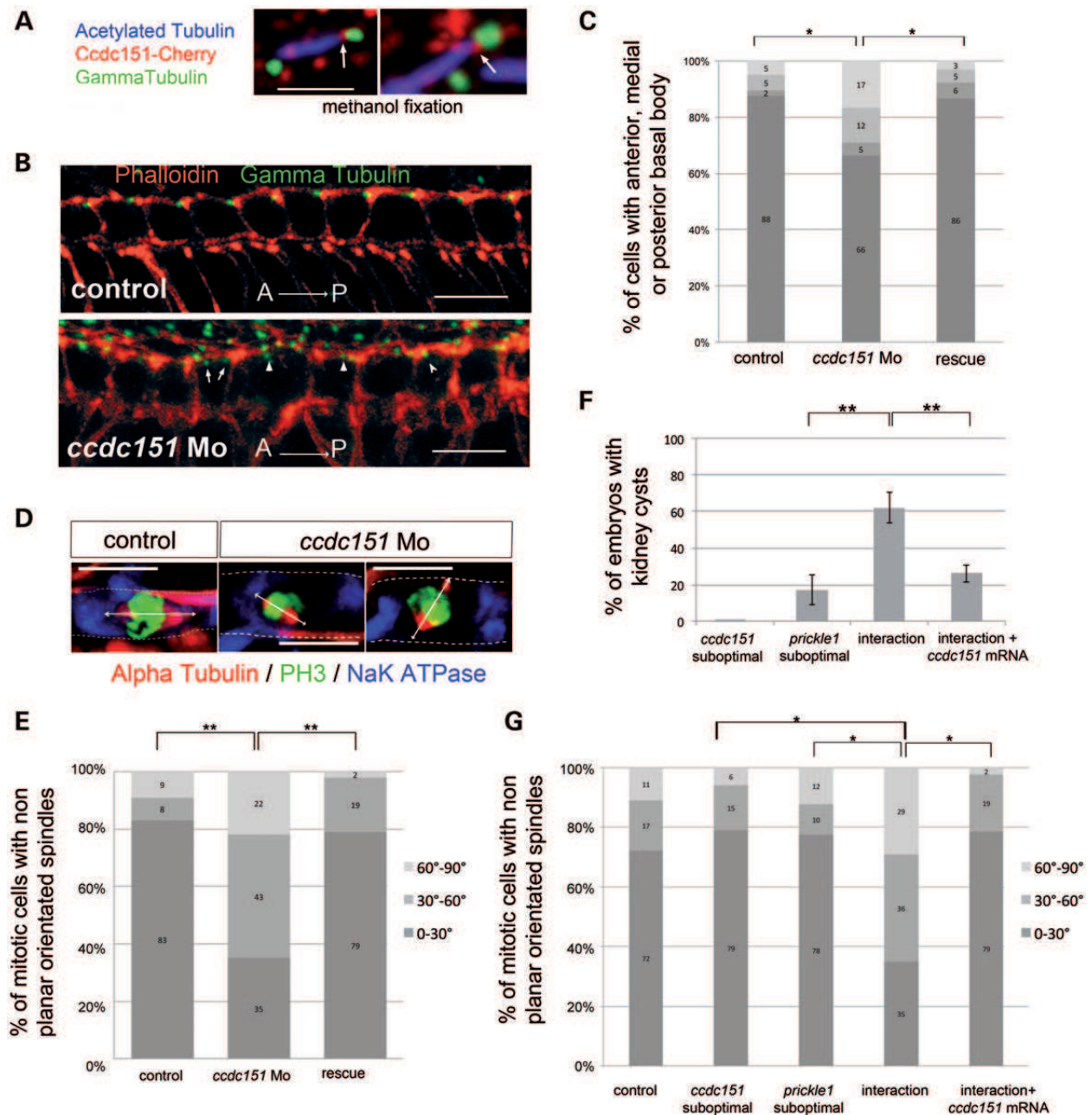


Figure 6. Ccdc151 has cell polarity-associated functions in the zebrafish. (A) In 24 h.p.f. zebrafish embryos, Ccdc151 localizes at the basal body of the cilium (arrows, anti-Gamma Tubulin, green) in the floor plate. Cilia are labeled with anti-Acetylated Tubulin (blue). (B) Confocal image of 24 h.p.f. control (upper panel) and *ccdc151* morphants (lower panel) showing the basal bodies (green) in floor plate cells. Anterior is to the left. Arrowheads point to some mis-positioned basal bodies in the morphant cells. (C) Percentage of floor plate cells with either one basal body in posterior, medial or anterior position (control: $n = 534$ cells in 26 embryos; *ccdc151* Mo: $n = 817$ cells in 37 embryos; rescue: $n = 417$ cells in 20 embryos). The number of mis-positioned basal body is specifically increased in morphant embryos. In a few percentage of cells, more than one Gamma-Tubulin dots that are randomly distributed can be observed (white arrows). These cells are classified as aberrant on the graph. This class is increased in Ccdc151-depleted embryos, which suggest a possible function of the protein in centriole cohesion. (D) Lateral confocal image of 48 h.p.f. control and *ccdc151* Mo-injected zebrafish embryos showing mitotic spindles orientation (red) from cells of the pronephric duct. In controls, mitotic spindles are oriented in the longitudinal plane of the duct but not in *ccdc151* morphants. DNA is labeled with anti-PH3 (green). (E) The graph indicates the percentage of mitotic cells within three classes of spindle orientations in control, *ccdc151* morphants and rescue from three independent experiments (control: $n = 43$ cells in 30 embryos, *ccdc151* Mo: $n = 63$ cells in 47 embryos, rescue: $n = 31$ cells in 18 embryos). (F) The graph illustrates the percentage of kidney cysts after injection of either *ccdc151* or *prickle1* Mos at suboptimal concentrations or after co-injection of the two Mos at suboptimal concentrations [three independent experiments, *ccdc151* Mo suboptimal (no cysts, $n = 57$), *prickle1* Mo suboptimal: $n = 65$, *ccdc151* + *prickle1* suboptimal Mos: $n = 95$, *ccdc151* + *prickle1* suboptimal Mos + *ccdc151* mRNAs $n = 72$]. (G) The graph indicates the functional interaction between *ccdc151* and *prickle1* in mitotic spindle orientation (three independent experiments, control: $n = 59$ cells in 21 embryos, *ccdc151* Mo suboptimal: $n = 48$ cells in 22 embryos, *prickle1* Mo suboptimal: $n = 41$ cells in 15 embryos, *ccdc151* + *prickle1* suboptimal Mos: $n = 55$ cells in 29 embryos, *ccdc151* + *prickle1* suboptimal Mos + *ccdc151* mRNAs $n = 31$ cells in 22 embryos). The angles between the spindle axis and the tubule axis were ranked in three classes. When angles are superior to 30°, divisions were considered as non-planar. (E–G) Two-tailed paired Student's *t*-test analysis was performed to evaluate significant variations relative to indicated condition, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Bars: (A, B and D) 10 μ m.

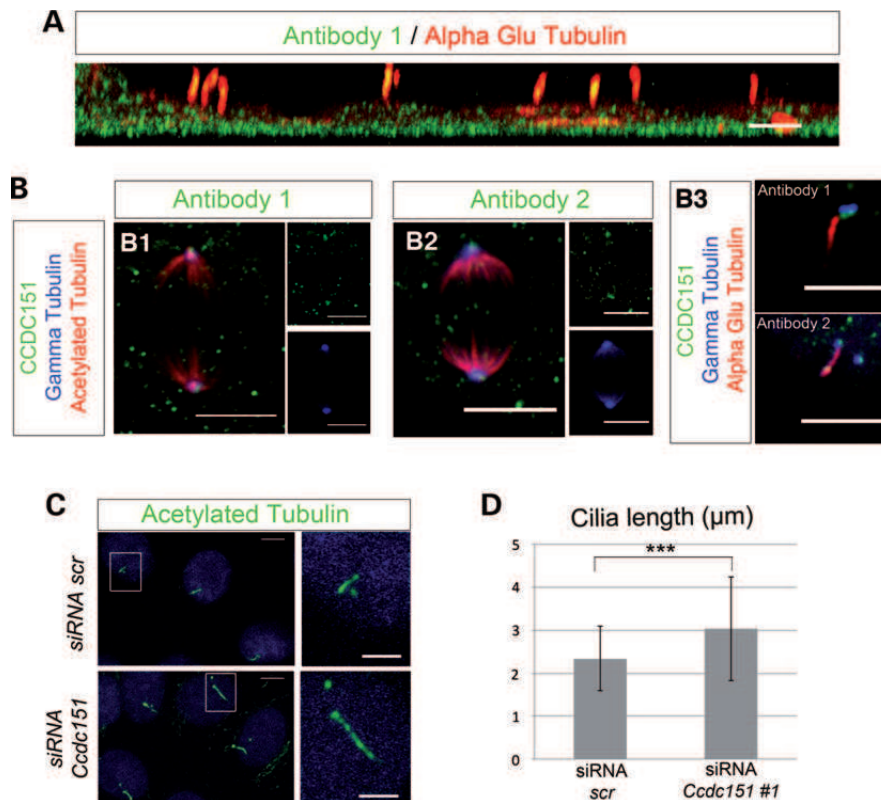


Figure 7. CCDC151 has a non-motile cilia function in IMCD3 cells. (A) CCDC151 is present in primary cilia of serum-starved IMCD3 cells fixed in paraformaldehyde solution and stained with two different anti-CCDC151 antibodies (only Antibody 1 is shown). (B) CCDC151 is also enriched at centrioles in IMCD3 dividing cells (B1–2), and basal bodies (B3) in serum-starved IMCD3 cells fixed with cold methanol and labeled with either one of the two anti-CCDC151 antibodies. (C) Transfection of siRNA directed against *Ccdc151* in IMCD3 cells induces the formation of longer cilia. Enlarged views of selected cilia are presented in insets. Cilia were stained for Acetylated Tubulin (green). (D) The graph indicates the mean ciliary length observed in siRNA scr and siRNA *Ccdc151* #1 (two experiments, siRNA scr $n = 54$ cilia, siRNA *Ccdc151* #1 $n = 56$ cilia). Two-tailed paired Student's *t*-test analysis was performed to evaluate significant variations relative to indicated condition, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Scale bars: (A–C) 5 μm (C enlarged insets) 2.5 μm .

structural function at the level of the axoneme and that are conserved in *Drosophila* are expressed in the testis, whereas proteins required for IFT-associated transport of motile components of the dynein arms are not. For example, dynein arm components and DRC proteins (gas8, CG14271; FlyBase) are expressed in the testis, whereas IFT46/CG15161 or WDR69/CG7568 are not [(17,18), FlyBase]. Furthermore, no CCDC151 protein is found in *P. falciparum*, whose motile flagella are assembled in an IFT-independent mode (31). Last, no CCDC151 ortholog is found in the microalgae *Ostreococcus* that have no flagella and no IFT but have retained some IDA components, suggesting that CCDC151 is not required for dynein function *per se*. However, we cannot exclude that CCDC151 has evolved differently in each animal species where it may play very different functions.

Relationships between CCDC151 and other components of the axonemal dynein assembly pathway

Our work suggests that CCDC151 is a novel factor involved in both IDA and outer dynein arm assembly. Several proteins are required for axonemal dynein assembly in different organisms. However, it is not clear how these proteins work together and what are their hierarchical relationships. None of the

characterized genes involved in the dynein assembly pathway share functional or evolutionary features with CCDC151. For instance, we show that CCDC151 is associated with motile cilia that require only IFT for their assembly. *Drosophila* is particularly helpful to discriminate between both types of motile cilia, as chordotonal neurons have IFT-dependent motile cilia (35), whereas sperm flagella assembly is IFT independent (29,30). Among the proteins that play a role both in the outer dynein arm and IDA assembly in vertebrates, all show unique orthologs in *Drosophila*, which are strongly expressed in the testis, suggesting an IFT-independent function for these genes. Therefore, DNAAF1/ODA7/LRRC50, DNAAF2/KTU/PF13, CCDC103 and LRRC6, which are required for both IDA and outer dynein arm assembly in humans or fish (6,7,14,15,40,47–49), have unique orthologs in *Drosophila* (CG1553/*Nop17l*, CG31623, CG13202 and *TilB*, respectively) that are strongly expressed in the testis (FlyBase). Like the human ortholog, *TilB/LRRC6* is required for the outer and inner axonemal dynein arm assembly in *Drosophila* sensory cilia and is also required for spermatozoid flagella motility in *Drosophila* (35).

Among the other proteins that have been shown to play a more specific role in either IDA or outer dynein arm assembly, none appear to be restricted to IFT-dependent cilia because their *Drosophila* orthologs are also strongly expressed in the *Drosophila*

testis, unlike CCDC151. This is true for DNAAF3, CCDC39, CCDC40 and CCDC114 (8,9,11,12), whose unique orthologs in *Drosophila* (DNAAF3/CG17669, CCDC39/CG17387 and CCDC40/CG41265, CCDC114/CG14905) are also strongly expressed in the testis.

Therefore, the only yet described component to be involved in dynein arm assembly and that is apparently not expressed in the *Drosophila* testis is ODA16/WDR69, which is required for IFT-dependent transport of axonemal dyneins from *Chlamydomonas* to zebrafish (16,23,50). These observations show that CCDC151 has evolved like IFT-associated proteins but not like other proteins described to be required for dynein assembly in animals. Hence, these observations reinforce the hypothesis that CCDC151 plays an IFT-associated function required for dynein arm assembly that is different from the function of the other proteins that have been described to date.

In vertebrates, CCDC151 proteins present cellular functions not associated with motile cilia

Our study strongly suggests that CCDC151 proteins have functions in vertebrates that are not restricted to dynein arm assembly. Indeed, in IMCD3 mouse cell cultures, CCDC151 is associated with primary cilia and basal bodies but also with the spindle poles. Knockdown experiments using siRNA against *Ccdc151* lead to the formation of longer cilia. Furthermore, in zebrafish, depletion of *Ccdc151* leads to cell division orientation defects in the pronephros. *ccdc151* functionally interacts with *prickle1* in this orientation of cell divisions, suggesting that *ccdc151* plays roles that are not directly related to dynein arm assembly. In *Leishmania donovani*, the sole CCDC151 family member is involved not only in the control of flagellar motility but also in the control of flagellar length (51). This is coherent with our observation that CCDC151 is required for primary cilia length control in IMCD3 cells. Altogether, CCDC151 is associated with processes that are not only linked to cilia motility but related to more general functions in cilia assembly or cell processes such as orientation of cell divisions, which have also been shown to be controlled by IFT proteins (45,52). Based on these observations, we hypothesize that CCDC151 could behave as a bridge, linking IFT proteins to specific cargoes such as dynein arms but also to other cargoes that are required during cell division or in cilia assembly. Such complex interactions between IFT proteins, specific cargoes and, for example, transition zone-associated proteins or dynein arm components have already been described (18,53,54).

In conclusion, our work identifies CCDC151 as a novel protein required for the assembly of motile cilia in vertebrates. CCDC151 represents a novel candidate gene in which mutations could lead to PCD. Because *ccdc151* also interacts with *prickle1* during cell division, it could also be involved in other primary cilia-associated syndromes where impaired PCP has been implicated in some of the physio-pathological outcomes.

MATERIALS AND METHODS

Zebrafish maintenance

General maintenance, collection and staging of zebrafish were carried out at the PRECI zebrafish facility of IFR 128,

Biosciences-Gerland (Lyon, France). The developmental stages are given in hour post-fertilization (h.p.f.) and day post-fertilization (d.p.f.) according to morphological criteria. For somite-stage embryos, the number of somites was used (55). Embryos were kept at 28.5°C in 1× Danieau solution (58 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.4 mM MgSO₄, 0.6 mM Ca(NO₃)₂, 5 mM Hepes, pH 7.6) in compliance with French Government guidelines. If necessary, 1-phenyl-2-thiourea (Sigma) was added in medium to avoid pigmentation.

Drosophila stocks

Flies were cultured in standard condition at 25°C. The following fly strain was constructed in the laboratory: *w, P{CG14127::GFP}^{M5}*, the transgene was inserted on the X chromosome. *w1118;Df(3L)Exel6115, P{XP-U}Exel6115/TM6B, Tb1* were obtained from the Bloomington Stock Center. ShRNA expressing strain targeting CG14127 (KK106258) was obtained from the Vienna Drosophila RNAi Center.

Bang assay

The climbing test was performed on 3–5-day-old male flies at identical time point each day. Ten flies were placed in a graduated vial and banged on the table at *t* = 0. Flies were recorded for 1 min after the bang. The movies were analyzed using QuickTime Player (Apple). Each fly climbing >10 cm was scored as positive. Three different batches of 10 flies were analyzed for each genotype. Each batch was successively tested five times and the results were averaged.

Plasmid constructs

All primers are described in Supplementary Material, Table S1.

Drosophila CG14127 reporter construct

A pJT12 reporter vector was constructed as follows. P5' from pW8 was inserted within the NaeI and KpnI site of pBSK. A cassette containing both an EGFP-Flag coding sequence (from pEGFP-Flag, kindly provided by S. Treves) and P3' from pW8 was then inserted in the previous construct within the ClaI (Blunt Ended) and KpnI sites. A 2668 bp fragment including CG14127 coding sequence and upstream regulatory sequence was amplified by PCR on wild-type *Drosophila* genomic DNA using CG14127-pro5/KpnI and CG14127-pro3/NheI primers. The resulting PCR fragment was cloned into the KpnI and NheI sites of the pJT12 plasmid. The transgenic strain was obtained by P-element-mediated insertion.

pCS2-Ccdc151

The complete zebrafish *ccdc151* coding sequence was obtained by RT-PCR with F1 and R2 primers. The resulting PCR product was cloned into the EcoRI and XbaI sites of the pCS2+ vector. The *ccdc151* sequence was verified by sequencing.

Ccdc151-cherry

The complete zebrafish *ccdc151* coding sequence was obtained by PCR on pCS2-Ccdc151 with F1 and R3 primers. The resulting PCR product was cloned into the EcoRI and AgeI sites of the pCS-mCherry vector in frame with the *cherry* sequence (a gift

from Dr S. Megason). The *ccdc151* sequence was verified by sequencing.

pBSK-Ccdc151

For *in situ* experiments, the first 871 bp of the zebrafish *ccdc151* coding sequence were amplified with F4 and R5 primers. The PCR product was cloned into the EcoRI and XbaI sites of pBSK.

Ccdc114-GFP

The complete zebrafish *ccdc114* coding sequence was obtained by RT-PCR with F8 and R9 primers. The resulting PCR product was cloned into the SpeI and SnaBI sites of the pCS2+ GFP vector in frame with the *gfp* sequence (a gift from Dr B. Ciruna). The *ccdc114* sequence was verified by sequencing.

mCCDC151-GFP

The complete mouse *Ccdc151* coding sequence was obtained by RT-PCR with F10 and R11 primers. The resulting PCR product was cloned into the HindIII and BamHI sites of pEGFP-N1 (Clontech) in frame with the *gfp* sequence. The *Ccdc151* sequence was verified by sequencing.

mCCDC151-MYC

The 6xMyc Tag cassette of 263 bp was obtained after PvuI and EcoRI digestion of pCS2+ nlsMT (a gift from Dr R. Rupp). The blunt-ended fragment was cloned in replacement of the GFP cassette from pEGFP-N1 to produce pJTm13. The mouse *Ccdc151* coding sequence was obtained after HindIII and BamHI digestion of the mCCDC151-GFP vector and cloned in the same restriction sites of pJTm13 in frame with the 6xMyc Tag cassette.

RT-PCR analysis

Total RNA of zebrafish embryos was extracted using the Nucleospin Extract II Kit (Macherey-Nagel). cDNA was obtained using 1 or 0.5 µg of DNase-treated RNA, 200 ng of random primers (Promega) and 200 U of RevertAid H minus M-MuLV reverse transcription (Thermo Fisher Scientific) in a final volume of 40 or 50 µl. Two or 4 µl of cDNA was used for PCR reactions. Primers F12 and R13 were used for *ccdc151* amplification and primers F-actin and R-actin for *actin beta* 2 amplification. PCR analyses on three independent RT were performed and quantifications were done using the Molecular Imager GelDoc XR system and the Quantity One software (Bio-Rad).

Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR was performed as described previously (33). The expression of *Ccdc151* (F-mCcdc and R-mCcdc primers) was normalized using the housekeeping gene *Tbp* (TATA binding protein) (56) (F-TBP and R-TBP primers).

Mos and mRNA injection

Mos against *ccdc151* were designed to target either the translation site of the mRNA (AUG) or the splice-donor site of the second coding exon and obtained from GENE TOOLS, LLC, Philomath. The following Mos were used: Mo-ccdc151AUG

5'-AGACCGACGTGCCGGGCATTATATA-3' and Mo-ccdc151Ex 5'-AAGATTCATAATGTCTGACCTCAGC-3'. The molecular defect caused by Mo-ccdc151Ex was verified by RT-PCR with primers F6 and R7 located in exons 1 and exon 3, respectively (Supplementary Material, Fig. S3). For functional interaction studies, we used previously described Mos targeting *prickle1* (57). For rescue experiments, the pCS2-Ccdc151 plasmid was linearized and capped mRNAs were transcribed from this template using the mMessage Machine Kit (Ambion).

Mos and purified mRNAs were diluted in 1× Danieau solution containing 0.1% phenol red (Sigma). Four nanograms of Mo-ccdc151Ex were injected at one-cell-stage embryos in a total volume of 500 pl using a micro-injector. For rescue experiments, 4 ng of Mo-ccdc151Ex and 80 pg of zebrafish *ccdc151* mRNAs were co-injected. For functional interaction, 3 ng of Mo-ccdc151Ex and 0.65 ng of Mo-*prickle1* were co-injected. For DFC injections, fluorescein-labeled Mo-ccdc151Ex was injected into the yolk of 512-cell-stage embryos as previously described (58). For localization, 20 pg of *ccdc151-cherry* and 20 pg of *ccdc114-gfp* ± 4 ng of Mo-ccdc151Ex were injected.

Antibodies

The following primary antibodies and dilutions were used: Acetylated Tubulin 6-11B-1 (Sigma, 1/500), NaK/ATPase α6F (DSHB, 1/500), Gamma Tubulin GTU88 (Sigma, 1/1000), phalloidin rhodamin (Interchim, 1/200), ZO1 (Zymed, 1/25), Alpha Tubulin (Sigma, 1/500), Phosphohistone H3 (Santa cruz, 1/750), Dsred living colors (Clontech, 1/500), Alpha Glu Tubulin (1D5-Synaptic systems, 1/100), GFP (Molecular Probes, 1/500), anti-Futch 22C10 (a gift from Dr S. Benzer, 1/500), Human CCDC151 (Abnova 1/200). Secondary antibodies were from Molecular Probes/Invitrogen / Life Technologies for immunofluorescence analysis. For western blot analysis, the following antibodies were used: goat anti-guinea pig-HRP (Jackson 1/10 000), goat anti-rabbit-HRP and goat anti-mouse-HRP (Bio-Rad, 1/3000).

Generation of antibodies against mouse CCDC151

The first 300 bp of the mouse *Ccdc151* coding sequence were amplified and cloned in frame with the 6xHis tag in the pSTABY-1 expression vector (Delphi Genetics). The production of the 6xHis tagged protein was performed according to the manufacturer's protocol (Delphi Genetics) and purified using Protino Ni-TED/IDA Combi sample (Macherey-Nagel). Immunization of guinea pigs with the purified protein was performed by Eurogentec.

Immunoblotting

Whole-cell extracts were prepared from COS7 cells that have been transiently transfected with mCCDC151-GFP or mCCDC151-MYC plasmids. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblot analysis according to standard protocols with Antibody 1 (1/200), Antibody 2 (1/200, Sigma) and anti-GFP (1/1000, Roche). Appropriate HRP-conjugated secondary antibodies were used for detection by chemiluminescence using the Immuno-Star WesternC Kit from Bio-Rad.

Whole-mount *in situ* hybridization

Whole-mount *in situ* hybridizations were carried out as described previously (59). RNA probes were synthesized using a Digoxigenin RNA Labeling Kit (Roche) according to the manufacturer's instruction. A sense RNA probe complementary to the specific zebrafish *ccdc151* probe was prepared as negative control. The stained embryos were fixed and photographed with a Leica 425C camera.

Cell culture

Mouse primary ependymal cell cultures were derived from mouse newborn brains (OF1 strain), as previously described (33). IMCD3 cells (a gift from A. Benmerah, Institut Cochin, Paris, France) were cultured in DMEM/HAM'S F12 medium containing 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 1 × non-essential amino acids. COS7 cells were cultured in DMEM medium containing 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (reagents from GE Healthcare).

Transfection and siRNA

For plasmid transfection, cells at 80–90% confluency were transfected with Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. For RNAi knockdown, individual siRNA from Sigma (siRNA *Ccdc151* #1) and siGENOME SMARTpool siRNA containing four different duplexes from Dharmacon (siRNA *Ccdc151* #2) were designed against mouse *Ccdc151* sequence using their custom services. Antisense sequences were as follows:

siRNA *Ccdc151* #1: 5'-ACUACCAGCAGAUUGUAAG-3';
siRNA *Ccdc151* #2: 5'-UCCAUUGGGAGCUCUCAUA,
5'-UAAUGCUCGCUUCUUGC-3', 5'-AUCAUUGUGACG
CUGCUCC-3', 5'-UAAGCGUAGUCCUCUGAGU-3'.

siGENOME Non-Targeting siRNA #2 (Dharmacon) was used as a negative control. For immunofluorescence experiments, 40 000 IMCD3 cells in 24 wells plate were transfected twice with each siRNA at J0 with 25 pmol and at J2 with 37.5 pmol using Lipofectamine 2000. Cells were serum-deprived 24 h before analysis at 96 h. For real-time RT-PCR analysis, 60 000 IMCD3 cells in 12 wells plate were transfected twice with each siRNA at J0 with 50 pmol and at J2 with 50 pmol using Lipofectamine 2000. RNA was extracted after 24 h serum deprivation at 96 h.

Immunohistochemistry

For immunostaining analysis, staged *Drosophila* embryos were treated as described previously (60).

Cells for immunofluorescence microscopy were grown, fixed and stained as described previously (33). Early zebrafish embryos (before 24 h.p.f.) were fixed 4 h in PFA 4%, washed in PBS 1 × –0.3% Triton X-100 and blocked 1 h at room temperature in blocking buffer (1% BSA, 1% DMSO, 2% NGS, 0.3% Triton X-100, PBS 1 ×, pH7.4). Primary antibodies were incubated in blocking buffer overnight at 4°C. After washes in PBS 1 × –0.3% Triton X-100, embryos were incubated with secondary antibodies in blocking buffer for 2 h at room temperature. Embryos at 48 h.p.f. were fixed in Dent's buffer (80% methanol/

20% DMSO) overnight at 4°C (or 4 h at RT for GFP labeling) and stained as described in Kramer-Zucker *et al.* (38).

Histology

Zebrafish embryos were fixed overnight in 4% PFA before preparation for histology according to Sullivan-Brown *et al.* (61). The embedded embryos were sectioned at 4 µm with a Leica RM2265 microtome. The sections were stained with azur/methylene blue (1/1). Slides were examined using an Axio Imager Z1 (Zeiss) microscope.

Electron microscopy

Whole embryos were fixed in a mixture of 1.5% glutaraldehyde and 1% paraformaldehyde in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 3 h at room temperature. The samples were postfixed for 0.75 h in 1% OsO₄ in 0.15 M cacodylate buffer. The samples were then rinsed in 0.15 M cacodylate buffer, dehydrated in a graded series of ethanol, embedded in Epon 812 (Fluka) and 1 µm sections observed after toluidine blue staining. Ultra-thin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined with a Philips CM 120 electron microscope.

Fluid flow recording in the KV

At four- to five-somite stages, embryos were mounted with the KV positioned upright in 1% low-melting agarose. The rotating particles were imaged using a spectral SP5 microscope (Leica) with a 40× water immersion lens. All movies were slowed down to 25 frames per second (f.p.s.).

High-speed video microscopy

Live embryos were incubated in drops of 1% low-melting agarose containing 0.4% tricaine (Sigma) and oriented along their lateral sides. Cilia motility was recorded with a Leica DM-RXA microscope equipped with a 60× water immersion objective and differential interference contrast optics. Videos were recorded with a PCO 1200 high-speed camera at 500 f.p.s. All movies were slowed down to 25 f.p.s.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Jérôme Schmitt and Patricia Morales for *Drosophila* medium and stock maintenance and Laure Bernard and Bernard Perret for zebrafish maintenance. Electron microscopy was performed at the Centre Technologique des Microstructures of the University of Lyon (CTmu) with the help of Jean-Luc Duteyrat. We are grateful to Yves Tourneur and Denis Ressnikoff from the Centre Commun de Quantimétrie of the University of Lyon and to Christophe Chamot from the Platim at the ENS-Lyon for their help in imaging. We also thank Laurent Duret for help with the phylogenetic analysis and Sylvie Schneider Maunoury for helpful discussions.

Conflict of Interest statement. None declared.

FUNDING

This work was supported by grants to B.D. from the Fondation pour la Recherche Médicale (équipe FRM 2009), the ANR (Ciliopath-X) and the Région Rhône-Alpes (Cible 2008). F.S. was supported by a doctoral fellowship from the Région Rhône-Alpes. J.J. was supported by a Fondation Line Pomaret Delalande award. B.C. was supported by a postdoctoral fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale.

REFERENCES

- Nigg, E.A. and Raff, J.W. (2009) Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell*, **139**, 663–678.
- Bettencourt-Dias, M., Hildebrandt, F., Pellman, D., Woods, G. and Godinho, S.A. (2011) Centrosomes and cilia in human disease. *Trends Genet.*, **27**, 307–315.
- Leigh, M.W., Pittman, J.E., Carson, J.L., Ferkol, T.W., Dell, S.D., Davis, S.D., Knowles, M.R. and Zariwala, M.A. (2009) Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/Kartagener syndrome. *Genet. Med.*, **11**, 473–487.
- Huang, B., Piperno, G. and Luck, D.J. (1979) Paralyzed flagella mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. Defective for axonemal doublet microtubule arms. *J. Biol. Chem.*, **254**, 3091–3099.
- Kobayashi, D. and Takeda, H. (2012) Ciliary motility: the components and cytoplasmic preassembly mechanisms of the axonemal dyneins. *Differentiation*, **83**, S23–S29.
- Panizzi, J.R., Becker-Heck, A., Castleman, V.H., Al-Mutairi, D.A., Liu, Y., Loges, N.T., Pathak, N., Austin-Tse, C., Sheridan, E., Schmidts, M. *et al.* (2012) CCDC103 mutations cause primary ciliary dyskinesia by disrupting assembly of ciliary dynein arms. *Nat. Genet.*, **44**, 714–719.
- Loges, N.T., Olbrich, H., Becker-Heck, A., Häffner, K., Heer, A., Reinhard, C., Schmidts, M., Kispert, A., Zariwala, M.A., Leigh, M.W. *et al.* (2009) Deletions and point mutations of LRRC50 cause primary ciliary dyskinesia due to dynein arm defects. *Am. J. Hum. Genet.*, **85**, 883–889.
- Merveille, A.-C., Davis, E.E., Becker-Heck, A., Legendre, M., Amirav, I., Bataille, G., Belmont, J., Beydon, N., Billen, F., Clément, A. *et al.* (2011) CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs. *Nat. Genet.*, **43**, 72–78.
- Becker-Heck, A., Zohn, I.E., Okabe, N., Pollock, A., Lenhart, K.B., Sullivan-Brown, J., McSheene, J., Loges, N.T., Olbrich, H., Häffner, K. *et al.* (2011) The coiled-coil domain containing protein CCDC40 is essential for motile cilia function and left-right axis formation. *Nat. Genet.*, **43**, 79–84.
- Mitchison, H.M., Schmidts, M., Loges, N.T., Freshour, J., Dritsoula, A., Hirst, R.A., O'Callaghan, C., Blau, H., Al Dabbagh, M., Olbrich, H. *et al.* (2012) Mutations in axonemal dynein assembly factor DNAAF3 cause primary ciliary dyskinesia. *Nat. Genet.*, **44**, 381–389, S1–S2.
- Onoufriadi, A., Paff, T., Antony, D., Shoemark, A., Micha, D., Kuyt, B., Schmidts, M., Petridi, S., Dankert-Roelse, J.E., Haarman, E.G. *et al.* (2012) Splice-site mutations in the axonemal outer dynein arm docking complex gene CCDC114 cause primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.*, **92**, 88–98.
- Knowles, M.R., Leigh, M.W., Ostrowski, L.E., Huang, L., Carson, J.L., Hazucha, M.J., Yin, W., Berg, J.S., Davis, S.D., Dell, S.D. *et al.* (2013) Exome sequencing identifies mutations in CCDC114 as a cause of primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.*, **92**, 99–106.
- Lee, L. (2011) Mechanisms of mammalian ciliary motility: insights from primary ciliary dyskinesia genetics. *Gene*, **473**, 57–66.
- Duquesnoy, P., Escudier, E., Vincensini, L., Freshour, J., Bridoux, A.-M., Coste, A., Deschildre, A., de Blic, J., Legendre, M., Montantin, G. *et al.* (2009) Loss-of-function mutations in the human ortholog of *Chlamydomonas reinhardtii* ODA7 disrupt dynein arm assembly and cause primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.*, **85**, 890–896.
- Omran, H., Kobayashi, D., Olbrich, H., Tsukahara, T., Loges, N.T., Hagiwara, H., Zhang, Q., Leblond, G., O'Toole, E., Hara, C. *et al.* (2008) Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature*, **456**, 611–616.
- Ahmed, N.T., Gao, C., Luckner, B.F., Cole, D.G. and Mitchell, D.R. (2008) ODA16 aids axonemal outer row dynein assembly through an interaction with the intraflagellar transport machinery. *J. Cell Biol.*, **183**, 313–322.
- Gao, C., Wang, G., Amack, J.D. and Mitchell, D.R. (2010) Oda16/Wdr69 is essential for axonemal dynein assembly and ciliary motility during zebrafish embryogenesis. *Dev. Dyn.*, **239**, 2190–2197.
- Hou, Y., Qin, H., Folliot, J., Pazour, G., Rosenbaum, J. and Witman, G. (2007) Functional analysis of an individual IFT protein: IFT46 is required for transport of outer dynein arms into flagella. *J. Cell Biol.*, **176**, 653–665.
- Wakabayashi, K., Takada, S., Witman, G.B. and Kamiya, R. (2001) Transport and arrangement of the outer-dynein-arm docking complex in the flagella of *Chlamydomonas* mutants that lack outer dynein arms. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **48**, 277–286.
- Takada, S., Wilkerson, C.G., Wakabayashi, K.-I., Kamiya, R. and Witman, G.B. (2002) The outer dynein arm-docking complex: composition and characterization of a subunit (oda1) necessary for outer arm assembly. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 1015–1029.
- Casey, D.M., Inaba, K., Pazour, G.J., Takada, S., Wakabayashi, K.-I., Wilkerson, C.G., Kamiya, R. and Witman, G.B. (2003) DC3, The 21-kDa subunit of the outer dynein arm-docking complex (ODA-DC), is a novel EF-hand protein important for assembly of both the outer arm and the ODA-DC. *Mol. Biol. Cell*, **14**, 3650–3663.
- Koutoulis, A., Pazour, G.J., Wilkerson, C.G., Inaba, K., Sheng, H., Takada, S. and Witman, G.B. (1997) The *Chlamydomonas reinhardtii* ODA3 gene encodes a protein of the outer dynein arm docking complex. *J. Cell Biol.*, **137**, 1069–1080.
- Wirschell, M., Pazour, G., Yoda, A., Hirono, M., Kamiya, R. and Witman, G.B. (2004) Oda5p, a novel axonemal protein required for assembly of the outer dynein arm and an associated adenylate kinase. *Mol. Biol. Cell*, **15**, 2729–2741.
- Wirschell, M., Olbrich, H., Werner, C., Tritschler, D., Bower, R., Sale, W.S., Loges, N.T., Pennekamp, P., Lindberg, S., Stenram, U. *et al.* (2013) The nexin-dynein regulatory complex subunit DRC1 is essential for motile cilia function in algae and humans. *Nat. Genet.*, **45**, 262–268.
- Ishikawa, H. and Marshall, W.F. (2011) Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat. Rev.*, **12**, 222–234.
- Broekhuis, J.R., Leong, W.Y. and Jansen, G. (2013) Regulation of cilium length and intraflagellar transport. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **303**, 101–138.
- Laurençon, A., Dubruille, R., Efimenko, E., Grenier, G., Bissett, R., Cortier, E., Rolland, V., Swoboda, P. and Durand, B. (2007) Identification of novel regulatory factor X (RFX) target genes by comparative genomics in *Drosophila* species. *Genome Biol.*, **8**, R195.
- Göpfert, M.C. and Robert, D. (2003) Motion generation by *Drosophila* mechanosensory neurons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 5514–5519.
- Han, Y., Kwok, B. and Kernan, M. (2003) Intraflagellar transport is required in *Drosophila* to differentiate sensory cilia but not sperm. *Curr. Biol.*, **13**, 1679–1686.
- Sarpal, R., Todi, S., Sivan-Loukianova, E., Shirolkar, S., Subramanian, N., Raff, E., Erickson, J., Ray, K. and Eberl, D. (2003) *Drosophila* KAP interacts with the kinesin II motor subunit KLP64D to assemble chordotonal sensory cilia, but not sperm tails. *Curr. Biol.*, **13**, 1687–1696.
- Briggs, L.J., Davidge, J.A., Wickstead, B., Ginger, M.L. and Gull, K. (2004) More than one way to build a flagellum: comparative genomics of parasitic protozoa. *Curr. Biol.*, **14**, R611–R612.
- Bonnafe, E., Touka, M., AitLounis, A., Baas, D., Barras, E., Ucla, C., Moreau, A., Flamant, F., Dubruille, R., Couble, P. *et al.* (2004) The transcription factor RFX3 directs nodal cilium development and left-right asymmetry specification. *Mol. Cell Biol.*, **24**, 4417–4427.
- El Zein, L., Ait-Lounis, A., Morlé, L., Thomas, J., Chhin, B., Spassky, N., Reith, W. and Durand, B. (2009) RFX3 governs growth and beating efficiency of motile cilia in mouse and controls the expression of genes involved in human ciliopathies. *J. Cell Sci.*, **122**, 3180–3189.
- Göpfert, M.C., Humphris, A.D.L., Albert, J.T., Robert, D. and Hendrich, O. (2005) Power gain exhibited by motile mechanosensory neurons in *Drosophila* ears. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 325–330.
- Kavlie, R.G., Kernan, M.J. and Eberl, D.F. (2010) Hearing in *Drosophila* requires TiiB, a conserved protein associated with ciliary motility. *Genetics*, **185**, 177–188.
- Kamikouchi, A., Inagaki, H.K., Effertz, T., Hendrich, O., Fiala, A., Göpfert, M.C. and Ito, K. (2009) The neural basis of *Drosophila* gravity-sensing and hearing. *Nature*, **458**, 165–171.

37. Kernan, M.J. (2007) Mechanotransduction and auditory transduction in *Drosophila*. *Pflugers Arch.*, **454**, 703–720.
38. Kramer-Zucker, A., Olale, F., Haycraft, C., Yoder, B., Schier, A. and Drummond, I. (2005) Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. *Development*, **132**, 1907–1921.
39. Kishimoto, N., Cao, Y., Park, A. and Sun, Z. (2008) Cystic kidney gene seahorse regulates cilia-mediated processes and Wnt pathways. *Dev. Cell*, **14**, 954–961.
40. Sullivan-Brown, J., Schottenfeld, J., Okabe, N., Hostetter, C.L., Serluca, F.C., Thiberge, S.Y. and Burdine, R.D. (2008) Zebrafish mutations affecting cilia motility share similar cystic phenotypes and suggest a mechanism of cyst formation that differs from *pkd2* morphants. *Dev. Biol.*, **314**, 261–275.
41. Melby, A.E., Warg, R.M. and Kimmel, C.B. (1996) Specification of cell fates at the dorsal margin of the zebrafish gastrula. *Development*, **122**, 2225–2237.
42. Cooper, M.S. and D'Amico, L.A. (1996) A cluster of noninvoluting endocytic cells at the margin of the zebrafish blastoderm marks the site of embryonic shield formation. *Dev. Biol.*, **180**, 184–198.
43. Essner, J., Amack, J., Nyholm, M., Harris, E. and Yost, H. (2005) Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development*, **132**, 1247–1260.
44. Cao, Y., Park, A. and Sun, Z. (2010) Intraflagellar transport proteins are essential for cilia formation and for planar cell polarity. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **21**, 1326–1333.
45. Jaffe, K.M. and Burdine, R.D. (2010) More than maintenance? A role for IFT genes in planar cell polarity. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **21**, 1240–1241.
46. FlyBase (2002) The FlyBase database of the *Drosophila* genome projects and community literature. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 106–108.
47. van Rooijen, E., Giles, R.H., Voest, E.E., van Rooijen, C., Schulte-Merker, S. and van Eeden, F.J. (2008) LRRC50, a conserved ciliary protein implicated in polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **19**, 1128–1138.
48. Kott, E., Duquesnoy, P., Copin, B., Legendre, M., Dastot-Le Moal, F., Montantin, G., Jeanson, L., Tamalet, A., Papon, J.-F., Siffroi, J.-P. *et al.* (2012) Loss-of-function mutations in LRRC6, a gene essential for proper axonemal assembly of inner and outer dynein arms, cause primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.*, **91**, 958–964.
49. Horani, A., Ferkol, T.W., Shoseyov, D., Wasserman, M.G., Oren, Y.S., Kerem, B., Amirav, I., Cohen-Cymberknoh, M., Dutcher, S.K., Brody, S.L. *et al.* (2013) LRRC6 mutation causes primary ciliary dyskinesia with dynein arm defects. *PLoS ONE*, **8**, e59436.
50. Ahmed, N.T. and Mitchell, D.R. (2005) ODA16p, a *Chlamydomonas* flagellar protein needed for dynein assembly. *Mol. Biol. Cell*, **16**, 5004–5012.
51. Harder, S., Thiel, M., Clos, J. and Bruchhaus, I. (2010) Characterization of a subunit of the outer dynein arm docking complex necessary for correct flagellar assembly in *Leishmania donovani*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **4**, e586.
52. Delaval, B., Bright, A., Lawson, N.D. and Doxsey, S. (2011) The cilia protein IFT88 is required for spindle orientation in mitosis. *Nat. Cell Biol.*, **13**, 461–468.
53. Parker, D.S. and Katsanis, N. (2011) Understanding cargo specificity in intraflagellar transport. *EMBO J.*, **30**, 2518–2519.
54. Zhao, C. and Malicki, J. (2011) Nephrocystins and MKS proteins interact with IFT particle and facilitate transport of selected ciliary cargos. *EMBO J.*, **30**, 2532–2544.
55. Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.*, **203**, 253–310.
56. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, **3**, RESEARCH0034.
57. Carreira-Barbosa, F., Concha, M.L., Takeuchi, M., Ueno, N., Wilson, S.W. and Tada, M. (2003) Prickle 1 regulates cell movements during gastrulation and neuronal migration in zebrafish. *Development*, **130**, 4037–4046.
58. Amack, J. and Yost, H. (2004) The T box transcription factor no tail in ciliated cells controls zebrafish left-right asymmetry. *Curr. Biol.*, **14**, 685–690.
59. Thisse, C. and Thisse, B. (2008) High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat. Protoc.*, **3**, 59–69.
60. Enjolras, C., Thomas, J., Chhin, B., Cortier, E., Duteyrat, J.L., Soulavie, F., Kernan, M.J., Laurencon, A. and Durand, B. (2012) *Drosophila* chibby is required for basal body formation and ciliogenesis but not for Wg signaling. *J. Cell Biol.*, **197**, 313–325.
61. Sullivan-Brown, J., Bisher, M.E. and Burdine, R.D. (2011) Embedding, serial sectioning and staining of zebrafish embryos using JB-4 resin. *Nat. Protoc.*, **6**, 46–55.

Supplementary Data

Table S1**Primers used for plasmid constructions, RT-PCR and real-time RT-PCR**

Primer	sequence
CG14127-pro5/KpnI:	TAATTCGGTACCCGTTGGACCAACATCAACTACG
CG14127-pro3/NheI:	TAATTCGCTAGCTTTTTGCGTCTTCCACCGGG
F1:	TAATTCGAATTCTATATAATGCCCCGGCACGTC
R2:	TAATTCGCTAGCTCATGGGGCTGGATCAGATC
R3:	TAATTCACCGGTGCGAGTTTACCCTTCCTCTTTTGGATG
F4:	TAATTCGAATTCATGCCCCGGCACGTCGGTC
R5:	TAATTCTCTAGACTATGATGGCGCTGCGCTG
F6:	GGTGGCCTTATGGTCCCTAT
R7:	CACAGGCATGTTCTCTGAATG
F8:	TAATTCACTAGTATGCCTCGTGGAAGATCTGC
R9:	GAATTATACGTATTAGTCCTCTAGCGAGCGCT
F10:	TAATTCAAGCTTATGACGTCCCCCTGTGC
R11:	TAATTCGGATCCCGAGATCTGCGCAACCTATTGCG
F12:	ACAGTGCTGGAGAAGCAGGT
R13:	GCTTTTGTTGTGTGGCTTCA
F-actin:	GAGGAGCACCCCGTCCTGC
R-actin	GATGGCTGGAACAGGGCC
F-mCcdc:	TGGAAGTCAGAGAAACCGTTC
R-mCcdc:	CTTCTCCCTCAACTGGTGCT
F-TBP:	ATGCTGAATATAATCCCAAGCGA
R-TBP:	GAAAATCAACGCAGTTGTCCG

```

Ccadc151_Dr      1  -----MPTSVSG-----GLMVPIHDKHSETORKIOLLEGDRSYF
Ccadc151_Hs      1  MTSPLCAAASANALFPQDQASTPSRVVNGREASGKPSHLRGKGTQAQWTPGRSKGG-SFHRGAGKPSVHSQVAAELKKIOLLEGDRKAF
Ccadc151_Mm      1  MTSPLCWAATTTVTSPQAPAPSSKAKG---SKVHRSKSMGRAQAWPARHPKSATSFH--AMKSSVHRAOVLEORIKIOLLEGDRKAFY
CG14127_Dm      1  -----NESKLNE-----LNROINETIKRRLLEGGDKTANA
KIAA1984_Hs      1  -----MRRHSETD-----VEEOTQEBKTTITOLQEOCRALQI
KIAA1984_Mm      1  -----MKVHNEAA-----VEAQTTEETTTITRLQEOCRALQI

Ccadc151_Dr      37  ESSQSAIKKKNRESITLQLOENNNHKKLA-----ESDEQVIKDVFGYGVKA----PFRNMPVKAARTVLEKQVR---
Ccadc151_Hs      90  ESSQWNINKKNOETISOLRKETNAHELKLLDIL-----KGDEKVVQAVIREKWKKEP----YKKNRT-GQALEHLDHRLR---
Ccadc151_Mm      85  ESSQWNINKKNOETINLOQETKNAHVOIKDIL-----QGSKVIQAIQEWKSEK----FLKNRTCEQALEHLEHQLR---
CG14127_Dm      32  AEWQKQNRINCDTISLKKDIKEQTIKASRLRNPLQRPVVIKESTGESRRRAQSTPTLIVGKA---TYPVGAKNADDAHFLTDLRIT---
KIAA1984_Hs      32  QGVKENMDQNKATLALLRSNIRR-----GAQDWALAKKYDQWITISKACGNLPLRLAHCRSTMEVVRERLRKYV
KIAA1984_Mm      32  QGVKEKTAQNKATMGILRSNLR-----GAQDWALAKKHQWITISKACGKDTSMRLAHGRSTLEVARELRKYV

Ccadc151_Dr      104 -DKMKKLNAMKHTTOKORRLLEDLKLQYOSM-----KPNKSPLEDQTOQOEDDEERKL-RILENRLKKTOLRCHAEHIMRGVKKLDEHH
Ccadc151_Hs      159 -EKVMOQNAERHQVVLRRRLLELQLOH-SL-----RLEMAEAOH--RTEVATM-RNLENRLKNAQMAQAEHITSVVQLRAHL
Ccadc151_Mm      155 -EKNQNALRHQVILRRLLEDLQLOH-SL-----RLEMAEAOH--SNMEAATM-RNLENRLKNAQMAQAEHITSVVQLRSYL
CG14127_Dm      116 -ESRKQDLRLHFRFSKQVPSKLVKIRGLLANKEAQNQNGEKPFETLESDANRKLVCLENEIHRNVQWMAEHRKKVYSIEASL
KIAA1984_Hs      101 PDRVMHNLILHLVRRRGKLESMLDLSL-----RSC-----PDASKEALLQITROLENNIEKKMIGIITTSQNHLLYDPLDYL
KIAA1984_Mm      101 PDRVNTNIIHLVRRRGKLESMLDLSL-----RNC-----PDATKDELRLQLOITROLENNIEKTVIKITTSQNHLLYKVLDDYL

Ccadc151_Dr      186 QEESLTFPQOLDRMETETIHRQTVQFKDLOVMNSDAHLSKDAKASLOLQEQVYREKREKIKISRYKKQTVBERMNAERMKRRPQWATM
Ccadc151_Hs      238 MDESINLENRLDSMEAEVVRTTHETEAHVVNQELNARDIAKNLOYLEETLVREKKRERYISECKKRAEEKKLENERMERRTHEHL
Ccadc151_Mm      234 QEESLNLENRLDSMEAEVVRTTHETEAHVVNQELNARDIAKNLOYLEESATRDKKREHYITCKKRAEEKKLOERMERRTHEHDV
CG14127_Dm      205 MTDARFERSLRELEASLSDQAEIERLQOVHNEAVEMRDAARVILORQEQQANVSOKTRERQALDFRKQVEARKLETERGRKLFATETK
KIAA1984_Hs      180 KTVLAGYFIELDKLQNLVNYCSEISDMKKMSQDAMMITDEVKRNMRQREASFERRARENRLNQKKLID--KIHAKETSEYRRGQM
KIAA1984_Mm      180 KVLAEYPTLEDKLQNLVANYCSEISDMTMSQDAMMITDEVKRNMRQREATFERRARENRLNQKKLID--KIHAKETSEYRRGRR

Ccadc151_Dr      276 ---HPEDEL---SSEAQRSAIIVGEE-----AETSTFEEAFQIRKATGVIDSQEIVDRFPVSQGETHGHLERMKAENERMQERREERN
Ccadc151_Hs      328 LQSDDETI-----QDSLHAKEEELRQ-----RWSMYQMEVIFGKVRDATGTDETHSLVRRFLAQGDTHFAQLETLASENEQTLVRLNQEKO
Ccadc151_Mm      324 LQSEDTI-----QDGRHREELRQ-----RWSMYQMEVIFGKVRDATGVAESHAVRRFLAQDEFTQLNKKKONELAKLNEBKO
CG14127_Dm      295 TLVHQDEVGSSSQDQRTATNGESEPVSQLESVTSQMSLEKOLNEASGATSPFEVFERFSQAKKSAARLNTLRKANEAKANLEBEBKO
KIAA1984_Hs      268 DLDPFSSNMSTETLKLRRKETSATG---MEYQSGVTAVVEKVRSAVRCSHVNDITSRFLAQRNNEENLQMEDCEERRVOLKALVK
KIAA1984_Mm      268 DLDPFSSNMSTMENVKVKKRKTSAV-----IQYQTKVTTTLVERVSAVQCSSLWDLAGRFLAQKNNEENLQMEDCEERRVOLKALMK

Ccadc151_Dr      354 TLOTOLODMKYSRETELSAEQMLQCEELRQOQEOORRDAAKDHLDRLTHIINTVRAQVQQLSDKLOHT--PMMKGPEPOSPDSEHIL
Ccadc151_Hs      408 QLORELEDLKYSGEATLVSOQKLQABAEQERLKKERHABAKDOLERALRAMQVAKDSLEHLASKLIHTITVEDGGRFAGEDDPQADNYVP
Ccadc151_Mm      404 RLQRELENLKYSGDATLVSORRLHEEMQKTFKKEORHNDVHERLEHTSRITOLVKDCLEHLANKSHVRLDDTVLAGKRRDRSEDIYAY
CG14127_Dm      385 ALSSELEASNFSDVKESEVQEVIEQTKNSIAAKEODRKLDTEAGKSMGVLYKLEKTCMIFKQVEVDESNIIEPKKHVSVAE-LP
KIAA1984_Hs      352 QLELEEAVALKFRQKPSISIFKSVEKKMTMDMKKEEERLQLAHSNMTKGQELLTIOGIDNLYVRMGITLPATO---REVVLSTNLDLN
KIAA1984_Mm      352 KLELEEAVALKFRQTPSAVGFNSIQKKMKNMKEEERLQLQAQNNNMKGQQLLVITQTCIDNLYIRLIGITLTPAQ---KETAVSNTLDLVY

Ccadc151_Dr      442 ELMSEAE-----KLMLLKEELQGNDLATI-----MKEMEEREFHATIARKIPQ-----YN-----TRIQLHEA
Ccadc151_Hs      498 NLLGLVEE-----KLLKLOAQLOGGRDVQEM-----LCHIANREFLASLEGRLEP-----YN-----TRIAPFLA
Ccadc151_Mm      494 NLLVVVEE-----KLLKLODQLESODVPKL-----LRHIADREFLASLEGRLEP-----YN-----TRILFPVA
CG14127_Dm      474 NPLAHTADEDMIEILKVKIKKCOELSKSEDPVFPFIPKLDIVDEEEMIKAEQPSPSIQEGEKPQMPVCYNLFAGRAQRAAGTSS
KIAA1984_Hs      439 SKLAYCEG-----KLTVLADRVQMS-----RNEEDTKVRDTESSTLKEK-----YN-----TRITFBN
KIAA1984_Mm      439 GKLDYCEG-----KLTVLADRMQTL-----RNEEDTKVRDTESSTLKEK-----YN-----TRITFBD

Ccadc151_Dr      496 HKQDPFDEEDSCDDEGDIITRFSLKHSQAIHDANTKKR-----TRIKKKRGKL
Ccadc151_Hs      552 TSKKKPFDEE-SEEDNEVVTASLKRISOKLIESHKHR-----RSRRS-----
Ccadc151_Mm      548 SVKKKPFDEE-SEEDDRDVVTAAFKLRISOKLIEARSKKR-----NRLRS-----
CG14127_Dm      564 SSPQAPAAVATADDNEVPSRNFILKRSQVLIVDSKSRKKPFRPTPGGRRR
KIAA1984_Hs      490 REEDMIDTFQFPDMDSYVPSRAETKKRAQRLIEGKLKAA-----KKKKK-----
KIAA1984_Mm      490 REEDMETQFADVDHSYVPSRAETKKRAQOLIEAKLKGA-----KKKKK-----

```

FIGURE S1

Figure S1. Sequence alignment of the CCDC151 family proteins

Conserved CCDC151 domains from zebrafish (Dr), humans (Hs), mouse (Mm) and *Drosophila* (Dm).

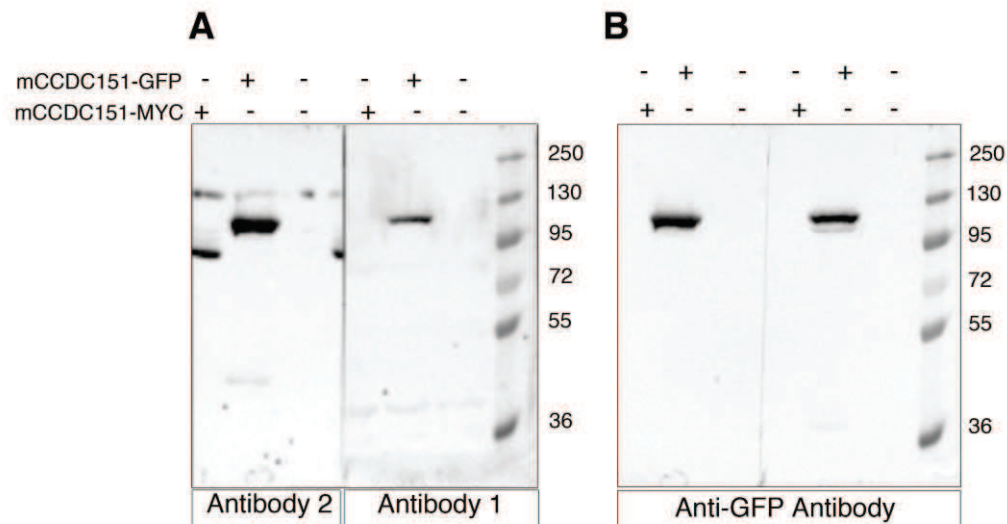


FIGURE S2

Figure S2. CCDC151 antibodies validation by western blot

(A) Detection of the 96 kDa GFP-tagged or 81 kDa Myc-tagged mouse CCDC151 protein overexpressed in CO7 cells using Antibody 1 directed against the mouse protein and Antibody 2 directed against the human protein. The Myc-tagged CCDC151 protein is also detected with Antibody 1 when exposure time is increased (not shown). (B) The 96 kDa GFP-tagged mouse CCDC151 protein is also detected by an anti-GFP antibody confirming the specificity of the 2 antibodies.

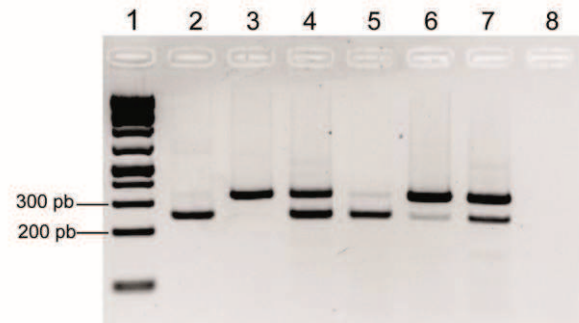


FIGURE S3

Figure S3. Mo-ccdc151Ex induces retention of intron 2 resulting in the introduction of a premature STOP in the protein sequence

PCR was performed on cDNA from 24 and 48 hpf embryos of control (lane 2 and 5), mo-ccdc151Ex (lane 3 and 6) and mo-ccdc151Ex+rescue (lane 4 and 7) with primers F6 and R7. Lane 1: 0.3 μ g of GeneRuler 1-kb Plus DNA Ladder; lane 8: no cDNA. Size of the spliced product: 252 pb; size of the unspliced product: 334 pb.

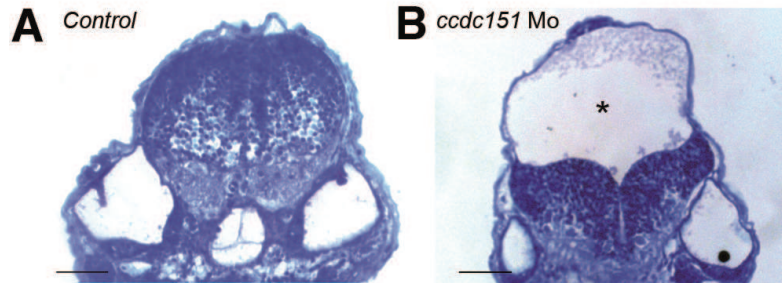


Figure S4

Figure S4. *ccdc151* morphants exhibit hydrocephaly

(A) Sections through the hindbrain region showing a ventricle of normal size in control embryos that is enlarged (star) in *ccdc151* morphants (B). Bars: 100 μm

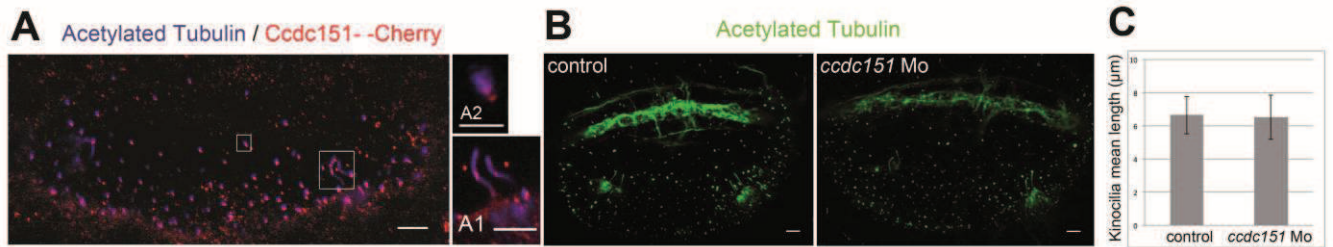


Figure S5

Figure S5: Ccdc151-Cherry is present in otic vesicle cilia but *ccdc151* morphants do not show otic vesicle defects

(A) Immunofluorescence on 24 hpf embryos injected with mRNAs coding for a Cherry-tagged version of Ccdc151 (Ccdc151-Cherry). Ccdc151-Cherry is present in the long kinocilia (inset A1) of the tether cells and in the shorter cilia (inset A2) in the vesicle. (B) otic vesicle of control or *ccdc151* Mo injected embryos stained for Acetylated Tubulin. (C) No difference in kinocilia length could be measured between control and *ccdc151* Mo injected embryos (control: n= 77 cilia in 14 embryos, *ccdc151* Mo: n=88 cilia in 15 embryos).

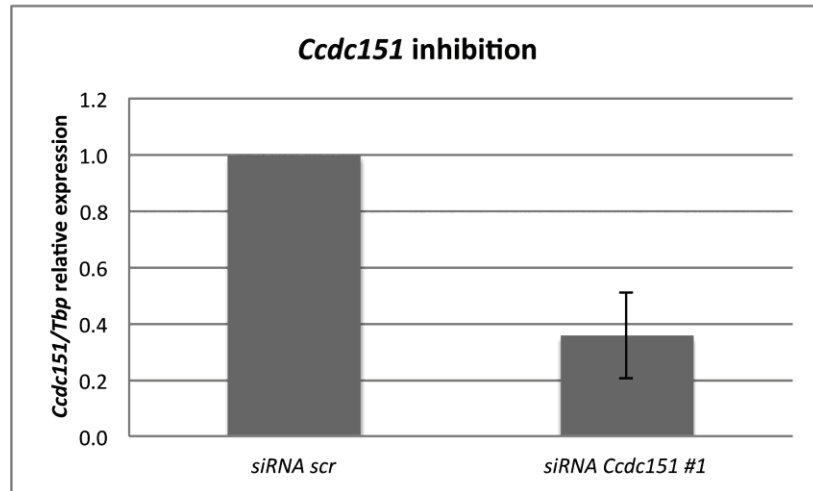


FIGURE S6

Figure S6. Specific siRNAs reduce *Ccdc151* mRNA expression levels in IMCD3 cells

IMCD3 cells were transfected twice with negative control siRNA (*siRNA scr*) or siRNA against *Ccdc151* (*siRNA Ccdc151* #1). *Ccdc151* mRNAs were quantified by real time RT-PCR and normalized to *Tbp* expression. More than 60% inhibition was observed in IMCD3 cells transfected with siRNA #1 directed against *Ccdc151* mRNA compared to cells transfected with negative control siRNA.

Movie S1. Tracking of particles movement in the control KV

Movie S2. Tracking of particles movement in the KV of *ccdc151* morphants

Movie S3. Video-recording of motile cilia in the pronephros of 2.5 dpf control zebrafish

Movie S4. Video-recording of motile cilia in the pronephros of 2.5 dpf *ccdc151* morphants

2. Caractérisation fonctionnelle du gène *Lrrc48*

2.1 - Contexte

La seconde partie de ma thèse fut consacrée à la caractérisation fonctionnelle d'un second gène potentiellement impliqué dans la fonction des cils : *LRRC48*. Ce travail a été initié chez la drosophile par un autre étudiant en thèse de l'équipe qui a notamment généré les mutants de ce gène. Depuis, les travaux ont été complétés par l'équipe et de mon côté j'ai participé à la compréhension des mécanismes de fonctionnement essentiellement chez les vertébrés. Les travaux, que je présente ici, sont rédigés en français sous forme d'article. Ils seront par la suite associés à l'article en cours de préparation relatifs aux cibles des facteurs de transcription RFX1 et RFX3 chez la souris, en collaboration avec l'équipe de Walter Reith.

2.2 - Introduction

Le flux directionnel généré par le battement des cils et des flagelles est critique dans de nombreux processus biologiques. Par exemple, le battement coordonné des multicils présents à la surface des cellules épendymaires facilite l'écoulement du liquide céphalorachidien et la motilité du flagelle de spermatozoïde lui permet de se déplacer. Le mouvement ciliaire repose sur l'action coordonnée de nombreux composants spécifiques aux axonèmes des cils motiles dont les dynéines, moteurs moléculaires à activité ATPase, qui assurent un rôle clé dans ce processus. L'activité des bras de dynéines est régulée par le DRC ou liens de néxine (N-DRC) en réponse aux signaux de la paire centrale et des fibres radiaires et implique des mécanismes encore peu caractérisés (Carbajal-González et al., 2013; Oda et al., 2013).

Chez *Chlamydomonas*, le N-DRC est un large complexe protéique ancré au tubule A du doublet externe à proximité de la fibre radiaire S2 et qui s'étend en direction du tubule B du doublet adjacent, formant ainsi un lien connectant les doublets externes (Heuser et al., 2009). Un crible génétique visant à identifier les mutations suppressives de mutants dont le flagelle est paralysé chez *Chlamydomonas* a permis l'identification de nombreux mutants altérant la structure du N-DRC et les bras de dynéine internes (BDI) qui y sont étroitement associés (Gardner et al., 1994; Heuser et al., 2009; Piperno and Mead, 1994; Piperno et al., 1992). Chez *Chlamydomonas*, douze polypeptides (DRC1-12) ont été proposés comme

membre de ce complexe et sept (DRC1-5, 7 et FAP61) ont de potentiels homologues dans les espèces possédant des cils motiles (Lin et al., 2011; Wirschell et al., 2013). Des analyses structurales et biochimiques des mutants du N-DRC chez *Chlamydomonas* montre que le mutant *pf3* est déficient pour DRC1 et possède les plus graves défauts d'assemblage du N-DRC et des BDI, de tous les mutants du N-DRC examinés. Il est donc indispensable à l'intégrité de ce complexe. De façon identique aux autres mutants du N-DRC, l'amplitude du battement des flagelles est diminuée et le mouvement est anormal dans ce mutant (Austin-Tse et al., 2013; Gardner et al., 1994; Piperno and Mead, 1994; Wirschell et al., 2013).

Parmi les composants du complexe qui ont été étudiés, les orthologues de DRC4, Gas8/trypanine sont nécessaires à la motilité ciliaire chez le poisson zèbre et le trypanosome respectivement (Baron et al., 2007; Colantonio et al., 2009). Plus précisément *gas8* est requis pour le développement des vertébrés et les morphants *gas8* chez le poisson zèbre développent de graves défauts développementaux caractéristiques des mutants et morphants pour les gènes ciliaires, tels que l'hydrocéphalie, des défauts d'asymétrie droite gauche et la mort des cellules de la crête neurale (Colantonio et al., 2009). *ccdc65*, l'orthologue de DRC2 chez les vertébrés, est également nécessaire à leur développement, puisque l'absence de cette protéine chez le poisson zèbre conduit à des défauts d'asymétrie droite gauche, des kystes rénaux, l'hydrocéphalie et les cils sont immobiles (Austin-Tse et al., 2013). Récemment, l'importance de ce complexe a été mise en évidence suite à la détection de mutations dans les gènes orthologues de DRC1 et DRC2 (CCDC164 et CCDC65 respectivement), chez les patients atteints de Dyskinésie Ciliaire Primitive (Austin-Tse et al., 2013; Horani et al., 2013a; Wirschell et al., 2013). Les autres candidats identifiés suite à des analyses protéomiques chez *Chlamydomonas* n'ont pour le moment pas fait l'objet d'analyses fonctionnelles.

Dans cette étude, nous montrons que le gène *LRRC48*, orthologue de FAP134 ou DRC3 chez *Chlamydomonas*, est évolutivement conservé dans les espèces possédant des cils motiles. La protéine est associée aux cils motiles, chez la drosophile, le poisson zèbre et la souris. Son expression est augmentée pendant la ciliogenèse induite *in vitro* des cils motiles des cellules épendymaires de souris et diminuée dans les souris *RFX3*^{-/-}. Chez la drosophile, *LRRC48* est nécessaire pour la motilité des flagelles de spermatozoïde et des cils des neurones sensoriels en 9+0, bien qu'aucun lien de néxine n'est été décrit dans ces cils sensoriels. Chez le poisson zèbre, la perte de fonction par injection de morpholino, conduit à l'hydrocéphalie, des kystes rénaux, des oedèmes cardiaques et des défauts de morphogenèse

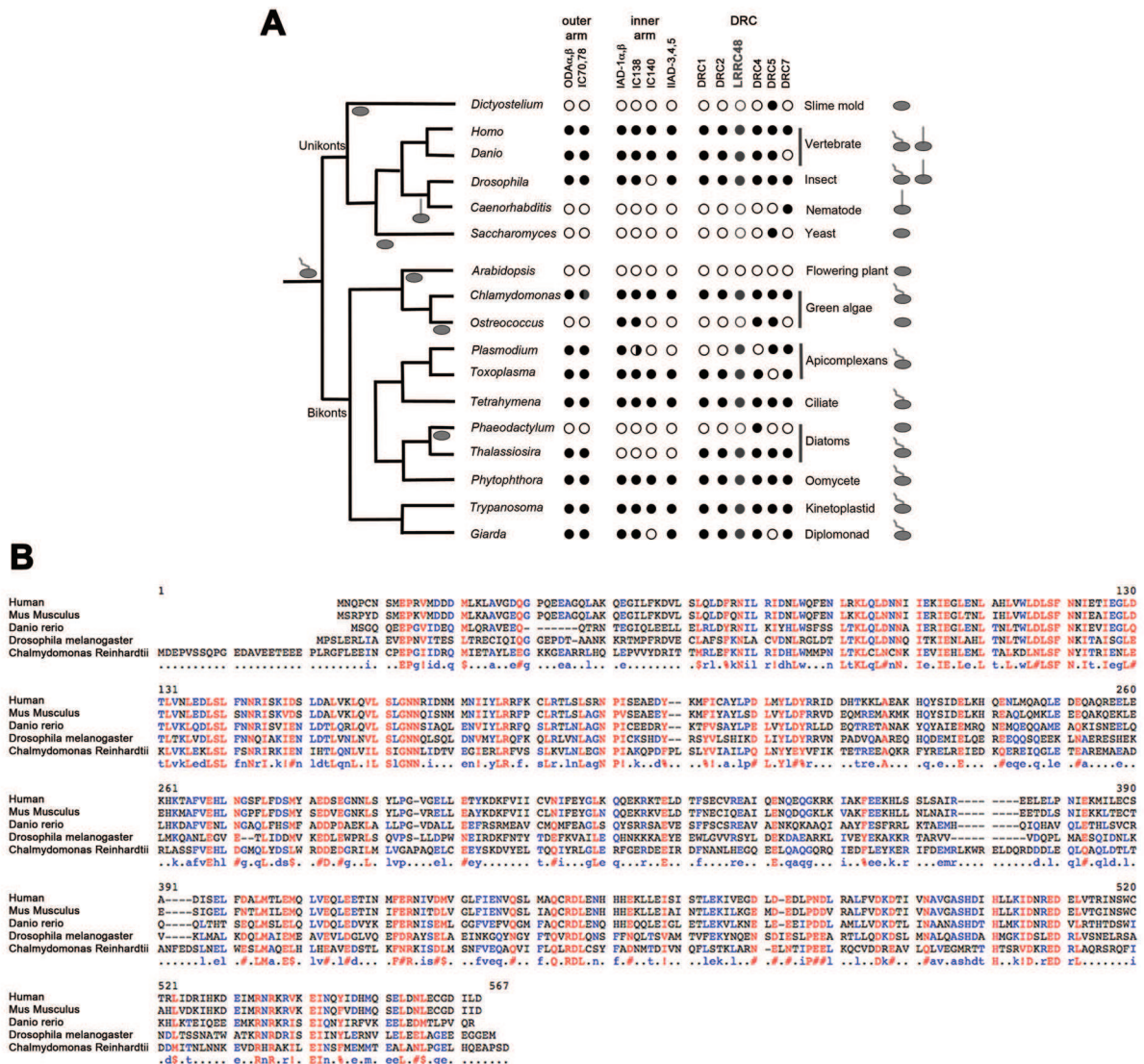


Figure 1 : LRR48 est conservée chez les espèces possédant des cils motiles.

A – Occurrences de LRR48 dans le règne animal eucaryote. Aucun orthologue de LRR48 n'est trouvé dans les espèces ne possédant pas de cils ou des cils non motiles. Les cercles pleins montrent l'existence d'un orthologue de la protéine humaine LRR48. Les cercles à moitié pleins montrent l'existence d'un orthologue chez l'Homme mais la relation d'orthologie n'est pas établie de façon réciproque en utilisant le PSI-Blast run 2. **B**- Alignement des séquences protéiques de LRR48 chez l'Homme et de ses orthologues chez la souris, le poisson zèbre, la drosophile et *Chlamydomonas reinhardtii*.

de l'oreille interne. Dans l'oreille interne des morphants *lrrc48*, le battement ciliaire des cils motiles est affecté, les kinocils des cellules sensorielles sont courbés et ces défauts sont associés à des problèmes de biogenèse des otolithes. L'ensemble de ces résultats révèlent l'importance de LRRC48 dans le développement animal et montre que la fonction motile assurée par DRC3 chez *Chlamydomonas*, est conservée chez les animaux. Ils montrent également pour la première fois que les protéines du N-DRC sont requises pour la motilité des cils en 9+0.

2.3 - Résultats

CG13125/*Lrrc48* est un gène spécifique aux espèces possédant des cils motiles

Nous avons précédemment identifié le gène CG13125/*Lrrc48* comme potentiel cible de RFX, dans un crible réalisé sur les gènes de drosophile visant à identifier les gènes possédant une boîte X dans leur promoteur (Laurençon et al., 2007). Nous avons cherché les occurrences pour LRRC48 et nous avons trouvé de potentiels orthologues uniquement dans les espèces possédant des cils motiles (**Figure 1A**). Par exemple, aucun orthologue n'est présent chez *C.elegans* qui ne possède pas de cils motiles alors que des orthologues ont été trouvés chez les protozoaires qui possèdent de nombreux cils motiles, comme *Tetrahymena thermophila*. La séquence protéique de l'Homme possède 31% d'identité avec la séquence de drosophile et 33% d'identité avec la séquence de *Chlamydomonas reinhardtii* dont l'orthologue est DRC3 (**Figure 1B**). DRC3 est un gène précédemment identifié chez *Chlamydomonas* comme membre du N-DRC, complexe nécessaire à la motilité (Gardner et al., 1994; Heuser et al., 2009; Piperno and Mead, 1994; Piperno et al., 1992). L'ensemble de ces données suggère fortement que CG13125/LRRC48 possède un rôle important dans la fonction des cils motiles.

***Lrrc48* est associé aux cils motiles et est sous le contrôle de RFX chez les animaux.**

Afin de comprendre la fonction de *Lrrc48* nous avons d'abord observé son profil d'expression et sa localisation subcellulaire dans de nombreux organismes modèles. Chez la souris, l'expression de *Lrrc48* est fortement augmentée pendant la différenciation induite *in vitro* des cils motiles, présents à la surface des cellules épendymaires (**Figure 2A**). De plus, l'expression de *Lrrc48* est fortement diminuée dans les cellules épendymaires issues de souris

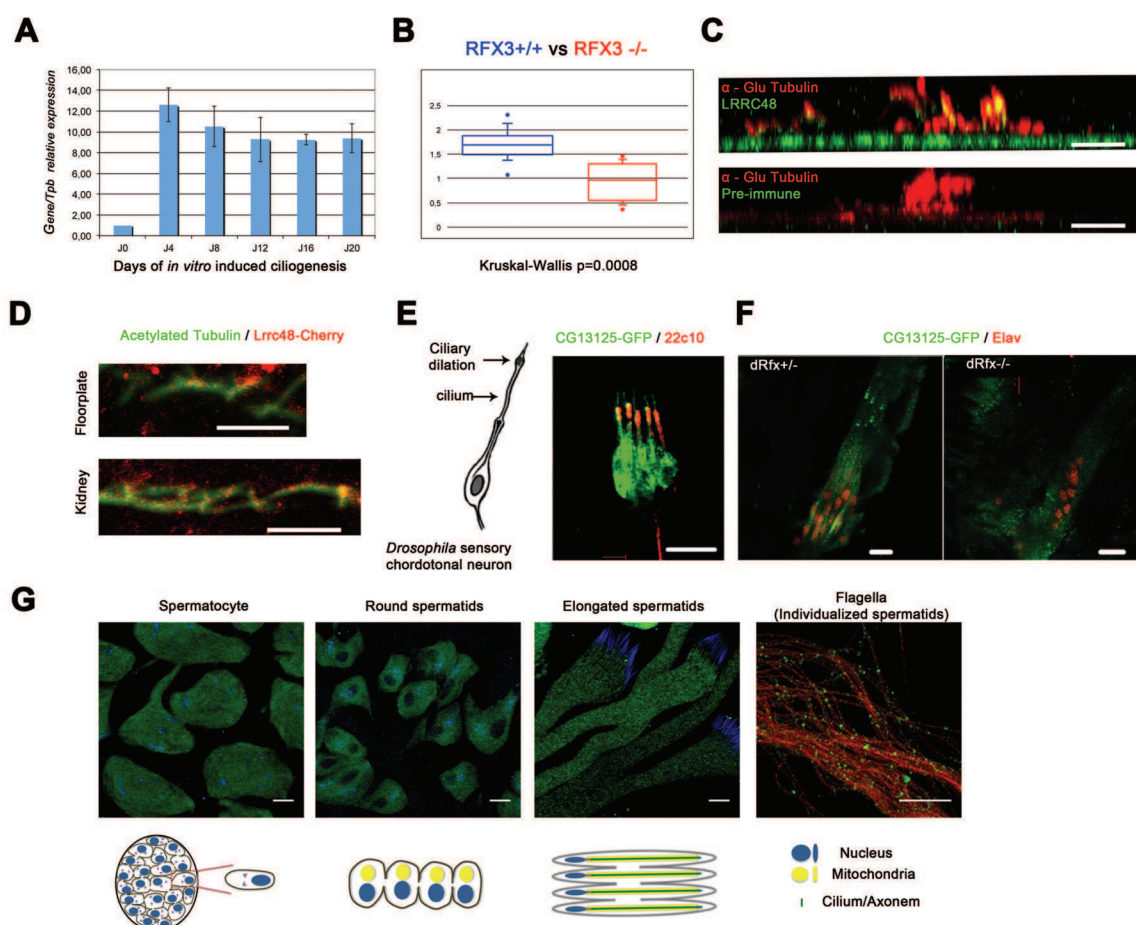


Figure 2 : *Lrrc48* est un gène cible de RFX associé aux cils motiles chez les animaux.

A – L'expression de *Lrrc48* est fortement augmentée pendant la ciliogenèse induite *in vitro* des cellules épendymaires de souris. **B**– L'expression de *Lrrc48* est significativement diminuée dans les souris RFX3^{-/-}. **C**– L'anticorps dirigé contre la protéine LRRC48 de souris marque les cils motiles des cellules épendymaires. Aucun marquage n'est obtenu avec le sérum pré-immun. **D**– Immunofluorescence d'embryons de poissons zèbre à 24 hpf injectés avec de l'ARNm codant pour une forme étiquetée cherry de *Lrrc48* (*Lrrc48*-Cherry). *Lrrc48*-Cherry est localisée dans les cils motiles du plancher du tube neural et du pronéphron. Les cils sont marqués en vert avec un anticorps ciblant la tubuline acétylée. **E**– Schéma d'un neurone chordotonal cilié de drosophile chez l'embryon. Dans ces neurones LRRC48/CG13125-GFP est détecté tout le long de l'axonème du cil et la protéine est également fortement présente dans le cytoplasme. Le système nerveux périphérique est marqué en rouge avec un anticorps anti-Futsch. **F**– Dans les mouches mutantes pour *dRfx*, le marquage CG13125-GFP est perdu dans les neurones chordotonaux. Les neurones sont marqués en rouge avec un anti-Elav. **G**– Pendant la spermatogenèse chez la drosophile, CG13125 est fortement exprimé dans le cytoplasme depuis le stade spermatocytes jusqu'aux spermatides. Dans les flagelles (spermatides individualisés) la protéine CG13125-GFP est associée à l'axonème sous forme de petits points. Le noyau est marqué en bleu avec du DRAQ5 et les flagelles sont marqués en rouge avec un anticorps anti-Axo49 ciblant la polyglycylation des tubulines. Une représentation schématique de l'organisation des cellules pendant la spermatogenèse est présentée sous chaque stade. Barre d'échelle : 10 μ m.

RFX3^{-/-} (**Figure 2B**) ce qui suggère que *Lrrc48* est sous le contrôle de RFX3 chez la souris. Nous avons développé un anticorps contre la protéine de souris grâce auquel nous avons pu observer la localisation de LRRC48 dans les cils motiles des cellules épendymaires. L'absence de marquage dans les cils en utilisant le sérum pré-immun démontre la spécificité du résultat obtenu (**Figure 2C**). Nous avons ensuite injecté de l'ARNm codant pour une forme étiquetée de *Lrrc48*-Cherry, dans le poisson zèbre et analysé la localisation subcellulaire de la protéine. Dans cet organisme, *Lrrc48*-Cherry est fortement associé aux cils motiles du pronéphron ainsi que dans les cils du plancher du tube neural à 24 heures post fertilisation (hpf) (**Figure 2D**). Ces résultats montrent que LRRC48 est associé aux cils motiles chez les vertébrés.

Afin de localiser LRRC48 chez la drosophile, nous avons généré une lignée transgénique exprimant une version de CG13125/LRRC48 étiquetée à la GFP sous le contrôle de son propre promoteur. Dans les embryons de drosophile, nous avons observé la localisation de CG13125-GFP uniquement dans les neurones sensoriels ciliés du système nerveux périphérique (SNP). Plus précisément, l'expression de la GFP est restreinte à un sous type de neurones, les neurones chordotonaux, qui sont les seuls à posséder des cils motiles en 9+0 chez la drosophile. L'axonème de ces cils est organisé autour de 9 doublets externes de microtubules jusqu'à la dilatation ciliaire puis se poursuit en neuf singlets (Lee E 2008) (**Figure 2E**). Des bras de dynéine externes sont associés aux doublets de microtubules et permettent le mouvement du cil sensoriel neuronal. Dans ces cellules, CG13125-GFP est fortement exprimé dans le corps cellulaire et il est associé au cil sur toute la longueur de l'axonème (**Figure 2E**). Toutefois, aucune expression de CG13125-GFP n'est détectée dans les neurones sensoriels externes qui ne possèdent pas de cils motiles. En contexte mutant *dRfx*^{-/-}, l'expression de CG13125-GFP est perdue, confirmant que dans le SNP, CG13125 est régulé par RFX (**Figure 2F**).

De plus, l'expression de CG13125 est également détectée tout au long de la spermatogenèse chez la mouche, où le marquage CG13125-GFP est observé depuis le stade spermatocyte jusqu'aux spermatozoïdes. Au stade spermatocyte, la protéine est localisée dans tout le cytoplasme et cette expression cytoplasmique est maintenue jusqu'au stade spermatide où les axonèmes ne sont pas encore séparés du cytoplasme. Dans les flagelles des spermatozoïdes, chaque spermatide est individualisé et la protéine CG13125-GFP est associée aux axonèmes, sous forme de marquage pointillé (**Figure 2G**). L'ensemble de ces données,

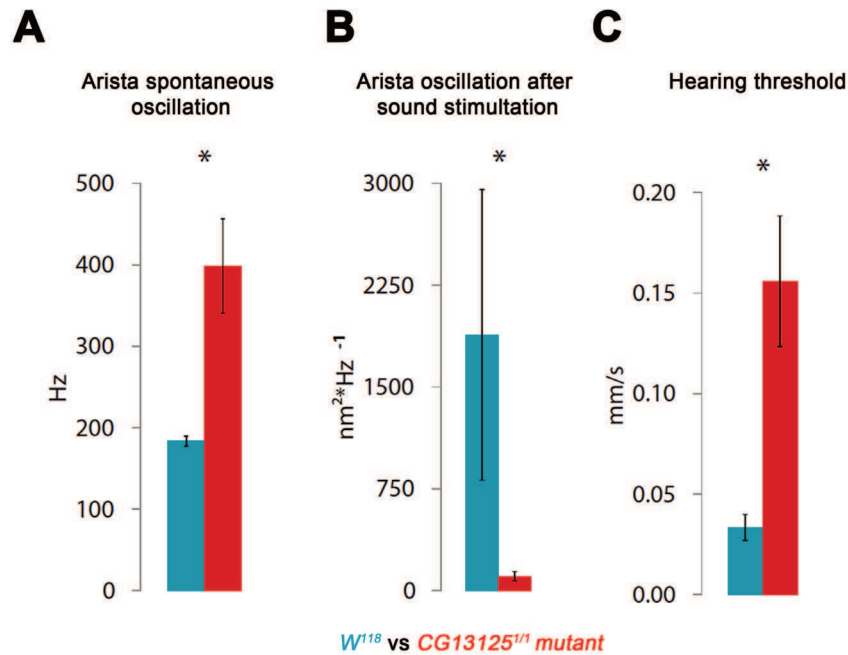


Figure 3 : Réponses auditives de l'organe Johnston chez les mouches contrôles et mutantes *CG13125^{1/1}*.

En bleu, les mouches contrôles *W¹¹⁸*, en rouge les mouches mutantes *CG13125^{1/1}*. **A-** En absence de stimulation sonore, l'arista des mouches contrôles *W¹¹⁸* oscille de façon spontanée à 184 ± 6 Hz. Cette fréquence d'oscillation est très nettement augmentée dans les mutants *CG13125^{1/1}*. **B-** Après stimulation sonore, la fréquence de déplacement de l'arista par rapport à l'intensité du son, observée dans les mutants *CG13125^{1/1}* est très nettement inférieure à celle observée dans les mouches *W¹¹⁸* (*W¹¹⁸*: 1884 ± 1070 nm²*Hz⁻¹, *CG13125^{1/1}*: 88 ± 35 nm²*Hz⁻¹). **C-** Le seuil de détection du son est plus élevé dans les mouches mutantes *CG13125^{1/1}* que dans les mouches contrôles *W¹¹⁸* (*W¹¹⁸*: $0,033 \pm 0,007$ mm/s, *CG13125^{1/1}*: $0,171 \pm 0,031$ mm/s).

montre que tout comme chez la souris et le poisson zèbre, CG13125 est localisé dans les cils motiles chez la drosophile.

Les mouches déficientes pour CG13125/*Lrrc48* possèdent des défauts d'audition.

Chez la drosophile, nous avons analysé la fonction de CG13125 en générant une mutation invalidante de *CG13125^{1/1}* en utilisant la recombinaison homologue (Maggert et al., 2008 et matériel et méthodes). Dans cet organisme, les mécanismes de l'audition sont assurés par l'organe de Johnston (OJ) localisé dans l'antenne. Cette dernière est composée d'une arista qui assure la fonction de récepteur sonore et de trois segments antennaire, a1, a2 et a3. Le segment a2 (ou organe de Johnston) est composé des organes chordotonaux contenant les neurones sensoriels ciliés (neurones chordotonaux) dont le mouvement actif est nécessaire à l'amplification du signal auditif chez la drosophile (Kavlie et al., 2010). Afin de tester directement, si CG13125 est impliqué dans la fonction des organes chordotonaux, nous avons analysé la réponse auditive de l'organe de Johnston. Pour cela, nous avons exposé les mouches à des sons de différentes intensités à la fréquence optimale de réception de l'arista (Göpfert and Robert, 2003; Göpfert et al., 2005). Les réponses mécanique et électrique des neurones de l'OJ sont accessibles en enregistrant le déplacement de l'antenne provoqué par l'exposition sonore et par la mesure du potentiel auditif généré dans le nerf.

Les résultats obtenus, montrent qu'en l'absence de stimulation sonore, l'arista des mouches contrôles *W¹¹⁸* oscille de façon spontanée à 184 ± 6 Hz. Dans les mutants *CG13125^{1/1}*, cette fréquence d'oscillation est très nettement augmentée puisqu'elle passe à 430 ± 60 Hz (**Figure 3A**). Après stimulation sonore, la fréquence de déplacement de l'arista par rapport à l'intensité du son observée dans les mutants *CG13125^{1/1}* est très nettement inférieure à celle observée dans les mouches *W¹¹⁸* (**Figure 3B**). De plus, les mouches mutantes *CG13125^{1/1}* sont moins sensibles aux faibles sons puisque leur seuil de détection du son est de $0,171 \pm 0,031$ mm/s contre $0,033 \pm 0,07$ mm/s dans les mouches contrôles *W¹¹⁸* (**Figure 3C**). L'ensemble de ces données montre que CG13125 est nécessaire à l'amplification mécanique adaptée à la réponse des stimuli sensoriels des neurones de l'OJ et que le mouvement du cil, qui génère la transduction du signal auditif, requiert CG13125. Plus précisément, ces résultats suggèrent que CG13125 est nécessaire à la motilité des cils des organes chordotonaux bien qu'aucun lien de néxine n'ait été décrit dans ces cils motiles en 9+0 jusqu'à présent.

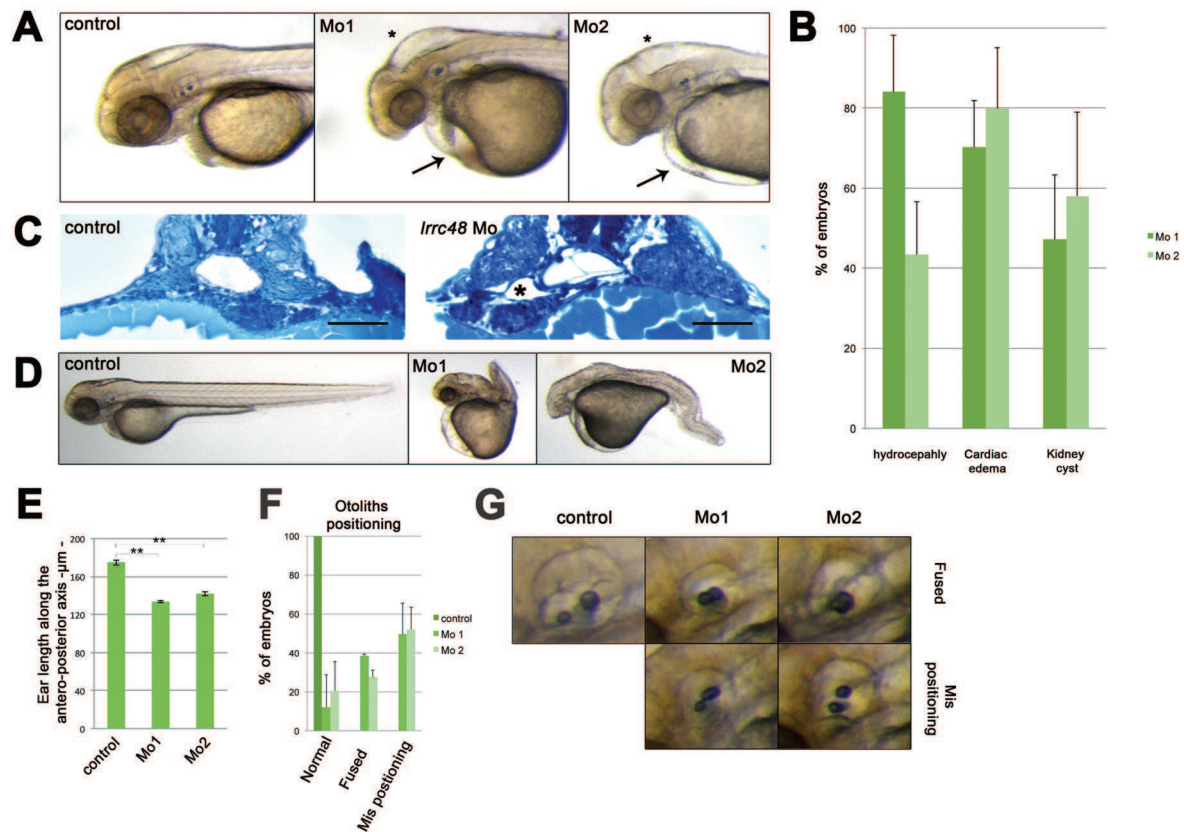


Figure 4: La perte de fonction de *Lrrc48* engendre des phénotypes caractéristiques de défauts ciliaires chez le poisson zèbre.

A-B – A 48 hpf, les morphants *lrrc48*, développent de l'hydrocéphalie (étoile), des kystes rénaux et des oedèmes cardiaques (flèche) (Mo1 : n=207, Mo2 : n=84). **C**- Coupes histologiques dans le pronéphron du poisson zèbre révélant la présence de kystes (étoile) dans les morphants *lrrc48*. **D**- A 48 hpf, certains morphants *lrrc48* ont un axe antéro-postérieur très raccourci. **E**- La taille de la vésicule otique le long de l'axe antéro-postérieur à 3 dpf est diminuée dans les morphants *lrrc48* comparé aux embryons contrôles (Contrôle : n=38, Mo1 : n=36, Mo2 : n=44) **F-G**- Le positionnement des otolithes est affecté dans la vésicule otique des morphants *lrrc48* à 3 dpf. Dans les embryons contrôles il y a exactement deux otolithes, un positionné au pôle antérieur, l'autre au pôle postérieur. Dans les morphants *lrrc48*, ils sont majoritairement fusionnés ou mal positionnés (Contrôle : n=38, Mo1 : n=36, Mo2 : n=44). Barre d'échelle : (C) 50 μ m.

CG13125/LRRC48 est nécessaire pour la motilité du flagelle de spermatozoïde chez la drosophile.

Afin de vérifier si CG13125 est nécessaire à la motilité, nous avons analysé le battement des flagelles des spermatozoïdes chez l'adulte. Dans un premier temps, nous avons pu constater que les spermatozoïdes des mutants *CG13125^{1/1}* se développent normalement. Toutefois, le battement ciliaire des spermatozoïdes est altéré. En effet, les flagelles des mouches *W¹¹⁸* bougent en formant une onde ondulatoire régulière sur l'ensemble de l'axonème (**Film 1**) alors que dans les mutants *CG13125^{1/1}* certaines portions de l'axonème sont totalement immobiles (**Film 2**). Ces résultats montrent que CG13125 est un composant nécessaire à la motilité des cils chez la drosophile.

La perte de fonction de *Lrrc48* chez le poisson zèbre conduit à des phénotypes associés à des défauts de fonctionnement des cils.

Pour aller plus loin dans la caractérisation fonctionnelle de *Lrrc48* chez les vertébrés, nous avons utilisé la stratégie du morpholino qui permet d'inhiber la fonction de *Lrrc48* chez le poisson zèbre. Nous avons utilisé deux morpholinos différents. Le premier cible la jonction entre l'intron 1 et l'exon 2 du transcrit (Mo1) et le second cible le site d'initiation de la traduction (Mo2). Chez le poisson zèbre, la perte de *Lrrc48* a permis de révéler des phénotypes caractéristiques associés à des déficits ciliaires, dont l'hydrocéphalie, les kystes rénaux (généralement bilatéraux) ainsi que des défauts périphériques comme la formation d'oedèmes cardiaques (**Figure 4A-C**). Les embryons les plus sévèrement atteints ont une extrémité caudale courbée et peuvent avoir un axe antéro-postérieur très raccourci (**Figure 4D**). Les défauts observés sont identiques avec les deux morpholinos ce qui permet de conclure qu'il s'agit bien de défauts spécifiques de la perte de fonction de *Lrrc48*.

Nous avons également observé que les morphants *lrrc48* possèdent de graves défauts de morphogénèse de l'oreille interne ou vésicule otique. A 3 jours post fertilisation (dpf), la longueur de la vésicule otique le long de l'axe antéro-postérieur est 20% et 24% plus courte en utilisant le Mo1 le Mo2 respectivement (**Figure 4E**). A ce stade, exactement 2 otolithes sont présents dans les embryons contrôles, l'un à l'extrémité antérieure et l'autre à l'extrémité postérieure de la vésicule, en position ventrale par rapport au canal semi-circulaire (Riley et al., 1997). A l'inverse, dans les morphants *lrrc48*, les otolithes sont mal positionnés (Mo1 : 49,5%, Mo2 : 51,9%) ou sont fusionnés (Mo1 : 38,6%, Mo2 : 27,5 %). Ces défauts ont déjà

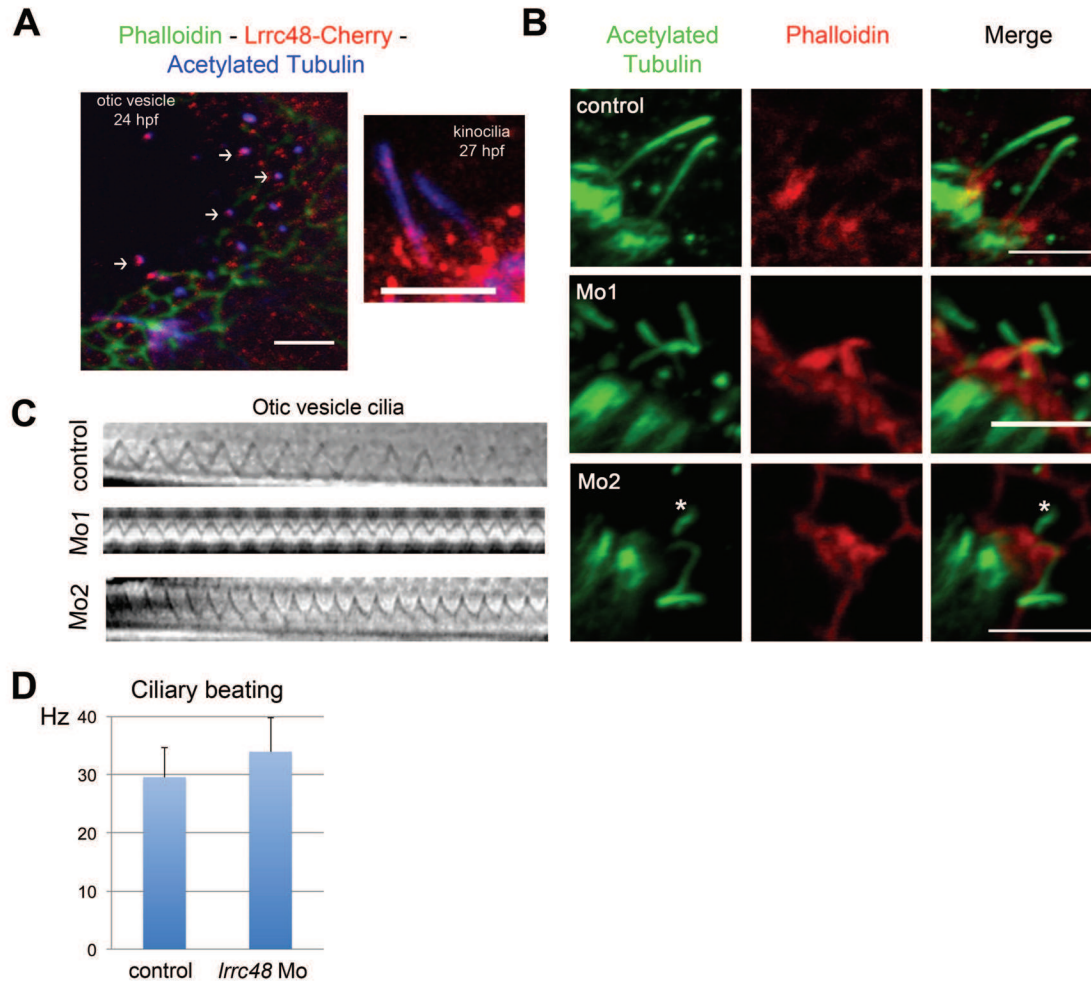


Figure 5 : Phénotype ciliaire dans l'oreille interne des morphants *lrrc48*.

A- Immunofluorescence sur embryons de poissons zèbre injectés avec de l'ARNm codant pour une forme étiquetée cherry de *Lrrc48* (*Lrrc48*-Cherry). A 24 hpf, *Lrrc48*-Cherry (rouge) est localisée dans tous les petits cils présents à proximité des kinocils et dans les kinocils jusqu'à 27 hpf. Les cils sont marqués en bleu avec un anticorps ciblant la tubuline acétylée et l'actine est révélée par la phalloïdine en vert. **B-** A 27 hpf, les kinocils apparaissent courbés/pliés dans les morphants *lrrc48*, alors qu'ils sont bien droits dans les contrôles (Contrôle : n=30, Mo1 : n=28, Mo2 : n=22). **C-** Kymograme du mouvement des cils motiles de l'oreille interne chez les morphants *lrrc48* et les contrôles. **D-** Graphique indiquant la valeur moyenne de la fréquence du battement ciliaire chez les morphants *lrrc48* et les contrôles (Contrôle : n=11, *lrrc48* Mo : n=12). Barre d'échelle : 5 μ m.

été décrits dans les mutants ou morphants qui affectent la fonction motile des cils comme *dnah5*, *lrrc50* ou *gas8* (Colantonio et al., 2009; Stooke-Vaughan et al., 2012; Yu et al., 2011), ce qui suggère un rôle dans la fonction motile des cils chez les vertébrés pour *lrrc48*.

Les kinocils de la vésicule otique sont pliés dans les morphants *lrrc48*

Nous avons ensuite cherché à comprendre si les défauts de formation des otolithes observés dans les morphants *lrrc48* résultent de défauts de formation ou de positionnement des cils de la vésicule otique. A 24 heures post fertilisation (hpf), trois catégories de cils sont présentes. Il y a de nombreux petits cils, dispersés dans l'ensemble de la vésicule dont certains sont motiles. Il existe également des cils plus longs, les kinocils, exclusivement localisés aux pôles antérieur et postérieur de la vésicule. Entre 19 hpf et 27 hpf, les précurseurs des otolithes fusionnent sur les kinocils pour former les otolithes, antérieurs et postérieurs (Stooke-Vaughan et al., 2012). Dans un premier temps, nous avons analysé la localisation de la protéine Lrr48-Cherry dans la vésicule otique. A 24 hpf, Lrrc48-Cherry est détectée dans l'ensemble des cils de la vésicule otique, y compris dans les kinocils. La localisation dans les kinocils est maintenue au moins jusqu'à 27 hpf, dernier stade analysé. On observe également un fort marquage dans le cytoplasme (**Figure 5A**). Ensuite nous avons analysé la distribution et la taille des cils pendant cette fenêtre, lorsque les cils sont supposés fonctionner dans l'assemblage des otolithes. A 19 hpf et 24 hpf, nous n'avons observé aucune différence concernant la taille et la répartition des cils dans la vésicule otique, entre les contrôles et les morphants *lrrc48*. Toutefois à 27 hpf, les kinocils semblent courbés et pliés comme si certaines portions de l'axonème étaient fragilisées (**Figure 5B**). Etant donné le phénotype observé, nous n'avons pas pu analyser la taille de ces cils de manière très rigoureuse. Cependant, la localisation aux pôles antérieurs et postérieurs de la vésicule otique des kinocils n'est pas altérée. Ces données montrent que Lrrc48 n'est pas nécessaire au bon positionnement des cils de la vésicule otique mais qu'il pourrait être impliqué dans le maintien de la rigidité de l'axonème des kinocils.

LRRC48 est nécessaire à la motilité des cils de l'oreille interne

Nous avons vu que les défauts de positionnement des otolithes ne résultent pas du mauvais positionnement des cils dans la vésicule otique. Nous avons donc décidé d'analyser l'implication de Lrrc48 dans la motilité des cils de la vésicule otique. En effet, les cils motiles présents à proximité des kinocils assurent l'écoulement d'un flux constant permettant la

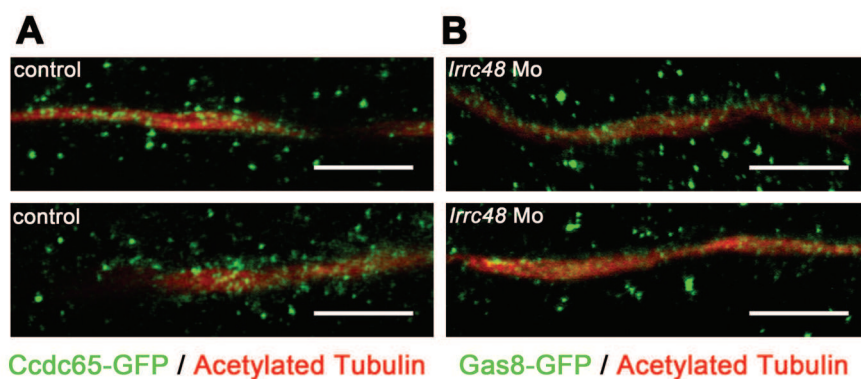


Figure 6 : Localisation de Ccdc65 et Gas8 dans les morphants *lrrc48*.

A- Ccdc65-GFP (en vert) est localisé dans les cils motiles du rein dans les embryons contrôles. Cette localisation ne semble pas affectée dans les morphants *lrrc48*. **B-** Gas8/DRC4-GFP est localisé dans les cils motiles du rein chez le poisson zèbre. La localisation ciliaire semble inchangée dans les morphants *lrrc48*. Les cils sont marqués en rouge avec un anticorps anti tubuline acétylée. Barre d'échelle : 10 μ m.

nucléation des otolithes (à partir des précurseurs) au niveau des kinocils des cellules sensorielles (Wu et al., 2011). Suite à des analyses réalisées *in vivo*, à 24 hpf, par vidéo microscopie, nous avons pu observer que l'amplitude du battement ciliaire est diminuée et que la fréquence mesurée est significativement plus élevée dans les morphants *lrrc48* (**Figure 5E,F - Films 3-4**). Par ailleurs nous avons également observé que le battement ciliaire n'est pas toujours régulier et qu'il est parfois interrompu. Ces résultats montrent que *Lrrc48* est nécessaire à la fonction motile des cils chez les vertébrés, de façon similaire à ce qui a été observé dans les flagelles de spermatozoïde chez la drosophile ou indirectement dans l'oreille de la drosophile.

Analyse de la stabilité du N-DRC dans les morphants *lrrc48*.

La phylogénie de *LRRC48*, révèle qu'il s'agit de l'orthologue de *DRC3* chez *Chlamydomonas*. *DRC3* appartient au N-DRC, complexe mutliprotéique requis pour la motilité du flagelle. Nous avons donc cherché les orthologues, chez le poisson zèbre, de certains membres du complexe, puis nous avons analysé leur devenir lorsque *Lrrc48* est absent. Pour cela nous avons injecté une forme étiquetée à la GFP de *Ccdc65* (*DRC2*) ou *Gas8* (*DRC4*), dans le poisson zèbre, conjointement ou non avec les morpholinos ciblant *lrrc48*. Nous avons observé une localisation axonémale sous forme de pointillés pour *Ccdc65*-GFP et *Gas8*-GFP dans les cils motiles du rein (**Figure 6A-B**) mais également une forte localisation cytoplasmique. Au vue des images obtenues, nous n'observons pas de défauts flagrants dans la localisation de *Ccdc65*-GFP et *Gas8*-GFP dans les morphants *lrrc48* (**Figure 6A-B**), ce qui suggère que *Lrrc48* n'est pas nécessaire pour la localisation axonémale de *Ccdc65* et *Gas8*. Néanmoins, il serait intéressant d'analyser la localisation des autres membres de ce complexe dans les morphants *lrrc48*.

2.4 - Discussion

Nous avons caractérisé la fonction de *LRRC48*, cible des facteurs de transcription de ciliogenèse RFX (Laurençon et al., 2007). La phylogénie de ce gène, montre qu'il s'agit d'un composant du N-DRC ou lien de nexine. Nous avons réalisé des expériences de perte de fonction qui nous ont permis de montrer l'implication dans la motilité des cils de cette protéine chez la drosophile et le poisson zèbre. De plus, nous avons vu que cette protéine est importante pour le développement animal et qu'elle assure un rôle clé dans la morphogenèse

et la fonction de l'oreille chez la drosophile et le poisson zèbre. Plus précisément, dans l'oreille de drosophile, CG13125/LRRC48 est nécessaire à la motilité des cils en 9+0, bien qu'aucun lien de néxine n'ait été décrit dans ces cils.

L'absence de *Lrrc48* affecte la motilité des cils mais l'ultrastructure des cils est normale.

Nos analyses fonctionnelles de *lrrc48* montrent que ce gène code une protéine nécessaire à la motilité des cils et flagelles chez la drosophile et à la motilité des cils de l'oreille interne chez le poisson zèbre. Chez ce dernier, nous avons également analysé le battement des cils motiles du rein, mais nous n'avons observé aucune différence significative dans la fréquence du battement entre les embryons contrôles et les morphants *lrrc48*. Cependant, en analysant les kymogrammes, nous avons constaté qu'environ 30% des sinusoïdes ne présentent pas la même régularité que celles obtenues avec les embryons contrôles. Plus précisément, la largeur du pic n'est pas la même à la base, au milieu et à la pointe de la sinusoïde. Ceci peut s'expliquer par un battement non coordonné des multicils, ou par la présence d'une population hétérogène, dans laquelle certains cils ne bougeraient pas correctement (amplitude, vitesse). Contrairement aux résultats obtenus dans l'oreille interne, les analyses réalisées dans le rein portent sur des cellules multiciliées. Ainsi il semblerait que le phénotype obtenu ne soit pas assez prononcé pour pouvoir être révélé dans ce tissu chez le poisson zèbre. De même, l'analyse de l'ultrastructure des cils du rein en microscopie électronique n'a révélé aucun défaut et l'analyse de l'ultrastructure des cils motiles de l'oreille interne n'a pu être réalisée pour des raisons techniques.

Cependant, chez la drosophile l'analyse de l'ultrastructure des cils des neurones sensoriels de l'organe de Johnston par microscopie électronique à transmission a pu être réalisée. L'intégrité de l'axonème en 9+0 n'apparaît pas particulièrement affecté et les bras de dynéines sont toujours présents dans les cils des mutants *CG13125^{1/1}*. Ces résultats sont différents de ceux obtenus dans les mutants *pf3* (DRC1) et *ida6* (DRC2) chez *Chlamydomonas* et chez les patients humains CCDC65/DRC2 où des défauts d'assemblage des bras de dynéine internes ont été rapporté (Austin-Tse et al., 2013; Wirschell et al., 2013). Ces données montrent que contrairement à d'autres membres du complexe, LRRC48 n'est pas nécessaire au maintien des bras de dynéine sur l'axonème. Toutefois, il manque ici les analyses ultrastructurales sur les spermatozoïdes de ces mutants afin de pouvoir définitivement conclure.

Lrrc48 est nécessaire pour moduler l'activité des bras de dynéine.

Le N-DRC est un complexe étroitement connecté aux autres structures axonémales. Des analyses par tomographie électronique ont notamment révélé la délicate connexion de ce complexe avec la fibre radiaire S2, les bras de dynéine internes (IA4, IA5) et avec l'OID (Outer-Inner Dynein linker) (Heuser et al., 2009; Oda et al., 2013). Chez *Chlamydomonas*, l'OID est une structure reliant les bras de dynéine internes (BDI) et externes (BDE). Elle est composée de la chaîne intermédiaire IC2 des BDE et interagit via son extrémité N-Terminal avec DRC4. Son rôle est d'inhiber l'activité des dynéines en absence de signaux provenant de la paire centrale et des fibres radiaires (Oda et al., 2013). L'interaction entre les BDE et le DRC est donc essentielle pour générer un battement ciliaire efficace et d'amplitude adaptée. Il est intéressant de constater que l'addition d'un tag biotinylé à l'extrémité N-Terminal d'IC2 active de manière non spécifique les BDE en initiant l'activité ATPase. La fréquence du battement ciliaire observée est significativement augmentée dans ces conditions et l'amplitude du battement est diminuée de façon similaire à ce qui est habituellement observée pour les mutants des bras de dynéine internes. L'addition de ce tag empêche donc certainement la propagation des signaux régulateurs. Ces résultats sont similaires à ceux que nous observons dans l'oreille interne de poisson zèbre où la fréquence du battement ciliaire est significativement augmentée mais où l'amplitude du battement est diminuée. Sachant que des analyses de cryo-électron tomographie réalisée sur des axonèmes des mutants *pf3* chez *Chlamydomonas* ont montré que DRC3 et DRC4 sont étroitement liés au niveau de cette projection, il est tentant de suggérer que DRC3 participe à la modulation de la fonction des bras de dynéines de manière similaire à ce qui a été décrit pour DRC4. Les similitudes phénotypiques observées lorsque la fonction de chacune de ces protéines est perturbée et l'absence de défauts ultrastructuraux renforcent cette hypothèse. Ainsi, chez les vertébrés, Lrrc48 est certainement un important régulateur de l'activité des bras de dynéine dans les cils motiles, probablement via son interaction avec Gas8/DRC4.

Les cils motiles en 9+0 possèdent des liens de néxine.

Chez la drosophile, nous montrons que le mouvement du cil, qui génère la transduction du signal auditif requiert CG13125. De façon identique aux cils du nœud embryonnaire chez la souris, les cils des neurones sensoriels sont dépourvus de paire centrale (9+0) mais ils possèdent les bras de dynéine nécessaires à la motilité (Lee et al., 2008). Aucune étude à ce jour n'a rapporté la présence des liens de néxine dans les cils motiles

organisés en 9+0. Nous montrons donc pour la première fois la présence de liens de néxine dans ce type de cils. Pourtant, sur les images de microscopie électronique des antennes de drosophile, la détection de ces structures n'est pas aisée. De manière générale, la visualisation de ces structures reste très difficile avec l'utilisation des techniques standard de microscopie électronique. En conséquence, les modifications souvent subtiles dans l'organisation de cette structure peuvent être facilement manqué. C'est notamment le cas, sur des sections de cils respiratoires issus des patients atteints de PCD et portant une mutation dans le gène *CCDC65* où aucun défaut ultrastructural n'a pu être montré (Horani et al., 2013a). De la même façon, aucune modification de la structure de l'axonème n'a pu être observée dans les cils des morphants *ccdc65*, qui ne bougent pas chez le poisson zèbre (Austin-Tse et al., 2013). Cependant chez les patients portant des mutations dans ce même gène, il existe une faible portion des axonèmes (5-15%) présentant des défauts affectant la structure des liens de néxine, couplés dans certains cas, à une désorganisation microtubulaire (Austin-Tse et al., 2013).

La détection du N-DRC/liens de néxine est donc très difficile par microscopie électronique et l'utilisation de cette technique assez lourde ne garanti pas forcément l'obtention de résultat. Dans ce contexte, l'utilisation d'anticorps ciblant les différents membres du complexe pourrait être une alternative, d'autant plus que des études récentes générée par un consortium, montre qu'un tiers des patients présentant des symptômes caractéristiques de PCD, ne possède pas de défauts dans l'ultrastructure de l'axonème (Barbato et al., 2009; Knowles et al., 2011; Zariwala et al., 2007).

Intégrité du N-DRC dans les morphants *lrrc48*.

D'après les analyses ultrastructurales réalisées chez *Chlamydomonas*, LRRC48 est un composant du domaine liant la plaque basale et le lobe distal du N-DRC. Dans ce complexe, la plaque basale, composée de DRC1 et DRC2, est le principal connecteur avec les doublets externes de microtubules, les fibres radiaires et les bras de dynéine internes. DRC4 est associée à DRC3 et facilite le recrutement des autres membres du complexe, dont DRC3 (Heuser et al., 2009; Lin et al., 2011; Rupp and Porter, 2003b). Chez le poisson zèbre, nous observons pas de défauts flagrants dans la localisation *Ccdc65* (DRC2) et *Gas8* (DRC4) dans les cils du rein des morphants *lrrc48*. Ces résultats sont cohérents avec le positionnement décrit pour ces composants, chez *Chlamydomonas*, vis à vis de *Lrrc48*. Ceci suggère que l'organisation spatiale du complexe est conservée chez les vertébrés. Ainsi, il serait judicieux

d'analyser le devenir des membres du complexe qui pourraient être affectés en l'absence de *Lrrc48*. D'après les descriptions structurales réalisées chez *Chlamydomonas*, DRC5 et DRC6 sont de bons candidats puisqu'il s'agit des composants du lobe distal (Lin et al., 2011).

Le DRC-lien de néxine et la mise en place de la latéralité.

L'altération du battement ciliaire est généralement associée à des problèmes de latéralité et chez le poisson zèbre, les morphants *gas8* et *ccdc65* possèdent des défauts d'asymétrie droite gauche (Austin-Tse et al., 2013; Colantonio et al., 2009). Les morphants *lrrc48* ne présentent pas ces défauts et des analyses réalisées par RT-PCR ont révélé la présence de transcrits d'origine maternelle, dans l'œuf, avant le début de l'expression zygotique. Il est donc possible que ce gène soit requis dans la mise en place de l'asymétrie droite gauche comme c'est le cas pour *gas8* et *ccdc65*, mais qu'on ne puisse le montrer chez le poisson zèbre à cause de cette expression maternelle. En effet le pool de protéine maternelle présent peut être suffisant pour permettre la bonne mise en place de l'asymétrie droite/gauche.

De façon très surprenante, les patients avec des mutations dans les gènes *CCDC65* et *CCDC164*, ne possèdent pas de défauts d'asymétrie droite gauche. Ces résultats sont contradictoires avec ceux obtenus chez le poisson zèbre, mais les défauts observés sont également différents. En effet, l'amplitude du battement des cils est diminuée dans les patients portant une mutation dans le gène *CCDC164* alors qu'ils sont totalement immobiles dans les morphants *ccdc164*. De même, chez les patients portant une mutation dans le gène *CCDC65*, l'amplitude du battement est diminuée ou non régulier. Ainsi il est tout à fait possible que ces défauts, qui sont moins prononcés chez l'Homme, ne soient pas suffisants pour perturber la mise en place de la latéralité.

En conclusion, nous montrons dans ce travail que la protéine LRRC48 est nécessaire à la fonction motile des cils chez les animaux. Il s'agit d'un bon candidat, pour lequel des mutations peuvent conduire à des Dyskinésies Ciliaires Primitives chez l'Homme.

2.5 - Matériel et méthodes

Constructions plasmidiques

L'ensemble des amorces utilisées sont décrites dans le tableau 1.

Pzeb6

La séquence codante de *lrrc48* est amplifiée par RT-PCR à partir des amorces F1 et R1. Le produit de PCR obtenu a été cloné entre les sites EcoRI et XbaI du vecteur pCS2+.

Lrrc48-Cherry

La séquence codante de *lrrc48* est amplifiée à partir du vecteur pzeb6 avec les amorces F2 et R2. Le produit de PCR obtenu a été cloné entre les sites EcoRI et AgeI du vecteur PCS-mb cherry en phase avec la séquence cherry.

DRC2-GFP et DRC4-GFP

Les séquences codantes des ADNc de poisson zèbre de *drc2* et *drc4* ont été obtenues par RT-PCR avec les amorces F3 et R3 et F4 et R4 respectivement. Les produits de PCR obtenus ont été clonés entre les sites SpeI et SnaBI du plasmide pCS2⁺-GFP en phase avec la GFP.

CG13125- GFP

Un fragment de 4kb comprenant le gène CG13125 et son promoteur est amplifié par PCR avec les amorces F5 et R5. Le fragment de PCR obtenu est inséré entre les sites KpnI et SacII dans le vecteur pW8-GFP en phase avec la GFP. Les lignées transgéniques y w [pW8_GFP_CG13125]M10F1/FM7, w et w ; [pW8_GFP_CG13125]F14M1/CyO ont été établies par transgénèse P.

KO par recombinaison homologue CG13125

Le gène CG13125 est éliminé par recombinaison homologue (Huang et al., 2008). Les bras gauche (5') et droit (3') de la séquence cible ont été amplifiés par PCR à partir d'ADN génomique obtenu sur les stocks y[1] w[*]/Dp(2;Y)G, P{hs-hid}Y; P{70FLP}11 P{70I-SceI}2B noc[Sco]/CyO, P{hs-hid}4 (BLM25680) à l'aide des amorces F6/R6 (bras gauche) et F7/R7 (bras droit). Les fragments obtenus ont été insérés dans le vecteur de recombinaison pRK2-attB. La construction obtenue (pJT39) permet l'élimination de l'exon 1 à l'exon 6 du gène CG13125. Toutes les régions clonées ont été vérifiées par séquençage. Une lignée

transgénique portant la construction pJT39 est créée par transgénése phic31 dans la lignée y1 M{Disc\RFP^{3xP3.PB} Avic\GFPE^{3xP3}=vas-int.Dm}^{ZH-2A} w; PBac{y+-attP-3B}VK00031. La lignée obtenue est utilisée pour la recombinaison homologue.

Stocks de mouches

Les lignées suivantes ont été générées et utilisées au laboratoire

w ; CG13125¹/CyO ,P{*GAL4-twi.G*}^{2.3}, P{*UAS-2xEGFP*}

w ; P{w+mC= GFP_CG13125}^{F14M1} /CyO ,P{*GAL4-twi.G*}^{2.3}, P{*UAS-2xEGFP*}

y w P{w+mC= GFP_CG13125}^{M10F1} /FM7w

w ; P{w+mC= GFP_CG13125}^{F14M1} -CG13125¹/CyO ,P{*GAL4-twi.G*}^{2.3}, P{*UAS-2xEGFP*}

w ;Bl/CyO ; PBac{y+-Bras homologie 5' et 3' CG13125 }VK00031^{M4M1} /TM6B

Embryons de poissons zèbres et micro injection

Les morpholinos ciblant *lrrc48* ont été dessinés pour empêcher l'épissage entre l'intron 1 et l'exon 2 (Mo1) ou pour empêcher la traduction (Mo2) et ont été obtenus de GENE TOOLS, LLC, Philomath. Les morpholinos utilisés sont les suivants : Mo1 : CCCTGACAGGCGGAGATTAGCGATA, Mo2 : CGCTCATCATGCGCCCTGTCTGGAA. Les conditions d'élevage et d'entretien, la collecte et l'injection sont identiques à celles décrites précédemment (Jerber et al., 2013). Pour les morpholinos, 2,8 ng de Mo1 et 2 ng de Mo2 ont été injectés. Pour la localisation, 15 pg d'ARN de *lrrc48-cherry*, 10 pg d'ARN de *drc2-GFP* ± 2,8 ng *lrrc48* Mo1, 30 pg d'ARN de *drc4-GFP* ± 2,8 ng *lrrc48* Mo1 ont été injectés.

Immunofluorescence

Les marquages sur les embryons de poisson zèbre, sur les cellules en culture et sur les antennes de drosophile ont été réalisés de la même façon que précédemment (Jerber 2013). Pour le marquage des testicules de drosophile, les testicules de mâles adultes ou de pupes sont disséqués en PBS 1X puis fixés en formaldéhyde 3,7%, écrasés entre lame et lamelle et congelés dans l'azote liquide. La lamelle est ensuite éliminée et les lames sont incubées 5 min en éthanol pur, rincées en PBT (PBS 1X – Triton 0,1 %) et bloquées en tampon de blocage (BSA 3% - NGS 5% - PBT). Les anticorps primaires sont dilués dans le tampon de blocage et incubés sur la nuit à 4°C. Après 3 lavages en PBS 1X, les lames sont incubées avec les

anticorps secondaires dilués en PBS 1X puis lavées en PBS 1X. Le montage est réalisé entre lame et lamelle avec du DAKO.

Anticorps utilisés

Les anticorps primaires suivants et les dilutions correspondantes ont été utilisés : Tubuline acétylée 6-11B-1 (Sigma, 1/500), Phalloïdine rhodamine (Interchim, 1/200), Dsred living colors (Clonetech, 1/500), Alpha Glu Tubuline (1D5-Synaptic systems, 1/100), GFP (Molecular Probes, 1/500), anti-Futsch 22C10 (fournit par Dr S. Benzer, 1/500), anti-ELAV (DSHB), DRAQ5 (1/1000, science signalling). Les anticorps secondaires correspondant sont de Molecular Probes/Invitrogen TM / Life Technologies.

Génération d'un anticorps ciblant la protéine de souris LRRC48

Les 300 paires de bases correspondantes aux 100 premiers acides aminés de l'ADNc de *Lrrc48* ont été amplifiés et clonés en phase avec le tag 6xHis dans le vecteur d'expression pSTABY-1 (Delphi Genetics). La production de la protéine étiquetée 6xHis a été réalisée selon les instructions du fournisseur (Delphi Genetics) et purifiée à l'aide du kit Protino Ni-TED/IDA Combi sample (Macherey-Nagel). L'immunisation des cochons d'inde avec la protéine purifiée a été réalisée par Eurogentec.

Imagerie des vésicules séminales chez la drosophile

Les vésicules séminales de mâles de drosophile âgés 3 de jours ont été utilisés. Les vésicules séminales ont été disséquées dans du PBS 1X et écrasées sur une lame de verre. Les lames ont été observées à température ambiante avec un microscope Zeiss Imager Z1 équipé d'un objectif 5X Plan-neofluar.

Phénotype d'audition

Des mouches adultes de 8 jours (n=5 pour chaque stock) ont été sélectionnées et les fréquences optimales de réception de l'arista ont été obtenues par l'enregistrement de la fréquence d'oscillation de celle-ci en absence de stimulation sonore via un laser Doppler vibrometer (Effertz et al., 2011; Nadrowski et al., 2008). Les mouches ont été exposées à des sons de pure intensité avoisinant la fréquence optimale d'oscillation de l'arista. Des intensités sonores allant de 10^{-3} to 10^2 mm/s ont été appliquées en 16 étapes et l'amplitude de déplacement de l'arista résultante a été enregistrée à l'aide d'un laser Politec Doppler vibrometer (PSV-400 scanning laser Doppler vibrometer with a DD-5000 displacement

decoder, Polytec, Waldbronn, Germany). Les réponses nerveuses correspondantes ont été enregistrées extra cellulièrement à l'aide de fils de tungsten électriquement affûtés comme potentiel d'action composé (CAP) (Effertz et al., 2011). Une équation de Hill est adaptée à chaque gamme dynamique de la réponse CAP afin de fixer le seuil d'audition pour chaque mouche, qui est fixé à 10% d'augmentation vis-à-vis de la pente de Hill (Senthilan et al., 2012). L'analyse des données statistiques a été réalisée en utilisant les logiciels Polytec-VIB (Polytec), Spike 2 (Cambridge Electronic Design, Excel 2007 (Microsoft), and SigmaPlot 10 (Systat Software).

L'histologie, les analyses par vidéo microscopie à haute vitesse, les expériences de RT-PCR en temps réel et la culture cellulaire ont été analysés de la même façon que précédemment (Jerber et al., 2013).

Table 1

Liste des amorces utilisées dans ce travail

	Amorce sens (5'→3')		Amorce anti-sens (5'→3')
F1	TCGAATTCCACGACGCATGATGTCCGGCCAGCAGGAGGAGCCCGG	R1	TAATTCGCTAGCTTAACGCTGCACAGGTAATGTC
F2	GGCCCAGAATTCATGATGAGCGGCCAG	R2	GGCCCAACCGGTGCACGCTGCACAGGTAA
F3	TAATTCACTAGTATGCCTAAAAAGCAGGGAA	R3	GAATTATACGTACTAAAGCTGTTTCTGCACAATA
F4	TAATTCACTAGTATGCCACCAAAAAGAAAATC	R4	TAATTCACTAGTATGCCACCAAAAAGAAAATC
F5	GCAGGTACCTATATCGATCACGGAGCGCGGCTAAGAACT	R5	GCACCGCGGATCCGATGGGGCTTCCTGGTGCAATTCACC
F6	GGATCACGTACGCGAGTATCGGGTCATGG	R6	GAATTAGGCGCGCCCTTTGCCGACAATATGACGG
F7	GGTACCGCATGCTCAGCTAGGTTGCCATGGGC	R7	TGTACCGCGCGCCGCCACGGGCACGTAGTAGCC

Discussion

Discussion

L'objectif premier de ma thèse était de caractériser la fonction de deux nouveaux gènes, *CCDC151* et *LRRC48*, aux fonctions inconnues et potentiellement impliqués dans la mise en place des cils. Les résultats obtenus montrent qu'il s'agit de protéines jouant un rôle prépondérant dans le fonctionnement des cils et des flagelles, de la drosophile à la souris. Plus précisément, *CCDC151* et *LRRC48* assurent un rôle essentiel dans la fonction motile des cils chez les animaux ce qui en fait d'excellents candidats aux Dyskinésies Ciliaires Primitives chez l'Homme.

De plus, ces travaux ont permis de montrer la pertinence des stratégies développées dans l'équipe afin d'identifier de nouveaux acteurs impliqués dans la formation et la fonction des cils. Néanmoins, ils ont également révélé que la fonction de ces protéines n'est pas restreinte à cette fonction motile et qu'elles sont certainement impliquées dans des processus cellulaires supplémentaires. Ainsi, j'ai choisi d'orienter ma discussion générale sur ces observations réalisées pendant mes travaux de thèse et qui suggèrent que les protéines *CCDC151* et *LRRC48* pourraient être associées à des fonctions indépendantes de la motilité des cils.

1. Le gène *CCDC151*

Nos analyses phylogénétiques sur le gène *CCDC151* nous ont permis de révéler qu'il partage des origines communes avec le gène *ODA1/DC2*, qui est nécessaire à l'ancrage des bras de dynéines externes du flagelle de *Chlamydomonas* (Takada et al., 2002). Pourtant grâce à l'utilisation de la drosophile nous avons pu montrer qu'il ne s'agit pas d'un composant structural des cils motiles mais que la protéine est associée aux cils dont la construction est dépendante du transport intraflagellaire. Ces données suggèrent que *CCDC151* est associée au transport des composants des cils qui dépendent des protéines de l'IFT. D'un autre côté, nous montrons que la protéine *CCDC151* est également requise pour l'orientation des fuseaux de division mitotiques et dans le positionnement des corps basaux, deux fonctions additionnelles à celle assurée par *Ccdc151* dans le compartiment ciliaire.

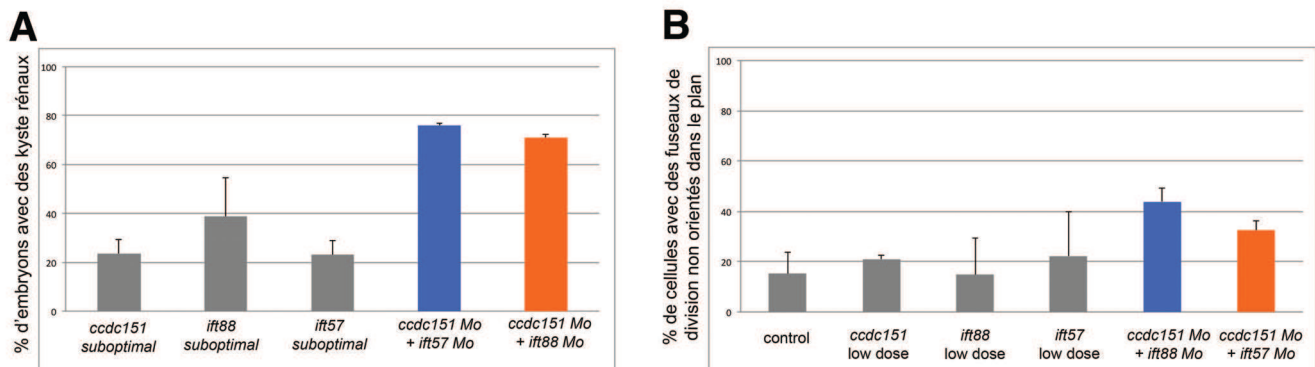


Figure 29: Interaction fonctionnelle entre les protéines Ccdc151 et Ift57 ou Ift88.

A- Graphique illustrant le pourcentage d'embryon avec des kystes rénaux après injection des morpholinos ciblant *ccdc151*, *ift57* ou *ift88* à des concentrations sous optimales ou après co-injection de deux morpholinos à dose sous optimale (3 expériences indépendantes, Contrôle : pas de kystes, *ccdc151* Mo sous optimal : n=52, *ift88* Mo sous optimal : n=58, *ift57* Mo sous optimal : n=27, *ccdc151* Mo sous optimal + *ift57* Mo sous optimal : n=35, *ccdc151* Mo sous optimal + *ift88* Mo sous optimal : n=54). **B-** Graphique illustrant le pourcentage de cellules dont l'orientation du fuseau de division n'est pas dans le plan, après injection des morpholinos ciblant *ccdc151*, *ift57* ou *ift88* à des concentrations sous optimales ou après co-injection de deux morpholinos à dose sous optimale (2 expériences indépendantes, Contrôle : n=68 cellules dans 36 embryons, *ccdc151* Mo sous optimal : n=46 cellules dans 33 embryons, *ift88* Mo sous optimal : n=51 cellules dans 18 embryons, *ift57* Mo sous optimal : n=46 cellules dans 25 embryons, *ccdc151* Mo sous optimal + *ift57* Mo sous optimal : n=57 cellules dans 29 embryons, *ccdc151* Mo sous optimal + *ift88* Mo sous optimal : n=102 cellules dans 29 embryons).

Par ailleurs, il est clairement établi que les protéines de l'IFT possèdent des fonctions cruciales dans la formation et la maintenance des cils mais elles ont également été impliquées dans des processus biologiques tels que la mitose (Delaval et al., 2011; Robert et al., 2007), le trafic vésiculaire intracellulaire (Baldari and Rosenbaum, 2010; Sedmak and Wolfrum, 2010) ou le positionnement des corps basaux (Cao et al., 2010; Guirao et al., 2010). Dans ce contexte, nous nous sommes demandé si la protéine CCDC151 pouvait interagir fonctionnellement avec les protéines de l'IFT en dehors du compartiment ciliaire.

1.1 - Interaction fonctionnelle entre les protéines de l'IFT et CCDC151

Parmi l'ensemble des protéines de l'IFT, nous avons choisi de focaliser notre analyse sur les protéines IFT88 et IFT57, deux membres du transport antérograde chargés d'acheminer les composants ciliaires jusqu'à l'extrémité distale du cil. En effet, la perte de fonction de la protéine Ift88 par injection de morpholino conduit à des défauts d'orientation du fuseau mitotique dans le rein chez le poisson zèbre (Delaval et al., 2011), de façon similaire à ce que nous montrons lorsque nous inhibons la fonction de Ccdc151. Par ailleurs une étude réalisée chez le poisson zèbre montre que la protéine Ift57 interagit fonctionnellement avec Prickle1 dans les mécanismes de convergence extension (Cao et al., 2010) ce qui en fait un bon candidat d'interaction pour Ccdc151 puisque nous montrons que Ccdc151 interagit fonctionnellement avec Prickle1 dans l'orientation des fuseaux de divisions.

Sur la base de ces similitudes, nous avons choisi de tester si les protéines IFT57 et IFT88 pouvaient interagir fonctionnellement avec CCDC151. Pour cela, nous avons injecté simultanément des doses suboptimales de morpholinos ciblant *ccdc151* et *ift57* ou *ift88* chez le poisson zèbre, puis nous avons analysé l'orientation des fuseaux de divisions dans le rein. Les résultats obtenus n'ont pas permis de révéler d'effet synergique sur le nombre de fuseau dont l'orientation n'est pas dans le plan de division, dans les doubles morphants *ccdc151/ift57* et *ccdc151/ift88*, comparé aux embryons contrôles ou aux simples morphants (**Figure 29**). Ces données suggèrent que la protéine Ccdc151 n'interagit pas fonctionnellement avec les protéines Ift57 et Ift88 dans les mécanismes qui contrôlent l'orientation des fuseaux de division cellulaire chez le poisson zèbre. Par ailleurs nous n'avons constaté aucune augmentation synergique dans le nombre de kystes présents chez les doubles morphants

comparés aux simples morphants (**Figure 29**), ce qui suggère qu'il n'y a pas non plus d'interaction dans la fonction motile des cils entre *Ccdc151* et *Ift57* ou *Ift88*.

Cependant, la méthode utilisée dans ces expériences n'est peut être pas adaptée. En effet, nous nous plaçons dans des conditions où la quantité de morpholino injectée ne permet pas de générer un phénotype visible. Nous n'altérons donc pas suffisamment la synthèse des protéines pour empêcher leur fonctionnement correct. Ces observations, sont également applicables lors des doubles injections et il est donc possible que nous soyons dans des conditions où l'inhibition protéique n'est pas suffisante pour révéler une interaction entre ces deux protéines. De plus, nous avons montré que les transcrits de *ccdc151* sont déposés maternellement, il se peut donc qu'il existe un pool de protéine *Ccdc151* suffisant pour assurer ces fonctions. Ceci est d'autant plus vrai dans le cas de la protéine *Ift88*, où il a été montré que les mutants dépourvus de protéines zygotiques *Ift88* possèdent de hauts niveaux d'ARN maternels qui peuvent restaurer la fonction des cils jusqu'à 4 dpf (Tsujikawa 2004).

Par ailleurs, d'après notre hypothèse selon laquelle *Ccdc151* est une protéine cargo des trains de l'IFT associée au transport des composants ciliaires, nous pouvons imaginer que la présence de *Ccdc151* au sein d'un tel complexe ne soit pas entièrement dépendante de la protéine *Ift88* ou *Ift57*. Ainsi la quantité de protéine *Ccdc151* restante dans ce complexe en l'absence d'une de ces deux protéines pourrait être suffisante pour assurer sa fonction. Ceci pourrait donc expliquer l'absence d'aggravation du phénotype observé dans notre cas. Afin de répondre à cette question, il semble nécessaire d'identifier le complexe protéique auquel appartient *Ccdc151*. Pour cela, nous pourrions notamment développer une technique de LAP-TAG (Localization and Tadem Affinity Purification) qui combine les avantages d'une protéine fusionnée à un marqueur fluorescent (type GFP) pour suivre la localisation et un TAG (type peptide S) pour réaliser une double purification par immunoprécipitation des complexes protéiques associés à *Ccdc151*.

De la même façon, il est tout à fait possible d'imaginer que *Ccdc151* est également un cargo des protéines de l'IFT dans la cellule, où il agirait là aussi en tant que cargo d'un complexe multiprotéique associé à diverses fonctions. Par exemple, il existe un complexe composé des protéines IFT88/57/20 conduit par la dynéine 1 et chargé d'acheminer les microtubules astraux jusqu'au pôle de division. La perte de fonction de la protéine IFT88 empêche la formation correcte des microtubules astraux et l'orientation du fuseau mitotique

est affectée (Delaval et al., 2011). Ainsi, il est tentant de spéculer que la protéine Ccdc151, puisse être membre d'un tel complexe et qu'elle agirait en tant qu'adaptateur entre les protéines de l'IFT et les protéines nécessaires à la nucléation des pôles de division, ce qui pourrait expliquer les défauts d'orientation des fuseaux de division observés en l'absence de Ccdc151. Nous pourrions donc analyser la localisation de Ccdc151 vis-à-vis des différents membres de ce complexe et réaliser des expériences de co-immunoprécipitation afin de montrer une potentielle interaction avec ces acteurs.

Finalement, il est aussi probable que la protéine Ccdc151 et les protéines Ift57 et Ift88 n'interagissent pas ensemble dans ces processus cellulaires. Dans ce cas, l'identification des partenaires biochimiques de Ccdc151 semble être la technique la plus adaptée pour préciser la fonction cellulaire de Ccdc151.

1.2 - Ccdc151 et la régulation de la taille des cils.

De façon surprenante, nous avons constaté que la perte de fonction de Ccdc151 n'affecte pas de la même façon la taille des cils en fonction des différents modèles utilisés dans cette étude. En effet, alors que la perte de fonction de Ccdc151 chez le poisson zèbre n'affecte pas la taille des cils, nous montrons que l'inhibition par ARN interférence dans les cellules IMCD3 entraîne la formation de cils plus longs. De tels résultats peuvent être surprenants mais ils ont par ailleurs été décrits dans d'autres systèmes. Par exemple, l'injection de morpholinos ciblant *nphp4* conduit à la formation de cils plus courts uniquement dans la région du cloaque du pronéphron et dans la vésicule de Kupffer chez le poisson zèbre (Burcklé et al., 2011; French et al., 2012) alors que la taille des cils est augmentée dans les mutants de ce gène chez *C.elegans* (Jauregui et al., 2008). De la même façon, les souris invalidées pour *rpgrlp1* possèdent des cils plus petits dans le nœud embryonnaire et le tube neural alors que la taille des cils n'est pas affectée dans la trachée (Besse et al., 2011; Vierkotten et al., 2007) et qu'ils sont plus longs lors de la perte de fonction par ARN interférence dans les cellules en culture RPE1 (Patzke et al., 2010). Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que les cils ne sont pas tous équivalents d'un type cellulaire à l'autre et / ou que leur dynamique d'assemblage est différente en fonction du type cellulaire et qu'ils ne dépendent pas du même groupe de gènes pour leur assemblage.

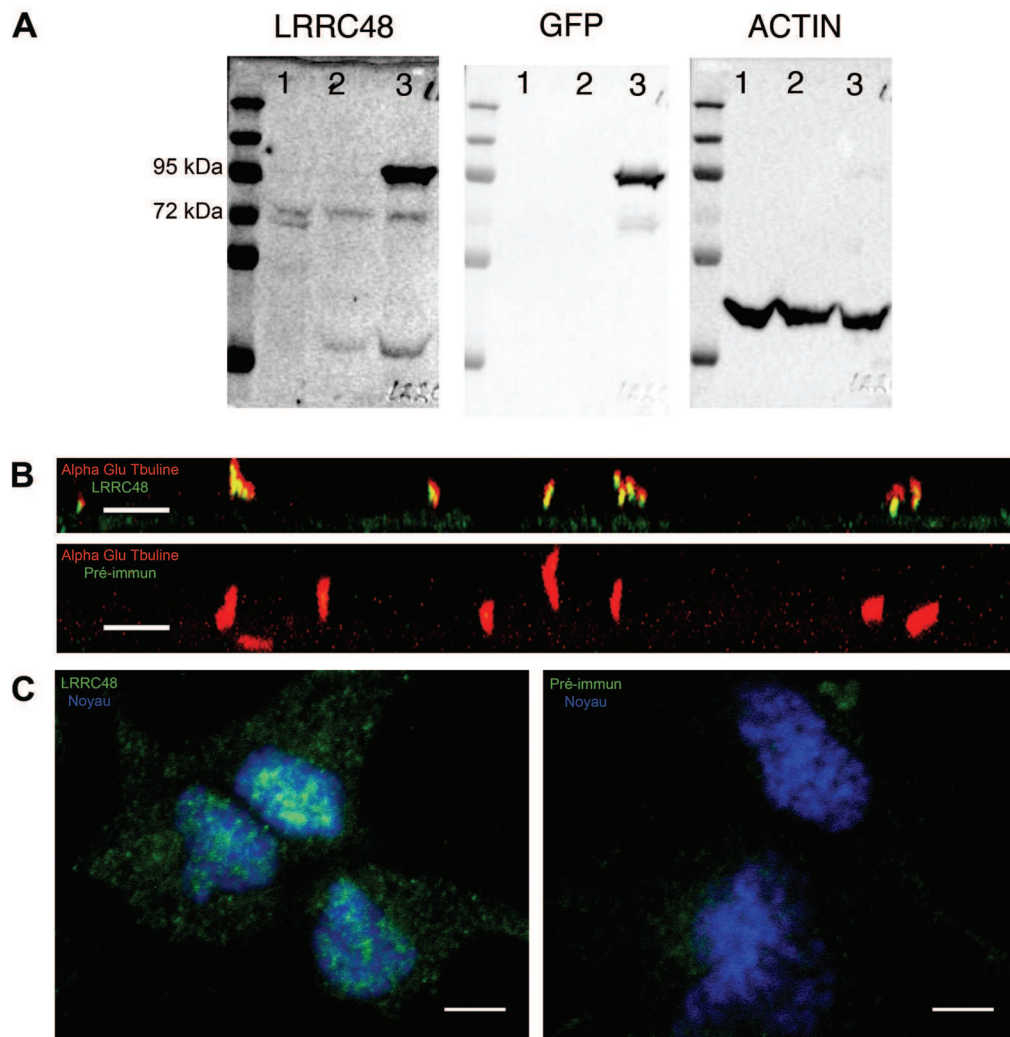


Figure 30 : Localisation de la protéine LRRC48 dans les cellules de rein de souris IMCD3.

A- L'anticorps ciblant la protéine de souris LRRC48 reconnaît la protéine LRRC48 dans les cellules IMCD3 (Ligne 1) et dans les cellules HELA (Ligne 2). Il reconnaît également la forme étiquetée avec la GFP et surexprimée dans les cellules HELA à 95 kDa (Ligne 3). Cette dernière est également détectée avec l'anticorps anti-GFP. **B-** La protéine LRRC48 est présente dans le cil primaire des cellules IMCD3 privées en sérum. Aucun marquage n'est observé en utilisant le sérum pré-immun. **C-** La protéine LRRC48 présente un marquage ponctué dans la cellule après fixation avec la para formaldéhyde. Cette localisation n'est pas observée avec le sérum pré - immun. Barre d'échelle : 5 μ m.

Dans ce contexte, nous montrons que dans les cil motiles, Ccdc151 est impliquée dans le transport des composants nécessaires à la motilité tels que les bras de dynéine ou de Ccdc114 membre du complexe des sites d'attachement des bras de dynéine, chez le poisson zèbre. Cette fonction ne peut être assurée dans le cil des cellules de mammifères IMCD3, où Ccdc151 est localisée puisqu'ils sont non motiles. Ceci suggère que la protéine Ccdc151 a acquies des fonctions supplémentaires associées à la biogenèse des cils primaires chez les mammifères. On peut notamment supposer que Ccdc151 assure une fonction analogue à celle réalisée dans les cils motiles. Plus précisément, elle pourrait également agir en tant qu'adaptateur entre les protéines de l'IFT et des composants nécessaires cette fois-ci, à la fonction du cil primaire et plus particulièrement ceux impliqués dans la régulation de la taille du cil. Là encore il ne s'agit que d'une hypothèse et la solution qui semble la plus adaptée pour répondre à cette question est probablement d'identifier le complexe protéique auquel appartient Ccdc151 dans le cil primaire.

2. Le gène *LRRC48*

Les analyses relatives au gène *LRRC48*, orthologue de FAP134 ou DRC3 chez *Chlamydomonas*, ont permis de révéler que la fonction motile assurée par DRC3 est conservée chez les animaux. Par ailleurs, nous montrons que la protéine LRRC48 est nécessaire au développement des vertébrés via son implication dans la motilité des cils, mais pas seulement, puisque des observations suggèrent que cette protéine pourrait être requise dans des processus cellulaires indépendants de la fonction motile des cils.

2.1 - Localisation dans les cellules dépourvues de cils motiles

Dans un premier temps nous avons analysé la localisation de la protéine LRRC48 dans notre modèle de cellules de rein de souris qui forment un cil primaire. Pour cela, nous avons utilisé l'anticorps que nous avons généré et nous avons pu montrer sa spécificité par western blot (**Figure 30**) et en utilisant le sérum pré-immun en guise de contrôle lors des immunofluorescences. Ces analyses nous ont permis de constater que la protéine LRRC48 est présente dans l'axonème des cils primaires des cellules IMDC3 (**Figure 30**). Dans ces mêmes cellules, ainsi que dans celles qui ne forment pas encore de cils, LRRC48 est également

associée à de multiples points dont la nature n'est pas encore identifiée. Nous sommes actuellement en train de chercher la nature de ces structures et nous avons commencé par l'analyse des protéines de la famille des rab. En effet, le marquage associé à ces protéines est généralement ponctué dans le cytoplasme (**Figure 30**). De plus, certains membres de cette famille sont localisés dans le cil (ex RAB8) ou à la base de celui (ex RAB11) et sont essentiels à la ciliogenèse (Knödler et al., 2010; Murga-Zamalloa et al., 2010; Nachury et al., 2007).

2.2 - Interaction entre LRRC48 et GAS8

Les analyses réalisées chez *Chlamydomonas* ont permis de montrer que DRC3 (LRRC48) et DRC4 (GAS8 chez la souris et GAS11 chez l'Homme) sont étroitement connectées au sein du complexe de régulation des dynéines dans les cils motiles (Lin 2011). Par ailleurs, GAS8 est pour le moment le seul membre du complexe ayant été associé à des structures indépendantes du cil motile tout comme nous l'avons observé pour LRRC48. En effet, GAS8 est associée à l'appareil de Golgi et présente un marquage ponctué en périphérie du noyau dans les cellules COS7 et dans les fibroblastes murins (Colantonio et al., 2006; Nishimura et al., 2008). De plus, GAS8 est impliquée dans les interactions membrane-microtubule à travers son association avec RAB3B dans les fibroblastes de souris. Ces résultats suggèrent que le complexe de régulation des dynéines s'est adapté dans les cellules de mammifères pour participer à des fonctions non motile. Ainsi par analogie avec le complexe N-DRC des cils et flagelles motiles, il se pourrait que LRRC48 soit associée à GAS8 au sein d'un complexe en dehors de l'axonème des cils motiles.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons d'abord analysé la localisation de LRRC48 au niveau de l'appareil de Golgi comme cela a été décrit pour GAS8. En effet, si les deux protéines interagissent ensemble, nous nous attendons à une co-localisation. Pour cela, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre la protéine Gmap 210, composant de l'appareil de Golgi, car c'est le seul marqueur du Golgi dont nous disposions au laboratoire. Les résultats que nous avons obtenus dans les cellules IMCD3 n'ont pas permis de révéler une co-localisation évidente entre ces deux protéines. Cependant, Gmap 210 est une protéine associée au cis-Golgi et il ne s'agit pas des marqueurs utilisés lors des études sur GAS8 (Colantonio et al., 2006; Nishimura et al., 2008). En effet, la co-localisation au niveau de l'appareil de Golgi

pour GAS8 a été montré en utilisant des anticorps ciblant les protéines GM130 ou Golgin-97, une protéine associée cette fois-ci au trans-Golgi. Nous ne pouvons donc pas exclure que LRRC48 soit en partie associée au Golgi tout comme GAS8. Ainsi, pour la suite de cette analyse, nous utiliserons ces mêmes marqueurs, mais l'absence de co-localisation au niveau de l'appareil de Golgi ne signifie pas pour autant que ces deux protéines n'interagissent pas ensemble. C'est pourquoi l'approche la plus adaptée et que nous sommes en train de mettre en place, consiste à analyser la localisation de LRRC48 vis-à-vis de GAS8, en utilisant un anticorps ciblant la protéine GAS8. En parallèle, nous sommes également en train de réaliser des expériences de co-immunoprécipitation entre ces deux protéines dans les cellules COS7. L'ensemble de ces expériences nous permettra de savoir si GAS8 et LRRC48 interagissent ensemble en dehors de l'axonème des cils motiles.

2.3 - Un rôle dans le cycle cellulaire

Afin de caractériser plus en détail la fonction de LRRC48 nous avons réalisé des expériences de perte de fonction par ARN interférence dans les cellules de rein de souris (IMCD3). De façon plutôt inattendue, nous avons constaté que la perte de fonction de LRRC48 dans ces cellules bloque la division cellulaire et les cellules qui forment encore des cils ne possèdent aucun défaut de ciliogenèse puisque la taille et la forme de ceux-ci ne sont pas affectées. Etant donné ces résultats, nous avons cherché à savoir quelles sont les protéines impliquées dans la ciliogenèse et dont la perte de fonction produit des résultats identiques. Ces recherches nous ont conduit à la protéine BBS4, dont la perte de fonction par ARN interférence bloque la division cellulaire dans les cellules HELA et COS7 (Kim et al., 2004). BBS4 est une protéine du BBSome et est un acteur clé dans la régulation du transport des protéines associées à la fonction ciliaire (Wei et al., 2012). Outre sa localisation ciliaire, BBS4 est également un composant des satellites centriolaires où elle participe avec PCM1 au recrutement des composants vers le centrosome ainsi qu'à l'organisation des microtubules (Kim et al., 2004). Plus précisément, BBS4 interagit directement avec la sous-unité p150^{glued} de la dynactine, elle-même partenaire de PCM1 et indispensable au transport de celle-ci le long des microtubules (Balczon et al., 1994; Dammermann and Merdes, 2002).

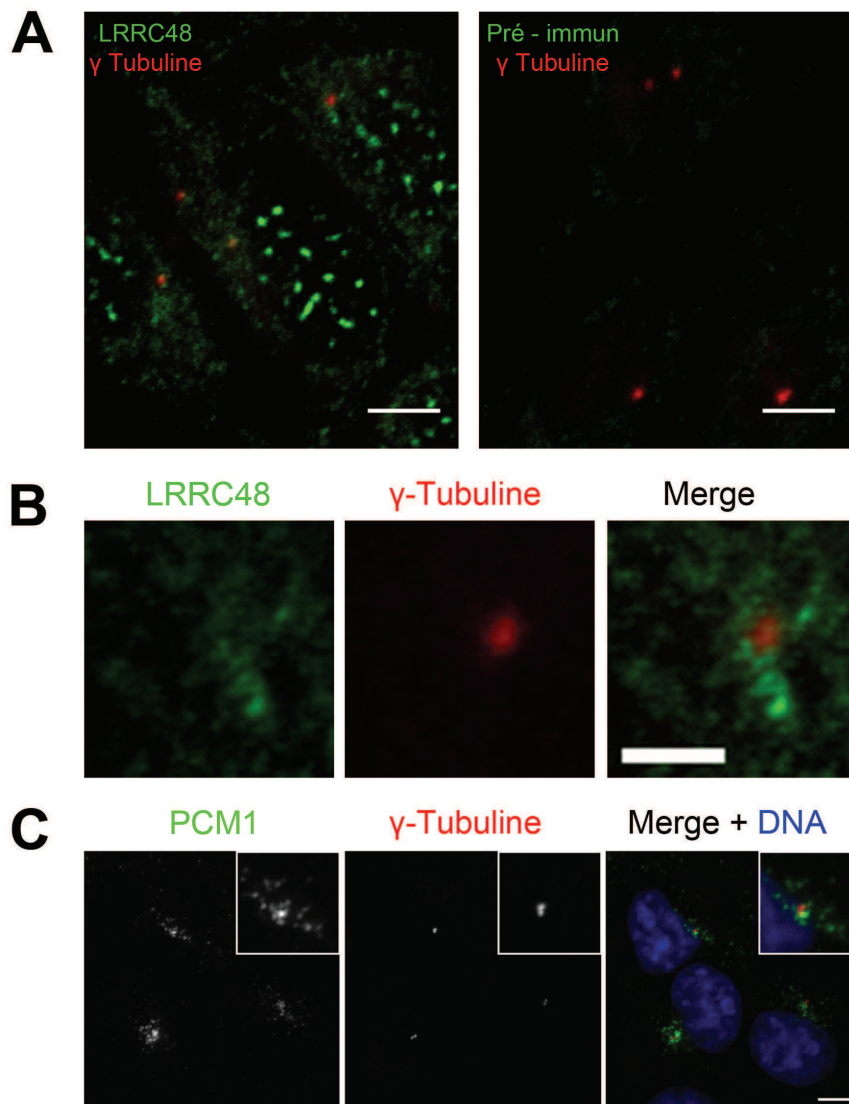


Figure 31 : Localisation de la protéine LRRC48 au niveau du centrosome dans les cellules IMCD3.

A- La protéine LRRC48 présente un marquage ponctué dans la cellule, dont certains sont très proche du centrosome après fixation au méthanol. Ce marquage est absent en utilisant le pré-immun. **B-** La protéine LRRC48 est localisée à étroite proximité du centrosome mais elle ne co-localise pas avec le marquage de la Gamma-Tubuline. **C-** Exemple de protéine étroitement associée à la Gamma-Tubuline avec la protéine PCM1, composant des satellites centriolaires. Adapté de Stowke et al., 2012. Barre d'échelle : (A) 5 μ m, (B) 2 μ m.

Dans ce contexte, nous avons décidé d'analyser la localisation de LRRC48 au niveau du centriole et du corps basal. Les résultats obtenus montrent qu'il n'existe aucune co-localisation avec les centrioles pendant le cycle cellulaire. De la même manière, à confluence, lorsque les cellules forment un cil, aucune co-localisation avec le corps basal n'a été observée. Toutefois, nous avons observé un marquage pointillé à proximité immédiate, des points formés par le marquage ciblant la Gamma-Tubuline dans les cellules en interphase (**Figure 31**) et qui pourrait correspondre aux satellites centriolaires. En effet, ce marquage nous rappelle celui observée lorsque l'on cible les protéines associées aux satellites centriolaires telles que PCM1 ou cep72 (Kim et al., 2004; Stowe et al., 2012). Ainsi, pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes associés à LRRC48, en dehors du cil motile, il semble particulièrement intéressant de préciser la localisation de LRRC48 au niveau du centrosome afin de voir si cette protéine peut être associée aux satellites centriolaires dans la cellule. Ces expériences vont être mises en œuvre dans un futur proche. De plus, au vu des similitudes observées entre BBS4 et LRRC48, il est tout à fait possible que la protéine LRRC48 soit impliquée dans le transport microtubulaire dépendant des dynéines dans la cellule, soit en tant que cargo d'un complexe multiprotéique ou bien en tant que régulateur de l'activité des dynéines cytoplasmiques de façon plus ou moins analogue à son rôle dans l'axonème des cils motiles. Dans ce contexte, l'absence de LRRC48, affecterait le transport et/ou le recrutement adéquat des protéines nécessaires à la fonction du centrosome et affecterait la fonction de celui-ci, ce qui pourrait expliquer les défauts de division cellulaire observés. Néanmoins, les acteurs impliqués dans les mécanismes associés à la division cellulaire sont très variés (kinases, cyclines) et il est tout à fait possible que LRRC48 soit associée à des partenaires n'ayant aucun lien avec la fonction du centriole ou du cil dans ce mécanisme.

L'ensemble de ces données, suggèrent fortement que la protéine LRRC48 possède des fonctions supplémentaires dans les cellules qui ne forment pas de cil motile et qu'elle pourrait participer aux mécanismes dépendants des interactions microtubules/dynéines en dehors de l'axonème des cils motiles et peut être en association avec la protéine GAS8.

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans leur globalité, ces travaux ont permis de préciser les mécanismes associés au fonctionnement des cils motiles chez les animaux et ils auront sans aucun doute des retombées en santé humaine pour la compréhension et le diagnostic des infertilités et des ciliopathies chez l'Homme. Ils ont également mis en avant la complexité et la diversité des mécanismes moléculaires associées aux fonctions des protéines impliquées dans le rôle des cils et des corps basaux.

Dans ce contexte, l'identification des partenaires d'interactions de ces protéines apparaît comme une étape essentielle afin d'améliorer nos connaissances encore partielles de leurs fonctions ainsi que l'étiologie des ciliopathies. Par exemple, dans le cas de CCDC151, le point de départ pourrait être des expériences de co-immunoprécipitation avec les protéines de l'IFT, bien que l'utilisation de méthodes plus globales telles que la spectrométrie de masse permettrait certainement de préciser d'avantage ses fonctions cellulaires.

Il serait notamment particulièrement intéressant d'identifier les partenaires de CCDC151 au même titre que ceux de LRRC48 dans les cellules qui forment un cil primaire afin de comprendre leur rôle précis dans les processus cellulaires indépendants de la fonction motile des cils. En effet, les cils ne sont pas tous équivalents d'un type cellulaire à l'autre. De même leur dynamique d'assemblage est différente en fonction du type cellulaire et ils ne dépendent pas du même groupe de gènes pour leur assemblage. Ainsi, il est tout à fait possible que les partenaires de CCDC151 soient différents d'un type cellulaire à l'autre. C'est pourquoi, lors de l'identification des partenaires d'une protéine ciliaire, il est indispensable de considérer le type cellulaire analysé et de replacer les résultats obtenus dans un contexte plus global associé au développement animal, puisque l'hétérogénéité des ciliopathies révèle que tous les types cellulaires ne sont pas touchés de la même façon et donc que le rôle de chaque composant associé à la fonction des cils n'est pas identique. De plus, il est tout à fait possible que l'altération de nombreux processus cellulaires comme la coordination des moteurs du transport intraflagellaire, de la biogenèse de la membrane ciliaire ou de la migration centriolaire à la membrane apicale convergent sur des défauts de ciliogenèse et qu'*in fine* le rôle des protéines ciliaires ne soit définitivement pas restreint à leur rôle dans la ciliogenèse.

Enfin, il est également probable qu'un groupe de protéines associé à une ciliopathie agisse en collaboration dans une voie cellulaire commune, probablement en formant un complexe multi-protéique et que toute mutation dans une sous-unité du complexe altère la fonction entière du complexe.

De ce fait, la caractérisation des partenaires d'une protéine impliquée dans la fonction du corps basal et/ou du cil n'a d'intérêt que si l'on considère l'ensemble du tissu concerné et non l'organelle et sa cellule de façon isolée. Chaque type de cil possède une structure et des attributs qui lui sont propres, ce qui le rend adapté pour une fonction spécifique au sein de l'organisme et c'est le déséquilibre généré par l'altération du fonctionnement d'un tissu donné qui altère la dynamique de fonctionnement globale d'un organisme et conduit à la maladie.

Annexe

Contrôle transcriptionnel de la ciliogenèse au cours du développement animal*

Julie Jerber, Joëlle Thomas et Bénédicte Durand

Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 5534, Université Lyon 1, Villeurbanne, 69622 Lyon, France

Auteur correspondant : Bénédicte Durand, durand-b@univ-lyon1.fr

Reçu le 18 juillet 2012

Résumé – Les cils et les flagelles sont des organelles cellulaires de structure très conservée et aux fonctions essentielles dans de nombreuses espèces, des protozoaires à l'Homme. Chez les animaux, différents types de cils coexistent et leur assemblage est dynamique au cours du développement. Chez l'Homme, toute perturbation de l'assemblage ou de la fonction des cils est responsable de nombreux syndromes désormais connus sous le terme de ciliopathies. Comprendre comment est régulé l'assemblage dynamique des cils au cours du développement et dans les différents tissus représente une question importante en biologie. Il apparaît que deux familles de facteurs de transcription, FOXJ1 (*Forkhead Box J1*) et RFX (*Regulatory Factor X*) sont d'importants acteurs du contrôle de l'expression des gènes ciliaires. FOXJ1 est essentiel à l'assemblage des cils motiles chez les vertébrés en régulant les gènes impliqués dans la motilité ciliaire ou dans le transport apical du corps basal, alors que les protéines RFX sont nécessaires à l'assemblage des cils primaires et motiles et régulent notamment les protéines du transport intraflagellaire. Récemment, de nouveaux acteurs jouant des rôles plus spécifiques dans la biogenèse des cils ont été décrits. Tous ces acteurs sont sujets à une régulation complexe permettant d'assurer le contrôle spécifique et dynamique de la ciliogenèse chez les métazoaires.

Mots clés : Corps basal / cils / FOXJ1 / RFX / facteurs de transcription

Abstract – Transcriptional control of ciliogenesis in animal development.

Cilia and flagella are eukaryotic organelles with a conserved structure and function from unicellular organisms to human. In animals, different types of cilia can be found and cilia assembly during development is a highly dynamic process. Ciliary defects in human lead to a wide spectrum of diseases called ciliopathies. Understanding the molecular mechanisms that govern dynamic cilia assembly during development and in different tissues in metazoans is an important biological challenge. The FOXJ1 (Forkhead Box J1) and RFX (Regulatory Factor X) family of transcription factors have been shown to be important factors in ciliogenesis control. FOXJ1 proteins are required for motile ciliogenesis in vertebrates. By contrast, RFX proteins are essential to assemble both primary and motile cilia through the regulation of specific sets of genes such as those encoding intraflagellar transport components. Recently, new actors with more specific roles in cilia biogenesis and physiology have also been discovered. All these factors are subject to complex regulation, allowing for the dynamic and specific regulation of ciliogenesis in metazoans.

Key words: Basal body / ciliogenesis / cilium / FOXJ1 / RFX / transcription factors

* Pour les autres articles sur le cil, voir Biol. Auj. 2011, 205, 1.

Introduction

Les cils et les flagelles sont des structures conservées au cours de l'évolution, et que l'on retrouve des protozoaires aux mammifères. Ils émergent dans le milieu extracellulaire et possèdent de nombreuses fonctions. Ainsi, chez les protozoaires, les flagelles jouent un rôle fondamental dans la motilité cellulaire mais sont également nécessaires aux comportements sensoriels et de reproduction. Chez les animaux, les cils ont un rôle sensoriel majeur puisque la plupart de nos sens, à l'exception du goût, dépendent de cellules sensorielles ciliées. Par ailleurs, la plupart des cellules développent un cil non motile, dit primaire, dont l'importance chez les vertébrés a été révélée au cours de ces dix dernières années. Ainsi le cil primaire constitue le principal organe de réception et de transduction des signaux de communication cellulaires comme ceux de la voie Sonic Hedgehog (SHH) (pour revues, voir Eggenschwiler & Anderson, 2007; Wong & Reiter, 2008). Chez l'Homme, l'absence de cils ou un dérèglement de leurs fonctions sont à l'origine de nombreuses maladies humaines définies sous le terme de ciliopathies (Baker & Beales, 2009; Cardenas-Rodriguez & Badano, 2009).

Les cils sont composés d'un squelette de microtubules appelé axonème, nucléé à partir du corps basal qui correspond à un centriole modifié. On distingue deux types de cils en fonction de leur architecture microtubulaire : les axonèmes en 9+2 présentent 9 doublets de microtubules périphériques associés à une paire centrale. La plupart sont motiles et cette catégorie regroupe tous les types de flagelles; les axonèmes en 9+0, généralement appelés cils primaires, ne possèdent pas la paire centrale de microtubules et sont en majorité non motiles.

Les cils et les flagelles forment un compartiment cellulaire séparé du compartiment cytoplasmique par une structure complexe à la jonction du corps basal et de la membrane plasmique que l'on appelle la zone de transition (Czarnecki & Shah, 2012). Cette zone de transition crée une barrière de diffusion entre le compartiment ciliaire et le cytoplasme. Les composants ciliaires doivent donc être acheminés depuis le cytoplasme à travers cette zone de transition jusqu'à l'extrémité distale du cil. L'assemblage des cils et des flagelles repose ainsi, dans la grande majorité des espèces, sur un transport intraflagellaire spécialisé nommé IFT (*IntraFlagellar Transport*) qui permet d'acheminer des complexes protéiques le long des microtubules axonémaux du cytosol vers l'extrémité distale du cil et inversement (Ishikawa & Marshall, 2011).

Les cils et les flagelles sont des structures dynamiques qui peuvent croître et se résorber dans différentes conditions physiologiques, au cours du cycle cellulaire et tout au long du développement.

Par exemple, chez l'algue verte *Chlamydomonas*, les flagelles se résorbent après l'accouplement et avant la division pour se reformer ensuite. Il en est de même chez les vertébrés où les cils disparaissent en mitose et s'assemblent de nouveau pendant les phases G₀/G₁. La croissance ciliaire est également très dynamique dans de nombreux tissus, notamment au niveau des cellules multiciliées des ventricules cérébraux et des épithéliums des voies respiratoires aériennes (Sorokin, 1968; Spassky *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2010). En effet, dans un premier temps, les cellules épithéliales de ces tissus forment un cil primaire avant d'amorcer la croissance de cils multiples grâce à des programmes développementaux précis. Les flagelles des spermatozoïdes sont eux aussi assemblés à un moment précis de leur développement. Quant aux cils primaires, ils sont très différents entre les cellules d'un même organisme bien qu'ils présentent une ultrastructure similaire. L'ensemble de ces observations suggère que les organismes ont dû développer des mécanismes de régulation complexe de la ciliogenèse au cours du développement.

Si historiquement plusieurs arguments expérimentaux suggèrent que l'assemblage des cils requiert la mise en route de gènes spécifiques, la découverte des différents acteurs impliqués dans cette régulation n'a été faite qu'au cours de la dernière décennie. En particulier, des études génétiques indépendantes, menées dans différents organismes, ont mis en évidence plusieurs des acteurs clés contrôlant la transcription des gènes ciliaires. Deux grandes familles de facteurs de transcription émergent de ces études : la famille FOXJ1 (*Forkhead Box J1*) et la famille RFX (*Regulatory Factor X*).

Les facteurs de transcription de type FOXJ1 et le programme de ciliogenèse motile.

FOXJ1 appartient à la famille des facteurs de transcription *forkhead/winged-helix*. Des orthologues de FOXJ1 ont été identifiés chez les vertébrés ainsi que chez de nombreux invertébrés. Aucun orthologue de FOXJ1 n'a été identifié chez les ecdysozoaires tels que *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster* (Mazet *et al.*, 2003).

De nombreux arguments suggèrent que FOXJ1 est nécessaire à la biogenèse des cils motiles. En effet chez les mammifères, *Foxj1* est exprimé dans de nombreux tissus possédant des cils motiles (Hackett *et al.*, 1995; Lim *et al.*, 1997; Blatt *et al.*, 1999; Brody *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2008; Jain *et al.*, 2010). Ainsi, l'expression de *Foxj1* dans les poumons est clairement corrélée à la croissance des cils motiles (Blatt *et al.*, 1999) mais pas à celle des cils primaires (Jain *et al.*, 2010). Les souris invalidées pour *Foxj1* présentent

des défauts d'asymétrie droite gauche et de l'hydrocéphalie, deux phénotypes connus comme résultant de défauts des cils motiles. Les souris *Foxj1*^{-/-} sont totalement dépourvues de cils motiles dans les épithéliums multiciliés et les corps basaux, bien que présents en nombre important, n'arrivent pas à s'ancrer au niveau de la membrane apicale des cellules, ce qui explique l'absence de cils (Chen *et al.*, 1998; Brody *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2003). En revanche, aucun défaut ultrastructural des cils du nœud embryonnaire n'a été identifié chez ces souris, suggérant que seule leur motilité est affectée puisque des défauts d'asymétrie droite gauche sont observés dans les mutants *Foxj1*^{-/-} (Brody *et al.*, 2000). De même, aucun défaut ultrastructural n'a été observé dans les cils primaires olfactifs de ces souris (Brody *et al.*, 2000). FOXJ1 apparaît donc comme un facteur de transcription spécifique de la biogenèse des cils motiles.

Des données récentes confirment cette conclusion et démontrent que FOXJ1 est un régulateur majeur du programme de ciliogenèse motile chez le poisson zèbre et le xénope. D'une part, la réduction de l'expression de *foxj1a* ou *b* chez le poisson conduisent à des défauts de ciliogenèse motile dans les territoires où ils s'expriment respectivement (Yu *et al.*, 2008, 2011). D'autre part, l'expression ectopique de *foxj1* dans plusieurs tissus chez le poisson zèbre et dans l'épiderme du xénope est suffisante pour induire la croissance des cils motiles (Stubbs *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008).

Cependant, plusieurs arguments suggèrent que des facteurs additionnels à FOXJ1 sont nécessaires pour compléter le programme de biogenèse des cils motiles. Par exemple, la surexpression de *Foxj1* n'est pas suffisante pour induire la croissance des cils motiles dans des cultures de cellules murines (You *et al.*, 2004) bien qu'elle conduise à une expression ectopique de la tubuline β -IV dans des cellules de bronchioles pendant le développement des poumons (Tichelaar *et al.*, 1999). L'expression de niveaux élevés de *foxj1* dans des embryons de xénope n'est pas suffisante pour induire la formation ectopique de cils dans toutes les cellules (Stubbs *et al.*, 2008). Parmi les facteurs additionnels, il a été suggéré que le niveau de CP110, une protéine centriolaire qui bloque le programme de ciliogenèse, soit important pour permettre à FOXJ1 d'induire la biogenèse des cils motiles (Stubbs *et al.*, 2008). D'autres candidats incluant la famille des facteurs de transcription RFX ont été proposés. En effet, RFX3 est nécessaire à la biogenèse des cils motiles de cellules épendymaires *in vitro* (El Zein *et al.*, 2009). De plus RFX3 et FOXJ1 possèdent des cibles directes communes, suggérant que ces deux types de facteurs de transcription coopèrent pour gouverner un programme de ciliogenèse motile spécifique (Stubbs *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008; El Zein *et al.*, 2009).

De nombreux gènes cibles des protéines FOXJ1 ont été décrits. Chez la souris, *Dnahc11* (*dynein axonemal heavy chain 11*) qui code une dynéine axonémale essentielle à la motilité ciliaire, est le premier gène pour lequel une diminution de l'expression a été décrite dans des poumons déficients pour *Foxj1* (Chen *et al.*, 1998). L'expression du gène de la calpastatine est également diminuée dans ces poumons (Gomperts *et al.*, 2004) mais il reste à démontrer que ces deux protéines sont des cibles directes de FOXJ1. Récemment, de nombreux autres gènes cibles de FOXJ1 ont été identifiés chez le xénope, le poisson zèbre et la souris (Stubbs *et al.*, 2008; Jacquet *et al.*, 2009) parmi lesquels beaucoup sont impliqués dans la motilité ciliaire. À l'heure actuelle, l'expression d'environ 100 gènes est augmentée plus de 10 fois lorsque *foxj1* est surexprimé dans l'épiderme du xénope et un tiers d'entre eux sont présents dans les banques de données des protéines ciliaires (Gherman *et al.*, 2006; Inglis *et al.*, 2006; Arnaiz *et al.*, 2009). Beaucoup d'entre eux codent des protéines exclusivement retrouvées dans les structures axonémales motiles telles que les sous-unités des dynéines axonémales [DNAH9 (*dynein axonemal heavy chain 9*), DNAH8 et DNAIC1 (*dynein axonemal intermediate chain 1*)], WDR16 (*WD repeat domain 16*) (Hirschner *et al.*, 2007), un composant de la paire centrale [SPAG6 (*sperm-associated antigen 6*)] et de nombreuses protéines appartenant aux ponts radiaires [RSHL2 (*radial spoke-head-like 2*), RSHL3 et RSPH1 (*radial spoke head 1*)]. Chez le poisson zèbre, cinq gènes, tous impliqués dans la ciliogenèse, sont décrits comme régulés par *foxj1a* (un des deux orthologues de *Foxj1*) : *dnah9*, *centrin2*, *tektin1*, *wdr78* et *efhc1* [*EF-hand-domain-(C-terminal)-containing1*]. De plus des expériences de ChIP (*chromatin immunoprecipitation*) chez le poisson zèbre montrent que *Foxj1a* se lie au promoteur des gènes *dnah9* et *wdr78 in vivo*, indiquant que ces gènes sont des cibles directes de FOXJ1 (Yu *et al.*, 2008). L'analyse de puces réalisées sur des ARNs extraits de la zone ventriculaire de cerveau de souris montre que l'expression d'environ 200 gènes est diminuée 1,5 fois dans les échantillons *Foxj1*^{-/-} (Jacquet *et al.*, 2009). Parmi ceux-ci, 55 sont connus pour avoir une fonction dans la zone ventriculaire du cerveau et presque la moitié d'entre eux code des protéines ciliaires ou des moteurs moléculaires associés au cytosquelette. De manière intéressante, 16 des cibles identifiées dans les cellules épendymaires de cerveau de souris *Foxj1*^{-/-} sont également des cibles de *Foxj1* chez le xénope telles que *dnah9*, *spag6*, *efhc1* et *dnahc1*. Seules trois d'entre elles n'ont pour le moment pas été associées à la ciliogenèse.

L'ensemble de ces observations démontre que les protéines FOXJ1 sont des actrices importantes de la régulation des gènes nécessaires à la fonction motile

des cils chez les vertébrés. Il est intéressant de noter qu'à l'heure actuelle aucun gène codant des protéines impliquées dans le transport intraflagellaire n'a été identifié comme cible de FOXJ1.

Comme mentionné précédemment, il n'existe aucun orthologue de FOXJ1 chez *C. elegans* ou chez la drosophile. Or *C. elegans* est dépourvu de cils motiles, ce qui confirme l'idée d'une implication de FOXJ1 dans la biogenèse des cils motiles. Cependant, chez la drosophile, les flagelles des spermatozoïdes sont motiles et les cils des organes chordotonaux possèdent des bras de dynéines externes, qui sont des caractéristiques des cils motiles (Lee *et al.*, 2008). De plus, plusieurs analyses fonctionnelles suggèrent que les cils des organes chordotonaux sont motiles, malgré l'absence de paire centrale (Gopfert & Robert, 2003; Gopfert *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008). Ainsi la motilité ciliaire chez la drosophile n'est pas dépendante de FOXJ1 et d'autres facteurs doivent intervenir pour réguler la biogenèse des cils motiles dans cet organisme. Les protéines RFX font partie des candidats possibles pour assurer cette fonction (voir ci-dessous). D'autres protéines de la famille *forkhead* peuvent également avoir évolué pour jouer un tel rôle chez la drosophile. Par exemple, il a été démontré que le facteur de transcription Fd3F, qui est un autre membre de la famille des facteurs de transcription de type *forkhead*, est exprimé uniquement dans les neurones chordotonaux. Il est sous le contrôle du facteur proneuronal Atonal et est nécessaire à la spécialisation fonctionnelle des cils de ces neurones (Cachero *et al.*, 2011; Newton *et al.*, 2012).

Compte tenu du rôle de FOXJ1 dans le programme de transcription qui conduit à la biogenèse des cils motiles, plusieurs observations intrigantes découlent de l'étude de ce gène. Ainsi, *Foxj1* est exprimé dans le plancher du tube neural chez la souris. Ces cellules possèdent un monocil, plus long que celui des cellules neurales adjacentes au plancher, mais qui n'a pas encore été démontré comme motile (Cruz *et al.*, 2010). Si FOXJ1 ne semble pas requis pour la croissance des cils du plancher du tube neural, il est cependant nécessaire pour moduler la réponse de ces cellules à SHH, ce qui suggère, malgré tout, de possibles défauts de la fonction des cils du plancher en absence de FOXJ1. De plus, l'expression ectopique de FOXJ1 dans la partie latérale du tube neural est suffisante pour induire la croissance de cils longs qui ressemblent aux cils du plancher du tube neural. Ces observations suggèrent que les cils du plancher du tube neural pourraient s'apparenter aux cils du nœud embryonnaire.

D'autre part, la fonction de FOXJ1 ne semble pas restreinte à la ciliogenèse car, chez la souris, FOXJ1 semble également jouer un rôle dans les cellules dépourvues de cils (lymphocytes circulants) ou de cils

motiles (astrocytes) (Lin *et al.*, 2004, 2005; Jacquet *et al.*, 2009). Ces observations soulèvent donc la question des mécanismes qui gouvernent la spécificité des gènes cibles de FOXJ1 dans ces différents systèmes. L'action combinée de plusieurs facteurs de transcription pourrait expliquer la spécificité d'action de FOXJ1 comme cela a été suggéré pour FOXJ1 et PITX2 dans la morphogénèse orofaciale de la souris (Venugopalan *et al.*, 2008).

La famille des facteurs de transcription RFX

La deuxième classe de facteurs de transcription identifiés comme acteurs clés de la ciliogenèse au sein de nombreuses espèces comprend la famille des protéines RFX. Elles ont d'abord été découvertes grâce à leur capacité à lier un motif appelé boîte-X, présent dans le promoteur des gènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II (Reith *et al.*, 1990). Ces protéines possèdent un domaine de liaison à l'ADN très conservé appartenant à la famille des facteurs de transcription *winged-helix* (Gajiwala *et al.*, 2000). Sept membres de la famille ont été identifiés chez les mammifères et un seul chez la levure et *C. elegans* (Emery *et al.*, 1996a; Aftab *et al.*, 2008) (figure 1A). Deux sous-groupes peuvent être distingués sur la base de leurs caractéristiques structurales : le premier groupe inclut la protéine SAK1 chez la levure, DAF-19 (*abnormal dauer formation 19*) chez *C. elegans*, RFX chez la drosophile et RFX1-4 et RFX6 chez les vertébrés. Le second groupe est composé du deuxième gène *Rfx* de drosophile (CG9727) ainsi que de RFX5 et RFX7 chez les vertébrés. Tous les membres du premier groupe possèdent un domaine de dimérisation permettant l'homodimérisation et/ou l'hétérodimérisation, ce qui n'est pas le cas pour les membres du second groupe (figure 1B). Ces derniers diffèrent également par leur spécificité de liaison à l'ADN. En effet, RFX5 assure uniquement la régulation des gènes du CMH de classe II chez l'Homme et la souris (Steimle *et al.*, 1995; Clausen *et al.*, 1998) et sa liaison dans les promoteurs de ces gènes nécessite des facteurs additionnels. De plus, la boîte-X reconnue par RFX5 est différente de celle reconnue par RFX1-3 (Steimle *et al.*, 1995; Emery *et al.*, 1996a, 1996b; Durand *et al.*, 1997; Masternak *et al.*, 1998).

L'implication dans la ciliogenèse du premier sous-groupe de protéines RFX a été mise en évidence chez *C. elegans* (Swoboda *et al.*, 2000). *daf-19*, le seul gène *Rfx* du nématode, est nécessaire à l'assemblage des cils sensoriels et les premières cibles directes de *daf-19*, toutes impliquées dans la ciliogenèse, ont pu être identifiées. Ce travail a ouvert la voie à de nombreuses études, basées sur la recherche d'une boîte-X dans le promoteur des gènes. Elles ont

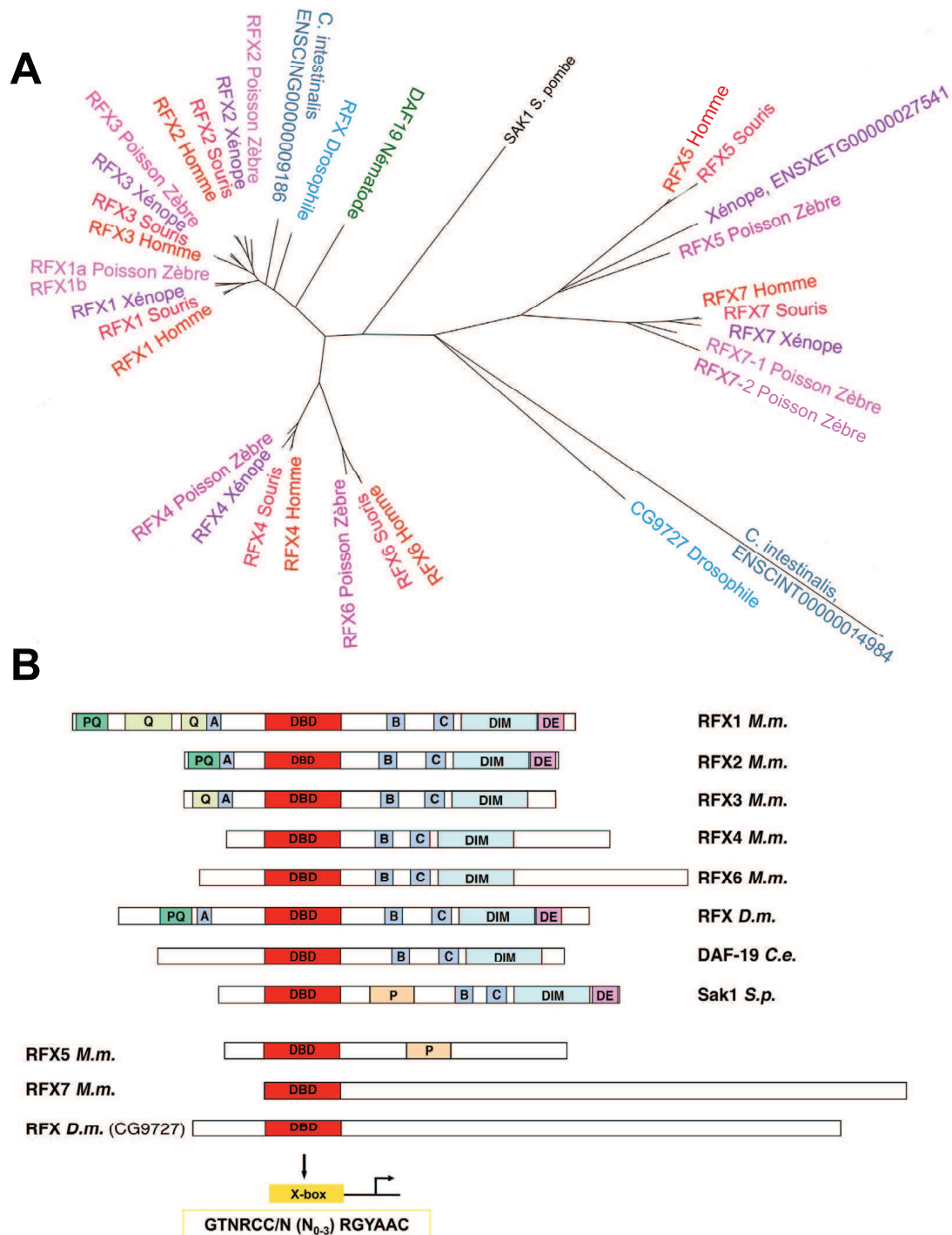


Fig. 1. Phylogénie et structure des facteurs de transcription RFX. (A) Arbre phylogénétique de la famille des facteurs de transcription RFX. Deux sous-groupes peuvent être distingués. Le premier regroupe l'unique gène *Rfx*, chez *C. elegans* et chez la levure, un gène *Rfx* chez la drosophile et 5 gènes *Rfx* (*Rfx1-Rfx4*, *Rfx6*) chez les vertébrés. Le second est composé du deuxième gène chez la drosophile (*CG9227*) et de deux gènes chez les mammifères. (B) Structure des différentes protéines RFX depuis la levure jusqu'aux mammifères. Le motif X-BOX a été caractérisé chez les mammifères pour RFX1 (Emery *et al.*, 1996b). A, B et C sont des domaines conservés aux fonctions inconnues; DBD, domaine de liaison à l'ADN (*DNA-binding domain*); DE, domaine riche en résidus acides aminés; DIM, domaine de dimérisation; P, région riche en proline; Q, région riche en glutamine.

conduit à l'identification de nouveaux gènes ciliaires dans plusieurs espèces (Haycraft *et al.*, 2001, 2003; Schafer *et al.*, 2003; Avidor-Reiss *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Blacque *et al.*, 2005; Winkelbauer *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Laurençon *et al.*, 2007). De plus, la comparaison du transcriptome entre nématodes déficients pour *daf19* et nématodes témoins a permis la génération d'une liste de protéines potentiellement ciliaires (Blacque *et al.*, 2005; Efimenko *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006).

Plusieurs membres du premier sous-groupe possèdent également une fonction conservée pour la ciliogenèse chez d'autres métazoaires. Chez la drosophile par exemple, *Rfx* est indispensable à la formation du cil des neurones sensoriels (Dubruille *et al.*, 2002). Chez la souris, *Rfx3* est nécessaire à la croissance des cils primaires dans le nœud embryonnaire et dans le pancréas endocrine (Bonnafe *et al.*, 2004; Ait-Lounis *et al.*, 2007) ainsi qu'au déroulement correct du programme de ciliogenèse motile (El Zein *et al.*, 2009). Toujours chez la souris, *Rfx4* est exprimé dynamiquement pendant le développement du cerveau et gouverne la croissance du cil primaire dans les territoires du cerveau où il est présent (Ashique *et al.*, 2009). Chez le poisson zèbre, *rfx2* est impliqué dans le programme de ciliogenèse motile (Liu *et al.*, 2007; Bisgrove *et al.*, 2011). *Rfx2* est également requis pour la croissance des cils primaires chez le xénope (Chung *et al.*, 2011). Chez la souris et contrairement à ce qui a été observé chez les invertébrés, l'absence d'une protéine RFX ne conduit pas à la perte totale des cils dans les tissus examinés. Ceci peut s'expliquer par une fonction redondante des protéines RFX. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'aucune différence dans la spécificité de liaison n'a encore été décrite entre RFX1, RFX2 et RFX3. De plus, les données obtenues chez la souris montrent par exemple que RFX3 et RFX4 pourraient jouer un rôle synergique dans le cerveau où ils sont tous deux requis pour le développement de l'organe sous-commissural, une structure essentielle pour l'homéostasie du liquide céphalorachidien (Blackshear *et al.*, 2003; Baas *et al.*, 2006). Il en serait de même pour RFX3 et RFX6, pour qui les mutants murins présentent des défauts développementaux similaires dans le pancréas (Ait-Lounis *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2010).

Les gènes cibles de RFX ont majoritairement été identifiés chez *C. elegans* et chez la drosophile (figure 2). De manière intéressante, chez la drosophile et le nématode, RFX contrôle l'expression de toutes les protéines associées au complexe B de l'IFT ainsi que toutes les protéines du BBS (*Bardet-Biedl Syndrome*) qui coordonnent le transport de l'IFT. Les protéines RFX régulent également la protéine motrice Dync2li1 (*dynein cytoplasmic light intermediate*

chain 1) associée au transport rétrograde de l'IFT ainsi qu'une protéine impliquée dans la régulation de la glutamylation de la tubuline chez *C. elegans* (DYF-1) et le poisson zèbre (*flee*). Ce processus est connu pour jouer un rôle important dans l'intégrité axonémale et dans le transport de l'IFT (Ou *et al.*, 2005; Redeker *et al.*, 2005; Pathak *et al.*, 2007). Concernant les composants des complexes A, IFT122 (*daf-10*) est sous le contrôle de DAF-19 chez *C. elegans* (Efimenko *et al.*, 2005). En revanche, chez la drosophile, l'expression des composants du complexe A de l'IFT ou des moteurs moléculaires qui y sont associés n'est pas modifiée en contexte mutant pour *Rfx* (Laurençon *et al.*, 2007). Cependant, plusieurs des gènes codant des composants du complexe A ont dans leur promoteur un motif de type boîte-X qui est conservé entre la drosophile, le nématode et les mammifères (Blacque *et al.*, 2005; Piasecki *et al.*, 2010). Ceci suggère que si les protéines RFX peuvent se lier aux promoteurs des gènes codant les composants du complexe IFTA, elles ne sont pas indispensables chez la drosophile pour l'expression de ces gènes.

De façon générale, les protéines RFX assurent le contrôle du transport de l'IFT en régulant les membres du complexe B, les BBS et les moteurs rétrogrades. Elles interviennent également dans le contrôle de l'expression des protéines associées au corps basal et à la zone de transition tels que les gènes à domaine B9 impliqués dans le syndrome humain de Meckel Gruber (Bialas *et al.*, 2009). Chez *C. elegans*, DAF-19 régule NPHP-1 (*nephronophthisis 1*) et NPHP-4, des protéines associées à la zone de transition (Winkelbauer *et al.*, 2005) et dont les orthologues sont impliquées dans les néphronophthies chez l'Homme, une autre ciliopathie. DAF-19 régule également *DYF-17*, une protéine localisée à la zone de transition et nécessaire à l'assemblage du cil ainsi que *DYF-18* qui influence le devenir des protéines de l'IFT (Phirke *et al.*, 2011). La figure 2 résume les gènes cibles de RFX ayant été confirmés chez la souris, la drosophile ou *C. elegans*.

Les facteurs de transcription RFX sont donc des régulateurs d'un groupe particulier de protéines ciliaires impliquées dans le transport intraflagellaire, processus primordial à l'assemblage et au fonctionnement des cils. Les protéines RFX régulent également un ensemble spécifique de protéines impliquées dans l'ancrage du corps basal au cytosquelette (*rootletine*) (Yang *et al.*, 2002; Bahe *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006) ou à la membrane apicale (protéines de la zone de transition) (Czarnecki & Shah, 2012). Aucune de ces protéines ne semblent être régulée par FOXJ1. En revanche, une autre classe de gènes incluant *Dnah9* est à la fois régulée par RFX et FOXJ1.

Comme mentionné précédemment, toutes les protéines RFX ne sont pas impliquées dans la ciliogenèse.

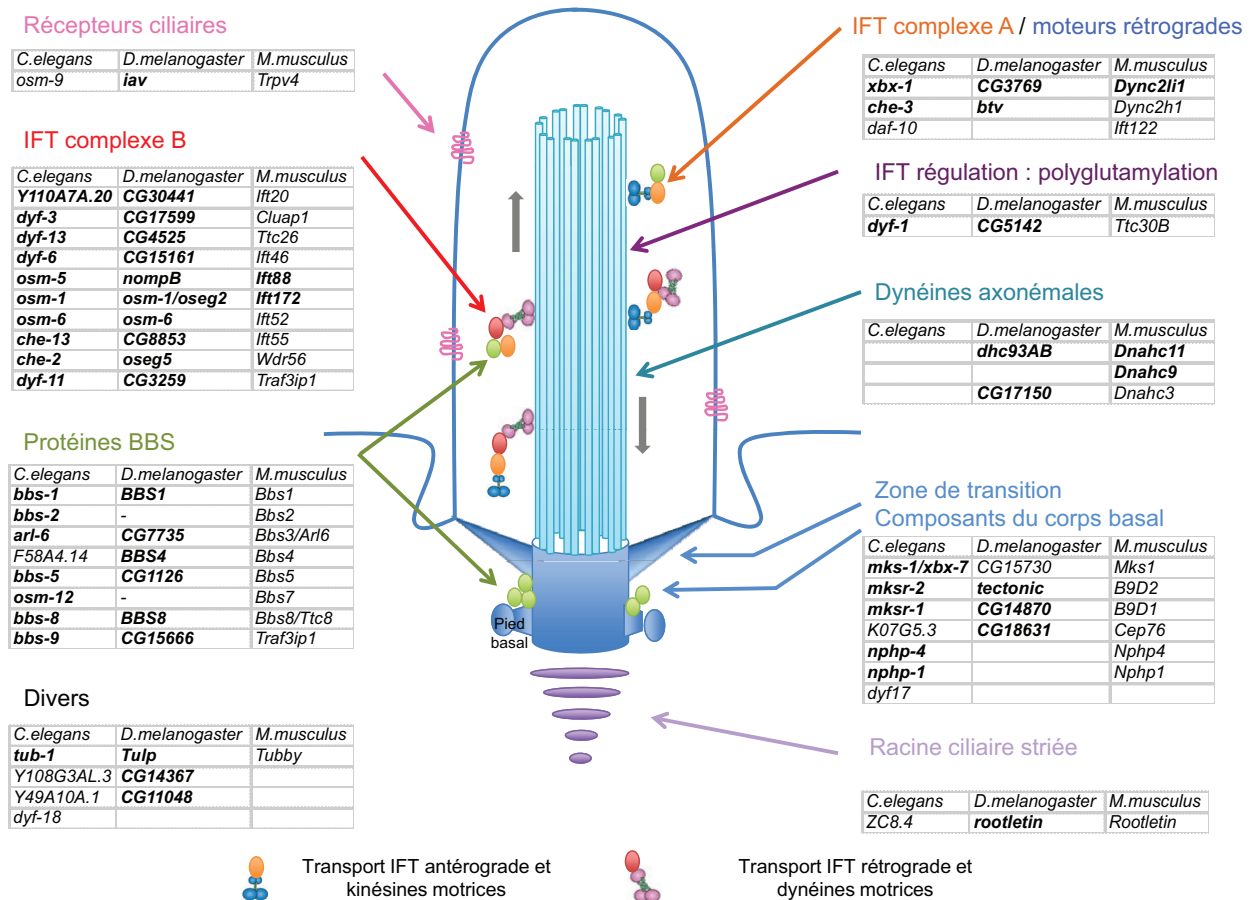


Fig. 2. Les cibles de RFX connues pour leur implication dans la ciliogenèse. Schéma simplifié d'un cil primaire et de son corps basal. Le corps basal est dérivé du centriole père et possède des structures spécialisées telles que le pied basal. Le corps basal est ancré à la membrane plasmique *via* les fibres de transition. La région située entre l'axonème et le corps basal s'appelle la zone de transition (Marshall, 2008 ; Seeley & Nachury, 2010). La motilité des cils est assurée par des bras de dynéines dites axonémales. Chez la drosophile et *C. elegans*, les protéines RFX contrôlent tous les gènes codant les composants du complexe B de l'IFT et les orthologues des protéines BBS (*Bardet-Biedl Syndrome*). Elles contrôlent également la dynéine, moteur rétrograde, ainsi que les gènes impliqués dans le contrôle de la polyglutamylation de la tubuline nécessaire au transport de l'IFT chez le poisson zèbre et *C. elegans*. Finalement, les protéines RFX régulent de nombreux gènes codant des protéines de la zone de transition nécessaires à l'ancrage du corps basal à la membrane plasmique. Les protéines RFX contrôlent également l'expression des gènes codant des protéines composant certains canaux localisés dans la membrane du cil et plusieurs protéines impliquées dans la fonction des cils selon un mécanisme encore inconnu. Par exemple, la famille de protéines Tubby est requise pour la fonction ciliaire mais leur mode d'action reste à définir. En gras, les gènes pour lesquels il a été montré qu'ils sont régulés par les RFX. En gris, leurs orthologues dans d'autres espèces, mais dont la régulation par RFX n'est pas formellement démontrée.

C'est le cas de RFX5 qui régule les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et de RFX6 qui est impliqué dans le développement du pancréas (Huang *et al.*, 1998). D'autre part, tous les gènes identifiés comme cible de RFX sur la base de la présence d'une boîte-X, ne sont pas tous impliqués dans la ciliogenèse. Ainsi, les défauts observés chez les souris déficientes pour *Rfx3* et *Rfx6* peuvent résulter d'une combinaison de défauts ciliaires et non ciliaires. Enfin, il existe chez *C. elegans*

différentes isoformes de DAF-19 (Senti & Swoboda, 2008). Parmi ces isoformes, une seule est nécessaire à la genèse de tous les cils sensoriels du nématode, les autres sont requises pour la stabilité synaptique des neurones sensoriels non ciliés ou dans le contrôle de la spécialisation des cils sensoriels (Wang *et al.*, 2010). Les isoformes non spécifiques de la ciliogenèse ne peuvent sauver le phénotype des mutants de la forme ciliogénique, ce qui suggère qu'il existe des cibles spécifiques en fonction des isoformes et ce, bien qu'ils

partagent le même domaine de liaison à l'ADN. Chez les mammifères, il est donc tout à fait envisageable que des isoformes spécifiques des protéines RFX jouent des rôles différents comme c'est le cas chez *C. elegans*.

Relations fonctionnelles entre les facteurs de transcription RFX et FOXJ1

Il a été montré chez la souris que RFX régule des gènes codant des dynéines axonémales, tels que *Dnah9*, qui est également une cible de FOXJ1. Ainsi, chez la souris, les protéines RFX et FOXJ1 semblent coopérer pour contrôler l'expression des gènes requis pour la motilité des cils. Outre le partage commun de gènes cibles, plusieurs observations suggèrent également qu'il existe une régulation croisée entre les facteurs de transcription RFX et FOXJ1 chez les vertébrés. RFX3 module l'expression de *Foxj1* dans des cultures de cellules épendymaires (El Zein *et al.*, 2009). Inversement, chez le poisson zèbre, *rfx2* est en partie régulé par *Foxj1*, l'opposé n'étant pas constaté (Yu *et al.*, 2008). Au niveau du nœud embryonnaire des souris, FOXJ1 est en amont de RFX3 et est requis pour l'expression de *Rfx3* (Alten *et al.*, 2012). Cependant, FOXJ1 ne semble pas réguler l'expression de *Rfx3* dans le plancher du tube neural chez la souris (Cruz *et al.*, 2010). Ces observations suggèrent des relations complexes entre les facteurs RFX et FOXJ1, qui varient d'un tissu et d'un organisme à l'autre et qui doivent encore être précisées.

Les autres acteurs

En plus des facteurs de transcription RFX et FOXJ1, plusieurs autres acteurs ont été identifiés dans le contrôle des gènes impliqués dans l'assemblage ou le fonctionnement des cils. Dans cette section, seuls ceux pour lesquels un rôle direct dans le contrôle de l'expression des gènes ciliaires a été décrit seront présentés.

Le facteur de transcription HNF1 β (*hepatocyte nuclear factor 1 β*) qui joue un rôle majeur dans l'homéostasie du foie, du pancréas et du rein est l'un d'entre eux. En effet, de manière intéressante, les souris déficientes pour *Hnf1 β* développent de graves polykystoses rénales qui sont des caractéristiques associées à de nombreuses ciliopathies chez l'Homme (Gresh *et al.*, 2004). Des approches par ChIP ont permis d'identifier de nombreuses cibles directes de HNF1 β impliquées dans la ciliogenèse telles que *Pkhd1* (*polycystic kidney and hepatic disease 1*), *Pkd2* (*polycystic kidney disease 2*), *Ift88* et la collectrine, suggérant ainsi un rôle ciliogénique pour HNF1 β dans le rein (Gresh *et al.*, 2004; Hiesberger *et al.*, 2005). Aucune donnée ne permet de dire si HNF1 β est impliqué dans

la ciliogenèse d'autres tissus, bien que des résultats obtenus chez les souris déficientes pour *Hnf6* révèlent que HNF1 β est un régulateur potentiel des gènes ciliaires du pancréas. En effet, dans les souris *Hnf6*^{-/-}, l'expression de *Hnf1 β* est altérée, celle de *Pkhd1* est absente et les souris développent des kystes rénaux et pancréatiques (Pierreux *et al.*, 2006). Ainsi, HNF1 β est important pour le programme génétique qui régule l'assemblage et la fonction des cils dans les tubules rénaux et probablement dans le pancréas.

La présence d'un tel programme cellulaire spécifique et nécessaire à la construction d'un sous-type de cils est particulièrement bien illustrée chez *C. elegans*. Dans cet organisme, les neurones olfactifs AWB (*Amphid Wing B*) possèdent un cil qui est composé de deux branches de tailles différentes. Dans ces neurones, FKH2, un autre membre de la famille des facteurs de transcription *forkhead*, est spécifiquement requis pour la morphogenèse de ce type particulier de cils sensoriels (Mukhopadhyay *et al.*, 2007) et il régule le transport de l'IFT en contrôlant le niveau d'expression de KAP-1 (*kinesin associated protein*) spécifiquement dans ces neurones. Ainsi, alors que DAF-19 gouverne la formation des cils dans toutes les cellules ciliées, FKH2 est uniquement nécessaire à la spécification d'un sous-type de cils particuliers chez *C. elegans*.

Plus récemment, il a été démontré chez la drosophile que le facteur pro-neuronal Atonal, qui est spécifique d'un lignage de cellules sensorielles ciliées que sont les organes chordotonaux, est capable d'activer directement des gènes impliqués dans l'assemblage des cils comme le gène *dilatory* (Cachero *et al.*, 2011). Dans ces neurones, la protéine *Dilatory* est localisée au corps basal et les mutants pour le gène *dila* présentent des défauts d'assemblage de l'axonème (Ma & Jarman, 2011). D'autre part, Atonal est également capable d'activer des facteurs de transcription spécifiques d'un sous-type de neurones ciliés comme le facteur Fd3F, celui-ci agissant de concert avec RFX, pour la spécialisation fonctionnelle des cils chordotonaux chez la drosophile (Newton *et al.*, 2012). De plus il a été démontré chez le poisson zèbre que Atoh1b est nécessaire au programme de différenciation des kinocils régulés par *Foxj1b* (Yu *et al.*, 2011). Ainsi, Atonal, initialement connu pour son rôle dans la détermination des précurseurs des sous-types neuronaux, apparaît comme un nouveau candidat à la spécification d'un sous-type de cils.

Par ailleurs, des analyses de ChIP réalisées sur des cellules épithéliales bronchiques humaines ont permis de révéler que le facteur de transcription S-SOX5 se lie directement sur le promoteur du gène *SPAG6* (*sperm-associated antigen 6*) qui code une protéine de la paire centrale de l'axonème. De plus, il a été démontré que la régulation de ce gène se fait en association

avec FOXJ1 qui exerce un rôle dominant vis-à-vis de S-SOX5 (Kiselak *et al.*, 2010).

Ainsi, de nouveaux facteurs de transcription impliqués dans la spécification d'un sous-type ciliaire particulier commencent à être décrits et il ne fait aucun doute que d'autres facteurs restent à découvrir.

Contrôle développemental des régulateurs

Tous les facteurs de transcription décrits jusqu'à présent sont exprimés de manière dynamique et dans des tissus spécifiques impliquant des mécanismes complexes de régulations. Quelques-uns de ces régulateurs ont été identifiés. On distingue notamment le gène *homeobox Noto* qui est exprimé dans le nœud embryonnaire de souris et qui contrôle la ciliogenèse. Dans les souris déficientes pour *Noto*, l'expression de *Foxj1* et de *Rfx3* est perdue dans le nœud embryonnaire, ce qui suggère que NOTO agit en amont de ces deux gènes (Beckers *et al.*, 2007). La réexpression de *Foxj1* dans un mutant *Noto* suffit à rétablir l'expression de *Rfx3* au niveau du nœud embryonnaire (Alten *et al.*, 2012). Dans les poissons médaka, l'expression du gène *floating head*, orthologue de *Noto*, est dépendante de la protéine *Oleed* (EED chez la souris) et les défauts des morphants *Oleed* peuvent être supprimés par l'expression de *floating head* (Arai *et al.*, 2009). Ces données suggèrent qu'il existe une cascade de régulation *Oleed* → *Noto* → *Foxj1* → *Rfx3*. Tous ces acteurs étant eux-mêmes régulés par les voies de signalisation qui interviennent au cours du développement.

C'est le cas de la voie SHH, qui régule l'expression de *foxj1a* dans le tube neural ventral du poisson zèbre mais pas dans les tubules rénaux ou dans la vésicule de Kupffer (KV) (Yu *et al.*, 2008). De plus, deux études réalisées chez le poisson zèbre ont permis de mettre en évidence l'importance de la signalisation FGF (*fibroblast growth factor*) dans la cascade de ciliogenèse au cours du développement. La première a permis d'identifier des gènes dont l'expression est augmentée en réponse à la signalisation FGF. Parmi ces gènes, *ier2* (*immediate early response 2*) code une protéine nucléaire et joue un rôle important dans la croissance des cils motiles de la KV. Les analyses fonctionnelles réalisées sur cette protéine ou sur son interacteur *Fibp1* (*FGF-interacting binding protein 1*) révèlent un rôle dans la mise en place de l'asymétrie droite gauche et dans la croissance des cils de la KV (Hong & Dawid, 2009). La seconde étude a permis de démontrer qu'une altération de la signalisation médiée par *Fgf8/Fgf24-Fgfr1* (*FGF receptor 1*) chez le poisson zèbre conduit à la diminution de la taille des cils dans la KV. De plus, l'expression des deux facteurs de transcription *Foxj1a* et *Rfx2* est diminuée dans les morphants *Fgfr1*, ce qui suggère un contrôle de la

ciliogenèse, via *Foxj1* et *Rfx2* par FGF au cours du développement (Neugebauer *et al.*, 2009).

De manière intéressante, la voie Notch est connue de longue date pour jouer un rôle dans les mécanismes d'inhibition latérale au cours du développement. Dans ce sens, elle joue un rôle important pour la spécification des cellules multiciliées dans l'épiderme du xénope ou dans les voies respiratoires humaines (Deblandre *et al.*, 1999 ; Tsao *et al.*, 2009). Par suite de la répression de la voie Notch, les cellules épithéliales acquièrent une destinée multiciliée dans ces deux tissus. Il a été montré récemment que la voie Notch réprime l'expression d'une protéine, la multiciline, requise pour que les cellules développent des cils motiles (Stubbs *et al.*, 2012). La multiciline est une petite protéine nucléaire, à domaine de type *coiled-coil*, qui contrôle la sortie du cycle cellulaire et l'amplification des corps basaux. Elle régule l'expression de *Foxj1* et de plusieurs protéines ciliaires. Ainsi, la répression de la voie Notch dans certaines cellules épithéliales permet l'expression de la multiciline et par conséquent le programme de ciliogenèse (figure 3). Récemment, il a été démontré que les microARNs jouent un rôle important dans la régulation de la voie Notch au cours du développement des épithéliums multiciliés. Parmi eux, la famille des microARNs miR-449 inhibent directement la voie Notch en se liant aux ARNs des gènes *Notch* et/ou de *Dll1* et contribuent ainsi à la différenciation terminale des cellules multiciliées de l'épithélium respiratoire humain et de l'épiderme de xénope (Marcet *et al.*, 2011).

La figure 3 rassemble les différents acteurs impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes nécessaire à l'assemblage ou à la fonction ciliaire.

Conclusion

Chez les métazoaires, l'expression des gènes ciliaires est donc régulée par quelques facteurs de transcription clés qui agissent en synergie et possèdent des fonctions complémentaires dans la spécification des différents types ciliaires. Il apparaît que les facteurs de transcription RFX et FOXJ1 régulent ainsi des gènes impliqués dans des fonctions spécifiques de la biogenèse et de la physiologie des cils en régulant différents groupes de protéines : FOXJ1 régule essentiellement les gènes impliqués dans la motilité ciliaire et dans le transport apical des corps basaux, alors que les protéines RFX régulent les gènes codant des protéines de l'IFT et celles requises pour l'ancrage du corps basal. FOXJ1 et RFX partagent cependant quelques cibles communes impliquées dans la motilité ciliaire. Cependant, de nombreux aspects concernant les interactions fonctionnelles entre ces deux facteurs de transcription restent à comprendre, de même que les mécanismes

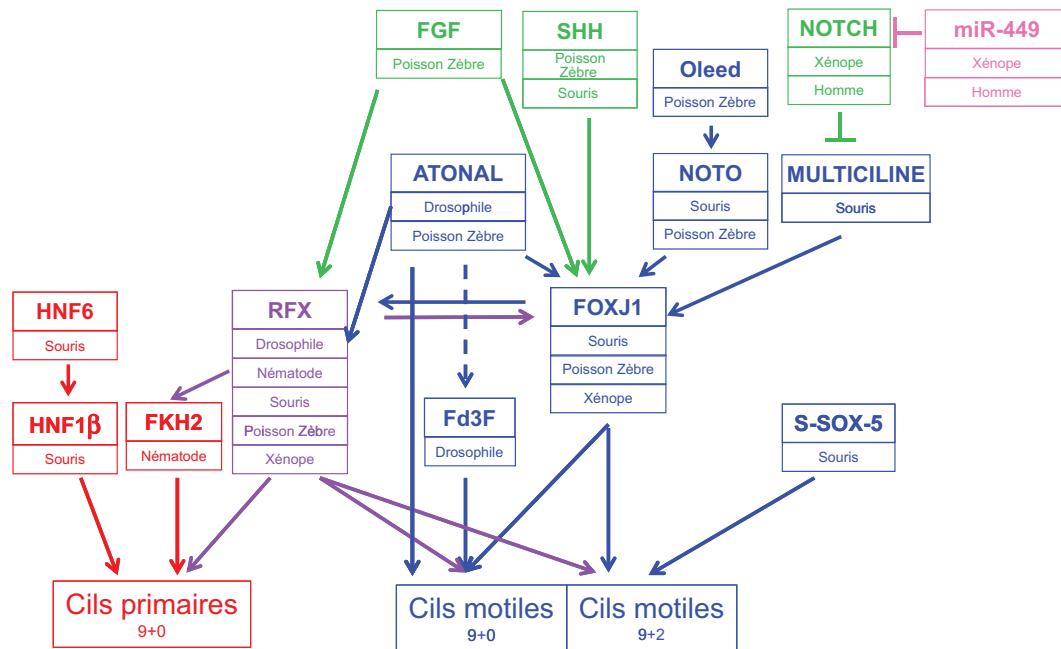


Fig. 3. Synthèse des différents acteurs impliqués dans la régulation des gènes codant des protéines nécessaires à l'assemblage ou à la fonction des cils. FOXJ1 est principalement impliqué dans l'assemblage des cils motiles chez les vertébrés. RFX est nécessaire à l'assemblage des cils aussi bien primaires que motiles. D'autres facteurs de transcription jouent un rôle dans la spécification d'un sous-type ciliaire : HNF1β régule l'expression des gènes ciliaires dans le rein et probablement dans le pancréas de souris. HNF6 régule l'expression de *Hnf1β* dans le pancréas de souris. RFX (DAF-19) chez *C. elegans* régule l'expression de *Fkh2* qui lui-même régule l'assemblage d'un sous-type de cils primaires chez le nématode. De même, Atonal chez la drosophile régule directement des gènes ciliaires, mais aussi *Rfx* ainsi que probablement le gène codant le facteur de transcription Fd3F spécifique des organes chordotonaux de la drosophile. Atonal joue aussi un rôle spécifique *via* Foxj1 dans la genèse des kinocils de la vésicule otique du poisson zèbre. S-SOX5 régule directement SPAG6, protéine axonémale de la paire centrale dans des cellules bronchiques humaines. Les facteurs Foxj1 et RFX interagissent fonctionnellement : Foxj1 régule *rfx2* chez le poisson zèbre, à l'inverse RFX3 module l'expression de *Foxj1* dans les cellules épendymaires de souris. L'expression de *Foxj1* et *Rfx3* est contrôlée par le facteur de transcription NOTO dans le nœud embryonnaire chez la souris. La signalisation FGF régule l'expression de *foxj1* et *rfx2* chez le poisson zèbre. La signalisation SHH régule l'expression de *foxj1a* dans le tube neural du poisson zèbre. Le microARN miR-449 inhibe la voie Notch qui elle-même agit sur l'expression de la multiciline et contribue ainsi au programme de ciliogenèse motile chez le xénope et l'Homme.

gouvernant la spécificité des cibles. En revanche, l'identification des gènes cibles de ces protéines dans différents systèmes cellulaires s'est avérée très informative pour la découverte des nouveaux composants ciliaires. D'autre part, les études récentes ont permis de révéler plusieurs des acteurs situés en amont de ces facteurs de transcription comme la protéine NOTO dans le nœud embryonnaire de souris ou la voie microARNs miR-449 => Notch => multiciline pour la spécification des cellules multiciliées. Sur le plan évolutif, il est intéressant de noter que les protéines RFX, bien que présentes de la levure aux mammifères, n'ont été "recrutées" pour la régulation des gènes ciliaires que chez les métazoaires (Piasecki *et al.*, 2010). Il serait donc intéressant de déterminer quels sont les autres facteurs qui jouent ce rôle chez ces animaux et de comprendre comment les protéines FOXJ1 ont été

recrutées au cours de l'évolution pour la régulation de la biogenèse des cils motiles.

De nombreuses données suggèrent qu'il existe des mécanismes post-transcriptionnels pour contrôler les niveaux d'expression des gènes ciliaires dans de nombreuses conditions expérimentales et physiologiques. C'est le cas chez *Chlamydomonas* ou chez l'oursin, où les mécanismes post-transcriptionnels sont impliqués dans la régulation des gènes de la tubuline après des expériences de déciliation (Baker *et al.*, 1986). Chez les mammifères, des observations récentes démontrent l'implication des microARNs dans le contrôle de l'expression des gènes ciliaires, d'une part indirectement comme on l'a vu en réprimant directement la voie Notch inhibitrice de la croissance de cils multiples et d'autre part, en agissant directement sur quelques gènes ciliaires. Ainsi le gène *Odf2* (*outer dense fiber*

of sperm tails 2), qui code un composant du corps basal, nécessaire à l'assemblage des cils, est une cible directe du microARN miR-96. Dans les cellules ciliées de l'oreille interne, des mutations du gène codant le microARN miR-96 induisent la perte progressive de l'audition chez l'Homme et la souris (Lewis *et al.*, 2009; Mencia *et al.*, 2009; Sacheli *et al.*, 2009), ce qui pourrait refléter une fonction ciliogénique du microARN miR-96 dans ces cellules.

L'ensemble de ces données met en avant l'existence d'une régulation extrêmement fine de l'expression des gènes ciliaires par un réseau complexe de différents facteurs et démontre que la régulation des gènes ciliaires est donc une étape clé pour comprendre le développement animal.

Références

- Aftab S., Semenec L., Chu J.S., Chen N., Identification and characterization of novel human tissue-specific RFX transcription factors. *BMC Evol Biol*, 2008, 8, 226.
- Ait-Lounis A., Baas D., Barras E., Benadiba C., Charollais A., Nlend Nlend R., Liegeois D., Meda P., Durand B., Reith W., Novel function of the ciliogenic transcription factor RFX3 in development of the endocrine pancreas. *Diabetes*, 2007, 56, 950–959.
- Alten L., Schuster-Gossler K., Beckers A., Groos S., Ulmer B., Hegermann J., Ochs M., Gossler A., Differential regulation of node formation, nodal ciliogenesis and cilia positioning by Noto and Foxj1. *Development*, 2012, 139, 1276–1284.
- Arai D., Hatano A., Higashinakagawa T., Oled, a medaka Polycomb group gene, regulates ciliogenesis and left-right patterning. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, 2009, 14, 1359–1367.
- Arnaiz O., Malinowska A., Klotz C., Sperling L., Dadlez M., Koll F., Cohen J., Cildb: a knowledge base for centrosomes and cilia. *Database (Oxford)* 2009, bap022.
- Ashique A.M., Choe Y., Karlen M., May S.R., Phamluong K., Solloway M.J., Ericson J., Peterson A.S., The Rfx4 transcription factor modulates Shh signaling by regional control of ciliogenesis. *Sci Signal*, 2009, 2, ra70.
- Avidor-Reiss T., Maer A.M., Koundakjian E., Polyanovsky A., Keil T., Subramaniam S., Zuker C.S., Decoding cilia function: defining specialized genes required for compartmentalized cilia biogenesis. *Cell*, 2004, 117, 527–539.
- Baas D., Meiniel A., Benadiba C., Bonnafé E., Meiniel O., Reith W., Durand B., A deficiency in RFX3 causes hydrocephalus associated with abnormal differentiation of ependymal cells. *Eur J Neurosci*, 2006, 24, 1020–1030.
- Bahe S., Stierhof Y.D., Wilkinson C.J., Leiss F., Nigg E.A., Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion. *J Cell Biol*, 2005, 171, 27–33.
- Baker E.J., Keller L.R., Schloss J.A., Rosenbaum J.L., Protein synthesis is required for rapid degradation of tubulin mRNA and other deflagellation-induced RNAs in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Cell Biol*, 1986, 6, 54–61.
- Baker K., Beales P.L., Making sense of cilia in disease: the human ciliopathies. *Am J Med Genet*, 2009, 151C, 281–295.
- Beckers A., Alten L., Viebahn C., Andre P., Gossler A., The mouse homeobox gene Noto regulates node morphogenesis, notochordal ciliogenesis, and left right patterning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, 15765–15770.
- Bialas N.J., Inglis P.N., Li C., Robinson J.F., Parker J.D., Healey M.P., Davis E.E., Inglis C.D., Toivonen T., Cottell D.C., Blacque O.E., Quarmby L.M., Katsanis N., Leroux M.R., Functional interactions between the ciliopathy-associated Meckel syndrome 1 (MKS1) protein and two novel MKS1-related (MKSR) proteins. *J Cell Sci*, 2009, 122, 611–624.
- Bisgrove B.W., Makova S., Yost H.J., Brueckner M., RFX2 is essential in the ciliated organ of asymmetry and an RFX2 transgene identifies a population of ciliated cells sufficient for fluid flow. *Dev Biol*, 2011, 363, 166–178.
- Blackshear P.J., Graves J.P., Stumpo D.J., Cobos I., Rubenstein J.L., Zeldin D.C., Graded phenotypic response to partial and complete deficiency of a brain-specific transcript variant of the winged helix transcription factor RFX4. *Development*, 2003, 130, 4539–4552.
- Blacque O.E., Perens E.A., Boroevich K.A., Inglis P.N., Li C., Warner A., Khattra J., Holt R.A., Ou G., Mah A.K., McKay S.J., Huang P., Swoboda P., Jones S.J., Marra M.A., Baillie D.L., Moerman D.G., Shaham S., Leroux M.R., Functional genomics of the cilium, a sensory organelle. *Curr Biol*, 2005, 15, 935–941.
- Blatt E.N., Yan X.H., Wuerffe M.K., Hamilos D.L., Brody S.L., Forkhead transcription factor HFH-4 expression is temporally related to ciliogenesis. *Am J Resp Cell Mol Biol*, 1999, 21, 168–176.
- Bonnafé E., Touka M., Ait-Lounis A., Baas D., Barras E., Ucla C., Moreau A., Flamant F., Dubruille R., Couble P., Collignon J., Durand B., Reith W., The transcription factor RFX3 directs nodal cilium development and left-right asymmetry specification. *Mol Cell Biol*, 2004, 24, 4417–4427.
- Brody S.L., Yan X.H., Wuerffel M.K., Song S.K., Shapiro S.D., Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. *Am J Resp Cell Mol Biol*, 2000, 23, 45–51.
- Cachero S., Simpson T.I., Zur Lage P.I., Ma L., Newton F.G., Holohan E.E., Armstrong J.D., Jarman A.P., The gene regulatory cascade linking proneural specification with differentiation in *Drosophila* sensory neurons. *PLoS Biol*, 2011, 9, e1000568.
- Cardenas-Rodriguez M., Badano J.L., Ciliary biology: understanding the cellular and genetic basis of human ciliopathies. *Am J Med Genet*, 2009, 151C, 263–280.
- Chen J., Knowles H.J., Hebert J.L., Hackett B.P., Mutation of the mouse hepatocyte nuclear

- factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. *J Clin Invest*, 1998, 102, 1077–1082.
- Chen N., Mah A., Blacque O.E., Chu J., Phgora K., Bakhoum M.W., Newbury C.R., Khattri J., Chan S., Go A., Efimenko E., Johnsen R., Phirke P., Swoboda P., Marra M., Moerman D.G., Leroux M.R., Baillie D.L., Stein L.D., Identification of ciliary and ciliopathy genes in *Caenorhabditis elegans* through comparative genomics. *Genome Biol*, 2006, 7, R126.
- Chung M.I., Peyrot S.M., Leboeuf S., Park T.J., McGary K.L., Marcotte E.M., Wallingford J.B., RFX2 is broadly required for ciliogenesis during vertebrate development. *Dev Biol*, 2011, 363, 155–165.
- Clausen B.E., Waldburger, J.M., Schwenk F., Barras E., Mach B., Rajewsky K., Forster I., Reith W., Residual MHC class II expression on mature dendritic cells and activated B cells in RFX5-deficient mice. *Immunity*, 1998, 8, 143–155.
- Cruz C., Ribes V., Kutejova E., Cayuso J., Lawson V., Norris D., Stevens J., Davey M., Blight K., Bangs F., Mynett A., Hirst E., Chung R., Balaskas, N., Brody S.L., Marti E., Briscoe J., Foxj1 regulates floor plate cilia architecture and modifies the response of cells to sonic hedgehog signalling. *Development*, 2010, 137, 4271–4282.
- Czarnecki P.G., Shah J.V., The ciliary transition zone : from morphology and molecules to medicine. *Trends Cell Biol*, 2012, 22, 201–210.
- Deblandre G.A., Wettstein D.A., Koyano-Nakagawa N., Kintner C., A two-step mechanism generates the spacing pattern of the ciliated cells in the skin of *Xenopus* embryos. *Development*, 1999, 126, 4715–4728.
- Dubruille R., Laurençon A., Vandaele C., Shishido E., Coulon-Bublex M., Swoboda P., Couble P., Kernan M., Durand B., *Drosophila* regulatory factor X is necessary for ciliated sensory neuron differentiation. *Development*, 2002, 129, 5487–5498.
- Durand B., Sperisen P., Emery P., Barras E., Zufferey M., Mach B., Reith W., RFXAP, a novel subunit of the RFX DNA binding complex is mutated in MHC class II deficiency. *EMBO J*, 1997, 16, 1045–1055.
- Efimenko E., Bubbs K., Mak H.Y., Holzman T., Leroux, M.R., Ruvkun G., Thomas, J.H., Swoboda P., Analysis of *xbx* genes in *C. elegans*. *Development*, 2005, 132, 1923–1934.
- Eggenchwil J.T., Anderson K.V., Cilia and developmental signaling. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23, 345–373.
- El Zein L., Ait-Lounis A., Morle L., Thomas J., Chhin B., Spassky N., Reith W., Durand B., RFX3 governs growth and beating efficiency of motile cilia in mouse and controls the expression of genes involved in human ciliopathies. *J Cell Sci*, 2009, 122, 3180–3189.
- Emery P., Durand B., Mach B., Reith W., RFX proteins, a novel family of DNA binding proteins conserved in the eukaryotic kingdom. *Nucl Acids Res*, 1996a, 24, 803–807.
- Emery P., Strubin M., Hofmann K., Bucher P., Mach B., Reith W., A consensus motif in the RFX DNA binding domain and binding domain mutants with altered specificity. *Mol Cell Biol*, 1996b, 16, 4486–4494.
- Gajiwala K.S., Chen H., Cornille F., Roques B.P., Reith W., Mach B., Burley S.K., Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding. *Nature*, 2000, 403, 916–921.
- Gherman A., Davis E.E., Katsanis N., The ciliary proteome database: an integrated community resource for the genetic and functional dissection of cilia. *Nat Genet*, 2006, 38, 961–962.
- Gomperts B.N., Gong-Cooper X., Hackett B.P., Foxj1 regulates basal body anchoring to the cytoskeleton of ciliated pulmonary epithelial cells. *J Cell Sci*, 2004, 117, 1329–1337.
- Gopfert M.C., Robert D., Motion generation by *Drosophila* mechanosensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100, 5514–5519.
- Gopfert M.C., Humphris, A.D., Albert, J.T., Robert D., Hendrich O., Power gain exhibited by motile mechanosensory neurons in *Drosophila* ears. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102, 325–330.
- Gresh L., Fischer E., Reimann A., Tanguy M., Garbay S., Shao X., Hiesberger T., Fiette L., Igarashi P., Yaniv M., Pontoglio M., A transcriptional network in polycystic kidney disease. *EMBO J*, 2004, 23, 1657–1668.
- Hackett B.P., Brody S.L., Liang M., Zeitz I.D., Bruns L.A., Gitlin J.D., Primary structure of hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 and characterization of gene expression in the developing respiratory and reproductive epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92, 4249–4253.
- Haycraft C.J., Swoboda P., Taulman P.D., Thomas J.H., Yoder B.K., The *C. elegans* homolog of the murine cystic kidney disease gene Tg737 functions in a ciliogenic pathway and is disrupted in *osm-5* mutant worms. *Development*, 2001, 128, 1493–1505.
- Haycraft C.J., Schafer J.C., Zhang Q., Taulman P.D., Yoder B.K., Identification of CHE-13, a novel intra-flagellar transport protein required for cilia formation. *Exp Cell Res*, 2003, 284, 251–263.
- Hiesberger T., Shao X., Gourley E., Reimann A., Pontoglio M., Igarashi P., Role of the hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) C-terminal domain in Pkhd1 (ARPKD) gene transcription and renal cystogenesis. *J Biol Chem*, 2005, 280, 10578–10586.
- Hirschner W., Pogoda H.M., Kramer C., Thiess U., Hamprecht B., Wiesmuller K.H., Lautner M., Verleysdonk S., Biosynthesis of Wdr16, a marker protein for kinocilia-bearing cells, starts at the time of kinocilia formation in rat, and *wdr16* gene knockdown causes hydrocephalus in zebrafish. *J Neurochem*, 2007, 101, 274–288.
- Hong S.K., Dawid I.B., FGF-dependent left-right asymmetry patterning in zebrafish is mediated by *Ier2* and *Fibp1*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106, 2230–2235.
- Huang M., Zhou Z., Elledge S.J., The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell*, 1998, 94, 595–605.

- Huang T., You Y., Spoor M.S., Richer E.J., Kudva V.V., Paige R.C., Seiler M.P., Liebler J.M., Zabner J., Plopper C.G., Brody S.L., Foxj1 is required for apical localization of ezrin in airway epithelial cells. *J Cell Sci*, 2003, 116, 4935–4945.
- Inglis P.N., Boroevich K.A., Leroux M.R., Piecing together a ciliome. *Trends Genet*, 2006, 22, 491–500.
- Ishikawa H., Marshall W.F., Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12, 222–234.
- Jacquet B.V., Salinas-Mondragon R., Liang H., Therit B., Buie J.D., Dykstra M., Campbell K., Ostrowski L.E., Brody S.L., Ghashghaei H.T., FoxJ1-dependent gene expression is required for differentiation of radial glia into ependymal cells and a subset of astrocytes in the postnatal brain. *Development*, 2009, 136, 4021–4031.
- Jain R., Pan J., Driscoll J.A., Wisner J.W., Huang T., Gunsten S.P., You Y., Brody S.L., Temporal relationship between primary and motile ciliogenesis in airway epithelial cells. *Am J Resp Cell Mol Biol*, 2010, 43, 731–739.
- Kiselak E.A., Shen X., Song J., Gude D.R., Wang J., Brody S.L., Strauss J.F., 3rd, Zhang Z., Transcriptional regulation of an axonemal central apparatus gene, sperm-associated antigen 6, by a SRY-related high mobility group transcription factor, S-SOX5. *J Biol Chem*, 2010, 285, 30496–30505.
- Laurençon A., Dubrulle R., Efimenko E., Grenier G., Bissett R., Cortier E., Rolland V., Swoboda P., Durand B., Identification of novel regulatory factor X (RFX) target genes by comparative genomics in *Drosophila* species. *Genome Biol*, 2007, 8, R195.
- Lee E., Sivan-Loukianova E., Eberl D.F., Kernan M.J., An IFT-A protein is required to delimit functionally distinct zones in mechanosensory cilia. *Curr Biol*, 2008, 18, 1899–1906.
- Lewis M.A., Quint E., Glazier A.M., Fuchs H., De Angelis M.H., Langford C., van Dongen S., Abreu-Goodger C., Piipari M., Redshaw N., Dalmay T., Moreno-Pelayo M.A., Enright A.J., Steel K.P., An ENU-induced mutation of miR-96 associated with progressive hearing loss in mice. *Nat Genet*, 2009, 41, 614–618.
- Li J.B., Gerdes J.M., Haycraft C.J., Fan Y., Teslovich T.M., May-Simera H., Li H., Blacque O.E., Li L., Leitch C.C., Lewis R.A., Green J.S., Parfrey P.S., Leroux M.R., Davidson W.S., Beales P.L., Guay-Woodford L.M., Yoder B.K., Stormo G.D., Katsanis N., Dutcher S.K., Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. *Cell*, 2004, 117, 541–552.
- Lim L., Zhou H., Costa R.H., The winged helix transcription factor HFH-4 is expressed during choroid plexus epithelial development in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94, 3094–3099.
- Lin L., Spoor M.S., Gerth A.J., Brody S.L., Peng S.L., Modulation of Th1 activation and inflammation by the NF-kappaB repressor Foxj1. *Science*, 2004, 303, 1017–1020.
- Lin L., Brody S.L., Peng S.L., Restraint of B cell activation by Foxj1-mediated antagonism of NF-kappa B and IL-6. *J Immunol*, 2005, 175, 951–958.
- Liu Y., Pathak N., Kramer-Zucker A., Drummond I.A., Notch signaling controls the differentiation of transporting epithelia and multiciliated cells in the zebrafish pronephros. *Development*, 2007, 134, 1111–1122.
- Ma L., Jarman, A.P., Dilatory is a *Drosophila* protein related to AZI1 (CEP131) that is located at the ciliary base and required for cilium formation. *J Cell Sci*, 2011, 124, 2622–2630.
- Marcet B., Chevalier B., Luxardi G., Coraux C., Zaragosi L.E., Cibois M., Robbe-Sermesant K., Jolly T., Cardinaud B., Moreilhon C., Giovannini-Chami L., Nawrocki-Raby B., Birembaut P., Waldmann R., Kodjabachian L., Barbry P., Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat Cell Biol*, 2011, 13, 693–699.
- Marshall W.F., Basal bodies platforms for building cilia. *Curr Top Dev Biol*, 2008, 85, 1–22.
- Masternak K., Barras E., Zufferey M., Conrad B., Corthals G., Aebersold R., Sanchez J.C., Hochstrasser D.F., Mach B., Reith W., A gene encoding a novel RFX-associated transactivator is mutated in the majority of MHC class II deficiency patients. *Nat Genet*, 1998, 20, 273–277.
- Mazet F., Yu J.K., Liberles D.A., Holland L.Z., Shimeld S.M., Phylogenetic relationships of the Fox (Forkhead) gene family in the Bilateria. *Gene*, 2003, 316, 79–89.
- Mencía A., Modamio-Høybjør S., Redshaw N., Morín M., Mayo-Merino F., Olavarrieta L., Aguirre L.A., del Castillo I., Steel K.P., Dalmay T., Moreno F., Moreno-Pelayo M.A., Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. *Nat Genet*, 2009, 41, 609–613.
- Mukhopadhyay S., Lu Y., Qin H., Lanjuin A., Shaham S., Sengupta P., Distinct IFT mechanisms contribute to the generation of ciliary structural diversity in *C. elegans*. *EMBO J*, 2007, 26, 2966–2980.
- Neugebauer J.M., Amack J.D., Peterson A.G., Bisgrove B.W., Yost H.J., FGF signalling during embryo development regulates cilia length in diverse epithelia. *Nature*, 2009, 458, 651–654.
- Newton F.G., Zur Lage P.I., Karak S., Moore D.J., Gopfert M.C., Jarman A.P., Forkhead transcription factor Fd3F cooperates with Rfx to regulate a gene expression program for mechanosensory cilia specialization. *Dev Cell*, 2012, 22, 1221–1233.
- Ou G., Blacque O.E., Snow J.J., Leroux M.R., Scholey J.M., Functional coordination of intraflagellar transport motors. *Nature*, 2005, 436, 583–587.
- Pathak N., Obara T., Mangos S., Liu Y., Drummond I.A., The zebrafish fleer gene encodes an essential regulator of cilia tubulin polyglutamylation. *Mol Biol Cell*, 2007, 18, 4353–4364.
- Phirke P., Efimenko E., Mohan S., Burghoorn J., Crona F., Bakhoun M.W., Trieb M., Schuske K., Jorgensen E.M., Piasecki B.P., Leroux M.R.,

- Swoboda P., Transcriptional profiling of *C. elegans* DAF-19 uncovers a ciliary base-associated protein and a CDK/CCRK/LF2p-related kinase required for intraflagellar transport. *Dev Biol*, 2011 357, 235–247.
- Piasecki B.P., Burghoorn J., Swoboda P., Regulatory Factor X (RFX)-mediated transcriptional rewiring of ciliary genes in animals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107, 12969–12974.
- Pierreux C.E., Poll A.V., Kemp C.R., Clotman F., Maestro M.A., Cordi S., Ferrer J., Leyns L., Rousseau G.G., Lemaigre F.P., The transcription factor hepatocyte nuclear factor-6 controls the development of pancreatic ducts in the mouse. *Gastroenterology*, 2006, 130, 532–541.
- Redeker V., Levilliers N., Vinolo E., Rossier J., Jaillard D., Burnette D., Gaertig J., Bre M.H., Mutations of tubulin glycylation sites reveal cross-talk between the C termini of alpha- and beta-tubulin and affect the ciliary matrix in *Tetrahymena*. *J Biol Chem*, 2005, 280, 596–606.
- Reith W., Herrero-Sanchez C., Kobr M., Silacci P., Berte C., Barras E., Fey S., Mach B., MHC class II regulatory factor RFX has a novel DNA-binding domain and a functionally independent dimerization domain. *Genes Dev*, 1990, 4, 1528–1540.
- Sacheli R., Nguyen L., Borgs L., Vandenbosch R., Bodson M., Lefebvre P., Malgrange B., Expression patterns of miR-96, miR-182 and miR-183 in the development inner ear. *Gene Expr Patterns*, 2009, 9, 364–370.
- Schafer J.C., Haycraft C.J., Thomas J.H., Yoder B.K., Swoboda P., XB1 encodes a dynein light intermediate chain required for retrograde intraflagellar transport and cilia assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell*, 2003, 14, 2057–2070.
- Seeley E.S., Nachury M.V., The perennial organelle: assembly and disassembly of the primary cilium. *J Cell Sci*, 2010, 123, 511–518.
- Senti G., Swoboda P., Distinct isoforms of the RFX transcription factor DAF-19 regulate ciliogenesis and maintenance of synaptic activity. *Mol Biol Cell*, 2008, 19, 5517–5528.
- Smith S.B., Qu H.Q., Taleb N., Kishimoto N.Y., Scheel D.W., Lu Y., Patch A.M., Grabs R., Wang J., Lynn F.C., Miyatsuka T., Mitchell J., Seerke R., Désir J., Eijnden S.V., Abramowicz M., Kacet N., Weill J., Renard M.E., Gentile M., Hansen I., Dewar K., Hattersley A.T., Wang R., Wilson M.E., Johnson J.D., Polychronakos C., German M.S., Rfx6 directs islet formation and insulin production in mice and humans. *Nature*, 2010, 463, 775–780.
- Sorokin S.P., Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *J Cell Sci*, 1968, 3, 207–230.
- Spassky N., Merkle F.T., Flames N., Tramontin, A.D., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A., Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci*, 2005, 25, 10–18.
- Steimle V., Durand B., Barras E., Zufferey M., Hadam, M.R., Mach B., Reith W., A novel DNA-binding regulatory factor is mutated in primary MHC class II deficiency (bare lymphocyte syndrome). *Genes Dev*, 1995, 9, 1021–1032.
- Stubbs J.L., Oishi I., Izpisua Belmonte J.C., Kintner C., The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Nat Genet*, 2008, 40, 1454–1460.
- Stubbs J.L., Vladar E.K., Axelrod J.D., Kintner C., Multicilin promotes centriole assembly and ciliogenesis during multiciliate cell differentiation. *Nat Cell Biol*, 2012, 14, 140–147.
- Swoboda P., Adler H.T., Thomas J.H., The RFX-type transcription factor DAF-19 regulates sensory neuron cilium formation in *C. elegans*. *Mol Cell*, 2000, 5, 411–421.
- Tichelaar J.W., Lim L., Costa R.H., Whitsett J.A., HNF-3/forkhead homologue-4 influences lung morphogenesis and respiratory epithelial cell differentiation *in vivo*. *Dev Biol*, 1999, 213, 405–417.
- Tsao P.N., Vasconcelos M., Izvolsky K.I., Qian J., Lu J., Cardoso W.V., Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways. *Development*, 2009, 136, 2297–2307.
- Venugopalan S.R., Amen M.A., Wang J., Wong L., Cavender A.C., D'Souza R.N., Akerlund M., Brody S.L., Hjalt T.A., Amendt B.A., Novel expression and transcriptional regulation of FoxJ1 during oro-facial morphogenesis. *Hum Mol Genet*, 2008, 17, 3643–3654.
- Wang J., Schwartz, H.T., Barr M.M., Functional specialization of sensory cilia by an RFX transcription factor isoform. *Genetics*, 2010, 186, 1295–1307.
- Winkelbauer M.E., Schafer J.C., Haycraft C.J., Swoboda P., Yoder B.K., The *C. elegans* homologs of nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are cilia transition zone proteins involved in chemosensory perception. *J Cell Sci*, 2005, 118, 5575–5587.
- Wong S.Y., Reiter J.F., The primary cilium at the crossroads of mammalian hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol*, 2008, 85, 225–260.
- Yang J., Liu X., Yue G., Adamian M., Bulgakov O., Li T., Rootletin, a novel coiled-coil protein, is a structural component of the ciliary rootlet. *J Cell Biol*, 2002, 159, 431–440.
- Yang J., Adamian M., Li T., Rootletin interacts with C-Nap1 and may function as a physical linker between the pair of centrioles/basal bodies in cells. *Mol Biol Cell*, 2006, 17, 1033–1040.
- You Y., Huang T., Richer E.J., Schmidt J.E., Zabner J., Borok Z., Brody S.L., Role of f-box factor foxj1 in differentiation of ciliated airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286, L650–657.
- Yu X., Ng, C.P., Habacher H., Roy S., Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. *Nat Genet*, 2008, 40, 1445–1453.
- Yu X., Lau D., Ng C.P., Roy S., Cilia-driven fluid flow as an epigenetic cue for otolith biomineralization on sensory hair cells of the inner ear. *Development*, 2011, 138, 487–494.

Bibliographie

- Afzelius, B.** (1998). Immotile cilia syndrome : past , present , and prospects for the future. 894–897.
- Ahmed, N. T. and Mitchell, D. R.** (2005). ODA16p , a Chlamydomonas Flagellar Protein Needed for Dynein Assembly. **16**, 5004–5012.
- Ahmed, N. T., Gao, C., Luckner, B. F., Cole, D. G. and Mitchell, D. R.** (2008). ODA16 aids axonemal outer row dynein assembly through an interaction with the intraflagellar transport machinery. *J. Cell Biol.* **183**, 313–22.
- Alsaadi, M. M., Gaunt, T. R., Boustred, C. R., Guthrie, P. A. I., Lenzi, L., Rainbow, L., Hall, N., Alharbi, K. K. and Day, I. N. M.** (2013). Europe PMC Funders Group From a single whole exome read to notions of clinical screening : primary ciliary dyskinesia and RSPH9 p . Lys268del in the Arabian Peninsula. **76**, 211–220.
- Alten, L., Schuster-Gossler, K., Beckers, A., Groos, S., Ulmer, B., Hegermann, J., Ochs, M. and Gossler, A.** (2012). Differential regulation of node formation, nodal ciliogenesis and cilia positioning by Noto and Foxj1. *Development* **139**, 1276–84.
- Andersen, J. S., Wilkinson, C. J. and Mayor, T.** (2003). Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. **426**, 570–4
- Anderson, R.** (1972). THREE-DIMENSIONAL BODY FROM THE STRUCTURE OF THE OVIDUCT BASAL MONKEY.
- Austin-Tse, C., Halbritter, J., Zariwala, M. a, Gilberti, R. M., Gee, H. Y., Hellman, N., Pathak, N., Liu, Y., Panizzi, J. R., Patel-King, R. S., et al.** (2013). Zebrafish Ciliopathy Screen Plus Human Mutational Analysis Identifies C21orf59 and CCDC65 Defects as Causing Primary Ciliary Dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 672–686.
- Avidor-reiss, T., Maer, A. M., Koundakjian, E., Polyansky, A., Keil, T., Subramaniam, S. and Zuker, C. S.** (2004). Decoding Cilia Function : Defining Specialized Genes Required for Compartmentalized Cilia Biogenesis University of California at San Diego. **117**, 527–539.
- Azimzadeh, J. and Bornens, M.** (2007). Structure and duplication of the centrosome. *J. Cell Sci.* **120**, 2139–42.
- Babu, D. and Roy, S.** (2013). Left – right asymmetry : cilia stir up new surprises in the node Left – right asymmetry : cilia stir up new surprises in the node. *Open Biol.*
- Bahe, S., Stierhof, Y.-D., Wilkinson, C. J., Leiss, F. and Nigg, E. a** (2005). Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion. *J. Cell Biol.* **171**, 27–33.
- Baker, K. and Beales, P. L.** (2009). Making sense of cilia in disease: the human ciliopathies. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* **151C**, 281–95.

- Baker, E. J., Keller, L. R., Schloss, J. a and Rosenbaum, J. L.** (1986). Protein synthesis is required for rapid degradation of tubulin mRNA and other deflagellation-induced RNAs in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 54–61.
- Balczon, R., Bao, L. and Zimmer, W.** (1994). PCM-1, A 228-kD Centrosome Autoantigen with a Distinct Cell Cycle Distribution. **124**, 783–793.
- Baldari, C. T. and Rosenbaum, J.** (2010). Intraflagellar transport: it's not just for cilia anymore. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 75–80.
- Barbato, a, Frischer, T., Kuehni, C. E., Snijders, D., Azevedo, I., Baktai, G., Bartoloni, L., Eber, E., Escribano, a, Haarman, E., et al.** (2009). Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children. *Eur. Respir. J.* **34**, 1264–76.
- Barbelanne, M., Song, J., Ahmadzai, M. and Tsang, W. Y.** (2013). Pathogenic NPHP5 mutations impair protein interaction with Cep290, a prerequisite for ciliogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 2482–2494.
- Baron, R. and Kneissel, M.** (2013). WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat. Med.* **19**, 179–92.
- Baron, D. M., Ralston, K. S., Kabututu, Z. P. and Hill, K. L.** (2007). Functional genomics in *Trypanosoma brucei* identifies evolutionarily conserved components of motile flagella. *J. Cell Sci.* **120**, 478–91.
- Bartoloni, L., Blouin, J.-L., Pan, Y., Gehrig, C., Maiti, A. K., Scamuffa, N., Rossier, C., Jorissen, M., Armengot, M., Meeks, M., et al.** (2002). Mutations in the DNAH11 (axonemal heavy chain dynein type 11) gene cause one form of situs inversus totalis and most likely primary ciliary dyskinesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10282–6.
- Basto, R., Lau, J., Vinogradova, T., Gardiol, A., Woods, C. G., Khodjakov, A. and Raff, J. W.** (2006). Flies without centrioles. *Cell* **125**, 1375–86.
- Bayly, R. and Axelrod, J. D.** (2011). Pointing in the right direction: new developments in the field of planar cell polarity. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 385–91.
- Becker-Heck, A., Zohn, I. E., Okabe, N., Pollock, A., Lenhart, K. B., Sullivan-Brown, J., McSheene, J., Loges, N. T., Olbrich, H., Haeffner, K., et al.** (2011). The coiled-coil domain containing protein CCDC40 is essential for motile cilia function and left-right axis formation. *Nat. Genet.* **43**, 79–84.
- Beckers, A., Alten, L., Viebahn, C., Andre, P. and Gossler, A.** (2007). The mouse homeobox gene *Noto* regulates node morphogenesis, notochordal ciliogenesis, and left right patterning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 15765–70.
- Beisson, J. and Wright, M.** (2003). Basal body/centriole assembly and continuity. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 96–104.

- Besschetnova, T. Y., Kolpakova-Hart, E., Guan, Y., Zhou, J., Olsen, B. R. and Shah, J. V** (2010). Identification of signaling pathways regulating primary cilium length and flow-mediated adaptation. *Curr. Biol.* **20**, 182–7.
- Besse, L., Neti, M., Anselme, I., Gerhardt, C., Rüther, U., Laclef, C. and Schneider-Maunoury, S.** (2011). Primary cilia control telencephalic patterning and morphogenesis via Gli3 proteolytic processing. *Development* **138**, 2079–88.
- Bhogaraju, S., Cajanek, L., Fort, C., Blisnick, T., Weber, K., Taschner, M., Mizuno, N., Lamla, S., Bastin, P., Nigg, E. a, et al.** (2013). Molecular basis of tubulin transport within the cilium by IFT74 and IFT81. *Science* **341**, 1009–12.
- Bhowmick, R., Li, M., Sun, J., Baker, S. a, Insinna, C. and Besharse, J. C.** (2009). Photoreceptor IFT complexes containing chaperones, guanylyl cyclase 1 and rhodopsin. *Traffic* **10**, 648–63.
- Bialas, N. J., Inglis, P. N., Li, C., Robinson, J. F., Parker, J. D. K., Healey, M. P., Davis, E. E., Inglis, C. D., Toivonen, T., Cottell, D. C., et al.** (2009). Functional interactions between the ciliopathy-associated Meckel syndrome 1 (MKS1) protein and two novel MKS1-related (MKS1R) proteins. *J. Cell Sci.* **122**, 611–24.
- Blacque, O. E., Reardon, M. J., Li, C., McCarthy, J., Mahjoub, M. R., Ansley, S. J., Badano, J. L., Mah, A. K., Beales, P. L., Davidson, W. S., et al.** (2004). Loss of *C. elegans* BBS-7 and BBS-8 protein function results in cilia defects and compromised intraflagellar transport. *Genes Dev.* **18**, 1630–42.
- Bloodgood, RA** (2009). From central to rudimentary to primary: the history of an underappreciated organelle whose time has come. The primary cilium. *Methods Cell Biol.* **94**, 3–52.
- Blum, M., Weber, T., Beyer, T. and Vick, P.** (2009). Evolution of leftward flow. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 464–71.
- Boisvieux-Ulrich, E., Laine, M. C. and Sandoz, D.** (1989). In vitro effects of taxol on ciliogenesis in quail oviduct. *J. Cell Sci.* **92 (Pt 1)**, 9–20.
- Bornens, M.** (2012). The centrosome in cells and organisms. *Science* **335**, 422–6.
- Borovina, A. and Ciruna, B.** (2013). IFT88 Plays a Cilia- and PCP-Independent Role in Controlling Oriented Cell Divisions during Vertebrate Embryonic Development. *Cell Rep.* **5**, 37–43.
- Borovina, A., Superina, S., Voskas, D. and Ciruna, B.** (2010). Vangl2 directs the posterior tilting and asymmetric localization of motile primary cilia. *Nat. Cell Biol.* **12**, 407–12.
- Bradley, B. a and Quarmby, L. M.** (2005). A NIMA-related kinase, Cnk2p, regulates both flagellar length and cell size in *Chlamydomonas*. *J. Cell Sci.* **118**, 3317–26.
- Briggs, L. J., Davidge, J. a, Wickstead, B., Ginger, M. L. and Gull, K.** (2004). More than one way to build a flagellum: comparative genomics of parasitic protozoa. *Curr. Biol.* **14**, R611–2.

- Brody, S. L., Yan, X. H., Wuerffel, M. K., Song, S. K. and Shapiro, S. D.** (2000). Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **23**, 45–51.
- Broekhuis, J. R., Leong, W. Y. and Jansen, G.** (2013). Regulation of cilium length and intraflagellar transport. *Int Rev Cell Mol Biol.* **303**, 101–38.
- Brown, J. M., Dipetrillo, C. G., Smith, E. F. and Witman, G. B.** (2012). A FAP46 mutant provides new insights into the function and assembly of the C1d complex of the ciliary central apparatus. *J. Cell Sci.* **125**, 3904–13.
- Bubenshchikova, E., Ichimura, K., Fukuyo, Y., Powell, R., Hsu, C., Morrical, S. O., Sedor, J. R., Sakai, T. and Obara, T.** (2012). Wtip and Vangl2 are required for mitotic spindle orientation and cloaca morphogenesis. *Biol. Open* **1**, 588–96.
- Burcklé, C., Gaudé, H.-M., Vesque, C., Silberman, F., Salomon, R., Jeanpierre, C., Antignac, C., Saunier, S. and Schneider-Maunoury, S.** (2011). Control of the Wnt pathways by nephrocystin-4 is required for morphogenesis of the zebrafish pronephros. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 2611–27.
- Bush, A., Chodhari, R., Collins, N., Copeland, F., Hall, P., Harcourt, J., Hariri, M., Hogg, C., Lucas, J., Mitchison, H. M., et al.** (2007). Primary ciliary dyskinesia: current state of the art. *Arch. Dis. Child.* **92**, 1136–40.
- Calarco-Gillam, P. D., Siebert, M. C., Hubble, R., Mitchison, T. and Kirschner, M.** (1983). Centrosome development in early mouse embryos as defined by an autoantibody against pericentriolar material. *Cell* **35**, 621–9.
- Callaini, G., Whitfield, W. G. F. and Riparbelli, M. G.** (1997). Centriole and Centrosome Dynamics during the Embryonic Cell Cycles That Follow the Formation of the Cellular Blastoderm in *Drosophila*. **190**, 183–190.
- Cao, Y., Park, A. and Sun, Z.** (2010). Intraflagellar transport proteins are essential for cilia formation and for planar cell polarity. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1326–33.
- Carbajal-González, B. I., Heuser, T., Fu, X., Lin, J., Smith, B. W., Mitchell, D. R. and Nicastro, D.** (2013). Conserved structural motifs in the central pair complex of eukaryotic flagella. *Cytoskeleton (Hoboken)*. **70**, 101–20.
- Cartwright, J. H. E., Piro, N., Piro, O. and Tuval, I.** (2007). Embryonic nodal flow and the dynamics of nodal vesicular parcels. *J R Soc Interface.* **4**, 49–55.
- Casey, D. M., Inaba, K., Pazour, G. J., Takada, S., Wakabayashi, K., Wilkerson, C. G., Kamiya, R. and Witman, G. B.** (2003). DC3 , the 21-kDa Subunit of the Outer Dynein Arm- Docking Complex (ODA-DC), Is a Novel EF-Hand Protein Important for Assembly of Both the Outer Arm and the ODA-DC. *Mol Biol Cell.* **14**, 3650–3663.
- Caspary, T., Larkins, C. E. and Anderson, K. V** (2007). The graded response to Sonic Hedgehog depends on cilia architecture. *Dev. Cell* **12**, 767–78.

- Castleman, V. H., Romio, L., Chodhari, R., Hirst, R. a, de Castro, S. C. P., Parker, K. a, Ybot-Gonzalez, P., Emes, R. D., Wilson, S. W., Wallis, C., et al.** (2009). Mutations in radial spoke head protein genes RSPH9 and RSPH4A cause primary ciliary dyskinesia with central-microtubular-pair abnormalities. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 197–209.
- Chen, J., Knowles, H. J., Hebert, J. L. and Hackett, B. P.** (1998). Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. *J. Clin. Invest.* **102**, 1077–82.
- Chen, N., Mah, A., Blacque, O. E., Chu, J., Phgora, K., Bakhoun, M. W., Newbury, C. R. H., Khattra, J., Chan, S., Go, A., et al.** (2006). Identification of ciliary and ciliopathy genes in *Caenorhabditis elegans* through comparative genomics. *Genome Biol.* **7**, R126.
- Chen, Y., Yue, S., Xie, L., Pu, X., Jin, T. and Cheng, S. Y.** (2011). Dual Phosphorylation of suppressor of fused (Sufu) by PKA and GSK3 β regulates its stability and localization in the primary cilium. *J. Biol. Chem.* **286**, 13502–11.
- Chien, A. J., Conrad, W. H. and Moon, R. T.** (2009). A Wnt survival guide: from flies to human disease. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 1614–27.
- Chih, B., Liu, P., Chinn, Y., Chalouni, C., Komuves, L. G., Hass, P. E., Sandoval, W. and Peterson, A. S.** (2012). A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain. *Nat. Cell Biol.* **14**, 61–72.
- Clement, D. L., Mally, S., Stock, C., Lethan, M., Satir, P., Schwab, A., Pedersen, S. F. and Christensen, S. T.** (2013). PDGFR α signaling in the primary cilium regulates NHE1-dependent fibroblast migration via coordinated differential activity of MEK1/2-ERK1/2-p90RSK and AKT signaling pathways. *J. Cell Sci.* **126**, 953–65.
- Colantonio, J. R., Bekker, J. M., Kim, S. J., Morrissey, K. M., Crosbie, R. H. and Hill, K. L.** (2006). Expanding the role of the dynein regulatory complex to non-axonemal functions: association of GAS11 with the Golgi apparatus. *Traffic* **7**, 538–48.
- Colantonio, J. R., Vermot, J., Wu, D., Langenbacher, A. D., Fraser, S., Chen, J.-N. and Hill, K. L.** (2009a). The dynein regulatory complex is required for ciliary motility and otolith biogenesis in the inner ear. *Nature* **457**, 205–9.
- Cole, D. G.** (2003). The intraflagellar transport machinery of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Traffic* **4**, 435–42.
- Cole, D. G., Diener, D. R., Himelblau, A. L., Beech, P. L., Fuster, J. C. and Rosenbaum, J. L.** (1998). *Chlamydomonas* kinesin-II-dependent Intraflagellar Transport (IFT): IFT Particles Contain Proteins Required for Ciliary Assembly in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons. **141**, 993–1008.
- Corbit, K. C., Shyer, A. E., Dowdle, W. E., Gaulden, J., Singla, V., Chen, M.-H., Chuang, P.-T. and Reiter, J. F.** (2008). Kif3a constrains beta-catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms. *Nat. Cell Biol.* **10**, 70–6.

- Craige, B., Tsao, C.-C., Diener, D. R., Hou, Y., Lechtreck, K.-F., Rosenbaum, J. L. and Witman, G. B.** (2010). CEP290 tethers flagellar transition zone microtubules to the membrane and regulates flagellar protein content. *J. Cell Biol.* **190**, 927–40.
- Dammermann, A. and Merdes, A.** (2002). Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *J. Cell Biol.* **159**, 255–66.
- Davis, R. E., Swiderski, R. E., Rahmouni, K., Nishimura, D. Y., Mullins, R. F., Agassandian, K., Philp, A. R., Searby, C. C., Andrews, M. P., Thompson, S., et al.** (2007). A knockin mouse model of the Bardet-Biedl syndrome 1 M390R mutation has cilia defects, ventriculomegaly, retinopathy, and obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19422–7.
- Dean, A. B. and Mitchell, D. R.** (2013). Chlamydomonas ODA10 is a conserved axonemal protein that plays a unique role in outer dynein arm assembly. *Mol. Biol. Cell* **24**, 3689–96.
- Deane, J. a, Cole, D. G., Seeley, E. S., Diener, D. R. and Rosenbaum, J. L.** (2001). Localization of intraflagellar transport protein IFT52 identifies basal body transitional fibers as the docking site for IFT particles. *Curr. Biol.* **11**, 1586–90.
- Delaval, B., Bright, A., Lawson, N. D. and Doxsey, S.** (2011). The cilia protein IFT88 is required for spindle orientation in mitosis. *Nat. Cell Biol.* **13**, 461–8.
- Delous, M., Hellman, N. E., Gaudé, H.-M., Silbermann, F., Le Bivic, A., Salomon, R., Antignac, C. and Saunier, S.** (2009). Nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are required for epithelial morphogenesis and associate with PALS1/PATJ and Par6. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4711–23.
- DiPetrillo, C. G. and Smith, E. F.** (2010). Pcdp1 is a central apparatus protein that binds Ca(2+)-calmodulin and regulates ciliary motility. *J. Cell Biol.* **189**, 601–12.
- Dishinger, J. F., Kee, H. L., Jenkins, P. M., Fan, S., Hurd, T. W., Hammond, J. W., Truong, Y. N.-T., Margolis, B., Martens, J. R. and Verhey, K. J.** (2010). Ciliary entry of the kinesin-2 motor KIF17 is regulated by importin-beta2 and RanGTP. *Nat. Cell Biol.* **12**, 703–10.
- Duquesnoy, P., Escudier, E., Vincensini, L., Freshour, J., Bridoux, A.-M., Coste, A., Deschildre, A., de Blic, J., Legendre, M., Montantin, G., et al.** (2009). Loss-of-function mutations in the human ortholog of Chlamydomonas reinhardtii ODA7 disrupt dynein arm assembly and cause primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* **85**, 890–6.
- Duriez, B., Duquesnoy, P., Escudier, E., Bridoux, A., Escalier, D., Rayet, I., Marcos, E., Vojtek, A., Bercher, J. and Amselem, S.** (2007). A common variant in combination with a nonsense mutation in a member of the thioredoxin family causes primary ciliary dyskinesia. **104**, 3336–41.
- Eberl, D. and Boekhoff-Falk, G.** (2007). Development of Johnston's organ in Drosophila. *Int J Dev Biol.* **51**, 679–687.

- Eberl, D. F., Hardy, R. W. and Kernan, M. J.** (2000). Genetically similar transduction mechanisms for touch and hearing in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **20**, 5981–8.
- Effertz, T., Wiek, R. and Göpfert, M. C.** (2011). NompC TRP channel is essential for *Drosophila* sound receptor function. *Curr. Biol.* **21**, 592–7.
- Engel, B. D., Ludington, W. B. and Marshall, W. F.** (2009). Intraflagellar transport particle size scales inversely with flagellar length: revisiting the balance-point length control model. *J. Cell Biol.* **187**, 81–9.
- Essner, J. J., Amack, J. D., Nyholm, M. K., Harris, E. B. and Yost, H. J.** (2005). Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development* **132**, 1247–60.
- Ezan, J. and Montcouquiol, M.** (2013). Revisiting planar cell polarity in the inner ear. *Semin. Cell Dev. Biol.* **24**, 499–506.
- Ezratty, E. J., Stokes, N., Chai, S., Shah, A. S., Williams, S. E. and Fuchs, E.** (2011). A role for the primary cilium in Notch signaling and epidermal differentiation during skin development. *Cell.* **145**, 1129–41.
- Fan, S., Fogg, V., Wang, Q., Chen, X.-W., Liu, C.-J. and Margolis, B.** (2007). A novel Crumbs3 isoform regulates cell division and ciliogenesis via importin beta interactions. *J. Cell Biol.* **178**, 387–98.
- Fan, S., Whiteman, E. L., Hurd, T. W., McIntyre, J. C., Dishinger, J. F., Liu, C. J., Martens, J. R., Verhey, K. J., Sajjan, U. and Margolis, B.** (2011). Induction of Ran GTP drives ciliogenesis. *Mol. Biol. Cell* **22**, 4539–48.
- Fawcett** (1954). The study of epithelial cilia and sperm flagella with the electron microscope. *Laryngoscope.* **64**, 557–67.
- Feistel, K. and Blum, M.** (2006). Three types of cilia including a novel 9+4 axoneme on the notochordal plate of the rabbit embryo. *Dev. Dyn.* **235**, 3348–58.
- Ferrante, M. I., Romio, L., Castro, S., Collins, J. E., Goulding, D. a, Stemple, D. L., Woolf, A. S. and Wilson, S. W.** (2009). Convergent extension movements and ciliary function are mediated by *ofd1*, a zebrafish orthologue of the human oral-facial-digital type 1 syndrome gene. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 289–303.
- Finetti, F., Paccani, S. R., Riparbelli, M. G., Giacomello, E., Perinetti, G., Pazour, G. J., Rosenbaum, J. L. and Baldari, C. T.** (2009). Intraflagellar transport is required for polarized recycling of the TCR/CD3 complex to the immune synapse. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1332–9.
- Fisch, C. and Dupuis-Williams, P.** (2011). Ultrastructure of cilia and flagella - back to the future! *Biol. Cell* **103**, 249–70.
- Francis, S. S., Sfakianos, J., Lo, B. and Mellman, I.** (2011). A hierarchy of signals regulates entry of membrane proteins into the ciliary membrane domain in epithelial cells. *J. Cell Biol.* **193**, 219–33.

- French, V. M., van de Laar, I. M. B. H., Wessels, M. W., Rohe, C., Roos-Hesselink, J. W., Wang, G., Frohn-Mulder, I. M. E., Severijnen, L.-A., de Graaf, B. M., Schot, R., et al.** (2012). NPHP4 variants are associated with pleiotropic heart malformations. *Circ. Res.* **110**, 1564–74.
- Gaillard, a R., Diener, D. R., Rosenbaum, J. L. and Sale, W. S.** (2001). Flagellar radial spoke protein 3 is an A-kinase anchoring protein (AKAP). *J. Cell Biol.* **153**, 443–8.
- Gajiwala, K. S., Chen, H., Cornille, F., Roques, B. P., Reith, W., Mach, B. and Burley, S. K.** (2000). Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding. *Nature* **403**, 916–21.
- Gao, B.** (2012). Wnt regulation of planar cell polarity (PCP). *Curr Top Dev Biol.* **101**, 263-95
- Gao, C., Wang, G., Amack, J. D. and Mitchell, D. R.** (2010). Oda16/Wdr69 is essential for axonemal dynein assembly and ciliary motility during zebrafish embryogenesis. **239**, 2190–2197.
- Garcia-Gonzalo, F. R., Corbit, K. C., Sirerol-Piquer, M. S., Ramaswami, G., Otto, E. a, Noriega, T. R., Seol, A. D., Robinson, J. F., Bennett, C. L., Josifova, D. J., et al.** (2011). A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nat. Genet.* **43**, 776–84.
- Gardner, L., O'Toole, E., Perrone, C., Giddings, T. and Porter, M.** (1994). Components of a “Dynein Regulatory Complex” Are Located at the Junction between the Radial Spokes and the Dynein Arms in Chlamydomonas flagella. *J Cell Biol.* **127**, 1311–1325.
- Geimer, S. and Melkonian, M.** (2004). The ultrastructure of the Chlamydomonas reinhardtii basal apparatus: identification of an early marker of radial asymmetry inherent in the basal body. *J. Cell Sci.* **117**, 2663–74.
- Gerdes, J. M., Liu, Y., Zaghoul, N. a, Leitch, C. C., Lawson, S. S., Kato, M., Beachy, P. a, Beales, P. L., DeMartino, G. N., Fisher, S., et al.** (2007). Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response. *Nat. Genet.* **39**, 1350–60.
- Ghosh, A. K., Hurd, T. and Hildebrandt, F.** (2012). 3D spheroid defects in NPHP knockdown cells are rescued by the somatostatin receptor agonist octreotide. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **303**, F1225–9.
- Ghossoub, R., Molla-Herman, A., Bastin, P. and Benmerah, A.** (2011). The ciliary pocket: a once-forgotten membrane domain at the base of cilia. *Biol. Cell* **103**, 131–44.
- Gilliam, J., Chang, J., Sandoval, I., Zhang, Y., Li, T., Pittler, S., Chiu, W. and Wensel, T.** (2012). Three-Dimensional Architecture of the Rod Sensory Cilium and Its Disruption in Retinal Neurodegeneration. *Cell.* **151**, 1029-41.
- Gong, Z., Son, W., Chung, Y. D., Kim, J., Shin, D. W., McClung, C. a, Lee, Y., Lee, H. W., Chang, D.-J., Kaang, B.-K., et al.** (2004). Two interdependent TRPV channel subunits, inactive and Nanchung, mediate hearing in Drosophila. *J. Neurosci.* **24**, 9059–66.

- Göpfert, M. C. and Robert, D.** (2003). Motion generation by *Drosophila* mechanosensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5514–9.
- Göpfert, M. C., Humphris, a D. L., Albert, J. T., Robert, D. and Hendrich, O.** (2005). Power gain exhibited by motile mechanosensory neurons in *Drosophila* ears. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 325–30.
- Graser, S., Stierhof, Y.-D., Lavoie, S. B., Gassner, O. S., Lamla, S., Le Clech, M. and Nigg, E. a** (2007). Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation. *J. Cell Biol.* **179**, 321–30.
- Gray, R. S., Roszko, I. and Solnica-Krezel, L.** (2011). Planar cell polarity: coordinating morphogenetic cell behaviors with embryonic polarity. *Dev. Cell* **21**, 120–33.
- Griffiths, G. M., Tsun, A. and Stinchcombe, J. C.** (2010). The immunological synapse: a focal point for endocytosis and exocytosis. *J. Cell Biol.* **189**, 399–406.
- Guichard, C., Harricane, M. C., Lafitte, J. J., Godard, P., Zaegel, M., Tack, V., Lalau, G. and Bouvagnet, P.** (2001). Axonemal dynein intermediate-chain gene (DNAI1) mutations result in situs inversus and primary ciliary dyskinesia (Kartagener syndrome). *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 1030–5.
- Guirao, B., Meunier, A., Mortaud, S., Aguilar, A., Corsi, J.-M., Strehl, L., Hirota, Y., Desoeuvre, A., Boutin, C., Han, Y.-G., et al.** (2010). Coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity orients mammalian motile cilia. *Nat. Cell Biol.* **12**, 341–50.
- Hagiwara, H., Kano, A., Aoki, T., Ohwada, N. and Takata, K.** (2000). Localization of gamma-tubulin to the basal foot associated with the basal body extending a cilium. *Histochem j* **Nov**, 669–71.
- Hamada, H., Meno, C., Watanabe, D. and Saijoh, Y.** (2002). Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 103–13.
- Han, Y., Kwok, B. H., Kernan, M. J., Brook, S. and York, N.** (2003). Intraflagellar Transport Is Required in *Drosophila* to Differentiate Sensory Cilia but Not Sperm State University of New York at Stony Brook. **13**, 1679–1686.
- Happé, H., de Heer, E. and Peters, D. J. M.** (2011a). Polycystic kidney disease: the complexity of planar cell polarity and signaling during tissue regeneration and cyst formation. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**, 1249–55.
- Happé, H., de Heer, E. and Peters, D. J. M.** (2011b). Polycystic kidney disease: the complexity of planar cell polarity and signaling during tissue regeneration and cyst formation. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**, 1249–55.
- Harris, P. and Torres, V.** (2009). Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease : The last 3 years. *Kidney Int.* **76**, 149–68.

- Heuser, T., Raytchev, M., Krell, J., Porter, M. E. and Nicastro, D.** (2009). The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella. *J. Cell Biol.* **187**, 921–933.
- Hilton, L. K., Gunawardane, K., Kim, J. W., Schwarz, M. C. and Quarmby, L. M.** (2013). The kinases LF4 and CNK2 control ciliary length by feedback regulation of assembly and disassembly rates. *Curr. Biol.* **23**, 2208–14.
- Hjeij, R., Lindstrand, A., Francis, R., Zariwala, M. a, Liu, X., Li, Y., Damerla, R., Dougherty, G. W., Abouhamed, M., Olbrich, H., et al.** (2013). ARMC4 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Randomization of Left/Right Body Asymmetry. *Am. J. Hum. Genet.* 357–367.
- Hojo, M., Takashima, S., Kobayashi, D., Sumeragi, A., Shimada, A., Tsukahara, T., Yokoi, H., Narita, T., Jindo, T., Kage, T., et al.** (2007). Right-elevated expression of charon is regulated by fluid flow in medaka Kupffer ' s vesicle. *Dev Growth Differ.* **49**, 395–405.
- Horani, A., Druley, T. E., Zariwala, M. a, Patel, A. C., Levinson, B. T., Van Arendonk, L. G., Thornton, K. C., Giacalone, J. C., Albee, A. J., Wilson, K. S., et al.** (2012). Whole-exome capture and sequencing identifies HEATR2 mutation as a cause of primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* **91**, 685–93.
- Horani, A., Brody, S. L., Ferkol, T. W., Shoseyov, D., Wasserman, M. G., Ta-Shma, A., Wilson, K. S., Bayly, P. V, Amirav, I., Cohen-Cymberknoh, M., et al.** (2013a). CCDC65 Mutation Causes Primary Ciliary Dyskinesia with Normal Ultrastructure and Hyperkinetic Cilia. *PLoS One* **8**, e72299.
- Horani, A., Ferkol, T. W., Shoseyov, D., Wasserman, M. G., Oren, Y. S., Kerem, B., Amirav, I., Cohen-Cymberknoh, M., Dutcher, S. K., Brody, S. L., et al.** (2013b). LRRC6 Mutation Causes Primary Ciliary Dyskinesia with Dynein Arm Defects. *PLoS One* **8**, e59436.
- Hornef, N., Olbrich, H., Horvath, J., Zariwala, M. a, Fliegauf, M., Loges, N. T., Wildhaber, J., Noone, P. G., Kennedy, M., Antonarakis, S. E., et al.** (2006). DNAH5 mutations are a common cause of primary ciliary dyskinesia with outer dynein arm defects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **174**, 120–6.
- Hou, Y., Qin, H., Follit, J. a, Pazour, G. J., Rosenbaum, J. L. and Witman, G. B.** (2007). Functional analysis of an individual IFT protein: IFT46 is required for transport of outer dynein arms into flagella. *J. Cell Biol.* **176**, 653–65.
- Hozumi, A., Satouh, Y., Makino, Y., Toda, T., Ide, H., Ogawa, K., King, S. and Inaba, K.** (2006). Molecular characterization of Ciona sperm outer arm dynein reveals multiple components related to outer arm docking complex protein 2. *Cell Motil. Cytoskeleton* **63**, 591-603.
- Hu, Q., Milenkovic, L., Jin, H., Scott, M. P., Nachury, M. V, Spiliotis, E. T. and Nelson, W. J.** (2010). A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. *Science* **329**, 436–9.

- Huang, P. and Schier, A. F.** (2009). Dampened Hedgehog signaling but normal Wnt signaling in zebrafish without cilia. *Development* **136**, 3089–98.
- Huang, T., You, Y., Spoor, M. S., Richer, E. J., Kudva, V. V., Paige, R. C., Seiler, M. P., Liebler, J. M., Zabner, J., Plopper, C. G., et al.** (2003). Foxj1 is required for apical localization of ezrin in airway epithelial cells. *J. Cell Sci.* **116**, 4935–45.
- Huang, J., Zhou, W., Watson, A. M., Jan, Y.-N. and Hong, Y.** (2008). Efficient ends-out gene targeting in *Drosophila*. *Genetics* **180**, 703–7.
- Huangfu, D. and Anderson, K. V** (2005). Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11325–30.
- Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A. S. and Murcia, N. S.** (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. **426**, 83–87.
- Ingham, P. W. and McMahon, a P.** (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* **15**, 3059–87.
- Insinna, C., Pathak, N., Perkins, B., Drummond, I. and Besharse, J. C.** (2008). The homodimeric kinesin, Kif17, is essential for vertebrate photoreceptor sensory outer segment development. *Dev. Biol.* **316**, 160–70.
- Insinna, C., Luby-Phelps, K., Link, B. a and Besharse, J. C.** (2009). Analysis of IFT kinesins in developing zebrafish cone photoreceptor sensory cilia. *Methods Cell Biol.* **93**, 219–34.
- Ishikawa, H. and Marshall, W. F.** (2011). Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 222–34.
- Ishikawa, H. and Marshall, W. F.** (2013). Isolation of Mammalian primary cilia. *Methods Enzymol.* **525**, 311–25.
- Janich, P. and Corbeil, D.** (2007). GM1 and GM3 gangliosides highlight distinct lipid microdomains within the apical domain of epithelial cells. *FEBS Lett.* **581**, 1783–7.
- Jauregui, A. R., Nguyen, K. C. Q., Hall, D. H. and Barr, M. M.** (2008). The *Caenorhabditis elegans* nephrocystins act as global modifiers of cilium structure. *J. Cell Biol.* **180**, 973–88.
- Jékely G, A. D.** (2006). Evolution of intraflagellar transport from coated vesicles and autogenous origin of the eukaryotic cilium. *Bioessays.* **28**, 191–8.
- Jerber, J., Baas, D., Soulavie, F., Chhin, B., Cortier, E., Vesque, C., Thomas, J. and Durand, B.** (2014). The coiled-coil domain containing protein CCDC151 is required for the function of IFT-dependent motile cilia in animals. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 563–77.
- Jiang, S.-T., Chiou, Y.-Y., Wang, E., Chien, Y.-L., Ho, H.-H., Tsai, F.-J., Lin, C.-Y., Tsai, S.-P. and Li, H.** (2009). Essential role of nephrocystin in photoreceptor intraflagellar transport in mouse. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 1566–77.

- Jonassen, J. a, San Agustin, J., Follit, J. a and Pazour, G. J.** (2008). Deletion of IFT20 in the mouse kidney causes misorientation of the mitotic spindle and cystic kidney disease. *J. Cell Biol.* **183**, 377–84.
- Jonassen, J. a, SanAgustin, J., Baker, S. P. and Pazour, G. J.** (2012). Disruption of IFT complex A causes cystic kidneys without mitotic spindle misorientation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 641–51.
- Jones, C., Roper, V. C., Foucher, I., Qian, D., Banizs, B., Petit, C., Yoder, B. K. and Chen, P.** (2008). Ciliary proteins link basal body polarization to planar cell polarity regulation. *Nat. Genet.* **40**, 69–77.
- Julkowska, D. and Bastin, P.** (2009). Tools for analyzing intraflagellar transport in trypanosomes. *Methods Cell Biol.* **93**, 59–80.
- Jun Yang, Jiangang Gao, Michael Adamian, Xiao-Hong Wen, Basil Pawlyk, Luo Zhang, Michael J. Sanderson, J. and Zuo, C. L. M. and T. L.** (2005). The Ciliary Rootlet Maintains Long-Term Stability of Sensory Cilia. *Mol. Cell. Biol.*
- Kaneshiro, E. S.** (1987). Lipids of Paramecium. *J. Lipid Res.* **28**, 1241–58.
- Karner, C. M., Chirumamilla, R., Aoki, S., Igarashi, P., Wallingford, J. B. and Carroll, T. J.** (2009). Wnt9b signaling regulates planar cell polarity and kidney tubule morphogenesis. *Nat. Genet.* **41**, 793–9.
- Kavlie, R. G., Kernan, M. J. and Eberl, D. F.** (2010). Hearing in *Drosophila* requires TilB, a conserved protein associated with ciliary motility. *Genetics* **185**, 177–88.
- Kee, H. L., Dishinger, J. F., Blasius, T. L., Liu, C.-J., Margolis, B. and Verhey, K. J.** (2012). A size-exclusion permeability barrier and nucleoporins characterize a ciliary pore complex that regulates transport into cilia. *Nat. Cell Biol.* **14**, 431–7.
- Keller, L. C., Romijn, E. P., Zamora, I., Yates, J. R. and Marshall, W. F.** (2005). Proteomic analysis of isolated chlamydomonas centrioles reveals orthologs of ciliary-disease genes. *Curr. Biol.* **15**, 1090–8.
- Kim, J., Chung, Y. D., Park, D.-Y., Choi, S., Shin, D. W., Soh, H., Lee, H. W., Son, W., Yim, J., Park, C.-S., et al.** (2003). A TRPV family ion channel required for hearing in *Drosophila*. *Nature* **424**, 81–4.
- Kim, J. C., Badano, J. L., Sibold, S., Esmail, M. a, Hill, J., Hoskins, B. E., Leitch, C. C., Venner, K., Ansley, S. J., Ross, A. J., et al.** (2004). The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nat. Genet.* **36**, 462–70.
- Kishimoto, N., Cao, Y., Park, A. and Sun, Z.** (2008). Cystic kidney gene seahorse regulates cilia-mediated processes and Wnt pathways. *Dev. Cell* **14**, 954–61.
- Knödler, A., Feng, S., Zhang, J., Zhang, X., Das, A., Peränen, J. and Guo, W.** (2010). Coordination of Rab8 and Rab11 in primary ciliogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 6346–51.

- Knowles, M. R., Leigh, M. W., Carson, J. L., Davis, S. D., Sharon, D., Ferkol, T. W., Olivier, K. N., Sagel, S. D., Rosenfeld, M., Burns, K. A., et al.** (2011). Mutations of DNAH11 in Primary Ciliary Dyskinesia Patients with Normal Ciliary Ultrastructure. *67*, 433–441.
- Knowles, M. R., Leigh, M. W., Ostrowski, L. E., Huang, L., Carson, J. L., Hazucha, M. J., Yin, W., Berg, J. S., Davis, S. D., Dell, S. D., et al.** (2013a). Exome sequencing identifies mutations in CCDC114 as a cause of primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* **92**, 99–106.
- Knowles, M. R., Ostrowski, L. E., Loges, N. T., Hurd, T., Leigh, M. W., Huang, L., Wolf, W. E., Carson, J. L., Hazucha, M. J., Yin, W., et al.** (2013b). Mutations in SPAG1 Cause Primary Ciliary Dyskinesia Associated with Defective Outer and Inner Dynein Arms. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 711–20.
- Kobayashi, T. and Dynlacht, B. D.** (2011). Regulating the transition from centriole to basal body. *J. Cell Biol.* **193**, 435–44.
- Kobayashi, N. and Hirokawa, N.** (1988). Cytoskeletal architecture and immunocytochemical localization of fodrin in the terminal web of the ciliated epithelial cell. *Cell Motil. Cytoskeleton.* **88**, 167–77.
- Kobayashi, D. and Takeda, H.** (2012). Ciliary motility: the components and cytoplasmic preassembly mechanisms of the axonemal dyneins. *Differentiation.* **83**, S23–9.
- Kodani, A., Salomé Sirerol-Piquer, M., Seol, A., Garcia-Verdugo, J. M. and Reiter, J. F.** (2013). Kif3a interacts with Dynactin subunit p150 Glued to organize centriole subdistal appendages. *EMBO J.* **32**, 597–607.
- Kohl, L., Robinson, D. and Bastin, P.** (2003). Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *EMBO J.* **22**, 5336–46.
- Kott, E., Duquesnoy, P., Copin, B., Legendre, M., Dastot-Le Moal, F., Montantin, G., Jeanson, L., Tamalet, A., Papon, J.-F., Siffroi, J.-P., et al.** (2012). Loss-of-function mutations in LRRC6, a gene essential for proper axonemal assembly of inner and outer dynein arms, cause primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* **91**, 958–64.
- Kott, E., Legendre, M., Copin, B., Papon, J.-F., Dastot-Le Moal, F., Montantin, G., Duquesnoy, P., Piterboth, W., Amram, D., Bassinet, L., et al.** (2013). Loss-of-Function Mutations in RSPH1 Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Central-Complex and Radial-Spoke Defects. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 561–70.
- Koutoulis, A., Pazour, G., Wilkerson, C., Inaba, K., Sheng, H., Takada, S. and Witman, G.** (1997). The Chlamydomonas reinhardtii ODA3 Gene Encodes a Protein of the Outer Dynein Arm Docking Complex. **137**, 1069–1080.
- Kozminski, K. G., Johnson, K. a, Forscher, P. and Rosenbaum, J. L.** (1993). A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 5519–23.

- Kozminski, K. G., Beech, P. L. and Rosenbaum, J. L.** (1995). The Chlamydomonas kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane. *J. Cell Biol.* **131**, 1517–27.
- Kramer-Zucker, A. G., Olale, F., Haycraft, C. J., Yoder, B. K., Schier, A. F. and Drummond, I. a** (2005). Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. *Development* **132**, 1907–21.
- Kunimoto, K., Yamazaki, Y., Nishida, T., Shinohara, K., Ishikawa, H., Hasegawa, T., Okanou, T., Hamada, H., Noda, T., Tamura, A., et al.** (2012). Coordinated ciliary beating requires Odf2-mediated polarization of basal bodies via basal feet. *Cell* **148**, 189–200.
- Lal, M., Song, X., Pluznick, J. L., Di Giovanni, V., Merrick, D. M., Rosenblum, N. D., Chauvet, V., Gottardi, C. J., Pei, Y. and Caplan, M. J.** (2008). Polycystin-1 C-terminal tail associates with beta-catenin and inhibits canonical Wnt signaling. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3105–17.
- Lancaster, M. a, Louie, C. M., Silhavy, J. L., Sintasath, L., Decambre, M., Nigam, S. K., Willert, K. and Gleeson, J. G.** (2009). Impaired Wnt-beta-catenin signaling disrupts adult renal homeostasis and leads to cystic kidney ciliopathy. *Nat. Med.* **15**, 1046–54.
- Lancaster, M. a, Schroth, J. and Gleeson, J. G.** (2011). Subcellular spatial regulation of canonical Wnt signalling at the primary cilium. *Nat. Cell Biol.* **13**, 700–7.
- Laurençon, A., Dubruille, R., Efimenko, E., Grenier, G., Bissett, R., Cortier, E., Rolland, V., Swoboda, P. and Durand, B.** (2007). Identification of novel regulatory factor X (RFX) target genes by comparative genomics in Drosophila species. *Genome Biol.* **8**, R195.
- Lee, E., Sivan-Loukianova, E., Eberl, D. F. and Kernan, M. J.** (2008). An IFT-A protein is required to delimit functionally distinct zones in mechanosensory cilia. *Curr. Biol.* **18**, 1899–906.
- Lee, J., Moon, S., Cha, Y. and Chung, Y. D.** (2010). Drosophila TRPN(=NOMPC) channel localizes to the distal end of mechanosensory cilia. *PLoS One* **5**, e11012.
- Leigh, M. W., Pittman, J. E., Carson, J. L., Thomas, W., Dell, S. D., Davis, S. D., Knowles, M. R. and Zariwala, M. A.** (2009). Clinical and Genetic Aspects of Primary Ciliary Dyskinesia / Kartagener Syndrome. **11**, 473–487.
- Li, Y., Santoso, N. G., Yu, S., Woodward, O. M., Qian, F. and Guggino, W. B.** (2009). Polycystin-1 interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to modulate intracellular Ca²⁺ signaling with implications for polycystic kidney disease. *J. Biol. Chem.* **284**, 36431–41.
- Lin, J., Tritschler, D., Song, K., Barber, C. F., Cobb, J. S., Porter, M. E. and Nicastro, D.** (2011). Building blocks of the nexin-dynein regulatory complex in Chlamydomonas flagella. *J. Biol. Chem.* **286**, 29175–91.

- Lindemann, C. B., Macauley, L. J. and Lesich, K. a** (2005). The counterbend phenomenon in dynein-disabled rat sperm flagella and what it reveals about the interdoubt elasticity. *Biophys. J.* **89**, 1165–74.
- Liu, A., Wang, B. and Niswander, L. a** (2005). Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Development* **132**, 3103–11.
- Loges, N. T., Olbrich, H., Fenske, L., Mussaffi, H., Horvath, J., Fliegauf, M., Kuhl, H., Baktai, G., Peterffy, E., Chodhari, R., et al.** (2008). DNAI2 mutations cause primary ciliary dyskinesia with defects in the outer dynein arm. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 547–58.
- Loges, N. T., Olbrich, H., Becker-Heck, A., Häffner, K., Heer, A., Reinhard, C., Schmidts, M., Kispert, A., Zariwala, M. a, Leigh, M. W., et al.** (2009). Deletions and point mutations of LRRC50 cause primary ciliary dyskinesia due to dynein arm defects. *Am. J. Hum. Genet.* **85**, 883–9.
- Low, S. H., Vasanth, S., Larson, C. H., Mukherjee, S., Sharma, N., Kinter, M. T., Kane, M. E., Obara, T. and Weimbs, T.** (2006). Polycystin-1, STAT6, and P100 function in a pathway that transduces ciliary mechanosensation and is activated in polycystic kidney disease. *Dev. Cell* **10**, 57–69.
- Ludington, W. B., Wemmer, K. a, Lechtreck, K. F., Witman, G. B. and Marshall, W. F.** (2013). Avalanche-like behavior in ciliary import. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 3925–30.
- Luyten, A., Su, X., Gondela, S., Chen, Y., Rompani, S., Takakura, A. and Zhou, J.** (2010). Aberrant regulation of planar cell polarity in polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1521–32.
- Maggert, K., Gong, W. and Golic, K.** (2008). Methods for homologous recombination in *Drosophila*. *methods Mol. Biol.* **420**, 155–74.
- Manton, I. and Clarke, B.** (1952). Electron microscope observations on the spermatozoid of *Fucus*. *Nature.* **9**, 973-4.
- Marcet, B., Chevalier, B., Luxardi, G., Coraux, C., Zaragosi, L-E., Cibois, M., Robbe-Sermesant, K., Jolly, T., Cardinaud, B., Moreilhon, C., et al.** (2011). Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat. Cell Biol.* **13**, 693–9.
- Marshall, W. F. and Nonaka, S.** (2006). Cilia: tuning in to the cell’s antenna. *Curr. Biol.* **16**, R604–14.
- Marshall, W. F., Qin, H., Brenni, R. and Rosenbaum, J. L.** (2005). Flagellar Length Control System: Testing a Simple Model Based on Intraflagellar Transport and Turnover. **16**, 270–278.
- Mazet, F., Yu, J.-K., Liberles, D. a., Holland, L. Z. and Shimeld, S. M.** (2003). Phylogenetic relationships of the Fox (Forkhead) gene family in the Bilateria. *Gene.* **316**, 79–89.

- Mazor, M., Alkrinawi, S., Chalifa-Caspi, V., Manor, E., Sheffield, V. C., Aviram, M. and Parvari, R.** (2011). Primary ciliary dyskinesia caused by homozygous mutation in DNAL1, encoding dynein light chain 1. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 599–607.
- McDermott, K. M., Liu, B. Y., Tlsty, T. D. and Pazour, G. J.** (2010). Primary cilia regulate branching morphogenesis during mammary gland development. *Curr. Biol.* **20**, 731–7.
- McIntyre, J. C., Davis, E. E., Joiner, A., Williams, C. L., Tsai, I.-C., Jenkins, P. M., McEwen, D. P., Zhang, L., Escobado, J., Thomas, S., et al.** (2012). Gene therapy rescues cilia defects and restores olfactory function in a mammalian ciliopathy model. *Nat. Med.* **18**, 1423–8.
- McIntyre, J. C., Williams, C. L. and Martens, J. R.** (2013). Smelling the roses and seeing the light: gene therapy for ciliopathies. *Trends Biotechnol.* **31**, 355–63.
- McNeill, H.** (2009). Planar cell polarity and the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 2104–11.
- McNeill, H.** (2010). Planar cell polarity: keeping hairs straight is not so simple. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a003376.
- Merveille, A.-C., Davis, E. E., Becker-Heck, A., Legendre, M., Amirav, I., Bataille, G., Belmont, J., Beydon, N., Billen, F., Clément, A., et al.** (2011). CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs. *Nat. Genet.* **43**, 72–8.
- Mitchison, H. M., Schmidts, M., Loges, N. T., Freshour, J., Dritsoula, A., Hirst, R. a, O’Callaghan, C., Blau, H., Al Dabbagh, M., Olbrich, H., et al.** (2012). Mutations in axonemal dynein assembly factor DNAAF3 cause primary ciliary dyskinesia. *Nat. Genet.* **44**, 381–9, S1–2.
- Mohan, S., Timbers, T. a, Kennedy, J., Blacque, O. E. and Leroux, M. R.** (2013). Striated rootlet and nonfilamentous forms of rootletin maintain ciliary function. *Curr. Biol.* **23**, 2016–22.
- Mohr, D., Frey, S., Fischer, T., Güttler, T. and Görlich, D.** (2009). Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes. *EMBO J.* **28**, 2541–53.
- Mohri, H., Inaba, K., Ishijima, S. and Baba, S. a.** (2012). Tubulin-dynein system in flagellar and ciliary movement. *Proc. Japan Acad. Ser. B* **88**, 397–415.
- Mollet, G., Silbermann, F., Delous, M., Salomon, R., Antignac, C. and Saunier, S.** (2005). Characterization of the nephrocystin/nephrocystin-4 complex and subcellular localization of nephrocystin-4 to primary cilia and centrosomes. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 645–56.
- Montcouquiol, M., Rachel, R. a, Lanford, P. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. a and Kelley, M. W.** (2003). Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature* **423**, 173–7.
- Moore, D. J., Onoufriadis, A., Shoemark, A., Simpson, M. a, Zur Lage, P. I., de Castro, S. C., Bartoloni, L., Gallone, G., Petridi, S., Woollard, W. J., et al.** (2013). Mutations

- in ZMYND10, a Gene Essential for Proper Axonemal Assembly of Inner and Outer Dynein Arms in Humans and Flies, Cause Primary Ciliary Dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 346-56.
- Murga-Zamalloa, C. a, Atkins, S. J., Peranen, J., Swaroop, A. and Khanna, H.** (2010). Interaction of retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) with RAB8A GTPase: implications for cilia dysfunction and photoreceptor degeneration. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 3591–8.
- Myktyyn, K., Mullins, R. F., Andrews, M., Chiang, A. P., Swiderski, R. E., Yang, B., Braun, T., Casavant, T., Stone, E. M. and Sheffield, V. C.** (2004). Bardet-Biedl syndrome type 4 (BBS-4)-null mice implicate Bbs4 in flagella formation but not global cilia assembly. **101**, 8664-9.
- Nachury, M. V, Loktev, A. V, Zhang, Q., Westlake, C. J., Peränen, J., Merdes, A., Slusarski, D. C., Scheller, R. H., Bazan, J. F., Sheffield, V. C., et al.** (2007). A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell.* **129**, 1201–13.
- Nachury, M. V, Seeley, E. S. and Jin, H.** (2010). Trafficking to the ciliary membrane: how to get across the periciliary diffusion barrier? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 59–87.
- Nadrowski, B., Albert, J. T. and Göpfert, M. C.** (2008). Transducer-based force generation explains active process in Drosophila hearing. *Curr. Biol.* **18**, 1365–72.
- Nauli, S. M., Alenghat, F. J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A. E. H., Lu, W., Brown, E. M., Quinn, S. J., et al.** (2003). Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat. Genet.* **33**, 129–37.
- Nicastro, D., McIntosh, J. R. and Baumeister, W.** (2005). 3D structure of eukaryotic flagella in a quiescent state revealed by cryo-electron tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 15889–94.
- Nigg, E. a and Stearns, T.** (2011). The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1154–60.
- Nishimura, D. Y., Fath, M., Mullins, R. F., Searby, C., Andrews, M., Davis, R., Andorf, J. L., Myktyyn, K., Swiderski, R. E., Yang, B., et al.** (2004). Bbs2-null mice have neurosensory deficits, a defect in social dominance, and retinopathy associated with mislocalization of rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 16588–93.
- Nishimura, N., Araki, K., Shinahara, W., Nakano, Y., Nishimura, K., Higashio, H. and Sasaki, T.** (2008). Interaction of Rab3B with microtubule-binding protein Gas8 in NIH 3T3 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **474**, 136–42.
- Niwa, S., Nakajima, K., Miki, H., Minato, Y., Wang, D. and Hirokawa, N.** (2012). KIF19A is a microtubule-depolymerizing kinesin for ciliary length control. *Dev. Cell.* **23**, 1167–75.
- Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, a, Kanai, Y., Kido, M. and Hirokawa, N.** (1998). Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia

- generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell*. **95**, 829–37.
- Norris, D. P. and Grimes, D. T.** (2012). Mouse models of ciliopathies: the state of the art. *Dis. Model. Mech.* **5**, 299–312.
- O'Hagan, R., Piasecki, B. P., Silva, M., Phirke, P., Nguyen, K. C. Q., Hall, D. H., Swoboda, P. and Barr, M. M.** (2011). The tubulin deglutamylase CCPP-1 regulates the function and stability of sensory cilia in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **21**, 1685–94.
- O'Toole, E. T., McDonald, K. L., Mäntler, J., McIntosh, J. R., Hyman, A. a and Müller-Reichert, T.** (2003). Morphologically distinct microtubule ends in the mitotic centrosome of *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **163**, 451–6.
- Ocbina, P. J. R., Tuson, M. and Anderson, K. V** (2009). Primary cilia are not required for normal canonical Wnt signaling in the mouse embryo. *PLoS One* **4**, e6839.
- Oda, T., Yagi, T., Yanagisawa, H. and Kikkawa, M.** (2013). Identification of the Outer-Inner Dynein Linker as a Hub Controller for Axonemal Dynein Activities. *Curr. Biol.* **23**, 656–664.
- Okada, Y., Nonaka, S., Tanaka, Y., Saijoh, Y., Hamada, H. and Hirokawa, N.** (1999). Abnormal nodal flow precedes situs inversus in *iv* and *inv* mice. *Mol. Cell*. **4**, 459–68.
- Okada, Y., Takeda, S., Tanaka, Y., Izpisua Belmonte, J.-C. and Hirokawa, N.** (2005). Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. *Cell*. **121**, 633–44.
- Olbrich, H., Häffner, K., Kispert, A., Völkel, A., Volz, A., Sasmaz, G., Reinhardt, R., Hennig, S., Lehrach, H., Konietzko, N., et al.** (2002). Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. *Nat. Genet.* **30**, 143–4.
- Olbrich, H., Schmidts, M., Werner, C., Onoufriadis, A., Loges, N. T., Raidt, J., Banki, N. F., Shoemark, A., Burgoyne, T., Al Turki, S., et al.** (2012). Recessive HYDIN mutations cause primary ciliary dyskinesia without randomization of left-right body asymmetry. *Am. J. Hum. Genet.* **91**, 672–84.
- Olsan, E. E., Mukherjee, S., Wulkersdorfer, B., Shillingford, J. M., Giovannone, A. J., Todorov, G., Song, X., Pei, Y. and Weimbs, T.** (2011). Signal transducer and activator of transcription-6 (STAT6) inhibition suppresses renal cyst growth in polycystic kidney disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 18067–72.
- Omoto, C., Yagi, T., Kurimoto, E. and Kamiya, R.** (1996). Ability of paralyzed flagella mutants of *Chlamydomonas* to move. *Cell Motil. Cytoskeleton* **33**, 88–9.
- Omran, H., Häffner, K., Völkel, a, Kuehr, J., Ketelsen, U. P., Ross, U. H., Konietzko, N., Wienker, T., Brandis, M. and Hildebrandt, F.** (2000). Homozygosity mapping of a gene locus for primary ciliary dyskinesia on chromosome 5p and identification of the heavy dynein chain DNAH5 as a candidate gene. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **23**, 696–702.

- Omran, H., Kobayashi, D., Olbrich, H., Tsukahara, T., Loges, N. T., Hagiwara, H., Zhang, Q., Leblond, G., O'Toole, E., Hara, C., et al. (2008).** Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature*. **456**, 611–6.
- Onoufriadis, A., Paff, T., Antony, D., Shoemark, A., Micha, D., Kuyt, B., Schmidts, M., Petridi, S., Dankert-Roelse, J. E., Haarman, E. G., et al. (2013).** Splice-site mutations in the axonemal outer dynein arm docking complex gene *CCDC114* cause primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* **92**, 88–98.
- Onoufriadis, A., Shoemark, A., Munye, M. M., James, C. T., Schmidts, M., Patel, M., Rosser, E. M., Bacchelli, C., Beales, P. L., Scambler, P. J., et al. (2014).** Combined exome and whole-genome sequencing identifies mutations in *ARMC4* as a cause of primary ciliary dyskinesia with defects in the outer dynein arm. *J. Med. Genet.* **51**, 61–7.
- Otto, E. a, Schermer, B., Obara, T., O'Toole, J. F., Hiller, K. S., Mueller, A. M., Ruf, R. G., Hoefe, J., Beekmann, F., Landau, D., et al. (2003).** 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.* **34**, 413–20.
- Ou, Y. and Rattner, J. B. (2004).** The centrosome in higher organisms: structure, composition, and duplication. *Int. Rev. Cytol.* **238**, 119–82.
- Ou, G., Blacque, O. E., Snow, J. J., Leroux, M. R. and Scholey, J. M. (2005).** Functional coordination of intraflagellar transport motors. *Nature* **436**, 583–7.
- Ou, G., Koga, M., Blacque, O. E., Murayama, T., Ohshima, Y., Schafer, J. C., Li, C., Yoder, B. K., Leroux, M. R. and Scholey, J. M. (2007).** Sensory Ciliogenesis in *Caenorhabditis elegans* : Assignment of IFT Components into Distinct Modules Based on Transport and Phenotypic Profiles. **18**, 1554–1569.
- Paintrand, M., Delacroix, H., Bornens, M. and Moudjou, M. (1992).** Centrosome Organization Their Sensitivity and Centriole Architecture : to Divalent Cations. **128**, 107–128.
- Panizzi, J. R., Becker-Heck, A., Castleman, V. H., Al-Mutairi, D. a, Liu, Y., Loges, N. T., Pathak, N., Austin-Tse, C., Sheridan, E., Schmidts, M., et al. (2012).** *CCDC103* mutations cause primary ciliary dyskinesia by disrupting assembly of ciliary dynein arms. *Nat. Genet.* **44**, 714–9.
- Papermaster, D. S., Schneider, B. G., DeFoe, D. and Besharse, J. C. (1986).** Biosynthesis and vectorial transport of opsin on vesicles in retinal rod photoreceptors. *J. Histochem. Cytochem.* **34**, 5–16.
- Patel, V., Li, L., Cobo-Stark, P., Shao, X., Somlo, S., Lin, F. and Igarashi, P. (2008).** Acute kidney injury and aberrant planar cell polarity induce cyst formation in mice lacking renal cilia. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1578–90.
- Pathak, N., Obara, T., Mangos, S., Liu, Y. and Drummond, I. A. (2007).** The Zebrafish *flee* Gene Encodes an Essential Regulator of Cilia Tubulin Polyglutamylation. **18**, 4353–4364.

- Patzke, S., Redick, S., Warsame, A., Murga-zamalloa, C. A., Khanna, H., Doxsey, S., Stokke, T. and Arbor, A. (2010).** CSPP Is a Ciliary Protein Interacting with Nephrocystin 8 and Required for Cilia Formation. *21*, 2555–2567.
- Pazour, G. J., Dickert, B. L., Vucica, Y., Seeley, E. S., Rosenbaum, J. L., Witman, G. B. and Cole, D. G. (2000a).** Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *J. Cell Biol.* **151**, 709–18.
- Pazour, G. J., Dickert, B. L., Vucica, Y., Seeley, E. S., Rosenbaum, J. L., Witman, G. B. and Cole, D. G. (2000b).** Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *J. Cell Biol.* **151**, 709–18.
- Pazour, G. J., Agrin, N., Leszyk, J. and Witman, G. B. (2005).** Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *J. Cell Biol.* **170**, 103–13.
- Pedersen, L. B. and Rosenbaum, J. L. (2008).** *Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling.* *Curr Top Dev Biol.* **85**, 23–61.
- Pedersen, L. B., Geimer, S. and Rosenbaum, J. L. (2006).** Dissecting the molecular mechanisms of intraflagellar transport in chlamydomonas. *Curr. Biol.* **16**, 450–9.
- Pedersen, L. B., Veland, I. R., Schröder, J. M. and Christensen, S. T. (2008).** Assembly of primary cilia. *Dev. Dyn.* **237**, 1993–2006.
- Pennarun, G., Escudier, E., Chapelin, C., Bridoux, a M., Cacheux, V., Roger, G., Clément, a, Goossens, M., Amselem, S. and Duriez, B. (1999).** Loss-of-function mutations in a human gene related to Chlamydomonas reinhardtii dynein IC78 result in primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 1508–19.
- Pennekamp, P., Karcher, C., Fischer, A., Schweickert, A., Skryabin, B., Horst, J., Blum, M. and Dworniczak, B. (2002).** The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice. *Curr. Biol.* **12**, 938–43.
- Phirke, P., Efimenko, E., Mohan, S., Burghoorn, J., Crona, F., Bakhoun, M. W., Trieb, M., Schuske, K., Jorgensen, E. M., Piasecki, B. P., et al. (2011).** Transcriptional profiling of C. elegans DAF-19 uncovers a ciliary base-associated protein and a CDK/CCRK/LF2p-related kinase required for intraflagellar transport. *Dev. Biol.* **357**, 235–47.
- Pifferi, S., Menini, A. and Kurahashi, T. (2008).** Signal Transduction in Vertebrate Olfactory Cilia. *The neurobiology of olfaction.* **Chapter 8**.
- Pifferi, M., Michelucci, A., Conidi, M., Cangiotti, A., Simi, P., Macchia, P. and Boner, A. (2010).** New DNAH11 mutations in primary ciliary dyskinesia with normal axonemal ultrastructure. *Eur. Respir. J.* **35**, 1411–3.
- Pigino, G., Bui, K. H., Maheshwari, A., Lupetti, P., Diener, D. and Ishikawa, T. (2011).** Cryoelectron tomography of radial spokes in cilia and flagella. *J. Cell Biol.* **195**, 673–87.

- Pigino, G., Maheshwari, A., Bui, K. H., Shingyoji, C., Kamimura, S. and Ishikawa, T.** (2012). Comparative structural analysis of eukaryotic flagella and cilia from *Chlamydomonas*, *Tetrahymena*, and sea urchins. *J. Struct. Biol.* **178**, 199–206.
- Piperno, G.** (1990). Functional diversity of dyneins. *Cell Motil. Cytoskeleton* **17**, 147-9.
- Piperno, G. and Mead, K.** (1994). Mutations in the “Dynein Regulatory Complex” Alter the ATP-insensitive Binding Sites for Inner Arm Dyneins in. **125**, 1109–1117.
- Piperno, G. and Mead, K.** (1997). Transport of a novel complex in the cytoplasmic matrix of *Chlamydomonas* flagella. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4457–62.
- Piperno, G., Mead, K. and Shestak, W.** (1992). The Inner Dynein Arms 12 Interact with a “Dynein Regulatory Complex” in. **118**, 1455–1463.
- Praetorius HA, S. K.** (2001). Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. *J Membr Biol* Nov, 71–9.
- Pugacheva, E. N., Jablonski, S. a, Hartman, T. R., Henske, E. P. and Golemis, E. a** (2007). HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell.* **129**, 1351–63.
- Qin, H., Rosenbaum, J. L. and Barr, M. M.** (2001). An autosomal recessive polycystic kidney disease gene homolog is involved in intraflagellar transport in *C. elegans* ciliated sensory neurons. *Curr. Biol.* **11**, 457–61.
- Qin, H., Diener, D. R., Geimer, S., Cole, D. G. and Rosenbaum, J. L.** (2004). Intraflagellar transport (IFT) cargo: IFT transports flagellar precursors to the tip and turnover products to the cell body. *J. Cell Biol.* **164**, 255–66.
- Rachel, R. a, Li, T. and Swaroop, A.** (2012). Photoreceptor sensory cilia and ciliopathies: focus on CEP290, RPGR and their interacting proteins. *Cilia* **1**, 22.
- Reiter JF., Blacque OE, L. M.** (2012). The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. 608–618.
- Richey, E. a and Qin, H.** (2012). Dissecting the sequential assembly and localization of intraflagellar transport particle complex B in *Chlamydomonas*. *PLoS One* **7**, e43118.
- Riley, B. B., Zhu, C., Janetopoulos, C. and Aufderheide, K. J.** (1997). A critical period of ear development controlled by distinct populations of ciliated cells in the zebrafish. *Dev. Biol.* **191**, 191–201.
- Ringo** (1967). The arrangement of subunits in flagellar fibers. *J Ultrastruct Res* Feb, 266–77.
- Robbins, D. J., Fei, D. L. and Riobo, N. a** (2012). The Hedgehog signal transduction network. *Sci. Signal.* **5**, re6.
- Robert, a., Margall-Ducos, G., Guidotti, J.-E., Bregerie, O., Celati, C., Brechot, C. and Desdouets, C.** (2007). The intraflagellar transport component IFT88/polaris is a

- centrosomal protein regulating G1-S transition in non-ciliated cells. *J. Cell Sci.* **120**, 918–918.
- Rogowski, K., Juge, F., van Dijk, J., Wloga, D., Strub, J.-M., Levilliers, N., Thomas, D., Bré, M.-H., Van Dorsselaer, A., Gaertig, J., et al.** (2009). Evolutionary divergence of enzymatic mechanisms for posttranslational polyglycylation. *Cell*. **137**, 1076–87.
- Ross, A. J., May-Simera, H., Eichers, E. R., Kai, M., Hill, J., Jagger, D. J., Leitch, C. C., Chapple, J. P., Munro, P. M., Fisher, S., et al.** (2005a). Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat. Genet.* **37**, 1135–40.
- Ross, A. J., May-Simera, H., Eichers, E. R., Kai, M., Hill, J., Jagger, D. J., Leitch, C. C., Chapple, J. P., Munro, P. M., Fisher, S., et al.** (2005b). Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat. Genet.* **37**, 1135–40.
- Ross, A. J., Dailey, L. a, Brighton, L. E. and Devlin, R. B.** (2007). Transcriptional profiling of mucociliary differentiation in human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **37**, 169–85.
- Rupp, G. and Porter, M. E.** (2003a). A subunit of the dynein regulatory complex in *Chlamydomonas* is a homologue of a growth arrest-specific gene product. *J. Cell Biol.* **162**, 47–57.
- Rupp, G. and Porter, M. E.** (2003b). A subunit of the dynein regulatory complex in *Chlamydomonas* is a homologue of a growth arrest-specific gene product. *J. Cell Biol.* **162**, 47–57.
- Sakakibara, H. and Oiwa, K.** (2011). Molecular organization and force-generating mechanism of dynein. *FEBS J.* **278**, 2964–79.
- Sammels, E., Devogelaere, B., Mekahli, D., Bultynck, G., Missiaen, L., Parys, J. B., Cai, Y., Somlo, S. and De Smedt, H.** (2010). Polycystin-2 activation by inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release requires its direct association with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in a signaling microdomain. *J. Biol. Chem.* **285**, 18794–805.
- Sang, L., Miller, J. J., Corbit, K. C., Giles, R. H., Brauer, M. J., Otto, E. a, Baye, L. M., Wen, X., Scales, S. J., Kwong, M., et al.** (2011). Mapping the NPHP-JBTS-MKS protein network reveals ciliopathy disease genes and pathways. *Cell* **145**, 513–28.
- Sasai, N. and Briscoe, J.** (2012). Primary cilia and graded Sonic Hedgehog signaling. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **1**, 753–72.
- Satir, P.** (1968). Studies on cilia. 3. Further studies on the cilium tip and a “sliding filament” model of ciliary motility. *J. Cell Biol.* **39**, 77–94.
- Satir, P.** (1974). How cilia move. *Sci. Am* 44–52.
- Satir, P.** (2008). Primary cilia: integral to development and disease. *Dev. Dyn.* **237**, 1953–4.

- Schneider, L., Clement, C. a, Teilmann, S. C., Pazour, G. J., Hoffmann, E. K., Satir, P. and Christensen, S. T.** (2005). PDGFR α signaling is regulated through the primary cilium in fibroblasts. *Curr. Biol.* **15**, 1861–6.
- Schneider, L., Cammer, M., Lehman, J., Sonja, K., Guerra, C. F., Veland, I. R., Stock, C., Hoffmann, K., Yoder, B. K., Schwab, A., et al.** (2010). Cellular Physiology and Biochemistry Directional Cell Migration and Chemotaxis in Wound Healing Response to PDGF-AA are Coordinated by the Primary Cilium in Fibroblasts. *Cell Physiol Biochem.* **25**, 279-92.
- Scholey, J. M.** (2008). Intraflagellar transport motors in cilia: moving along the cell's antenna. *J. Cell Biol.* **180**, 23–9.
- Schröder, J. M., Larsen, J., Komarova, Y., Akhmanova, A., Thorsteinsson, R. I., Grigoriev, I., Manguso, R., Christensen, S. T., Pedersen, S. F., Geimer, S., et al.** (2011). EB1 and EB3 promote cilia biogenesis by several centrosome-related mechanisms. *J. Cell Sci.* **124**, 2539–51.
- Schwabe, G., Hoffmann, K., Loges, N., Birker, D., Rossier, C., de Santi, M., Olbrich, H., Fliegauf, M., Faily, M., Liebers, U., et al.** (2008). Primary ciliary dyskinesia associated with normal axoneme ultrastructure is caused by DNAH11 mutations. *Hum. Mutat.* **Feb**, 289–98.
- Schwander, M., Kachar, B. and Müller, U.** (2010). Review series: The cell biology of hearing. *J. Cell Biol.* **190**, 9–20.
- Schweickert, A., Weber, T., Beyer, T., Vick, P., Bogusch, S., Feistel, K. and Blum, M.** (2007). Cilia-driven leftward flow determines laterality in *Xenopus*. *Curr. Biol.* **17**, 60–6.
- Sedmak, T. and Wolfrum, U.** (2010). Intraflagellar transport molecules in ciliary and nonciliary cells of the retina. *J. Cell Biol.* **189**, 171–86.
- Seeley, E. S. and Nachury, M. V** (2010). The perennial organelle: assembly and disassembly of the primary cilium. *J. Cell Sci.* **123**, 511–8.
- Senthilan, P. R., Piepenbrock, D., Ovezmyradov, G., Nadrowski, B., Bechstedt, S., Pauls, S., Winkler, M., Möbius, W., Howard, J. and Göpfert, M. C.** (2012). *Drosophila* auditory organ genes and genetic hearing defects. *Cell* **150**, 1042–54.
- Shida, T., Cueva, J. G., Xu, Z., Goodman, M. B. and Nachury, M. V** (2010). The major alpha-tubulin K40 acetyltransferase α TAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 21517–22.
- Shinohara, K., Kawasumi, A., Takamatsu, A., Yoshiba, S., Botilde, Y., Motoyama, N., Reith, W., Durand, B., Shiratori, H. and Hamada, H.** (2012). Two rotating cilia in the node cavity are sufficient to break left-right symmetry in the mouse embryo. *Nat. Commun.* **3**, 622.
- Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Krönig, C., Schermer, B., Benzing, T., Cabello, O. a, Jenny, A., et al.** (2005). Inversin, the gene product

- mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat. Genet.* **37**, 537–43.
- Singla, V. and Reiter, J. F.** (2006). The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* **313**, 629–33.
- Singla, V., Romaguera-Ros, M., Garcia-Verdugo, J. M. and Reiter, J. F.** (2010). Odf1, a human disease gene, regulates the length and distal structure of centrioles. *Dev. Cell* **18**, 410–24.
- Snow, J. J., Ou, G., Gunnarson, A. L., Walker, M. R. S., Zhou, H. M., Brust-Mascher, I. and Scholey, J. M.** (2004). Two anterograde intraflagellar transport motors cooperate to build sensory cilia on *C. elegans* neurons. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1109–13.
- Sorokin, S.** (1962). Centrioles rudimentary and smooth and the formation of cilia muscle by fibroblasts.. *J Cell Biol.* **15**, 363–77.
- Sorokin, S. P.** (1968). Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *J. Cell Sci.* **3**, 207–30.
- Stephan, A., Vaughan, S., Shaw, M. K., Gull, K. and McKean, P. G.** (2007). An essential quality control mechanism at the eukaryotic basal body prior to intraflagellar transport. *Traffic* **8**, 1323–30.
- Stooke-Vaughan, G. a, Huang, P., Hammond, K. L., Schier, A. F. and Whitfield, T. T.** (2012). The role of hair cells, cilia and ciliary motility in otolith formation in the zebrafish otic vesicle. *Development* **139**, 1777–87.
- Stowe, T. R., Wilkinson, C. J., Iqbal, A. and Stearns, T.** (2012). The centriolar satellite proteins Cep72 and Cep290 interact and are required for recruitment of BBS proteins to the cilium. *Mol. Biol. Cell.* **23**, 3322–35.
- Strapps, W. R. and Tomlinson, a** (2001). Transducing properties of Drosophila Frizzled proteins. *Development* **128**, 4829–35.
- Stubbs, J. L., Oishi, I., Izpisua Belmonte, J. C. and Kintner, C.** (2008). The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Nat. Genet.* **40**, 1454–60.
- Stubbs, J., Vladar, E., Axelrod, J. and Kintner, C.** (2012). Multicilin promotes centriole assembly and ciliogenesis during multiciliate cell differentiation. **14**, 140–147.
- Sun, Z., Amsterdam, A., Pazour, G. J., Cole, D. G., Miller, M. S. and Hopkins, N.** (2004). A genetic screen in zebrafish identifies cilia genes as a principal cause of cystic kidney. *Development* **131**, 4085–93.
- Supp, D. M., Witte, D. P., Potter, S. S. and Brueckner, M.** (1997). Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in inversus viscerum mice. *Nature* **389**, 963–6.

- Supp, D. M., Brueckner, M., Kuehn, M. R., Witte, D. P., Linda, A., Mcgrath, J., Corrales, J. and Potter, S. S.** (1999). Targeted deletion of the ATP binding domain of left-right dynein confirms its role in specifying development of left-right asymmetries. *126*, 5495–5504.
- Swoboda, P., Adler, H. T. and Thomas, J. H.** (2000). The RFX-type transcription factor DAF-19 regulates sensory neuron cilium formation in *C. elegans*. *Mol. Cell* **5**, 411–21.
- Takada, S., Wilkerson, C. G., Wakabayashi, K., Kamiya, R. and Witman, G. B.** (2002). The Outer Dynein Arm-Docking Complex: Composition and Characterization of a Subunit (Oda1) Necessary for Outer Arm Assembly. **13**, 1015–1029.
- Takeda, S., Yonekawa, Y., Tanaka, Y., Okada, Y., Nonaka, S. and Hirokawa, N.** (1999). Left-right asymmetry and kinesin superfamily protein KIF3A: new insights in determination of laterality and mesoderm induction by kif3A^{-/-} mice analysis. *J. Cell Biol.* **145**, 825–36.
- Takiar, V. and Caplan, M. J.** (2011). Polycystic kidney disease: pathogenesis and potential therapies. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**, 1337–43.
- Tan, P. L., Barr, T., Inglis, P. N., Mitsuma, N., Huang, S. M., Garcia-Gonzalez, M. a, Bradley, B. a, Coforio, S., Albrecht, P. J., Watnick, T., et al.** (2007). Loss of Bardet Biedl syndrome proteins causes defects in peripheral sensory innervation and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 17524–9.
- Tan, F. E., Vldar, E. K., Ma, L., Fuentealba, L. C., Hoh, R., Espinoza, F. H., Axelrod, J. D., Alvarez-Buylla, A., Stearns, T., Kintner, C., et al.** (2013). Myb promotes centriole amplification and later steps of the multiciliogenesis program. *Development* **140**, 4277–86.
- Tanaka, Y., Okada, Y. and Hirokawa, N.** (2005). FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature* **435**, 172–7.
- Tarkar, A., Loges, N. T., Slagle, C. E., Francis, R., Dougherty, G. W., Tamayo, J. V, Shook, B., Cantino, M., Schwartz, D., Jahnke, C., et al.** (2013). DYX1C1 is required for axonemal dynein assembly and ciliary motility. *Nat. Genet.* **45**, 995-1003.
- Taschner, M., Bhogaraju, S. and Lorentzen, E.** (2012). Architecture and function of IFT complex proteins in ciliogenesis. *Differentiation.* **83**, S12–22.
- Thomas, J., Morlé, L., Soulavie, F., Laurençon, A., Sagnol, S. and Durand, B.** (2010). Transcriptional control of genes involved in ciliogenesis: a first step in making cilia. *Biol. Cell* **102**, 499–513.
- Tsujikawa, M. and Malicki, J.** (2004). Intraflagellar transport genes are essential for differentiation and survival of vertebrate sensory neurons. *Neuron* **42**, 703–16.
- Tyler, K. M., Fridberg, A., Toriello, K. M., Olson, C. L., Cieslak, J. a, Hazlett, T. L. and Engman, D. M.** (2009). Flagellar membrane localization via association with lipid rafts. *J. Cell Sci.* **122**, 859–66.

- Vierkotten, J., Dildrop, R., Peters, T., Wang, B. and Rüther, U.** (2007). Ftm is a novel basal body protein of cilia involved in Shh signalling. *Development* **134**, 2569–77.
- Vincensini, L., Blisnick, T. and Bastin, P.** (2011). 1001 Model Organisms To Study Cilia and Flagella. *Biol. Cell* **103**, 109–30.
- Vladar, E. K., Antic, D. and Axelrod, J. D.** (2009). Planar Cell Polarity Signaling : The Developing. cell's compass. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* e002964.
- Vladar, E. K., Bayly, R. D., Sangoram, A. M., Scott, M. P. and Axelrod, J. D.** (2012). Microtubules enable the planar cell polarity of airway cilia. *Curr. Biol.* **22**, 2203–12.
- Wakabayashi, K., Yagi, T. and Kamiya, R.** (1997). Ca²⁺-dependent waveform conversion in the flagellar axoneme of Chlamydomonas mutants lacking the central-pair/radial spoke system. *Cell Motil. Cytoskeleton* **38**, 22-8.
- Wallingford, J. B. and Mitchell, B.** (2011). Strange as it may seem : the many links between Wnt signaling , planar cell polarity , and cilia. *Genes Dev.* **25**, 201–213.
- Wang, S. and Dong, Z.** (2013). Primary cilia and kidney injury: current research status and future perspectives. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **305**, F1085–98.
- Wang, Y. and Nathans, J.** (2007). Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Development* **134**, 647–58.
- Warner, F. D.** (1976). Ciliary inter-microtubule bridges. *J. Cell Sci.* **20**, 101–14.
- Watanabe, D.** (2003). The left-right determinant Inversin is a component of node monocilia and other 9+0 cilia. *Development* **130**, 1725–1734.
- Wei, Q., Zhang, Y., Li, Y., Zhang, Q., Ling, K. and Hu, J.** (2012). The BBSome controls IFT assembly and turnaround in cilia. *Nat. Cell Biol.* **14**, 950–7.
- Wheatley, D. N.** (2005). Landmarks in the first hundred years of primary (9+0) cilium research. *Cell Biol. Int.* **29**, 333–9.
- Williams, C. L., Winkelbauer, M. E., Schafer, J. C., Michaud, E. J. and Yoder, B. K.** (2008). Functional Redundancy of the B9 Proteins and Nephrocystins in *Caenorhabditis elegans* Ciliogenesis. *Mol Biol Cell.* **19**, 2154–2168.
- Williams, C. L., Li, C., Kida, K., Inglis, P. N., Mohan, S., Semenec, L., Bialas, N. J., Stupay, R. M., Chen, N., Blacque, O. E., et al.** (2011). MKS and NPHP modules cooperate to establish basal body/transition zone membrane associations and ciliary gate function during ciliogenesis. *J. Cell Biol.* **192**, 1023–41.
- Winkelbauer, M. E., Schafer, J. C., Haycraft, C. J., Swoboda, P. and Yoder, B. K.** (2005). The *C. elegans* homologs of nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are cilia transition zone proteins involved in chemosensory perception. *J. Cell Sci.* **118**, 5575–87.

- Wirschell, M., Pazour, G., Yoda, A., Hirono, M., Kamiya, R. and Witman, G. B.** (2004). Oda5p, a Novel Axonemal Protein Required for Assembly of the Outer Dynein Arm and an Associated Adenylate Kinase. *Mol Cell Biol.* **15**, 2729–2741.
- Wirschell, M., Yamamoto, R., Alford, L., Gokhale, A., Gaillard, A. and Sale, W. S.** (2011). Regulation of ciliary motility: conserved protein kinases and phosphatases are targeted and anchored in the ciliary axoneme. *Arch. Biochem. Biophys.* **510**, 93–100.
- Wirschell, M., Olbrich, H., Werner, C., Tritschler, D., Bower, R., Sale, W. S., Loges, N. T., Pennekamp, P., Lindberg, S., Stenram, U., et al.** (2013). The nexin-dynein regulatory complex subunit DRC1 is essential for motile cilia function in algae and humans. *Nat. Genet.* **45**, 262–8.
- Wloga, D., Dave, D., Meagley, J., Rogowski, K., Jerka-Dziadosz, M. and Gaertig, J.** (2010). Hyperglutamylation of tubulin can either stabilize or destabilize microtubules in the same cell. *Eukaryot. Cell.* **9**, 184–93.
- Wu, D., Freund, J. B., Fraser, S. E. and Vermot, J.** (2011). Mechanistic basis of otolith formation during teleost inner ear development. *Dev. Cell.* **20**, 271–8.
- Yang, J. and Li, T.** (2005). The ciliary rootlet interacts with kinesin light chain and may provide a scaffold for kinesin-1 vesicular cargos. **309**, 379–89.
- Yang, P., Fox, L., Colbran, R. J. and Sale, W. S.** (2000). Protein phosphatases PP1 and PP2A are located in distinct positions in the Chlamydomonas flagellar axoneme. *J. Cell Sci.* **113**, 91–102.
- Yang, J., Liu, X., Yue, G., Adamian, M., Bulgakov, O. and Li, T.** (2002). Rootletin, a novel coiled-coil protein, is a structural component of the ciliary rootlet. *J. Cell Biol.* **159**, 431–40.
- Yang, P., Diener, D. R., Yang, C., Kohno, T., Pazour, G. J., Dienes, J. M., Agrin, N. S., King, S. M., Sale, W. S., Kamiya, R., et al.** (2006). Radial spoke proteins of Chlamydomonas flagella. *J. Cell Sci.* **119**, 1165–74.
- Yeh, S.-D., Chen, Y.-J., Chang, A. C. Y., Ray, R., She, B.-R., Lee, W.-S., Chiang, H.-S., Cohen, S. N. and Lin-Chao, S.** (2002). Isolation and properties of Gas8, a growth arrest-specific gene regulated during male gametogenesis to produce a protein associated with the sperm motility apparatus. *J. Biol. Chem.* **277**, 6311–7.
- Yin, C., Kiskowski, M., Pouille, P.-A., Farge, E. and Solnica-Krezel, L.** (2008). Cooperation of polarized cell intercalations drives convergence and extension of presomitic mesoderm during zebrafish gastrulation. *J. Cell Biol.* **180**, 221–32.
- Yokoyama, R., O'toole, E., Ghosh, S. and Mitchell, D. R.** (2004). Regulation of flagellar dynein activity by a central pair kinesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 17398–403.
- Yoshida, S., Shiratori, H., Kuo, I. Y., Kawasumi, A., Shinohara, K., Nonaka, S., Asai, Y., Sasaki, G., Belo, J. A., Sasaki, H., et al.** (2012). Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2. *Science* **338**, 226–31.

- Yu, X., Ng, C. P., Habacher, H. and Roy, S.** (2008). Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. *Nat. Genet.* **40**, 1445–53.
- Yu, J., Carroll, T. J., Rajagopal, J., Kobayashi, A., Ren, Q. and McMahon, A. P.** (2009). A Wnt7b-dependent pathway regulates the orientation of epithelial cell division and establishes the cortico-medullary axis of the mammalian kidney. *Development.* **136**, 161–71.
- Yu, X., Lau, D., Ng, C. P. and Roy, S.** (2011a). Cilia-driven fluid flow as an epigenetic cue for otolith biomineralization on sensory hair cells of the inner ear. *Development* **138**, 487–94.
- Zariwala, M., O’Neal, W. K., Noone, P. G., Leigh, M. W., Knowles, M. R. and Ostrowski, L. E.** (2004). Investigation of the possible role of a novel gene, DPCD, in primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **30**, 428–34.
- Zariwala, M. a, Knowles, M. R. and Omran, H.** (2007). Genetic defects in ciliary structure and function. *Annu. Rev. Physiol.* **69**, 423–50.
- Zariwala, M. a, Gee, H. Y., Kurkowiak, M., Al-Mutairi, D. a, Leigh, M. W., Hurd, T. W., Hjeij, R., Dell, S. D., Chaki, M., Dougherty, G. W., et al.** (2013). ZMYND10 Is Mutated in Primary Ciliary Dyskinesia and Interacts with LRRC6. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 336–45.
- Zhang, Q., Seo, S., Bugge, K., Stone, E. M. and Sheffield, V. C.** (2012). BBS proteins interact genetically with the IFT pathway to influence SHH-related phenotypes. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1945–53.
- Zhao, C. and Malicki, J.** (2011). Nephrocystins and MKS proteins interact with IFT particle and facilitate transport of selected ciliary cargos. *EMBO J.* **30**, 2532–44.
- Zhao, L., Yuan, S., Cao, Y., Kallakuri, S., Li, Y., Kishimoto, N., Dibella, L. and Sun, Z.** (2013). Reptin/Ruvbl2 is a Lrrc6/Seahorse interactor essential for cilia motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 12697–12702.
- Ziętkiewicz, E., Bukowy-Bieryłło, Z., Voelkel, K., Klimek, B., Dmeńska, H., Pogorzelski, A., Sulikowska-Rowińska, A., Rutkiewicz, E. and Witt, M.** (2012). Mutations in radial spoke head genes and ultrastructural cilia defects in East-European cohort of primary ciliary dyskinesia patients. *PLoS One* **7**, e33667.