



HAL
open science

Mise en évidence et caractérisation de nouveaux gènes impliqués dans les ciliopathies rénales

Marion Failler

► **To cite this version:**

Marion Failler. Mise en évidence et caractérisation de nouveaux gènes impliqués dans les ciliopathies rénales. Biologie cellulaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB023 . tel-01374870

HAL Id: tel-01374870

<https://theses.hal.science/tel-01374870>

Submitted on 2 Oct 2016

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

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

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES**

Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité

Département Biologie Cellulaire et Moléculaire, Physiologie, Physiopathologie
(BCMPP)

MARION FAILLER

Pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences

Sujet :

**Mise en évidence et caractérisation
de nouveaux gènes impliqués dans les ciliopathies rénales**

Soutenue le 18 Septembre 2015

Composition du Jury

Dr. Hervé ENSLEN
Pr. Bénédicte DURAND
Dr. Anne-Marie TASSIN
Dr. Estelle ESCUDIER
Dr. Nathalie DELGEHYR
Dr. Sophie SAUNIER
Dr. Alexandre BENMERAH

Le hasard ne favorise que les esprits préparés.

Louis Pasteur

REMERCIEMENTS

Ca y est, nous y sommes, la fin est là ! Tous les gens qui ont vécu cette expérience si riche avec moi savent qu'elle n'a pas toujours été facile, qu'il y a eu des moments particulièrement difficiles. Toutefois, j'ai appris tant de choses et accompli tant d'autres que cela restera une très belle et grande aventure. Et c'est certainement grâce à tous ceux qui m'ont accompagné.

D'abord, Alex, bien sûr, qui a bien voulu s'engager dans cette folie avec moi, malgré tout... Je te suis infiniment reconnaissante d'avoir toujours cru en moi, surtout quand moi, je n'y croyais plus. Merci de m'avoir toujours soutenu et de m'avoir si bien comprise. Merci pour ton aide et ta disponibilité au quotidien. Merci pour tout ce que j'ai appris et pour toutes ces IF qui, malgré ce que certains en disent, en mettent plein les yeux. Ca va me manquer.

Je remercie aussi Sophie de m'avoir accueillie dans son équipe et de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet si intéressant. Merci d'avoir été avec moi dans les moments les plus critiques. Et merci de m'avoir fait confiance pour présenter mes travaux en congrès international. Ca a été de fabuleuses expériences.

Ensuite, je remercie tous ceux qui ont partagé mes journées, mes manip, mes résultats, les soirées autour d'un verre (voire plus) et plus encore...

Je pense particulièrement à Camille qui m'a apportée un soutien très précieux. Merci pour ta gentillesse et pour le temps et la patience que tu m'as donné. Tu es le rire du labo, alors merci pour tous tes éclats de rire et pour la joie et la bonne humeur que tu transmets autour de toi.

Je pense aussi à Évelyne avec qui j'ai partagé tant d'émotions (pas forcément les meilleures...) et de discussions. Vivement les prochaines, ici ou ailleurs... Je te remercie pour ton amitié et j'espère de tout cœur que les étoiles filantes exauceront tes souhaits, tu le mérites.

Louise, it was a pleasure not supervising you and not speaking french with you. Being with me during this unpleasant period helped me so much, thank you. I wish you all the best. Do not forget to believe in your own choices.

Je n'oublierai pas non plus la bella ragazza Valentina, la sympathie et l'aide génétique d'Emilie, les conseils si précieux d'Albane (sauf en musique !), la disposition affective si particulière de Gweltas à viser le bien et le bonheur de chacun, les questions de Maxence, la folie de Rebecca, ma nouvelle voisine Nathalie, l'enthousiasme inébranlable de Flora, l'accent chantant de Lara, les discussions sur l'oligogénisme avec Corinne, l'aide d'Olivier, Marion, Marie, Hugo, Daniel et tous les autres... Merci à tous pour tous les moments qu'on a partagés ensemble et qui ont contribué à faire de ces 3 années, les plus riches de ma vie.

J'ai également une pensée pour les personnes de l'institut IMAGINE avec qui j'ai eu l'occasion de discuter et de travailler. Meriem, j'ai adoré notre haute-résolution et m'extasier devant des anneaux avec toi. Ludovic, Kévin, Sophie T., Isabelle... vos questions m'ont beaucoup apporté (dont un papier ! merci).

Je remercie aussi les équipes avec lesquelles nous avons collaboré : Ludovic Leconte de l'institut Curie qui m'a formé au SIM ; Nathalie Spassky et Nathalie Delgéhry à l'ENS, merci d'avoir bien voulu couper les têtes pour moi ; à l'hôpital Trousseau, Serge Anselem, Marie Legendre j'ai beaucoup apprécié notre séjour dans le fin-fond du Colorado et Estelle Escudier qui m'a beaucoup appris sur la motilité.

Une dernière pensée pour les « gens de Cochin », Cécile, Marie-Christine, Serge. Présents dès mes débuts de chercheuse, merci d'être toujours là. J'ai hâte qu'on se retrouve tous autour d'une pizza.

Enfin, un dernier mot pour les plus chers. Un certain nombre d'années qu'ils sont là, dans les moments de joie et les autres. Merci en particulier à mes pharmaciens préférés pour tous les moments passés ensemble et pour leur amitié dont je ne peux plus me passer. Et surtout merci à mes parents pour leurs soutiens indéfectibles (au pluriel, tellement il y en a eu) et à Benjamin et Hasna pour le bonheur qu'ils partagent avec moi.

Pour terminer, je remercie les membres du jury qui ont accepté de juger mon travail : Bénédicte Durand, Anne-Marie Tassin, Hervé Enslén, Nathalie Delgéhry et Estelle Escudier.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	5
SOMMAIRE	7
PREAMBULE	11
INTRODUCTION	13
<i>I. Les cils et flagelles</i>	13
I.1. Les différents cils	14
<i>I.1.a. Les cils mobiles</i>	14
<i>I.1.b. Les cils non motiles</i>	15
<i>Le cil connecteur des photorécepteurs</i>	16
<i>Les cils primaires</i>	16
<i>Les cils des neurones olfactifs</i>	17
<i>Les cils de l'oreille interne</i>	17
<i>I.1.c. Les cils du nœud embryonnaire</i>	18
I.2. Les corps basaux	19
<i>I.2.a Le centrosome</i>	20
<i>Les appendices sub-distaux</i>	21
<i>Les appendices distaux</i>	22
<i>La partie distale des centrioles</i>	23
<i>I.2.b. Les racines ciliaires</i>	24
I.3. L'axonème	25
<i>I.3.b. Les protéines associées aux microtubules des cils motiles</i>	26
<i>Les bras de dynéines et ponts radiaires</i>	26
<i>Les tektines</i>	28
<i>I.3.c. La zone de transition et les fibres de transition</i>	30
<i>I.3.d. Le compartiment inversine</i>	32
I.4. La ciliogenèse	33

1.4.a. L'initiation de la ciliogenèse.....	33
L'ancrage du corps basal.....	33
L'amplification centriolaire dans les cellules multiciliées.....	35
1.4.b. Le transport intraflagellaire.....	36
Les complexes IFT.....	37
Les moteurs moléculaires.....	39
Le BBSome.....	40
1.4.c. La régulation.....	42
La régulation de la ciliogenèse par les facteurs de transcription.....	42
La régulation de la dynamique des microtubules de l'axonème.....	45
La régulation du désassemblage du cil.....	45
1.5. Les fonctions du cil primaire.....	47
II. Les ciliopathies.....	51
II.1. Les atteintes des cils motiles.....	51
La dyskinésie ciliaire primitive.....	51
L'hétérotaxie.....	52
L'infertilité.....	53
L'hydrocéphalie.....	53
La génétique de la DCP.....	54
II.2. Les atteintes des cils primaires.....	58
Les kystes dans les maladies rénales.....	58
Autres organes touchés par des défauts des cils primaires.....	61
Le syndrome de Bardet-Biedl.....	61
Les ciliopathies létales.....	62
II.2.a. La néphronoptose.....	63
II.2.b. Les syndromes associés à la NPH.....	64
II.2.c. Les gènes NPHP.....	66
Le complexe NPHP1/4/8 à la zone de transition.....	66
Le complexe NPHP5/6 à la zone de transition.....	67
La région distale du corps basal.....	68
Le compartiment inversine.....	68
L'IFT.....	69

<i>L'axonème</i>	69
<i>La réponse aux dommages de l'ADN</i>	70
II.2.d. <i>Les corrélations génotype-phénotype</i>	71
II.3. <i>L'identification et la validation des mutations causales retrouvées chez les patients</i>	75
<i>La mise en évidence des mutations responsables</i>	75
<i>La validation des variations et les études fonctionnelles</i>	77
RESULTATS	81
<i>PARTIE I : Le gène CEP83 est muté chez des patients atteints de néphronophthie infantile et de retard mental</i>	81
<i>ARTICLE 1 : Mutations of CEP83 cause infantile nephronophthisis and intellectual disability</i>	82
<i>PARTIE II : Effets cumulatifs des mutations des gènes WDR19 et TEKT1 chez une patiente atteinte d'un syndrome de Saldino-Mainzer et d'une dyskésie ciliaire primitive</i>	105
<i>ARTICLE 2 : Additive effects of TEKT1 and WDR19 mutations in patient with Mainzer-Saldino syndrome and Bronchial Ciliary Dyskinesia</i>	106
DISCUSSION	139
<i>CEP83 : un nouveau gène associé à la NPH infantile</i>	139
<i>WDR19 et TEKT1 : les effets cumulatifs des mutations de 2 gènes dans l'expression phénotypique</i>	143
CONCLUSION	153
BIBLIOGRAPHIE	155
ANNEXES	191
<i>Annexe 1 : Septins 2, 7 and 9 and MAP4 colocalize along the axoneme in the primary cilium and control ciliary length</i>	191
<i>Annexe 2 : Mutations in KIAA0586 Cause Lethal Ciliopathies Ranging from a Hydrolethalus Phenotype to Short-Rib Polydactyly Syndrome</i>	205

PREAMBULE

Les ciliopathies sont un ensemble de maladies génétiques associées à un défaut des cils et/ou des flagelles. En effet, la majorité des mutations identifiées chez des patients a été retrouvée dans des gènes dits ciliaires, c'est-à-dire codant des protéines jouant des rôles importants au niveau des cils. Les cils et flagelles sont des organites très conservés au cours de l'évolution. On distingue les cils motiles et/ou flagelles qui ont des fonctions biologiques essentielles dans la locomotion cellulaire et la mise en mouvement de fluides, et les cils primaires qui sont des antennes sensorielles impliquées dans la transmission de signaux environnementaux. Les défauts spécifiques des cils motiles sont associés à l'infertilité masculine et à des maladies respiratoires associées ou non à des défauts de latéralité gauche-droite (*situs inversus*). Les cils primaires étant présents dans la plupart des cellules des vertébrés, leur dysfonctionnement peut toucher tous les organes et engendrer des pathologies très diverses caractérisées par un chevauchement phénotypique et génétique très important. Les manifestations les plus fréquentes concernent le système nerveux central, la rétine, le rein, le foie et le squelette.

La néphronoptose (NPH) est l'une des manifestations rénales la plus courante dans les ciliopathies. C'est une maladie autosomique récessive à l'origine d'insuffisance rénale terminale chez l'enfant. La NPH est souvent associée à une grande variété de signes extra-rénaux comme des anomalies de la rétine, du squelette et neurologiques. L'association spécifique de ces manifestations définit des syndromes (Senior-Løken, Joubert, Saldino-Mainzer). Aujourd'hui, des mutations de 20 gènes ont été impliquées dans la NPH.

Au cours de mon travail de thèse au sein du Laboratoire des Maladies Rénales Héritaires de l'institut IMAGINE, j'ai étudié les implications *in vitro* et *in vivo* des mutations mises en évidence dans deux nouveaux gènes candidats chez des patients atteints de formes syndromiques de NPH, *CEP83* et *TEKT1*. J'ai pu valider l'effet pathogène des mutations de *CEP83*, qui code une protéine centriolaire importante pour la ciliogenèse, et ainsi contribuer à la caractérisation de ce nouveau gène de NPH (*NPHP18*). J'ai également caractérisé les effets délétères des variations de *TEKT1* mises en évidence chez une patiente présentant un phénotype complexe de ciliopathie associant atteintes des cils primaires (syndrome de

Saldino-Mainzer) et des cils motiles (dyskinésie ciliaire bronchique). Les variations de *TEKT1* chez cette patiente sont associées à des mutations de *WDR19/NPHP13* précédemment impliquées dans la NPH. J'ai mis en évidence les fonctions de la tektine-1, codée par *TEKT1*, dans la ciliogenèse du cil primaire et obtenu des arguments en faveur de sa fonction dans la motilité ciliaire. Le syndrome complexe de la patiente pourrait donc résulter de l'association des effets des mutations de ces deux gènes.

INTRODUCTION

I. Les cils et flagelles

Les cils et flagelles font partis des organites de la cellule eucaryote les plus anciens. Ils sont présents dans la plupart des organismes et ont une structure très conservée au cours de l'évolution, ce qui laisse présager de leur importance capitale pour la cellule et l'organisme. Le cil est le premier organite cellulaire à avoir été décrit en 1675 par Antoni van Leeuwenhoek chez les protozoaires. Tandis que la fonction évidente des cils motiles a vite été caractérisée, le rôle des cils primaires non motiles, est longtemps resté incompris et ils ont été considérés comme un simple vestige de l'évolution. Ce cil sensoriel a été « redécouvert » récemment comme un organite essentiel chez les vertébrés lorsque des dysfonctionnements ont été associés à des maladies génétiques humaines.

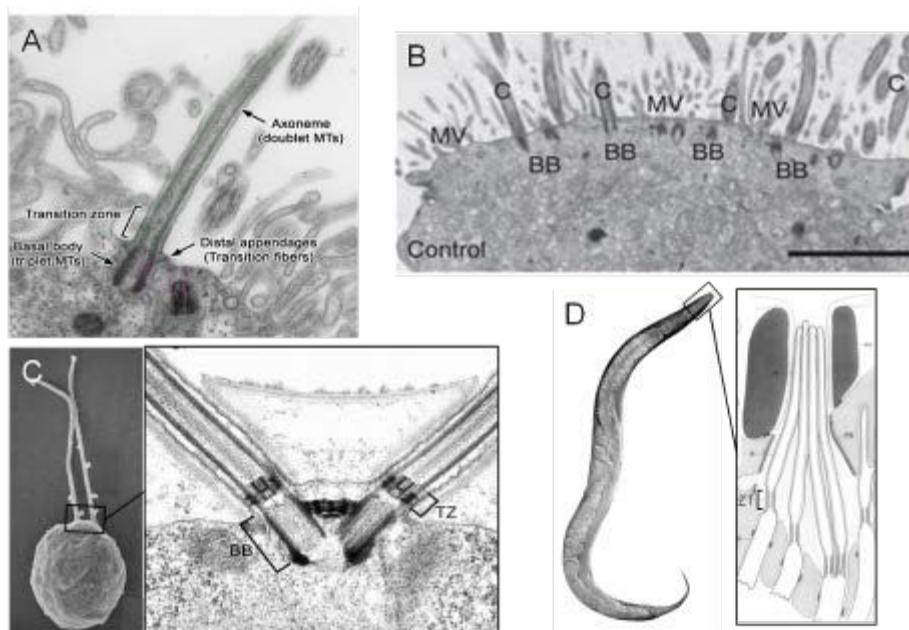


Figure 1 : Les cils et leur corps basal

A) Cil primaire du plexus choroïdien observé en microscopie électronique (Narita et Takeda 2015). L'axonème est représenté en vert et les 2 centrioles du corps basal sont en rose. B) Les cils motiles (C) de l'épithélium respiratoire ont un corps basal (BB) à 1 centriole et sont séparés par des microvillosités (MV) (microscopie électronique de Boon et al. 2014). C) L'algue verte *Chlamydomonas* possède 2 flagelles. Chacun est relié à un corps basal à 1 centriole (BB) par la zone de transition (TZ) (microscopie électronique de Silflow et Lefebvre 2001). D) Les neurones olfactifs du nématode *Ceanorhabditis elegans* (microscopie à contraste de phase) sont schématisés : le corps basal correspond à la zone de transition (Perkins et al. 1986) .

Deux types de cils existent chez les vertébrés : les motiles et les non motiles. Certains cils non motiles sont connus sous le nom de cils primaires, ce sont des cils sensoriels capables de détecter les signaux extracellulaires et de les transmettre à l'intérieur de la cellule. Parmi les cils mobiles, on distingue les flagelles qui permettent le déplacement de la cellule qui les porte et les cils mobiles qui sont impliqués dans la mise en mouvement de fluides biologiques ou de cellules (voir Chapitre I.1).

Les cils et flagelles sont formés d'un squelette de 9 doublets de microtubules, appelé axonème, qui s'allongent à partir d'un corps basal. Ce corps basal est issu du centrosome et composé de deux centrioles dans le cas des cils primaires (Figure 1.A). Dans les cellules multiciliées et certains organismes comme *Chlamydomonas reinhardtii*, une algue unicellulaire qui se déplace et perçoit son environnement grâce à ses deux flagelles, il n'est composé que d'un seul centriole (Silflow et Lefebvre 2001) (Figure 1. B et C). Il peut même avoir dégénéré dans les cils sensoriels des neurones olfactifs du ver, *Caenorhabditis elegans* (Perkins et al. 1986) (Figure 1.D).

I.1. Les différents cils

I.1.a. Les cils mobiles

La fonction la plus évidente des cils motiles est leur implication dans la motilité cellulaire. Chez les protistes, les flagelles propulsent (*Paramecium tetraurelia*) ou tractent (*Chlamydomonas* ; Figure 1C) l'organisme dans son environnement aqueux, une caractéristique que l'on retrouve chez les gamètes mâles de beaucoup d'espèces. De nombreuses études menées sur les flagelles des spermatozoïdes ont contribué à la compréhension aussi bien de la structure flagellaire que des mécanismes du battement (Gibbons 1981; Inaba 2003). Chez l'Homme, la fécondation de l'ovocyte dépend à la fois du battement flagellaire des spermatozoïdes (Figure 2) et du battement des cils présents à la surface des cellules épithéliales des trompes de Fallope qui permettent le déplacement de l'ovule. En effet, les cils mobiles sont essentiels à la propulsion de fluides physiologiques extracellulaires. Par exemple, les centaines de cils retrouvés à la surface des cellules épithéliales des voies respiratoires réalisent des battements synchronisés pour évacuer le mucus vers les voies aériennes supérieures (Figure 2) tandis que ceux des cellules épendy-

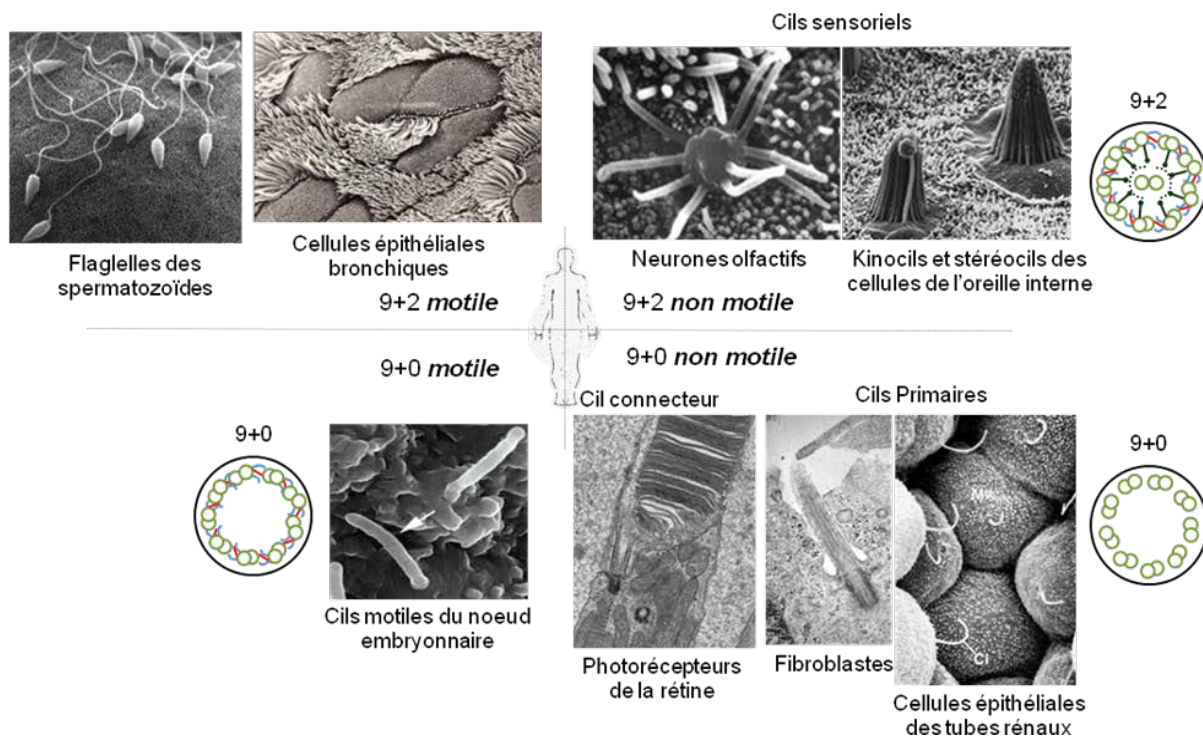


Figure 2 : Les différents cils retrouvés chez l'Homme, observés en microscopie électronique

Les cils de structure (9+2) comprennent les flagelles des spermatozoïdes et les cils motiles des cellules multiciliées comme celles de l'épithélium respiratoire. Les cils sensoriels des neurones olfactifs et les kinocils de l'oreille interne possèdent également cette ultrastructure bien qu'ils soient non motiles. Les cils de structure (9+0) mobiles sont localisés au niveau du nœud embryonnaire tandis que les non mobiles sont retrouvés dans la plupart des types cellulaires comme les fibroblastes, l'épithélium rénal et les photorécepteurs.

-maires qui tapissent les ventricules du cerveau mettent en mouvement le liquide céphalo-rachidien. Pour permettre leur mouvement de va-et-vient, les cils motiles possèdent une structure dite (9+2) avec les 9 doublets de microtubules de l'axonème qui entourent une paire centrale de microtubules simples brins. Les battements des cils motiles sont permis grâce à des moteurs moléculaires, les dynéines (King 2013), qui utilisent l'ATP pour permettre le glissement des microtubules les uns par rapport aux autres (voir Chapitre I.3.b). Certains cils motiles ont une structure (9+0) (Figure 2) et un mouvement rotatoire (voir Chapitre I.1.c).

1.1.b. Les cils non motiles

D'autres cils sont non motiles et uniques à la surface des cellules et sont impliqués dans une large gamme de processus biologiques allant de la chémo- et mécano-détection aux cascades de signalisation essentielles au développement et au maintien de l'homéostasie

tissulaire (Singla et Reiter 2006). Il s'agit d'organites sensoriels capables de détecter des stimuli tels que le flux de liquide (cils des cellules tubulaires rénales), la lumière (cil des photorécepteurs), l'osmolarité, des particules chimiques ou olfactives (cils des neurones olfactifs)... et de transmettre les informations dans le corps cellulaire.

Le cil connecteur des photorécepteurs

L'exemple le plus spectaculaire d'antenne sensorielle est peut être le cil des photorécepteurs de la rétine. C'est le premier cil possédant une structure (9+0) avec un corps basal à 2 centrioles observé en microscopie électronique (De Robertis 1956; Wolken 1956). Il s'agit, en fait, d'un cil modifié qui forme le segment externe. A la jonction entre le segment externe et le segment interne ou corps cellulaire, le cil connecteur (Figure 2) correspond à la zone de transition (voir Chapitre 1.3.d). Le segment externe des photorécepteurs est composé d'une énorme concentration de rhodopsine, un récepteur couplé aux protéines G qui s'accumule sur des disques membranaires. La rhodopsine est stimulée par les photons et peut ainsi recevoir et transmettre les signaux lumineux (Rieke et Baylor 1998).

Les cils primaires

Les premières images de cil primaire en microscopie électronique ont été réalisées en 1961 par B. Barnes à partir de coupes d'hypophyse de souris (Barnes 1961). Le fait qu'il soit unique à la surface des cellules, de structure (9+0) et avec un corps basal à 2 centrioles laissait suggérer que, comme les cils des photorécepteurs, il s'agissait d'organites sensoriels. D'abord appelé cil vestigial, il a été rebaptisé « cil primaire » à la suite des observations de cellules pulmonaires par S. Sorokin car il se formait en premier et de façon transitoire avant les cils motiles au cours du développement (S. P. Sorokin 1968). La grande concentration de récepteurs de signalisation à la membrane ciliaire a ensuite conduit à concevoir le cil primaire comme une antenne réceptrice qui sort de quelques micromètres du corps cellulaire pour percevoir le monde extérieur. Les cils primaires ont été observés dans de nombreux autres tissus comme les cellules tubulaires rénales (Figure 2). Les cils primaires sont ubiquitaires puisque la quasi-totalité des types cellulaires des vertébrés peut assembler un cil primaire lorsque la cellule entre en quiescence et quitte le cycle cellulaire, aussi bien dans les tissus au cours du développement que lors de la différenciation cellulaire.

Les cils des neurones olfactifs

On trouve aussi des cils sensoriels à la surface des neurones olfactifs au sein de l'épithélium de la cavité nasale des vertébrés (Figure 2). La morphologie de ces neurones a été décrite dès le milieu du 19^{ème} siècle mais ce n'est que 100 plus tard que leur fonction a été révélée (Getchell 1986; Lancet 1986). Il s'agit de neurones bipolaires avec une dendrite unique qui forme une protubérance entre les cellules épithéliales et au bout de laquelle se trouvent plusieurs cils sensoriels de structure (9+2) issus d'un corps basal à 2 centrioles. Lorsque les molécules odorantes sont détectées par les récepteurs olfactifs couplés aux protéines G de la membrane ciliaire, la concentration en AMPc augmente très fortement dans le cil via l'adénylate cyclase 3 (AC3). Les canaux ioniques de la membrane ciliaire sont alors activés par l'AMPc et entraînent une dépolarisation qui génère un signal neuronal transmis au cerveau. Certains vertébrés, comme les poissons et les grenouilles (Lidow et Menco 1984; Reese 1965), possèdent des cils olfactifs mobiles qui permettraient aussi d'évacuer le mucus. On peut alors penser qu'au cours de l'évolution, les cils olfactifs des mammifères se soient spécialisés dans les fonctions sensorielles tout en conservant leur architecture de 9+2 microtubules.

Les cils de l'oreille interne

L'organe auditif de Corti est constitué de cellules sensorielles ciliées. Elles sont pourvues de stéréocils de taille croissante qui forment une touffe (M. E. Schneider et al. 2002) et ont une fonction de mécanosenseurs. Les stéréocils sont, en fait, des microvillosités composées non pas de microtubules mais de nombreux filaments d'actine. La coordination de leur orientation dans le tissu donne l'organisation typique en chevron de l'épithélium cochléaire. L'organe de l'oreille interne est indispensable à l'audition ainsi qu'à l'équilibre. Il contient des cristaux de carbonate de calcium, les otolithes, qui reposent sur les stéréocils. Comme les ondes sonores, les mouvements de la tête provoquent un déplacement des otolithes produisant des forces mécaniques au niveau des stéréocils et induisent une dépolarisation électrique des cellules sensorielles. Le signal électrique est ensuite transmis au système nerveux central pour assimiler l'information auditive et maintenir l'équilibre de tout l'organisme. La formation et l'ancrage corrects des otolithes sont donc essentiels à l'ouïe et à l'équilibre (Anniko, Wenngren, et Wróblewski 1988; Jones et al. 2004). La formation en chevron des stéréocils, au cours du développement embryonnaire, est guidée par un cil

sensoriel, appelé kinocil (Figure 2), qui disparaît après la naissance chez les mammifères (Lim et Anniko 1985). Bien qu'il soit non motile, le kinocil a une structure (9+2) car il a perdu les bras de dynéines, moteurs moléculaires indispensables au mouvement (Lidow et Menco 1984).

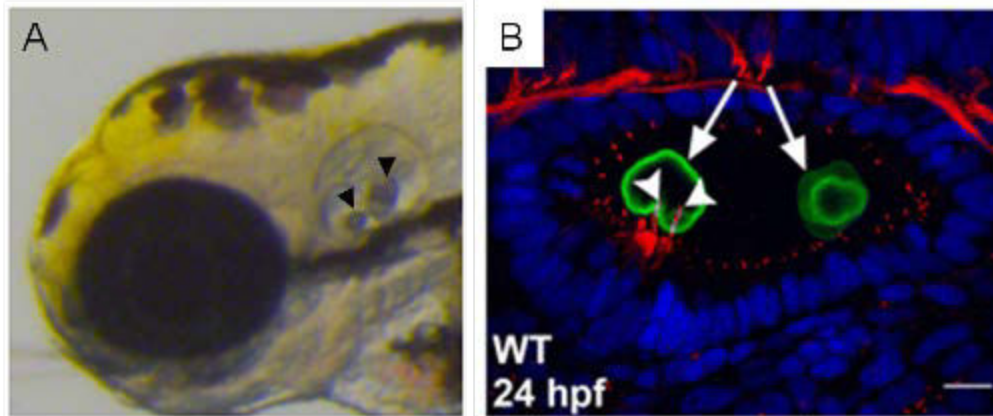


Figure 3 : La vésicule otique chez le poisson zèbre

A) Chez le poisson zèbre la vésicule otique se situe juste derrière l'œil. Les 2 otolithes sont visibles par transparence (têtes de flèche). B) Disposition des 2 otolithes (vert, flèches) aux pôles de la vésicule otique de l'embryon de poisson zèbre 24 après fertilisation (24hpf). Deux kinocils (rouges, têtes de flèche) supportent un otolithe tandis que la vésicule est tapissée de petits cils motiles. Issu de X. Yu et al. 2011.

Chez le poisson zèbre, par contre, le kinocil ne disparaît pas et aurait donc un rôle dans les fonctions auditives. Deux kinocils sont visibles dans la vésicule otique des embryons de poisson, 24h environ après fertilisation. Ils participeraient à la nucléation des 2 otolithes l'un à côté de l'autre dans la vésicule otique (Haddon et Lewis 1996; Riley et al. 1997). De plus, la vésicule otique du poisson est tapissée de cils dont certains seraient motiles et qui seraient nécessaires à la différenciation des kinocils ainsi qu'à l'asymétrie de répartition des otolithes dans l'organe auditif selon une régulation spatiale et temporelle bien précise (Riley et al. 1997; X. Yu et al. 2011) (Figure 3).

1.1.c. Les cils du nœud embryonnaire

Le nœud embryonnaire est une structure particulière qui se forme de façon transitoire au cours du stade de gastrulation et qui est indispensable à la détermination de l'axe gauche-droite de l'embryon. Deux types de cils sont retrouvés au niveau du nœud embryonnaire : les cellules au centre possèdent chacune un cil motile unique qui génère un flux de liquide

extra-embryonnaire orienté vers la gauche et perçu par des cils primaires à la périphérie d'une seule partie du nœud provoquant ainsi une signalisation asymétrique (Hirokawa et al. 2006) (Figure 4A). Qu'ils soient mobiles ou non, les cils des cellules du nœud embryonnaire ont une structure (9+0). En effet, les cils mobiles ne possèdent que des bras de dynéines et n'ont ni paire centrale de microtubules ni ponts radiaires (revu dans Satir et Christensen 2007), ce qui leur permet de décrire un mouvement circulaire.

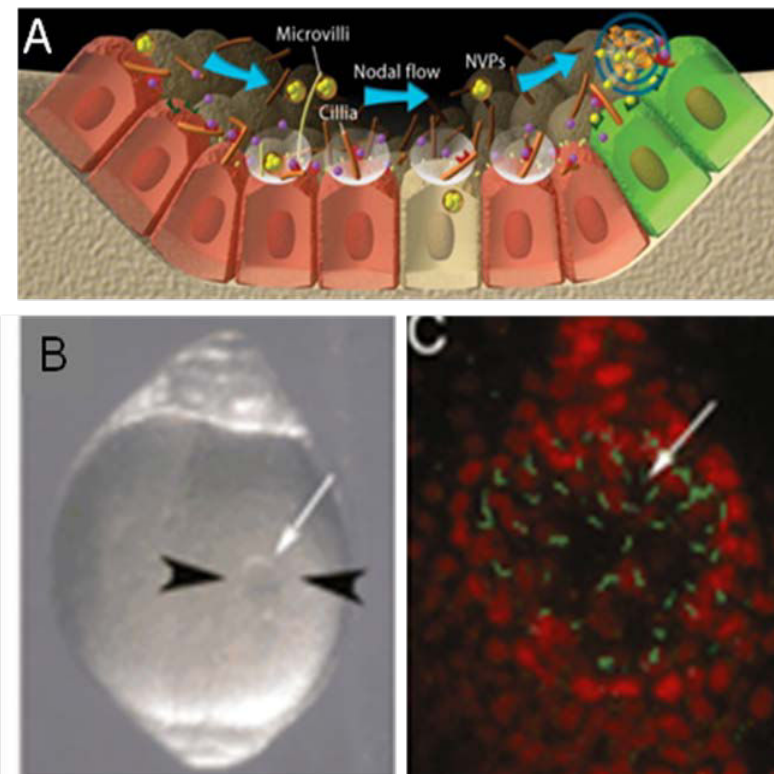


Figure 4 : Les cils du nœud embryonnaire et de la vésicule de Kupffer

A) Le nœud embryonnaire est constitué de cils motiles qui génèrent un flux dans le sens des aiguilles d'une montre. Ce flux est perçu par les cils primaires à la périphérie de l'organe de manière asymétrique et déclenche les voies de signalisation calcique dans les cellules (vertes) à l'origine de la détermination de la latéralité. Issu de Hirokawa et al. 2006. B-C) La vésicule de Kupffer de l'embryon du poisson zèbre est une structure fermée dans laquelle les cils sont clairement visibles en immunofluorescence. Issu de Essner et al. 2005.

Le nœud embryonnaire du poisson zèbre est la vésicule de Kupffer. C'est une structure fermée et transitoire (entre 10 et 17h après fertilisation soit entre 5 et 15 somites) sur la face ventrale du bourgeon caudal (Cooper et D'Amico 1996; Essner et al. 2005; Oteíza et al. 2008) (Figure 4B et C). Les anomalies de la motilité ciliaire ou des cils primaires peuvent entraîner un *situs inversus* (voir Chapitre II.1), le plus souvent caractérisé par des défauts cardiaques.

I.2. Les corps basaux

Dans le cas du cil primaire, le siège de la ciliogenèse est formé du centrosome qui prend alors le nom de corps basal. C'est plus exactement le centriole père (ou « mother centriole »

en anglais) qui sert de base à la nucléation du cil primaire car il possède des appendices distaux capables de s'ancrer à la membrane et de recruter les acteurs de la ciliogenèse. Le corps basal des cils mobiles est formé d'un unique centriole modifié amplifié à partir de structures spécifiques appelées deutérosomes (voir Chapitre I.4.a).

1.2.a Le centrosome

Le centrosome est composé de deux centrioles : le centriole père, aussi appelé centriole mature, et le centriole fils (Figure 5).

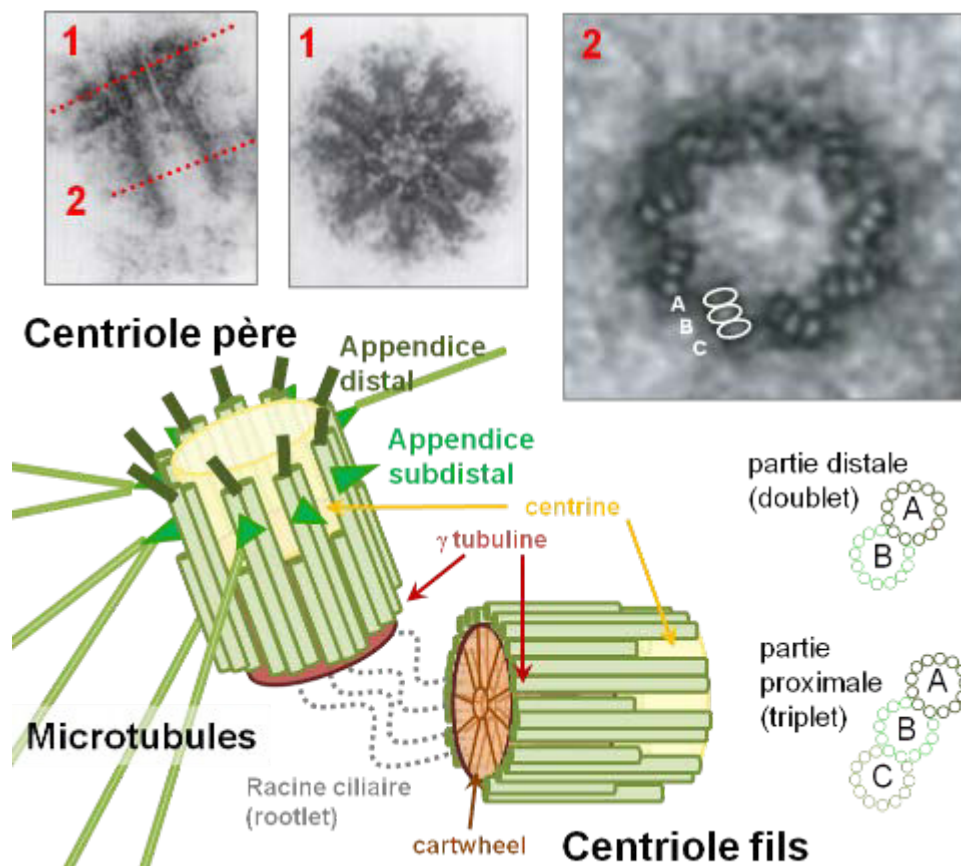


Figure 5 : Structure du centrosome

Le centrosome est composé de 2 centrioles disposés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre et reliés entre eux par des racines ciliaires. Le centriole père se distingue du centriole fils grâce aux appendices distaux et sub-distaux qui forment une couronne (section 1). Les appendices sub-distaux servent de point d'ancrage aux microtubules cytoplasmiques. Dans leur partie proximale, les centrioles sont constitués de 9 triplets de microtubules (A, B et C, section 2), qui entourent une structure stabilisatrice appelée cartwheel, alors que dans leur partie distale, ils ne sont plus constitués que de doublets de microtubules (A et B). La centrine est un marqueur de la partie distale des centrioles tandis que la γ -tubuline est un marqueur de la partie proximale. Adapté de Bornens 2002.

Chacun des centrioles est formé par des microtubules extrêmement stables grâce à des modifications post-traductionnelles telles que la polyglutamylation (Bettencourt-Dias et Glover 2007). Ils possèdent une polarité structurale avec, à leur partie proximale, un pool de γ -tubuline entouré de 9 triplets de microtubules et 9 doublets de microtubules entourant un pool de centrine en partie distale (Paoletti et al. 1996). Les triplets de microtubules sont constitués d'un premier microtubule A complet (le plus au centre) qui supporte consécutivement deux microtubules B et C incomplets (en périphérie). Les triplets sont disposés en cylindre autour d'une structure en forme de roues superposées les unes sur les autres (appelées cartwheel). Chaque roue se compose de 9 filaments (spokes) qui rayonnent autour d'un anneau central (hub). Chaque filament est connecté au microtubule A des triplets de microtubules grâce à un composant dit en « tête d'épingle » (pinhead). Il a été proposé que ce cartwheel serve de squelette interne aux centrioles lors de leur formation et pour stabiliser leur structure en 9 (Nakazawa et al. 2007). Lors de leur élongation, seuls les microtubules A et B de chaque triplet se prolongent après le cartwheel. A la fin de la maturation centriolaire, le cartwheel est dégradé (Guichard et al. 2010).

Le centriole père se distingue du centriole fils par la présence d'appendices distaux et sub-distaux sur chaque microtubule B (Paintrand et al. 1992), formant une couronne (revu dans Bornens 2002).

Les appendices sub-distaux

Les appendices sub-distaux permettent l'ancrage des microtubules cytoplasmiques au centrosome (Figure 5). Ils sont constitués de nineine (Mogensen et al. 2000), centrioline (Gromley et al. 2003), ϵ -tubuline (Chang et al. 2003), cenexine/ODF2 (Lange et Gull 1995; Nakagawa et al. 2001), EB1 (Louie et al. 2004) et de CEP170 (Guarguaglini et al. 2005). C'est la nineine qui servirait de protéine d'ancrage à l'extrémité (-) des microtubules et participerait à leur stabilité (Mogensen et al. 2000). En effet, le centrosome est connu pour orchestrer les événements cellulaires dépendants des microtubules tels que la division cellulaire, la polarisation et la motilité des cellules grâce à sa propriété d'ancrer les microtubules. Le centrosome constitue ainsi un centre de nucléation et d'ancrage des microtubules (MTOC) particulièrement dynamique (revu dans Bornens 2002).

Dans les cellules multiciliées, les 9 appendices sub-distaux du centriole père sont remplacés par un « pied basal » unique (Figure 8B, Gibbons 1981) dont la formation est aussi dépendante d'ODF2 (Kunimoto et al. 2012). Il serait souvent associé au réseau de microtubules cytoplasmiques situés en dessous de la membrane apicale de la cellule (Gordon 1982). Les corps basaux étant généralement polarisés dans les cellules multiciliées, il est tentant de penser que les « pieds basaux » et le réseau de microtubules apical jouent un rôle dans cette polarisation. L'orientation des corps basaux déterminant celle des cils, il a été suggéré que l'association des pieds basaux avec le réseau de microtubules participerait à la coordination des battements ciliaires (Kunimoto et al. 2012).

Les appendices distaux

Les appendices distaux, quant à eux, permettent l'ancrage du corps basal à la membrane plasmique lors de la ciliogenèse. Ils s'assemblent sur le brin B des triplets microtubules à partir de la protéine centrosomale, CEP83, qui est indispensable au recrutement des protéines CEP89/CEP123 (Sillibourne et al. 2011), d'une part, et SCLT1, d'autre part. A partir de SCLT1, s'ajoutent les protéines CEP164 (Graser et al. 2007) et FBF1, formant deux nouveaux branchements différents (Figure 6 ; Tanos et al. 2013). Dès que le cil est formé, ces appendices distaux prennent le nom de fibres de transition.

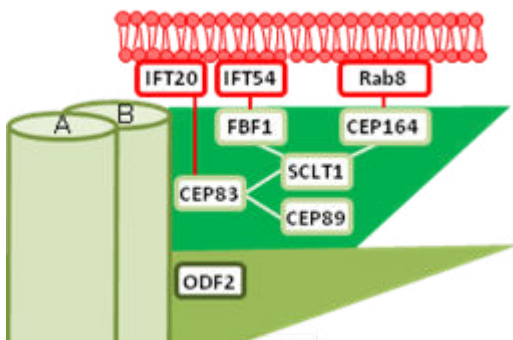


Figure 6 : Structure des appendices distaux

Les appendices distaux (vert foncé) s'assemblent à la partie distale des 9 doublets de microtubules du centriole père pour l'ancrer à la membrane (rouge). Adapté de Tanos et al. 2013.

La formation des appendices est aussi contrôlée par ODF2 (Tateishi et al. 2013). Tateishi et al ont montré que l'assemblage des appendices sub-distaux dépendait du domaine N-terminal d'ODF2 tandis que la formation des appendices distaux dépendait de son domaine C-terminal. Ainsi, seule l'extrémité C-terminale d'ODF2 est indispensable à la formation du cil. Les protéines OFD1 et C2cd3 sont indispensables au recrutement des différents constituants des appendices distaux (Singla et al. 2010; Ye et al. 2014) en contrôlant l'élongation des centrioles (Singla et al. 2010; Christel Thauvin-Robinet et al. 2014).

La partie distale des centrioles

Dans les cellules en cycle, la ciliogenèse est inhibée par la protéine centrosomale CP110 (Tsang et al. 2006). Elle est recrutée et stabilisée à la partie distale des centrioles par CEP97 où ce complexe forme une coiffe. Il agit ainsi comme un régulateur négatif de la ciliogenèse en empêchant la croissance des microtubules centriolaires (Spektor et al. 2007) (Figure 7A). L'activité de dépolymérisation et de remodelage des microtubules des centrioles de la kinésine KIF24 participerait aussi à la stabilisation et au recrutement de CP110 et CEP97 à la partie distale des centrioles contribuant à l'inhibition de la ciliogenèse (Kobayashi et al. 2011). Ainsi, ces protéines contrôleraient la taille des centrioles (T. I. Schmidt et al. 2009) comme OFD1 et C2cd3. Après l'ancrage du centriole père à membrane *via* les appendices distaux, CEP290 s'associerait à Talpid3 et à la centrine à la partie distale des microtubules centriolaires pour lever cette inhibition (Prosser et Morrison 2015) en recrutant la protéine Tau tubulin kinase 2 (Ttbk2). Ttbk2 interagit avec CEP164 au niveau des appendices distaux (Oda et al. 2014) et déplacerait CP110 (Goetz, Liem, et Anderson 2012) de la partie distale du centriole père en le phosphorylant, permettant ainsi l'élongation du cil (Figure 7B).

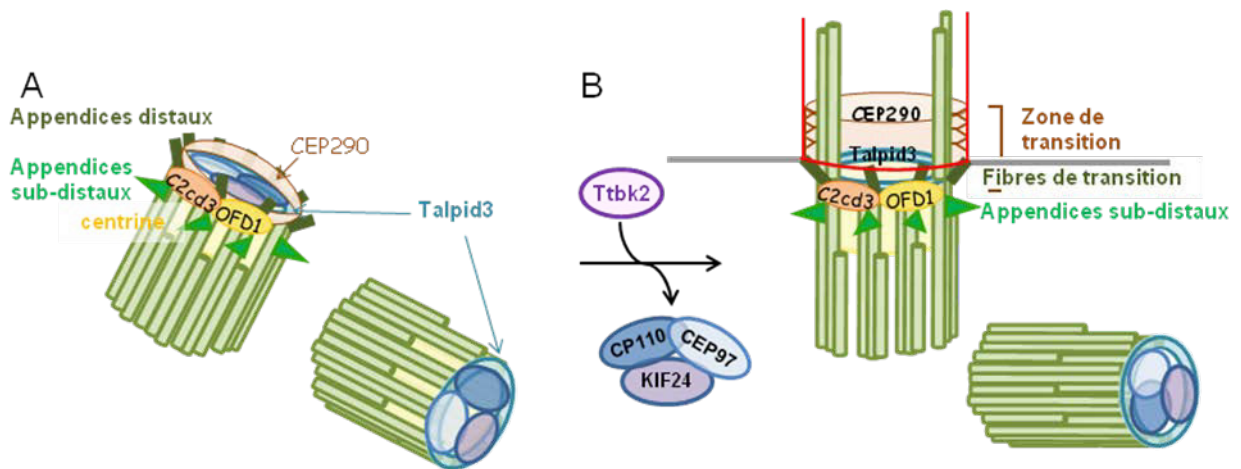


Figure 7 : Les protéines de la partie distale des centrioles lors des premières étapes de la ciliogenèse

A) Dans les cellules en cycle, la partie distale des 2 centrioles est coiffée d'un complexe protéique formé de KIF24, CP110 et CEP97. B) Lors des étapes précoces de la ciliogenèse le recrutement de Ttbk2 au centrosome par Talpid3, CEP290 et la centrine entraîne le déplacement de KIF24, CP110 et CEP97 du centriole père afin de permettre l'élongation des microtubules de l'axonème.

Ainsi, CP110 et CEP97 se localisent à l'extrémité distale des deux centrioles tout au long du cycle cellulaire et disparaissent uniquement du centriole père dans les cellules ciliées. Une fois l'extrémité du centriole libérée de CP110, de nombreuses protéines de la partie distale

vont participer au recrutement de protéines jouant un rôle clé au niveau du cil. Par exemple, CEP290 recrute la petite GTPase, Rab8, dans le cil (Tsang et al. 2008) pour favoriser son élongation. Les protéines centriolaires, ODF1 et Cby1, quant à elles, recrutent AHI et forment un complexe indispensable à la fonction des fibres de transition et donc à l'intégrité du cil. Il a été montré que Cby était nécessaire à la formation de la zone de transition et participait au recrutement des protéines d'IFT indispensables à la ciliogenèse (Enjolras et al. 2012). Enfin, Cby1 recrute aussi la protéine membranaire, ARL13b, et pourrait être impliqué dans des voies de signalisation ciliaires (Y. L. Lee et al. 2014).

1.2.b. Les racines ciliaires

L'extrémité proximale des centrioles est caractérisée par les racines ciliaires (Worley, Fischbein, et Shapiro 1953). Dans les cellules non ciliées, les racines ciliaires sont présentes entre les 2 centrioles et permettent de les relier physiquement entre eux pour maintenir l'intégrité du centrosome (Figure 5). Le constituant très majoritaire des racines ciliaires est la rootetine, une protéine composée principalement de domaines coiled-coil capables de former des homodimères. Ces homodimères se polymérisent en protofilaments qui se regroupent pour former les racines ciliaires à la base des cils (Yang et al. 2002). Elles sont particulièrement élaborées dans les photorécepteurs et les cellules multiciliées. Dans les photorécepteurs, elles apparaissent comme de fins filaments striés qui parcourent tout le corps cellulaire jusqu'à la terminaison synaptique (Spira et Milman 1979). Dans les cellules épithéliales multiciliées, elles forment un réseau de filaments solides sous la membrane apicale (Figure 8B). Les racines ciliaires ne sont pas nécessaires à la ciliogenèse ni aux fonctions du corps basal. Par contre, elles confèrent une grande stabilité à la base du cil et jouent un rôle d'ancrage très important. Les cellules photoréceptrices élaborent un cil particulièrement grand et la présence d'un réseau de filaments fournit rigidité et maintien, également essentiel à leur viabilité à long terme (Yang et al. 2005). Pour cela les filaments des racines ciliaires s'associent aux filaments intermédiaires et aux filaments d'actine qui permettent à la cellule de résister aux tensions mécaniques (Lemulloy, Gounon, et Sandoz 1987). De même, les racines ciliaires stabiliseraient les cils motiles pour faciliter et synchroniser leurs battements. Les racines ciliaires pourraient aussi participer au bon positionnement du centrosome et du cil dans la cellule en s'associant aux autres organites tels que le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les mitochondries et même le

noyau. Il a aussi été proposé que la rootletine serve de site d'ancrage à certains cargos vésiculaires et joue ainsi un rôle dans le trafic intracellulaire (Yang et al. 2005).

I.3. L'axonème

Le cil se forme par l'élongation des microtubules A et B du centriole père du corps basal formant un squelette de 9 doublets de microtubules stables (9+0) et disposés en cercle, l'axonème (Figure 8). Dans les cils (9+2), deux simples brins de microtubules sont nucléés au centre de l'axonème, à partir de la plaque basale, au niveau de la partie proximale du cil (zone de transition ; Figure 8B ; Gilula et Satir 1972). Comme les microtubules cellulaires, ces microtubules se polymérisent à partir d'hétérodimères d' α - β tubuline avec l'extrémité (-), très stable, à la base et l'extrémité (+), très dynamique, au sommet du cil.

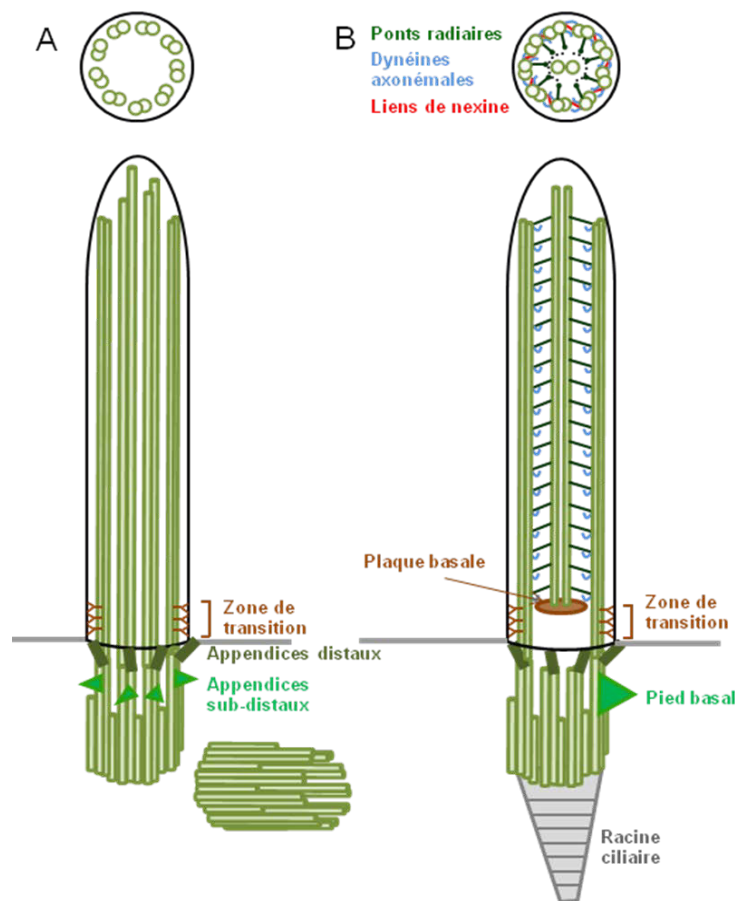


Figure 8 : Structure des cils

A) Le cil primaire est constitué d'un axonème à 9 doublets de microtubules formés à partir du centriole père du corps basal et qui est séparé du corps cellulaire par la zone de transition. Le centriole père se distingue du centriole fils par la présence d'appendices distaux et sub-distaux. B) Le cil motile est constitué de 9 doublets de microtubules qui entourent une paire centrale de microtubules. Les 9 doublets périphériques sont formés à partir du corps basal à un centriole tandis que la paire centrale est issue de la plaque basale. Le centriole possède des appendices distaux et un pied basal dans la partie distale et des racines ciliaires dans la partie proximale. Le mouvement est permis grâce à des moteurs moléculaires, les dynéines et des protéines associées, les ponts radiaires et les liens de nexines.

La stabilité des microtubules est associée à des modifications post-traductionnelles comme l'acétylation (L'Hernault et Rosenbaum 1985), la détyrosination (Stephens 1992), la polyglycation (Xia et al. 2000) ou la polyglutamylation (Kubo et al. 2010) qui servent de marqueurs de l'axonème. Ces modifications ne sont pas toujours présentes au niveau de la

partie distale de l'axonème car il s'agit du site d'élongation des microtubules et ils peuvent y être très dynamiques.

1.3.b. Les protéines associées aux microtubules des cils motiles

Les bras de dynéines et ponts radiaux

Le battement ciliaire est dépendant de moteurs moléculaires, les dynéines, qui font glisser les doublets de microtubules des cils les uns par rapport aux autres. Les dynéines forment des complexes protéiques, appelés bras de dynéines, composés de chaînes lourdes, intermédiaires et légères. Les bras de dynéines, directement observables en microscopie électronique, sont disposés selon une périodicité fixe, en 2 rangées de part et d'autre des microtubules A, l'une à l'extérieur (bras externes) et l'autre à l'intérieur (bras internes) de l'axonème (Figure 9).

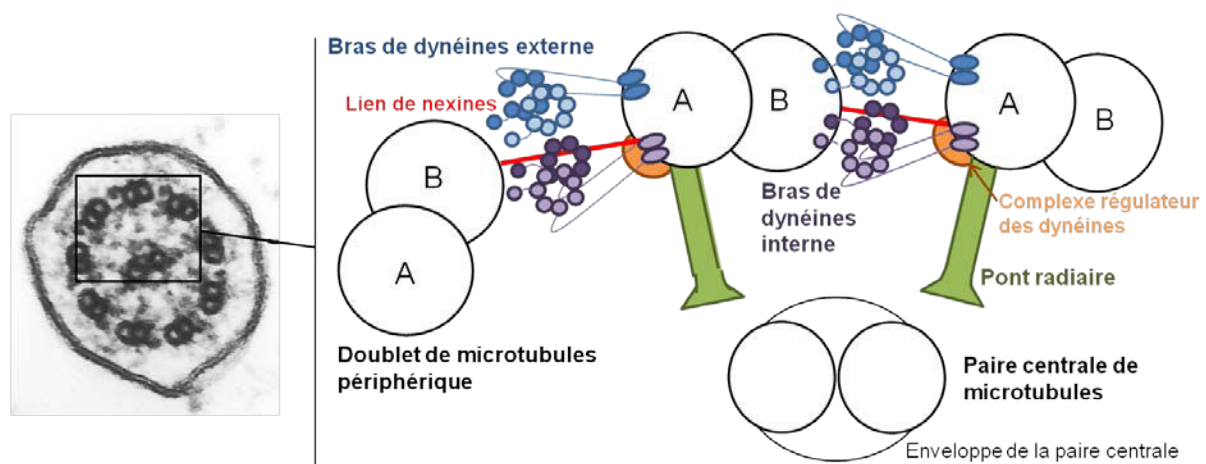


Figure 9 : Les protéines indispensables au battement des cils motiles

Les cils motiles de structure (9+2) sont composés de moteurs moléculaires à activité ATPasique, les dynéines, qui permettent le battement. Elles forment des bras internes (violet) et externe (bleu), de part et d'autre des microtubules A de chaque doublet périphérique et entrent en contact avec le microtubule B adjacent pour le faire glisser lors du cycle de l'ATP et créer le mouvement. Le mouvement de va-et-vient est régulé par les liens de nexines, qui relient les microtubules périphériques entre eux, et les ponts radiaux, qui relient les complexes régulateurs des dynéines à l'enveloppe de la paire centrale. Adapté de Lindemann et Lesich 2010.

Les bras de dynéines sont fixés au microtubule A grâce aux chaînes intermédiaires et leurs unités motrices sont localisées au niveau des chaînes lourdes. Ces dernières sont constituées d'une queue N-terminale reliée au microtubule A *via* les chaînes intermédiaires et légères, de 6 domaines ATPasiques disposés en anneau et d'un domaine coiled-coil qui peut interagir

transitoirement avec le microtubule B du doublet adjacent. Au cours du cycle de l'ATP, l'anneau de domaines ATPases pivote et le domaine coiled-coil est modifié pour augmenter l'affinité de l'unité motrice avec le microtubule sur lequel elle exerce une force. Au moment de la libération de phosphate par l'ATP, l'énergie fournie permet de modifier l'orientation des unités motrices vers la partie distale de l'axonème entraînant le microtubule B (King 2010). Le glissement des doublets de microtubules les uns par rapport aux autres est limité par les liens de nexines qui relient les doublets à leurs voisins et transforment le mouvement en battement. De plus, comme les dynéines se déplacent toutes dans la même direction le long de l'axonème, elles ne peuvent pas être activées toutes en même temps. Pour orienter le cil dans un sens puis dans l'autre et produire le battement, celles d'un côté de l'axonème sont activées pendant que celles du côté opposé sont inactives, et vice et versa (Figure 10A ; Lindemann et Lesich 2010). Cette alternance entre activation et inactivation serait induite par une signalisation calcique au niveau de complexes régulateurs des dynéines et des ponts radiaires (E. F. Smith et Yang 2004).

Les ponts radiaires forment une structure en T qui relie la paire centrale de microtubules aux bras de dynéines internes *via* une tige ancrée au microtubule A des doublets périphériques et une tête qui entrerait en contact avec l'enveloppe de la paire centrale de façon transitoire (Figure 9 ; Goodenough et Heuser 1985). Les complexes régulateurs des dynéines interagiraient avec les bras de dynéines internes, les liens de nexines et les ponts radiaires pour réguler l'activation des unités motrices (voir Chapitre II.1).

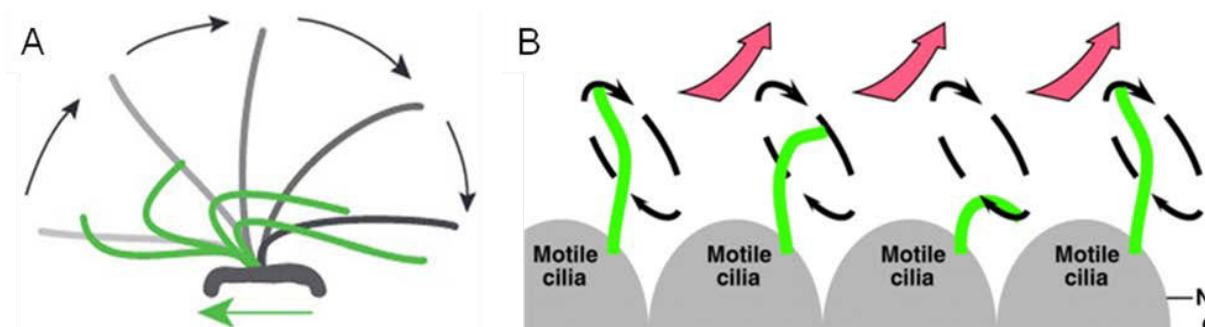


Figure 10 : Les différents mouvements des cils motiles

A) Les cils des cellules épithéliales bronchiques, épendymaires et du tractus génital féminin exercent de forts battements synchronisés (en gris) suivis d'une phase de rétablissement (en vert). Issu de Werner, Onnebrink, et Omran 2015. B) Les cils motiles du nœud embryonnaire (en vert) observent une rotation dans le sens des aiguille d'une montre qui produit un flux asymétrique (flèches rouges). Issu de Bisgrove et Yost 2006.

En l'absence de pont radiaire et de microtubule central comme dans le cas des cils motiles (9+0), les dynéines sont toujours capables de s'activer mais elles entraînent un mouvement circulaire du cil au lieu d'un mouvement de va-et-vient (Figure 10B). Le bras externe des dynéines seraient donc à l'origine de la force des battements tandis que les ponts radiaires, avec l'aide des bras internes, les réguleraient et seraient à l'origine de la forme du mouvement (Lindemann et Lesich 2010).

Les tektines

Les expériences *in vitro* de dissociation de l'axonème par des procédés chimiques ont montré que les microtubules des flagelles d'oursin de mer étaient constitués de protofilaments très stables qui résistaient à ces traitements, appelés « ribbons » (R. W. Linck, Amos, et Amos 1985). Ils sont constitués d' α - et β -tubuline, d'autres protéines spécifiques (ex. Sp77 et Sp83) et de filaments de tektines (Nojima, Linck, et Egelman 1995). Les tektines sont exprimées dans tous les organismes ciliés et chez les vertébrés sous le contrôle des facteurs de transcription FOXJ1 (Hellman et al. 2010; Didon et al. 2013) et RFX-2 (Chung et al. 2014; voir Chapitre I.4.c). Elles sont très conservées au cours de l'évolution. Il existe une isoforme chez *Chlamydomonas*, 3 chez l'oursin (tektines A, B et C) 4 chez le poisson zèbre et 5 chez les mammifères.

Les tektines sont constituées de 4 hélices- α regroupées deux par deux (hélices 1A, 1B, 2A et 2B), chaque hélice étant séparée par un domaine dit de liaison (Figure 11A). Les hélices des segments 1 et 2 présentent une forte homologie de séquence et permettraient la formation de dimères parallèles. Une séquence de 9 résidus (RPNVELCRD), localisée dans le dernier domaine de liaison séparant les hélices 2A et 2B (Figure 11A), est particulièrement conservée au sein de toutes les tektines et suggère l'importance de ces motifs pour l'interaction des tektines entre elles et/ou avec les dimères de tubuline au sein du microtubule A (J. M. Norrander et al. 1996; Amos 2008). Les données chez l'oursin de mer montrent que les tektines sont retrouvées en quantité équimolaire dans un protofilament qui serait alors composé de deux hétérodimères des isoformes A et B (homologues des tektines 2 et 4) et d'un homodimère de tektine C (homologue de la tektine-1).

Le filament de tektines est retrouvé à l'intérieur du brin A des doublets de microtubules de l'axonème et des triplets des centrioles (R. W. Linck, Amos, et Amos 1985 ; Figure 11B). A ce

jour, les fonctions précises associées à cette localisation restent mystérieuses. Il a été proposé que les tektines formeraient un point d'ancrage au brin B de microtubule sur le brin A. Elles pourraient aussi servir de site d'assemblage aux bras de dynéines, ponts radiaux et liens de nexines sur le microtubule A puisque la distance entre deux molécules de tektines le long des filaments du ribbons est similaire à celle séparant 2 dynéines (Richard W. Linck et Norrander 2003). Il est cependant difficile de comprendre comment l'information portée par les filaments de tektines à l'intérieur du doublet pourrait être interprétées à l'extérieur du microtubule. Le filament de tektines pourrait aussi conférer une très grande stabilité aux doublets de microtubules lors du glissement et de la flexion de l'axonème (Sui et Downing 2006) puisqu'elles ont une périodicité axiale équivalente à celle des dimères de tubuline (Richard W. Linck et Norrander 2003).

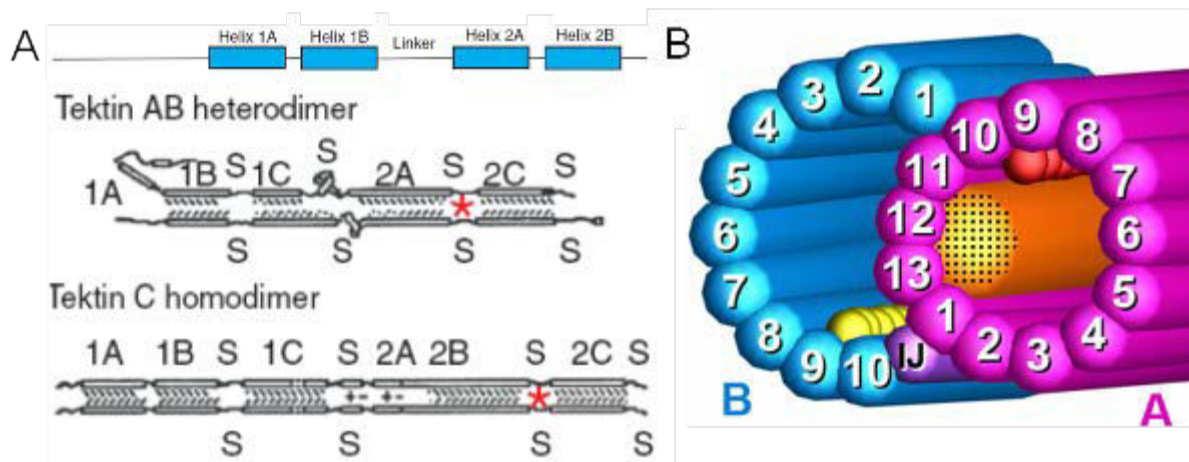


Figure 11 : Localisation et structure des filaments de tektines

A) Les tektines sont composées de 4 hélices regroupées 2 par 2 (hélices 1A, 1B, 2A et 2B), chaque hélice étant séparée par un domaine de liaison (Linker). Chez l'oursin de mer, les tektines A et B s'hétérodimérisent tandis que les tektines C s'homodimérisent. Les tektines sont composées de domaines de liaison séparés par des ponts disulfures (S). Le nanopeptide très conservé est localisé dans le dernier domaine de liaison (étoile rouge). Issu de Amos 2008. B) Représentation d'une section de doublet de microtubules. Le microtubule incomplet B (bleu) repose sur le microtubule A (rose). Les filaments de tektines (orange) sont localisés à la jonction entre les microtubules A et B axonémaux. Issu de R. Linck et al. 2014.

L'étude des tektines chez les rongeurs a beaucoup contribué à caractériser le rôle physiologique de ces protéines. La tektine-1 est fortement exprimée dans les tissus présentant des cils motiles (épendyme, épithélium bronchique, testis) (J. Norrander et al. 1998). Elle a été localisée au niveau des centrosomes des spermatides en différenciation et disparaît progressivement au cours de la spermatogénèse chez la souris (Larsson et al. 2000).

Elle a également été localisée dans le flagelle des spermatozoïde chez l'homme (Xu et al. 2001). Sa fonction n'a pas été étudiée.

La tektine-2, ou tektine-t, est présente entre la tête et le flagelle des spermatozoïdes, dans une partie appelée « pièce intermédiaire » (Tanaka et al. 2004). L'inactivation du gène chez la souris entraîne des anomalies des bras internes de dynéines conduisant à l'immobilité des spermatozoïdes et des cils bronchiques. Ces données confortent l'hypothèse que les tektines peuvent aussi servir de site d'assemblage des protéines accessoires indispensables aux battements ciliaires telles que les bras de dynéines.

La perte du gène *Tekt3* chez la souris entraîne le même type de phénotype avec une réduction de la motilité des spermatozoïdes (Roy et al. 2009). Le phénotype est encore plus drastique chez les souris invalidées pour *Tekt4* qui présente des défauts importants de coordination des battements des flagelles sans affecter, pour autant, la structure de l'axonème (Roy et al. 2007). Enfin, la tektine-5 a aussi été localisée dans les flagelles des spermatozoïdes chez le rat (Murayama et al. 2008).

L'ensemble de ces données indiquent clairement que les tektines sont intimement liées aux fonctions motrices des flagelles et des cils motiles chez les mammifères ; aucune étude n'a jamais été réalisée dans les cils primaires. Enfin, en plus de leurs fonctions ciliaires, les tektines 1 et 2 ont été observées au centrosome et au niveau du midbody dans les cellules en mitose où elles sont requises pour la cytokynèse (R. He et al. 2013; Durcan et al. 2008). Le rôle des autres tektines dans la cytokynèse n'a pas été étudié.

1.3.c. La zone de transition et les fibres de transition

Bien que la membrane ciliaire soit en continuité avec la membrane plasmique, le cil forme un compartiment distinct du reste de la cellule. Une barrière physique est établie entre le cil et la cellule, constituée des fibres de transition, qui relie le corps basal du cil à la membrane, et de la zone de transition. La zone de transition est un domaine particulièrement conservé au cours de l'évolution et caractérisé par des projections en "Y" qui relie les microtubules de l'axonème à la membrane ciliaire formant un collier à la base du cil (Figure 12 ; Gilula et Satir 1972). Elle a d'abord été décrite dans les cils mobiles comme une région se trouvant entre la paire centrale de microtubules et le corps basal, avant d'être identifiée dans la plupart des types ciliaires, mobiles ou sensoriels. La zone de transition joue

le rôle d'une barrière de diffusion pour les protéines solubles et de filtre moléculaire pour les protéines membranaires ciliaires (Q. Hu et Nelson 2011) rappelant les pores nucléaires (Satir et Christensen 2007). En effet, l'inactivation de certaines protéines de la zone de transition entraîne des défauts dans la localisation des composants ciliaires comme les IFT (Jauregui et al. 2008) ou de la membrane ciliaire (Awata et al. 2014). Différents complexes protéiques de la zone de transition interagissent pour contrôler la composition ciliaire. La constitution protéique de ces complexes a été mise en évidence avec l'identification des gènes mutés dans des ciliopathies (voir Chapitre II.2). Ces complexes sont constitués de protéines NPHP, NPHP1-NPHP4-NPHP8 (Williams et al. 2011), CEP290/NPHP6 et NPHP5 (Schäfer et al. 2008), et des 13 protéines du module MKS comprenant les protéines MKS, Tectonic, Tmem et AHI1 (Figure 12 ; Garcia-Gonzalo et al. 2011). Plus particulièrement, CEP290 et NPHP4 participeraient à l'interaction entre les microtubules et la membrane ciliaire pour préserver l'étanchéité de la barrière de diffusion et la composition ciliaire (Craigie et al. 2010; Awata et al. 2014).

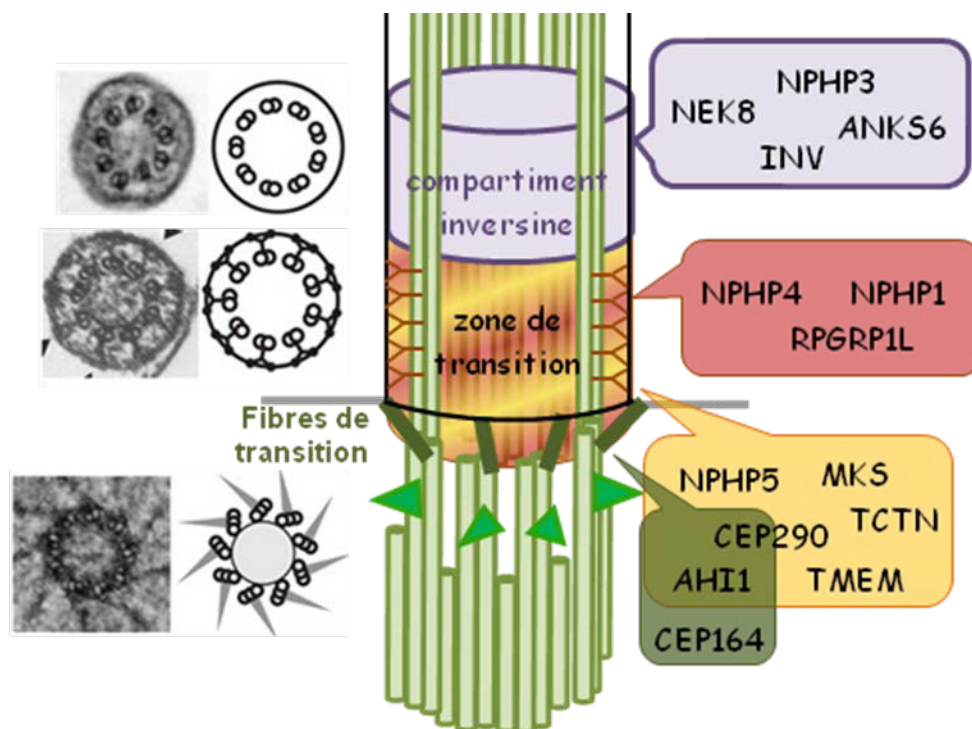


Figure 12 : Les protéines de la zone de transition et du compartiment inversine

La zone de transition est composée de 2 complexes protéiques formés des protéines NPHP (rouge) et MKS (jaune) qui sont importants pour la ciliogenèse et la régulation des protéines de signalisation. Les fibres de transition (vert) permettent l'ancrage et la filtration des protéines ciliaires. Le compartiment inversine est constitué des protéines INV, NEK8, NPHP3 et ANKS6 (violet). Adapté de H. H. Arts et Knoers 2013; Czarnecki et Shah 2012.

Les septines participent également à cette barrière de diffusion. Les septines, une famille de protéines du cytosquelette qui fixent le GTP, forment des oligomères qui s'assemblent en anneaux ou filaments et s'associent à l'actine, les microtubules ou la membrane plasmique (Caudron et Barral 2009). Les septines ont été impliquées dans la formation de barrières de diffusion notamment au niveau de l'anneau contractile lors de la division cellulaire ou des épines dendritiques des neurones (K. Schmidt et Nichols 2004; Tada et al. 2007). Dans les cils, elles participent à la formation de l'annulus, une barrière de diffusion à l'extrémité distale de la pièce intermédiaire du flagelle des spermatozoïdes (Kuo et al. 2015). Enfin, au cil primaire, SEPT2 a été impliquée dans la formation d'un anneau entre l'axonème et les fibres de transition où elle participerait à la restriction du trafic de protéines membranaires dans le cil (Q. Hu et al. 2010). Toutefois, la distribution des septines dans le cil dépend du type tissulaire et cellulaire car SEPT2, SEPT7 et SEPT9 ont aussi été retrouvées tout le long de l'axonème où elles jouent un rôle positif dans l'élongation de l'axonème (Ghossoub et al. 2013; annexe 1).

Comme indiqué ci-dessus (Chapitre I.2.a), les appendices distaux sont appelés fibres de transition dès l'ancrage du corps basal à la membrane. Elles pourraient participer au phénomène de sélection des protéines ciliaires et/ou à la barrière de diffusion limitant l'accès au compartiment ciliaire (revu dans Wei, Ling, et Hu 2015). Elle servirait également de point d'ancrage aux particules IFT notamment via leur interaction avec IFT54/IFT20 (voir Chapitre I.4.b).

1.3.d. Le compartiment inversine

Un autre complexe protéique a été identifié dans une zone distincte de la partie proximale de l'axonème, appelée « compartiment inversine » (Figure 12). Ce domaine n'a pas été caractérisé par des analyses structurales des cils par microscopie électronique. Il a été identifié par la présence de l'inversine (Inv/NPHP2) enrichie au niveau de la partie proximale de l'axonème (Morgan et al. 2002; Watanabe et al. 2003). Elle est nécessaire au recrutement des autres protéines du compartiment : Nek8/NPHP9, NPHP3 et ANKS6/NPHP16 (Shiba et al. 2010; Hoff et al. 2013, Figure 13). Bien que ce compartiment semble indispensable à l'intégrité des fonctions de signalisation ciliaire, sa fonction précise n'est pas encore claire. Simons et al. (2005) ont suggéré que Inv/NPHP2 pouvait avoir une fonction dans l'équilibre

entre les voies Wnt canonique et non-canonique (voir Chapitre I.5) et Bergmann et al. (2008) ont montré que NPHP3 inhibait l'induction de la voie Wnt canonique *via* Disheveled dans le xénope. Le complexe du compartiment jouerait donc un rôle dans la régulation de certaines voies de signalisation.

I.4. La ciliogenèse

I.4.a. L'initiation de la ciliogenèse

La formation du cil, ou ciliogenèse, nécessite l'ancrage préalable du corps basal à la membrane puis l'apport des constituants de l'axonème et de la membrane ciliaire qui seront ensuite acheminés dans le cil grâce au transport intraflagellaire selon des processus finement régulés.

L'ancrage du corps basal

Deux voies de formation des cils primaires ont été décrites selon le type cellulaire. Dans les cellules épithéliales polarisées comme les cellules épithéliales rénales, le centrosome s'ancrerait directement à la membrane apicale *via* les appendices distaux (Figure 13B). Dans les cellules non polarisées comme les fibroblastes, S. Sorokin (1962) a proposé un modèle dans lequel le cil commencerait à pousser dans une vésicule ciliaire dans le cytoplasme qui fusionnerait ensuite avec la membrane plasmique pour libérer le cil dans le milieu extracellulaire (Figure 13A). Il a récemment été démontré que la vésicule ciliaire était issue de plusieurs petites vésicules qui se fixent sur les appendices distaux et fusionnent entre elles grâce à des protéines de la famille EHD (Eps15 homology domain) et à la machinerie des SNARE (Lu et al. 2015). La vésicule ciliaire semble provenir directement de l'appareil de Golgi puisqu'elle est caractérisée par la présence de Rab8 (Peränen 2011) ou IFT20 (Follit et al. 2006), toutes deux impliquées dans le trafic vésiculaire à partir de l'appareil de Golgi. De plus, CEP83, essentielle à l'ancrage du centrosome à la membrane, est également retrouvée au Golgi où elle interagit avec IFT20 et participerait ainsi au transport et à l'ancrage de la vésicule ciliaire au centrosome (Joo et al. 2013). CEP164, quant à elle, participerait au recrutement et à l'activation de Rab8 par son facteur d'échange, Rabin8 (K. N. Schmidt et al. 2012), elle-même transportée au niveau du centrosome par Rab11, un régulateur des endosomes de recyclage péricentriolaires (Westlake et al. 2011). D'autres protéines

centriolaires telles que CEP290 et Talpid3 sont aussi indispensables au recrutement de Rab8 au centrosome (Kobayashi et al. 2014) et pourraient former une plateforme pour faciliter les étapes initiales de la ciliogenèse.

Lors de l'élongation du cil dans la vésicule, le corps basal ne changerait de position par rapport au noyau, c'est l'extrémité distale du cil qui progresserait vers la surface de la cellule et la membrane de la vésicule ciliaire fusionnerait avec la membrane plasmique pour libérer le cil dans le milieu extracellulaire (revu dans S. P. Sorokin 1968; Ghossoub et al. 2011). La partie proximale du cil est alors entourée d'une invagination de la membrane plasmique, la poche ciliaire (Figure 13B), enrichie en structures d'endocytose (Ghossoub et al. 2011), qui pourrait aussi se comporter comme une plateforme d'ancrage du cytosquelette et de transport vers le cil (Benmerah 2013).

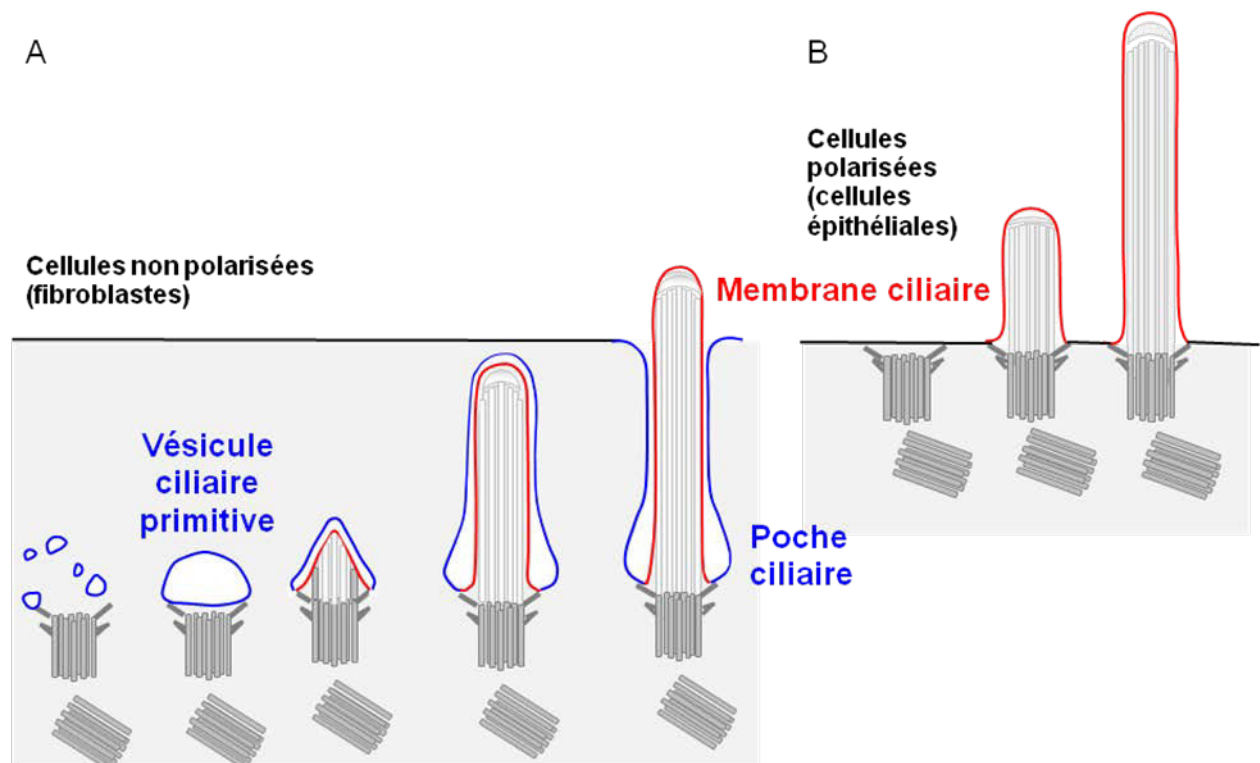


Figure 13 : Les deux voies de formation des cils primaires

A) Dans les cellules non polarisées comme les fibroblastes, l'axonème grandit dans la vésicule ciliaire primitive formée par la fusion de petites vésicules qui s'ancrent aux appendices distaux du centriole père. Au cours de la croissance, la vésicule s'allonge et fusionne avec la membrane plasmique pour libérer le cil dans le milieu extérieur. La base du cil est alors entourée de la poche ciliaire. B) Dans les cellules polarisées comme les cellules épithéliales, le corps basal s'ancre à la membrane plasmique et le cil pousse directement à l'extérieur de la cellule. La membrane plasmique s'invagine pour former la membrane ciliaire. Adapté de Sorokin, 1962.

La plupart des protéines membranaires ciliaires sont adressées au cil dans des vésicules golgiennes ou issues des endosomes de recyclage grâce à des motifs dans leur région cytoplasmiques qui permet de les sélectionner et/ou les faire entrer dans le cil (revu dans Madhivanan et Aguilar 2014). Ces vésicules permettent également l'apport de membrane nécessaire à la croissance de la membrane ciliaire.

L'amplification centriolaire dans les cellules multiciliées

Contrairement aux cils primaires qui sont uniques à la surface de la cellule, les cils motiles sont nombreux à la surface des cellules, ce qui nécessite l'amplification préalable des corps basaux constitués d'un seul centriole. Au cours de leur réplication, les centrioles sont formés à partir de la partie proximale des deux centrioles pendant que le cil primaire se désassemble. Les centrioles sont capables de produire une dizaine de nouveaux centrioles, ce qui est loin des centaines de centrioles observés dans les cellules multiciliées. Un mode d'amplification « acentriolaire » a alors été décrit et formerait environ 90% des procentrioles dans les cellules multiciliées. Bien que ce mécanisme ait été observé il y a plusieurs décennies (S. P. Sorokin 1968), il n'a été décrit précisément que très récemment dans les cellules épendymaires (Al Jord et al. 2014). Les procentrioles forment des halos autour de plusieurs structures denses aux électrons en microscopie électronique, appelées deutérosomes, et nucléées les unes après les autres à partir du segment proximal du centriole fils, alors que le cil primaire est toujours présent (Figure 14A). La composition des deutérosomes commence seulement à être étudiée avec l'identification de Deup1 (Zhao et al. 2013; Klos Dehring et al. 2013). Les procentrioles se développent simultanément autour du deutérosome, leur partie distale vers l'intérieur. Alors que les deutérosomes sont encore dans la région péricentriolaire, la maturation s'arrête, les procentrioles sont petits et constitués de simples brins de microtubules (Figure 14B). Une fois que le dernier deutérosome est nucléé, tous les deutérosomes s'éloignent du centrosome. Dans le cytoplasme, les procentrioles finissent leur élongation autour des deutérosomes et forment alors une structure en fleur (Figure 14C). Enfin, les centrioles sont relâchés (Figure 14D) et migrent vers la membrane plasmique pour s'y ancrer et initier la formation d'un cil motile (Figure 14E). Pendant ce temps, d'autres procentrioles ont aussi été nucléés autour des centrioles père et fils formant d'autres structures en fleur. Ainsi, au cours de la

différenciation des cellules multiciliées, les deux voies d'amplification « centriolaire » et « acentriolaire » sont présentes (Al Jord et al. 2014).

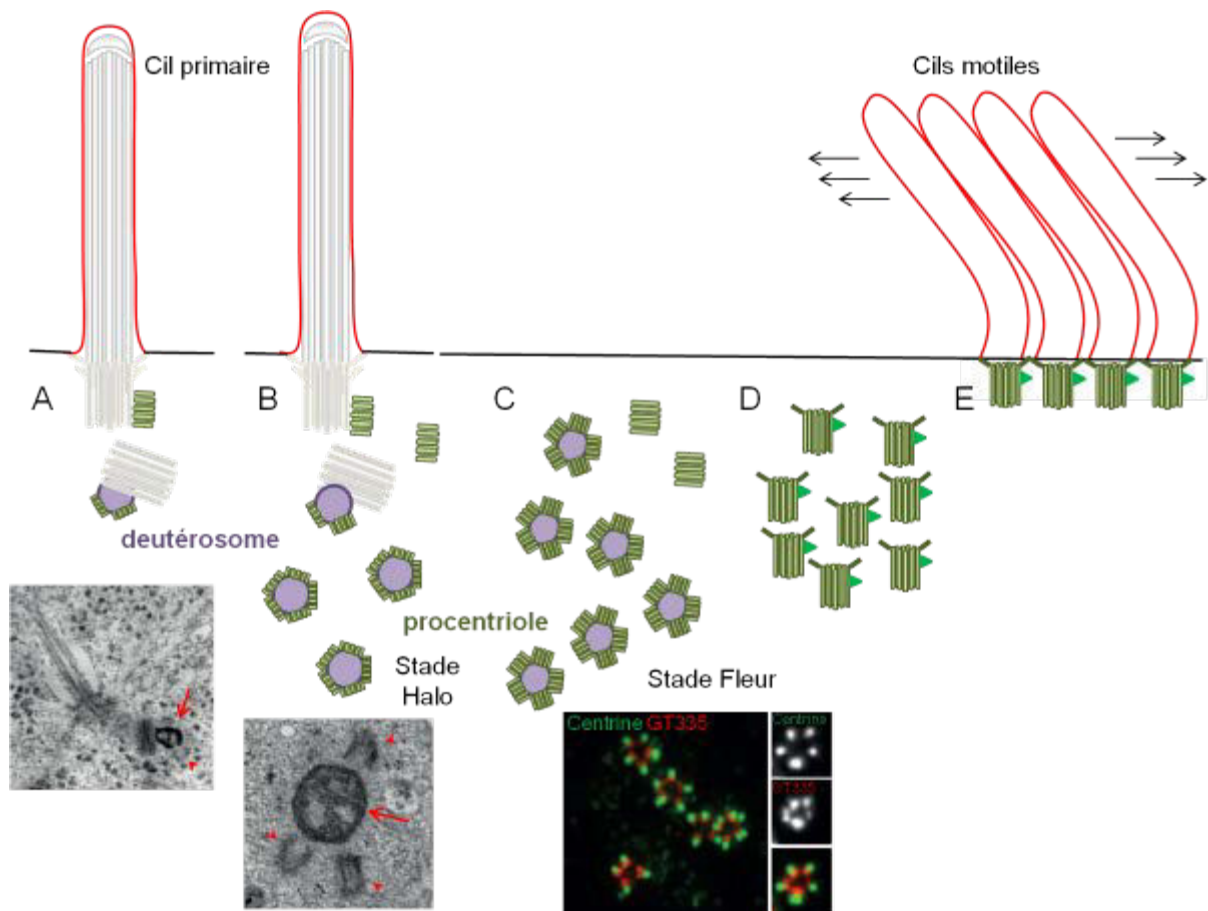


Figure 14 : L'amplification des centrioles dans les cellules multiciliées

A) Les procentrioles (verts et têtes de flèches rouges) se forment au niveau de la partie proximale des 2 centrioles. Le centriole fils est aussi le siège de formation des deutérosomes (violets et flèches rouges) où sont nucléés la majorité des procentrioles. B) Alors que le cil primaire est toujours présents, le nombre de deutérosomes augmente formant des structures en halo. C) Les deutérosomes migrent dans le cytoplasme et les procentrioles (marqués par la centrine en vert et GT335 en rouge) finissent leurs maturation : stade fleur. D) Les centrioles néosynthétisés sont libérés et migrent vers la membrane plasmique où ils s'ancrent pour E) former un cil mobile. Adapté de Jord et al. 2014.

1.4.b. Le transport intraflagellaire

Le transport intraflagellaire (IFT) est responsable du transport des cargos comme la tubuline à l'intérieur du cil. Il s'agit de complexes protéiques localisés entre la membrane et les doublets de microtubules périphériques qui se déplacent de la base vers l'extrémité distale du cil (transport antérograde) et dans le sens inverse (transport rétrograde ; Figure 15). L'IFT est nécessaire à l'assemblage du cil ainsi qu'à l'apport permanent de nouvelles protéines et

à leur régulation. Il jouerait aussi un rôle primordial dans la fonction du cil primaire en permettant aux acteurs des voies de signalisation d'entrer et de sortir du cil pour transmettre les signaux jusque dans le corps cellulaire (revu dans Pedersen et Rosenbaum 2008; Morga et Bastin 2013).

Les complexes IFT

Le transport intraflagellaire (IFT) a été observé la première fois dans les flagelles de *Chlamydomonas*. L'IFT a été décrit comme le mouvement continu et bidirectionnel des particules d'IFT sous la membrane du flagelle (Kozminski, Beech, et Rosenbaum 1995). Ce phénomène a ensuite été observé dans les cils d'autres types cellulaires comme les cils sensoriels des neurones du nématode *C. elegans* (Orozco et al. 1999), les cils primaires des cellules tubulaires rénales de la souris (IMCD, Tran et al. 2008) et le flagelle de *Trypanosoma brucei* (Absalon et al. 2008) indiquant que les sous-unités IFT sont conservées au cours de l'évolution. Tandis que *Chlamydomonas* a permis d'identifier et de comprendre l'IFT et son rôle dans l'assemblage des cils et des flagelles, l'utilisation du trypanosome a beaucoup contribué à la compréhension du rôle de l'IFT dans la construction et à la maintenance du flagelle car il conserve son ancien flagelle pendant l'assemblage du nouveau (Bastin et al. 1999).

Deux complexes distincts, A et B, ont pu être mis en évidence contenant 6 et 14 sous unités respectivement. Les protéines IFT sont caractérisées par de nombreux motifs impliqués dans les interactions protéines-protéines comme les domaines WD, TRP et coiled-coil (Douglas G. Cole 2003). Ces sous-domaines sont impliqués dans les interactions des protéines IFT entre elles ainsi que dans le transport des constituants du cil (cargos, voir ci-dessous).

La fonction de presque toutes les sous-unités d'IFT a été étudiée dans de multiples organismes. Ces études ont montré que la perte totale d'une protéine du complexe B conduisait systématiquement à une inhibition de l'assemblage du cil suggérant que le complexe B participe au transport antérograde des précurseurs de l'axonème dans le compartiment ciliaire (G. J. Pazour et al. 2000; Brazelton et al. 2001; Kobayashi et al. 2007; Absalon et al. 2008). Le complexe d'IFTB est plus particulièrement composé d'un cœur de 9 sous-unités stables (IFT88, IFT81, IFT74, IFT70, IFT52, IFT46, IFT27, IFT25 et IFT22) et de plusieurs sous-unités périphériques (IFT172, IFT20, IFT80, IFT57, IFT54) (Figure 15 ; revu dans Pedersen et Rosenbaum 2008).

Les protéines du complexe A (IFT44, IFT140, IFT139, IFT122, IFT43 et IFT121), par contre, ne sont pas essentielles à la formation de l'axonème. Les mutants du complexe IFT-A chez *Chlamydomonas* sont toujours capables de former des flagelles qui présentent un élargissement de leur extrémité distale dans laquelle les protéines du complexe IFT-B s'accumulent (Iomini et al. 2001; Piperno et al. 1998) suggérant que le transport rétrograde est défectueux. Les sous-unités du complexe IFT-A réguleraient le transport des protéines membranaires essentielles à la fonction ciliaire (Arl13b, AC3, et Smo ; Liem et al. 2012). Les IFT144, IFT140 et IFT122, qui forment le cœur du complexe A, interagissent avec TULP3 qui contrôle le transport des RCPG (SSTR3, MCHR1) dans le cil (Mukhopadhyay et al. 2010).

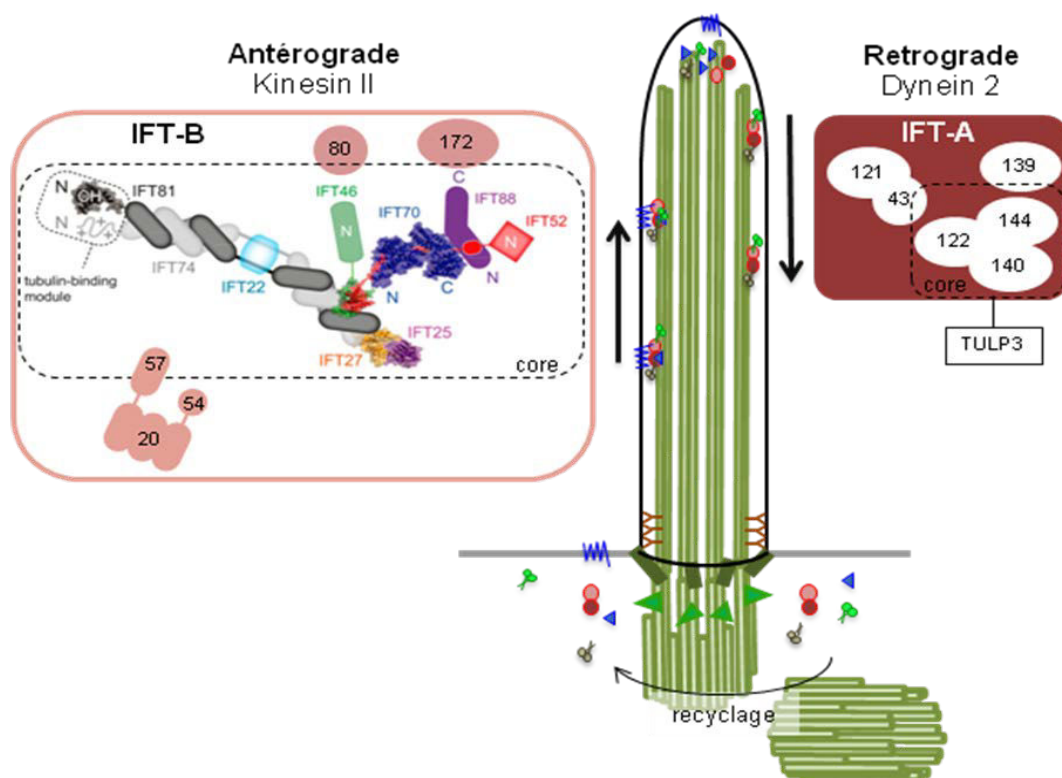


Figure 15 : Les protéines du transport intraflagellaire (IFT)

L'IFT est composé de deux unités motrices : le transport rétrograde est réalisé par 14 protéines constituant le complexe IFT-B et la kinésine II ; le transport antérograde est réalisé par 6 protéines du complexe IFT-A et la dynéine 2. Adapté de Bhogaraju, Engel, et Lorentzen 2013; Taschner et al. 2014.

Aucune activité de traduction n'ayant lieu dans le compartiment ciliaire, toutes les protéines nécessaires à la formation et à l'activité du cil sont synthétisées dans le cytoplasme. Elles sont ensuite reconnues par les complexes IFT qui assurent alors leur transport dans le compartiment ciliaire. A ce jour, peu de cargos des complexes IFT ont été décrits incluant les bras externes de dynéines par IFT46 (Hou et al. 2007; Ahmed et al. 2008), la tubuline par IFT81/74 (Bhogaraju et al. 2013) et d'autres facteurs impliqués dans la motilité par

IFT56/TTC26 (Ishikawa et al. 2014). Les protéines transmembranaires sont transportées vers le cil dans des vésicules provenant de l'appareil de Golgi ou des compartiments de recyclage voir Chapitre I.4.a). Des protéines du transport intraflagellaire comme IFT20 et IFT54 ont été décrites comme impliquées dans ce transport (Follit et al. 2006; Omori et al. 2008). Ces deux protéines du complexe IFT-B sont également impliquées dans les étapes précoces de la ciliogenèse en amont de leur fonction dans l'IFT. IFT54 participerait à l'ancrage de la vésicule ciliaire au centrosome en interagissant avec IFT20 ainsi qu'avec Rab8 et Rabaptin5 (Omori et al. 2008), un régulateur du trafic au sein des endosomes, et FBF1 au niveau des fibres de transition (Wei et al. 2013) (voir Chapitre I.3.c).

Des études ont récemment montré que certaines IFT pourraient également avoir des fonctions en dehors du cil, dans le transport vésiculaire. En effet, plusieurs IFT (IFT20, IFT52, IFT57 et IFT88) ont été impliquées dans le transport des récepteurs T nécessaires à la mise en place de la synapse immunologique dans les lymphocytes T, cellules non ciliées (Finetti et al. 2009; Finetti et al. 2014). IFT88 est aussi essentielle au transport des microtubules vers les pôles du fuseau mitotique, assurant ainsi la bonne orientation de la division cellulaire (Delaval et al. 2011). Enfin, l'IFT139 participerait à l'organisation du cytosquelette de microtubules dans les podocytes matures, non ciliés (Huynh Cong et al. 2014).

Les moteurs moléculaires

L'apport permanent de protéines dans le cil nécessite une machinerie de transport actif. Afin de se déplacer le long de l'axonème, les complexes d'IFT sont associés à des moteurs moléculaires.

Le moteur du transport antérograde est un complexe hétérotrimérique de la famille des kinésines-II. Ce complexe est formé de deux sous unités motrices, KIF3A et KIF3B, et d'une sous unité non motrice, KAP (kinesin associated protein ; Scholey 2003). L'absence de KIF3A chez la souris et de ses orthologues chez *Chlamydomonas*, l'oursin de mer, la drosophile... entraîne des défauts d'assemblage du cil (Nonaka et al. 1998; Marszalek et al. 1999; Takeda et al. 1999; Morris et Scholey 1997; Sarpal et al. 2003; Kozminski, Beech, et Rosenbaum 1995) indiquant que les kinésines-II servent de moteur au transport intraflagellaire antérograde dans tous les systèmes ciliaires étudiés. D'autres membres de la famille des kinésines ont été détectés dans les cils de différentes espèces et certaines d'entre elles ont

été impliquées dans l'assemblage et la maintenance des cils soit en coopérant avec les kinésines-II soit en transportant des récepteurs spécifiques à la membrane ciliaire (Z. Hu et al. 2015). Par exemple, KIF17, une kinésine-II homodimérique, assure l'IFT à la région distale des cils sensoriels chez *C. elegans* (Snow et al. 2004) ou dans les photorécepteurs (revu dans Scholey 2012) ainsi que le transport de certaines protéines de la membrane ciliaire, comme démontré dans les neurones olfactifs (Jenkins et al. 2006).

Le moteur du transport rétrograde est une isoforme de dynéine, la dynéine 2 (DYNC2H1). Chez *Chlamydomonas*, elle forme un complexe d'au moins 4 sous-unités : une chaîne lourde, DHC1b, qui a une activité motrice ATPasique, deux chaînes intermédiaires (D1bLIC et FAP133) et une chaîne légère (LC8) (Pfister et al. 2005; Rompolas et al. 2007). Chez *Chlamydomonas* et *C. elegans*, les mutants de la chaîne lourde présentent une large accumulation des particules d'IFT au sommet des cils indiquant que le transport rétrograde est défectueux (G. J. Pazour, Dickert, et Witman 1999; Porter et al. 1999; Signor et al. 1999). Chez les mammifères, l'invalidation de la chaîne lourde conduit à des cils avec une partie distale élargie (Huangfu et Anderson 2005; May et al. 2005) indiquant que le rôle de la dynéine 2 dans le transport rétrograde est conservé au cours de l'évolution. De même, l'invalidation des chaînes légères Tctex-1 (Palmer et al. 2011) et TCTEX1D2 (Asante, Stevenson, et Stephens 2014) conduit à des cils plus longs dans les cellules humaines *in vitro*. Les chaînes intermédiaires WDR34 (Huber et al. 2013) et WDR60 (McInerney-Leo et al. 2013), quand à elles, sont retrouvées mutées chez des patients atteints de ciliopathies squelettiques (voir Chapitre II.2).

Le BBSome

L'identification de mutations dans le gène *BBS8* a permis d'associer pour la première fois le syndrome de Bardet-Biedl (voir Chapitre II.2) à des défauts ciliaires (Ansley et al. 2003). Depuis, des mutations ont été identifiées dans une vingtaine de gènes dont certains codent des sous-unités du BBSome, un complexe protéique conservé au cours de l'évolution qui joue un rôle dans le transport ciliaire.

Différentes sous unités du complexe BBSome ont été initialement localisées à la base des cils (Ansley et al. 2003; Mykytyn et al. 2004) et associées à l'IFT chez *C. elegans* (Blacque et al. 2004). Ensuite, les travaux de M. Nachury ont caractérisé la composition de ce complexe

BBSome. Il est formé d'au moins 8 protéines BBS (BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8, BBS9 et BBIP10/BBS18 ; Nachury et al. 2007). Les 3 sous-unités BBS6, BBS10 et BBS12 s'associent et stabilisent BBS7 pour former le cœur du complexe avec BBS2 et BBS9. Ensuite, les sous-unités périphériques BBS1, BBS5, BBS8 et BBS4 s'incorporent au complexe (Zhang et al. 2012). Enfin, BBS4 recrute BBIP10, une protéine nécessaire à l'acétylation des microtubules ciliaires. La GTPase Arl6 ou BBS3 ne fait pas partie du BBSome proprement dit mais est un acteur majeur car elle recrute le complexe à la membrane ciliaire et permettrait ainsi son entrée dans le cil (Mourão et al. 2014) et son interaction avec des cargos à transporter dans le cil (ex. SSTR3 ; Jin et al. 2010).

Les protéines du BBSome ont été identifiées parmi les partenaires de l'IFT et participeraient aussi au transport dans le cil en formant un manteau associé à la membrane (Figure 16). Les protéines BBS pourraient, en effet, partager certaines fonctions avec les protéines de l'IFT. D'abord dans le transport de vésicules entre l'appareil de Golgi et la base du cil, plusieurs protéines de l'IFT et du BBSome ont des partenaires en commun tels que le GEF de Rab8, Rabin8 (Nachury et al. 2007). Le complexe BBSome pourrait ainsi participer au transport des protéines transmembranaires jusqu'à la membrane ciliaire puisqu'il est capable de reconnaître les séquences d'adressage au cil *via* BBS3/Arl6. Chez les souris invalidées pour les gènes BBS4 ou BBS2, les récepteurs SSTR3 et Mchr1 ne se localisent plus dans le cil des neurones confirmant que les protéines BBS sont indispensables au recrutement de certains récepteurs à la membrane ciliaire (Berbari et al. 2008). Dans ce cadre, il participe également à la signalisation Hedgehog en transportant les récepteurs Patched et Smoothened dans le cil (Zhang et al. 2011; Zhang et al. 2012).

Le BBSome participerait à la régulation de l'assemblage des protéines d'IFT à la base du cil (Ou et al. 2005; Wei et al. 2012) et s'y associerait pour être transporté dans le cil (Piperno et Mead 1997; D. G. Cole et al. 1998; Ou et al. 2005; Lechtreck et al. 2009; Liew et al. 2014). Plusieurs protéines BBS ont été retrouvées en mouvement le long de l'axonème rappelant le trajet des particules d'IFT (Blacque et al. 2004). Le BBSome serait également impliqué dans le réarrangement des complexes IFT au sommet du cil nécessaire à la transition entre transport antérograde et transport rétrograde (Wei et al. 2012) (Figure 16).

Enfin, le complexe BBSome participerait à des fonctions de signalisation ciliaire indépendamment de ses fonctions dans le transport des protéines membranaires ciliaires. Il a ainsi été impliqué dans la dégradation de la β -caténine par le protéasome dans la voie Wnt (Gerdes et al. 2007).

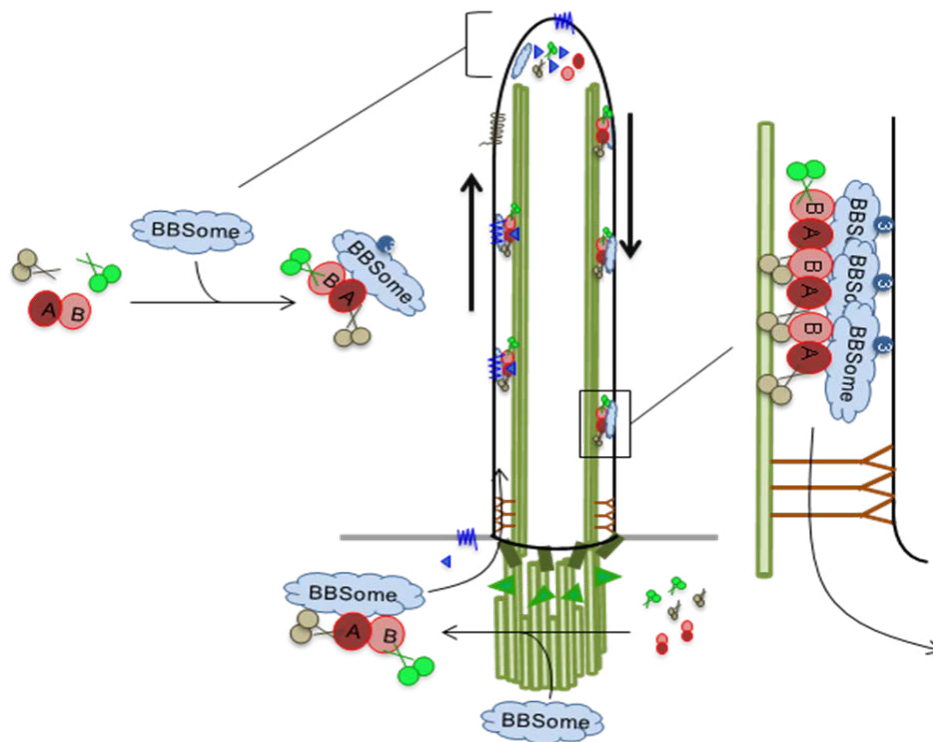


Figure 16 : Les fonctions du BBSome

Le BBSome est impliqué dans l'assemblage des protéines IFT à la base ainsi qu'au sommet du cil et participe au transport intraflagellaire. Adapté de Wei et al. 2012.

1.4.c. La régulation

La régulation de la ciliogenèse par les facteurs de transcription

Les cils sont constitués de plusieurs centaines de protéines communes à tous les cils pour certaines (IFT, BBS...) et spécifiques à un ou plusieurs types ciliaires pour d'autres (bras de dynéines, ponts radiaires...). De plus, les cils sont assemblés selon des programmes structurels et temporels différents selon les cellules. Ce sont des structures dynamiques qui peuvent croître et se résorber dans différentes conditions physiologiques. Par exemple, les cils primaires n'apparaissent qu'au moment de la sortie du cycle cellulaire (phase G0) et les cils motiles des bronches ou des ventricules cérébraux se forment seulement après la disparition du cil primaire dans les tissus en cours de différenciation. Cette diversité requière

l'implication de gènes de contrôle finement régulés et spécifiques des types cellulaires (revu dans (Choksi et al. 2014; Vieillard, Jerber, et Durand 2014). Les facteurs de transcription les plus impliqués dans la ciliogenèse sont les protéines de la famille RFX (Regulatory Factor X) qui régulent l'assemblage de la plupart des cils et le facteur FOXJ1 qui contrôle l'expression des constituants des cils motiles (Vij et al. 2012).

Les premiers éléments de ce mécanisme ont été décrits chez *C. elegans*, avec l'identification d'un facteur de transcription contrôlant l'expression des gènes ciliaires. Swoboda, Adler, et Thomas (2000) ont démontré que de nombreux gènes étaient placés sous le contrôle du facteur de transcription *daf-19*, qui est de type RFX, et qui est nécessaire à l'assemblage des cils sensoriels. La plupart des cibles directes de *daf-19* identifiées ont été impliquées dans la ciliogenèse. Depuis, il a été montré que les facteurs de transcription de type RFX sont impliqués dans la ciliogenèse chez d'autres organismes, dont la drosophile, la souris (Bonnafe et al. 2004) et l'homme. Les protéines RFX se lient à un motif, appelé boîte-X, présent dans le promoteur des gènes, *via* un domaine de liaison 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 (Emery et al. 1996) que l'on peut répartir en deux sous-groupes : RFX 1-4 et RFX-6 ont la propriété de pouvoir se dimériser contrairement aux RFX-5 et RFX-7. Seules les protéines RFX du premier groupe ont été identifiées comme régulatrices de la ciliogenèse. Elles contrôlent spécifiquement le transport de l'IFT en régulant les membres du complexe B et les moteurs rétrogrades mais aussi les protéines BBS. Elles interviennent également dans le contrôle de l'expression des protéines associées au corps basal (rootletine) (Laurençon et al. 2007). Enfin, les protéines RFX régulent un ensemble spécifique de protéines à la zone de transition. Par exemple, chez *C. elegans*, *daf-19* régule *nphp-1* et *nphp-4* (Winkelbauer et al. 2005).

L'autre facteur de transcription identifié comme régulateur de protéines ciliaires est FOXJ1. Il appartient à la famille des facteurs de transcription *forkhead/winged-helix*. Chez les mammifères, *Foxj1* est exprimé dans de nombreux tissus possédant des cils motiles (Hackett et al. 1995; Blatt et al. 1999; Brody et al. 2000; X. Yu et al. 2008). L'expression de *Foxj1* dans les poumons, par exemple, est clairement corrélée à la formation des cils motiles (Blatt et al. 1999). L'inactivation de *Foxj1* chez la souris conduit à l'absence de cils motiles sans défaut des cils primaires et à un *situs inversus* (Chen et al. 1998; Brody et al. 2000). Les données

obtenues chez le poisson zèbre ont confirmé que *foxj1* est un régulateur majeur de la ciliogenèse des cils motiles (X. Yu et al. 2008; X. Yu et al. 2011). D'abord, la réduction de l'expression des deux orthologues *foxj1a/b* conduit à des défauts de formation des cils motiles et, l'expression ectopique de *foxj1* dans des tissus ciliés (*cils primaires*) induit la formation de cils anormaux avec des caractéristiques de cils motiles (Stubbs et al. 2008; X. Yu et al. 2008). L'expression de *foxj1* ne semble toutefois pas suffisante pour induire la formation de cils motiles (You et al. 2004). De nombreux gènes cibles de *foxj1* ont été décrits 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. La plupart de ces gènes cibles codent des protéines exclusivement impliquées dans la motilité des cils telles que les sous-unités des dynéines axonémales, de la paire centrale ou des ponts radiaires (Brody et al. 2000; Stubbs et al. 2008; Jacquet et al. 2009; X. Yu et al. 2008). Chez le poisson zèbre en particulier, trois gènes impliqués dans la motilité ciliaire sont décrits comme régulés par *foxj1a* : *dnah9*, *tektin1* et *efhc1* (Hellman et al. 2010). Enfin, l'invalidation de *foxj1* chez la souris n'entraîne aucun défaut ultrastructurel dans les cils primaires (Brody et al. 2000) indiquant que ce facteur de transcription régule spécifiquement les gènes des cils motiles.

Pour augmenter la diversité de structures et de fonctions ciliaires, il existe une régulation croisée entre les facteurs de transcription RFX et FOXJ. Ils semblent coopérer pour contrôler l'expression de certains gènes requis pour la ciliogenèse (Didon et al. 2013). En effet, RFX3 est aussi nécessaire à la biogenèse des cils motiles de cellules épendymaires *in vitro* (El Zein et al. 2009) en aval de FOXJ1 (Didon et al. 2013). De plus, RFX3 possède des cibles directes communes avec FOXJ1, suggérant que ces deux types de facteurs de transcription s'associent pour gouverner un programme de ciliogenèse motile spécifique (Stubbs et al. 2008; X. Yu et al. 2008; El Zein et al. 2009). D'autres protéines, comme celles de la famille forkhead, peuvent aussi participer et préciser encore ces phénomènes de régulations complexes. Le co-activateur transcriptionnel, MCIDAS, quant à lui, agirait en parallèle de FOXJ1 pour promouvoir l'amplification des centrioles et leur maturation dans les cellules multiciliées (Boon et al. 2013).

La régulation de la dynamique des microtubules de l'axonème

La taille des cils est régulée par l'équilibre entre l'assemblage et le désassemblage des microtubules au sommet de l'axonème, c'est-à-dire à leur extrémité positive. L'IFT étant responsable de l'apport de tubuline dans le cil, il participerait à la polymérisation des microtubules et il a été proposé que l'activité des protéines motrices, KIF3A-KIF3B-KAP3, soit impliquée dans la détermination de la longueur des cils (Ishikawa et Marshall 2011). D'autres kinésines régulent aussi la dynamique des microtubules. Le domaine moteur de KIF19A a une activité de dépolymérisation des microtubules et contrôle leur croissance au sommet des cils mobiles (Niwa et al. 2012). Par contre, il ne semble pas que KIF19A soit impliquée au niveau des cils (9+0) suggérant l'existence d'autres mécanismes dans les cils primaires. KIF7, par exemple, limite la croissance des cils primaires en provoquant des catastrophes au sommet de l'axonème et limitant ainsi la polymérisation des microtubules (M. He et al. 2014). Enfin, l'activité de dépolymérisation de KIF2/MCAK a aussi été montrée comme essentielle dans le contrôle de la croissance des flagelles du protozoaire *Leishmania* (Blaineau et al. 2007) et dans les cellules de mammifères (Miyamoto et al. 2015).

D'autres protéines, comme DCDC2 et RP1, possèdent un domaine similaire à la doublecortine qui facilite la polymérisation des microtubules. Ainsi, la surexpression de DCDC2 augmente de deux fois la taille des cils dans les neurones et les fibroblastes (Massinen et al. 2011). De même, la surexpression de RP1 augmente la taille des cils des photorécepteurs (Omori et al. 2010) et son dysfonctionnement entraîne la dégénérescence des cellules photoréceptrices de la rétine.

Les protéines associées aux microtubules, MAP (mitogen-activated protein), sont aussi connues pour stabiliser les microtubules. Ainsi, la protéine MAP4 est acteur majeur de la stabilité du réseau de microtubules cytoplasmiques. Elle a aussi été localisée au niveau de l'axonème des cils primaires et des photorécepteurs où elle aurait une fonction antagoniste à celle de certaines protéines de la famille des septines, SEPT2, 7 et 9, qui favorisent la ciliogenèse (Ghossoub et al. 2013, voir annexe 1).

La régulation du désassemblage du cil

Le cil ne peut se former que pendant les phases G0/G1 du cycle cellulaire et doit être "déconstruit" lors des phases G1/S, pour être ensuite résorbé lors de la transition G2/M et

ainsi permettre à la cellule de se diviser (Ke et Yang 2014). Il y aurait donc une corrélation entre le cil et le cycle cellulaire. En effet, une anomalie dans le cycle cellulaire peut résulter en une ciliogenèse anormale et des défauts de formation du cil peuvent aboutir à des problèmes de régulation du cycle cellulaire. Des protéines identifiées comme modulateurs du cycle cellulaire ont ainsi été impliquées dans le contrôle de la ciliogenèse. Par exemple, Nek8, une kinase de la famille NIMA (Never In Mitosis gene A), est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et localisée au niveau du compartiment inversine du cil. Nek8 est impliquée dans la voie de signalisation « Hippo » qui consiste en une cascade de protéines kinases et contrôle la prolifération cellulaire ainsi que la taille des organes pendant l'organogenèse (revu dans Pan 2010). L'activation de la voie augmente la phosphorylation de la kinase MST1/2 (Mammalian Sterile 20-Like Kinase) qui phosphoryle, à son tour, la kinase LATS1/2 (Large Tumour Suppressor 1/2) permettant la rétention cytoplasmique et l'inhibition des activateurs co-transcriptionnels, TAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif) et YAP (Yes-associated protein), en les phosphorylant. Nek8 stabiliserait TAZ dans le noyau tandis que son partenaire NPHP4 interagirait avec la kinase LATS et inhiberait la phosphorylation de YAP et TAZ conduisant ainsi à l'activation de l'activité transcriptionnelle pro-proliférative (Habbig et al. 2012). Chez la souris, la perte de Nek8 entraîne des anomalies de morphologie graves et des cils extrêmement long dans les reins (L. A. Smith et al. 2006; Sohara et al. 2008). D'autres kinases de la famille NIMA semblent avoir un effet opposé sur la ciliogenèse. Nek1 peut modifier la stabilité du centrosome et réguler à la fois la formation du cil et la progression du cycle cellulaire (White et Quarmby 2008). Ainsi, son extinction modifie la morphologie des cellules et diminue le nombre et la taille des cils (Thiel et al. 2011).

L'entrée dans le cycle cellulaire nécessite la translocation de Hef1 (human enhancer of filamentation 1) depuis les adhésions focales de la membrane jusqu'à corps basal (Plotnikova, Golemis, et Pugacheva 2008). Là, il active la kinase Aurora-A qui phosphoryle l'histone désacétylase, HDAC6. HDAC6 entraîne la désacétylation des microtubules qui favorise leur désassemblage (Pugacheva et al. 2007). Il a été montré que ce processus était contrôlé par NPHP1 et NPHP2 en interagissant avec Aurora pour empêcher son activation par Hef1 (Mergen et al. 2013). D'autres processus comme la méthylation (M. J. Schneider,

Ulland, et Sloboda 2008) et l'ubiquitination (K. Huang, Diener, et Rosenbaum 2009) interviennent aussi lors de la déconstruction du cil.

I.5. Les fonctions du cil primaire

Les cils primaires ont des fonctions de signalisation clés au sein des vertébrés : les photorécepteurs perçoivent les signaux lumineux, les cils des neurones olfactifs détectent les odeurs, ceux des cellules épithéliales des tubules rénaux sont capables de sentir le flux de l'urine... A cause de ce rôle spécifique dans la régulation de ces voies de signalisation, la composition de la membrane ciliaire est différente de celle de la membrane plasmique. En effet, la membrane ciliaire est particulièrement enrichie en RCPG (SSTR3, Smoothened, rhodopsine...), acteurs des cascades de signalisation comme les adénylate cyclases (AC3, AC5, AC6), les récepteurs à activité kinase (PDGFR, TGF β R) et les canaux calciques (PC2) (revu dans Christensen et al. 2012) impliqués dans la perception des signaux extracellulaires. Des défauts de ces voies de signalisation sont associés à la plupart des phénotypes observés dans les ciliopathies dues à des atteintes des cils primaires (voir Chapitre II.2).

Dans les tubules rénaux, le cil primaire est capable de sentir le flux de liquide dans la lumière et participe au maintien de l'homéostasie tissulaire. Les polycystines, PC1 et PC2, jouent un rôle clé dans la sensation du flux. PC1 est une protéine mécano-sensible qui perçoit les forces mécaniques associées au flux et active PC2, le canal calcique, pour permettre l'entrée de calcium dans le compartiment ciliaire (Hanaoka et al. 2000). Cette voie de signalisation est très importante la morphogénèse tubulaire rénale et sa dérégulation sa dérégulation peut entraîner une polykystose rénale (revu dans Chebib et al. 2015; voir Chapitre II.2).

Une des grandes avancées dans la compréhension des fonctions du cil primaire a été la caractérisation de son rôle dans la voie Sonic-Hedgehog (Shh) (Corbit et al. 2005). En l'absence du ligand Hedgehog (Hh), le récepteur Patched (Ptch) est localisé au cil et exerce une répression sur le récepteur membranaire Smoothened (Smo) et sur les facteurs de transcription de la famille Gli *via* la protéine Sufu (Suppressor of Fused). Les protéines Gli sont alors phosphorylées par les protéines kinases PKA et GSK3b et dégradées par le protéasome pour former des répresseurs de la transcription (Wang, Fallon, et Beachy 2000). La voie est activée lorsque Ptch est stimulé par Hh. Ptch est alors exclu du cil ce qui permet à Smo d'y entrer (Corbit et al. 2005). Là, Smo lève l'inhibition de la protéine Sufu sur les 3

facteurs de transcription, Gli1, Gli2 et Gli3 (Haycraft et al. 2005) qui s'accumulent alors au sommet du cil pour y être activés. Ils sont ensuite transloqués dans le noyau pour induire la transcription de gènes impliqués dans la prolifération ou la migration cellulaire. Tous les acteurs de cette voie doivent donc être transportés à l'intérieur et/ou à l'extérieur du cil en fonction de son activation. La petite GTPase, Arl13b (ADP-ribosylation like factor), est aussi localisée à la membrane ciliaire et est indispensable au trafic des protéines de la voie Shh dans le cil (Larkins et al. 2011). La transduction du signal *via* les protéines Gli dépend également d'adénylate cyclases à la membrane ciliaire telles que AC3 qui contrôlent le niveau d'AMPC dans le cil et, par conséquent, l'activation de la PKA, régulateur négatif de la voie (Liem et al. 2012). Le cil primaire est donc primordial à la balance entre l'activation et l'inhibition de la voie Shh chez les vertébrés.

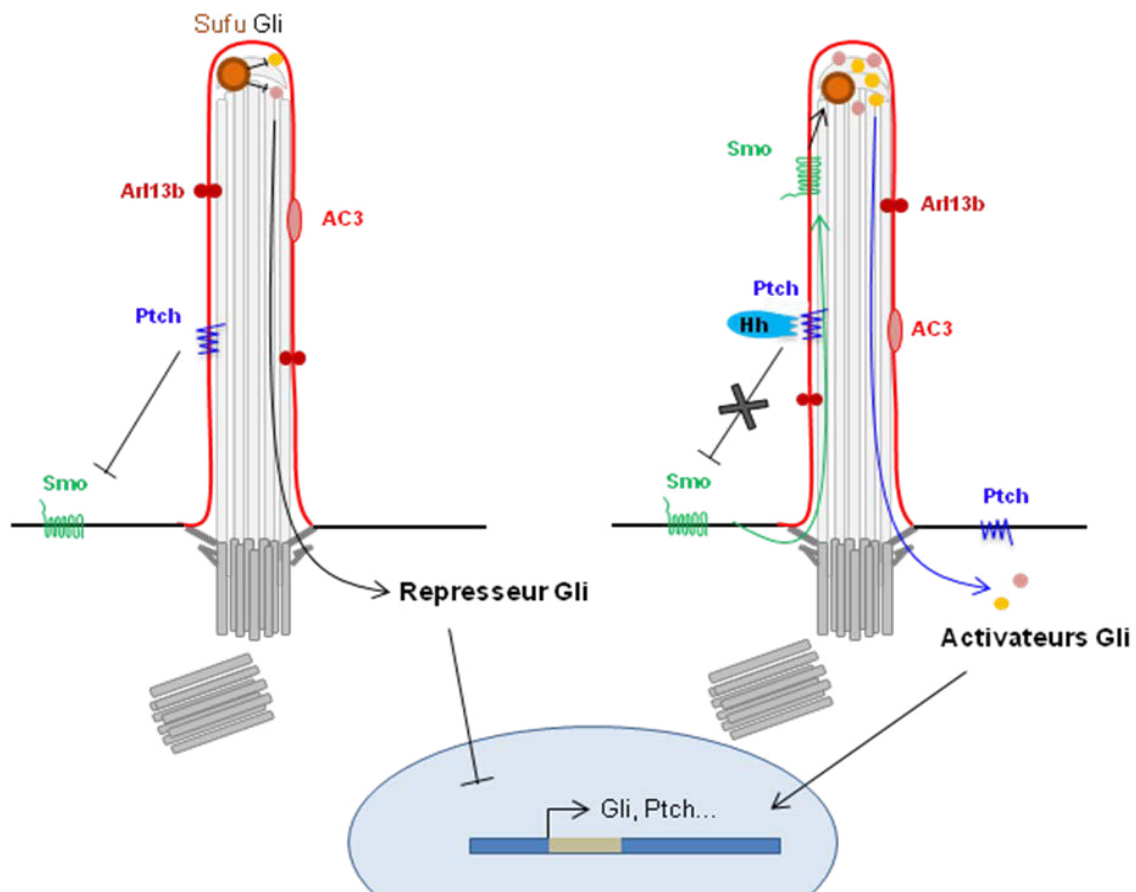


Figure 17 : La voie de signalisation Sonic-Hedgehog

En absence de ligand, le récepteur Patched (Ptch) empêche la translocation du récepteur Smoothened (Smo) dans le cil et la protéine Sufu réprime les facteurs de transcription Gli. En présence de ligand Hedgehog, Hh, Ptch sort du cil permettant à Smo d'y entrer pour lever l'inhibition de Sufu sur les Gli qui s'accumulent au sommet du cil et induisent la transcription des gènes cibles de la voie. Adapté de Ruiz i Altaba, Palma, et Dahmane 2002.

La voie Shh est cruciale dans le développement des vertébrés, depuis les premiers stades de l'embryogénèse et jusqu'à l'organogénèse où ils participent à l'homéostasie des tissus. De nombreuses manifestations retrouvées dans les cas de ciliopathies ont été associées à des défauts de la voie Shh comme la polydactylie, les anomalies cérébelleuses et du squelette (revu dans Goetz et Anderson 2010). Il a été montré chez la souris que la perte du signal Shh empêchait la différenciation des cellules ventrales du tube neural et donc sa fermeture correcte chez la souris (Huangfu et al. 2003; A. Liu, Wang, et Niswander 2005). L'inhibition de la voie peut aussi entraîner des perturbations de la migration des progéniteurs neuronaux lors du développement cérébral à l'origine de défauts fonctionnels graves, comme l'épilepsie et le déficit intellectuel (Fang et al. 2011) ; des signes cliniques souvent retrouvés dans les ciliopathies. Des phénomènes de migration collective des cellules épithéliales ont aussi été observés lors du développement rénal et seraient dépendants de la voie Shh (Kramer-Zucker et al. 2005; Vasilyev et al. 2009; Yao et al. 2014). Cette voie serait aussi impliquée dans les processus de transition mésenchyme-épithélium et de formation des kystes dans les reins (voir Chapitre II.2).

Le cil primaire a aussi été impliqué dans la modulation des voies de signalisation Wnt canonique et non-canonique (Simons et al. 2005; Corbit et al. 2008). La voie canonique a lieu en l'absence de cil, lorsque la famille de récepteurs membranaires Frizzled, stimulés par leurs ligands Wnt, activent Disheveled (Dvl). Dvl inhibe alors le complexe de dégradation de la β -caténine, GSK3 β /axin/APC. La β -caténine s'accumule et est transloquée dans le noyau où elle s'associe aux facteurs de transcription TCF/LEF qui contrôlent de nombreux processus cellulaires comme la prolifération et la différenciation (Angers et Moon 2009). La voie non-canonique est aussi connue sous le nom de polarité planaire (PCP) et correspond à la polarité coordonnée des cellules épithéliales dans le plan de l'épithélium, c'est-à-dire qu'elle est perpendiculaire à la polarité apico-basale. Les protéines de la PCP sont réparties de façon asymétrique dans les cellules épithéliales selon un axe perpendiculaire à l'axe proximo-distal. La protéine ciliaire, inversine, est capable d'interagir avec Dvl cytoplasmique pour l'adresser au protéasome et ainsi activer la PCP (Simons et al. 2005). L'inversine s'associe à NPHP3 (Bergmann et al. 2008) et également NPHP4 (Burcklé et al. 2011) pour contrôler la stabilité de Dvl et réprimer la voie Wnt canonique- β -caténine au profit de la voie Wnt/PCP. Récemment la voie Wnt non-canonique (PCP) a été impliquée dans le contrôle des

phénomènes de convergence - extension lors de l'élongation des tubules rénaux chez les vertébrés (Lienkamp et al. 2012; Castelli et al. 2013).

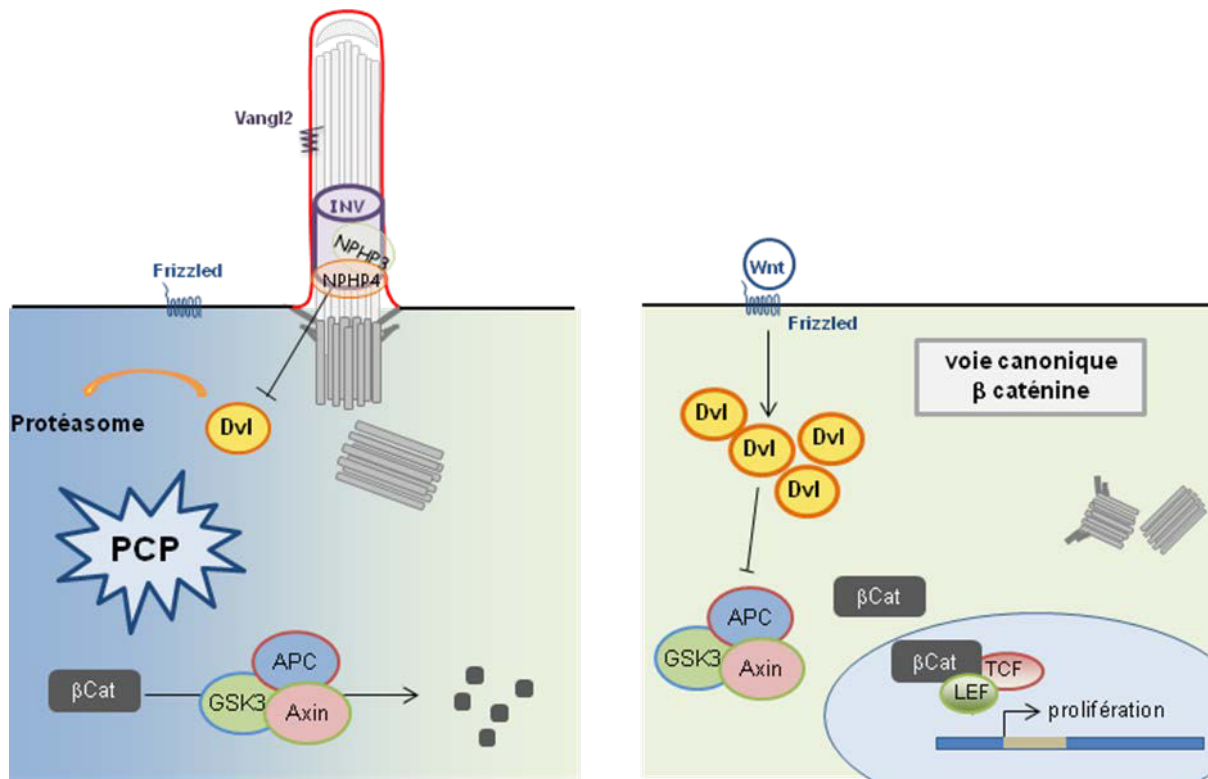


Figure 18 : Les voies Wnt/PCP et Wnt canonique

Le cil, *via* les protéines inversine, NPHP3 et NPHP4, inhibe Disheveled (Dvl) qui est alors dégradé par le protéasome et qui favorise la dégradation de la β -caténine. En absence de cil, Dvl s'accumule et inhibe le complexe de dégradation de la β -caténine, APC/GSK3/axin. La β -caténine est alors transloquée dans le noyau où elle active le programme transcriptionnel. Adapté de Corbit et al. 2008

Toutefois, l'implication de cil primaire dans la balance entre les voies Wnt canonique et non canonique est controversée. En effet, les défauts de ciliogenèse causés par l'inactivation de l'IFT dans les embryons de souris (Ocbina, Tuson, et Anderson 2009) ou chez le poisson zèbre (P. Huang et Schier 2009) ne perturbe pas la PCP. Le cil primaire ne serait donc pas toujours indispensable à la voie Wnt/PCP et la nature de leur relation reste à éclaircir.

II. Les ciliopathies

Les défauts de structure des cils motiles ont été associés pour la première fois au syndrome des cils immobiles à la fin des années 70 (B. A. Afzelius 1976) mais c'est la découverte des défauts des cils primaires dans les cellules épithéliales rénales d'un modèle murin de polykystose rénale, pour lequel le gène *Tg737/IFT88* est muté (G. J. Pazour et al. 2000 ; voir Chapitre II.2), qui a contribué à l'avancée capitale dans la compréhension des fonctions des cils primaires. Depuis le nombre de maladies liées à des défauts du cil a considérablement augmenté (Bisgrove et Yost 2006) et elles ont été regroupées sous le terme de ciliopathies.

Les ciliopathies forment un groupe de maladies génétiquement et cliniquement très hétérogènes pouvant apparaître à tous les âges de la vie, du fœtus à l'adulte. La grande majorité de ces maladies se caractérisent par des anomalies structurelles et/ou fonctionnelles des cils et les gènes mutés dans ces pathologies codent des protéines localisées au niveau du cil et/ou du flagelle ou indispensables à leur fonction.

II.1. Les atteintes des cils motiles

La dyskinésie ciliaire primitive

La dyskinésie ciliaire primitive (DCP) était initialement appelée syndrome des cils immobiles car elle est caractérisée par des défauts du battement ciliaire tout le long du tractus respiratoire, de la muqueuse nasale aux bronches, qui entraînent une altération du transport muco-ciliaire. Il s'agit donc d'une maladie respiratoire définie par une bronchorrhée chronique et des infections récurrentes touchant les voies basses (bronchectasies) et hautes (sinusite chronique). La présence de cellules multiciliées dans la trompe d'Eustache peut aussi entraîner des otites séromuqueuses à répétition. Les signes cliniques débutent dès la naissance et peuvent évoluer plus ou moins rapidement. Bien que ce soit une maladie rare, la DCP est la deuxième affection congénitale des voies respiratoires la plus fréquente après la mucoviscidose. Il s'agit d'une maladie autosomique récessive dont la prévalence est estimée à 1/10 000 (Bjorn A. Afzelius et Stenram 2006). Dans certains cas, des mutations ont aussi été trouvées dans des gènes localisés sur le chromosome X (*RPGR*, A. Moore et al. 2006; *OFD1*, Budny et al. 2006). Le pronostic de la maladie dépend de la répétition des épisodes infectieux broncho-pulmonaires qui entraînent souvent une insuffisance

respiratoire chronique. Le seul traitement disponible à ce jour est symptomatique. Une mise à jour régulière des vaccinations et une prise en charge précoce des infections respiratoires par antibiothérapie, associée à un traitement bronchodilatateur et une kinésithérapie respiratoire, aident à prévenir le développement de bronchectasies. Chez les patients avec une insuffisance respiratoire très sévère, une transplantation pulmonaire peut être proposée.

Le meilleur test de dépistage non invasif de la dyskinésie ciliaire est la mesure de l'oxyde d'azote (NO) nasal qui est corrélée à la fréquence de battement ciliaire (Jain et al. 1993) et reflète l'activité respiratoire. Une mesure du NO abaissée ou effondrée révèle une diminution de la mobilité ciliaire et permet de discriminer les dyskinésies ciliaires primitives et celles secondaires à une infection par exemple. Le diagnostic doit être confirmé par la mise en évidence des défauts de motilité des cils (capacité, amplitude, cinétique,...) de cellules épithéliales obtenues par brossage de la muqueuse nasale ou bronchique. L'analyse de la structure des cils (absence de bras de dynéines, désorganisation des microtubules...) en microscopie électronique (Werner, Onnebrink, et Omran 2015) peut également aider à orienter le diagnostic, même si il existe des formes de DCP sans défaut de structure de l'axonème (Schwabe et al. 2008). La DCP est souvent associée de signes extra-pulmonaires.

L'hétérotaxie

Dans presque 50 % des cas, la DCP est associée à un *situs inversus* : on parle alors de syndrome de Kartagener (Escudier et al. 2009; Boon et al. 2013). Le *situs inversus* ou hétérotaxie est une maladie congénitale dans laquelle les organes de la cage thoracique et l'abdomen sont inversés par rapport à un axe de symétrie droite/gauche. Il peut être total lorsque tous les organes sont concernés (Figure 19B), ce qui n'est pas une source de problème et n'empêche pas une vie normale. Une hétérotaxie partielle (Figure 19C), par contre, peut être associée à des anomalies cardiaques (environ 6% des cas) (Kennedy et al. 2007; Nakhleh et al. 2012), telles qu'une communication interauriculaire ou une transposition des gros vaisseaux, mais aussi à des malformations pulmonaires, rénales, biliaires... L'hétérotaxie est due à l'absence ou au dysfonctionnement des cils motiles du nœud embryonnaire qui ne génèrent plus de flux ou bien à cause des cils primaires qui ne

perçoivent plus ce flux. La gauche et la droite de l'embryon sont alors mises en place de façon aléatoire (Francis et al. 2012).

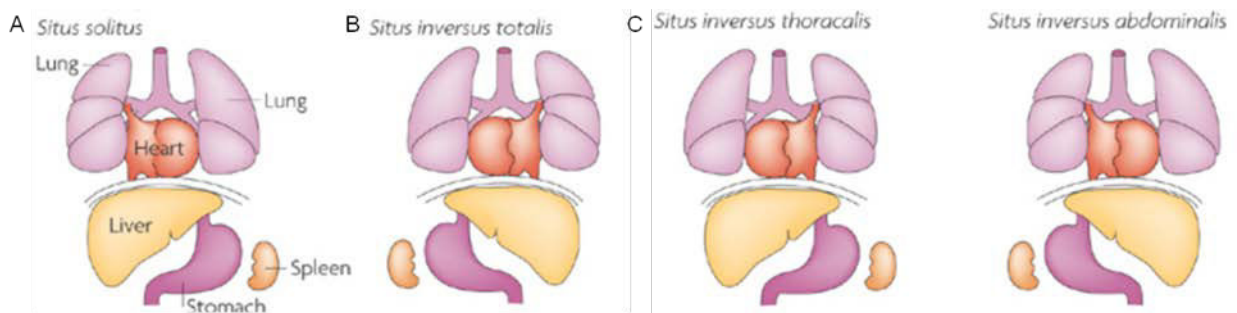


Figure 19 : Les défauts de latéralité gauche-droite - situs inversus

A) Lorsque les organes sont correctement positionnés dans l'abdomen, on parle de *situs solitus*. B) L'inversion totale de l'axe gauche-droite entraîne un *situs inversus totalis*. C) L'inversion de certains organes uniquement peut entraîner des anomalies graves, surtout au niveau du cœur (rouge). Issu de Fliegauf et al. 2006.

L'infertilité

La structure des flagelles des spermatozoïdes est similaire aux cils motiles bronchiques et il peut y avoir une stérilité chez l'homme dans la DCP (Boon et al. 2013).

La motilité ciliaire peut aussi être altérée dans les trompes de Fallope expliquant l'infertilité observée chez les femmes atteintes de syndrome de Kartagener (Halbert et al. 1997). Cependant, des cas de grossesse ont été rapportés chez des patientes atteintes de DCP (Bleau, Richer, et Bousquet 1978; Jean et al. 1979; Eliyahu et Shalev 1996).

L'hydrocéphalie

Une anomalie des cils motiles peut aussi provoquer une hydrocéphalie. Il s'agit de l'augmentation du volume des ventricules cérébraux contenant le liquide céphalo-rachidien (LCR). En effet, l'épithélium des ventricules, appelé épendyme, est cilié pour permettre la circulation du LCR en générant un flux dans les ventricules cérébraux. Lorsque ces cils ne sont pas fonctionnels, la pression intraventriculaire peut augmenter dans les voies de circulation entraînant la dilatation des ventricules. Toutefois, ce phénotype est très rarement observé chez des patients atteints de DCP alors qu'il est courant dans les modèles de souris (L. Lee 2013).

La génétique de la DCP

Les études menées sur la formation des bras de dynéines externes chez *Chlamydomonas* furent le point de départ de la recherche de mutations chez les patients par une approche gène candidat (Pennarun et al. 1999). C'est en 1999 que le premier gène impliqué dans la DCP a été isolé. Il code une protéine de la chaîne intermédiaire des dynéines, l'orthologue de *DNAI1* chez *Chlamydomonas*. L'identification de deux mutations de *DNAI1* entraînant la production de protéines non fonctionnelles chez un patient atteint de DCP a permis d'établir la cause des défauts de battement ciliaire observés. L'absence de mutation de *DNAI1* chez d'autres patients présentant un phénotype similaire a révélé l'hétérogénéité génétique de la maladie.

Des mutations perte-de-fonction, dans la plupart des cas, ont été retrouvées dans une trentaine de gènes (Tableau 1) pour environ 65% des patients souffrant de DCP (Knowles, Daniels, et al. 2013). Ces gènes, pour la grande majorité, codent les protéines structurales des cils, indispensables au battement ciliaire (Figure 20). Des mutations ont été identifiées dans des gènes codant des protéines des bras de dynéines externes (*DNAH5* (15-20% des cas), *DNAI1* (10% des cas), *TXNDC3*, *DNAI2*, *DNAL1*, *ARMC4*, *CCDC114*, *CCDC151*) qui conduisent à la perte totale ou partielle des bras de dynéines externes. L'absence totale ou partielle des bras internes est toujours associée soit à l'absence de bras externes soit à la désorganisation des doublets périphériques et parfois de la paire centrale. La désorganisation de l'axonème est causée par des mutations dans des protéines impliquées dans l'interaction des bras internes avec les microtubules et l'assemblage des liens de nexines (*CCDC40*, *CCDC39*, *CCDC65*). D'autres mutations ont été identifiées dans des protéines des ponts radiaires (*RSPH1*, *RSPH4A*, *RSPH9*) ou de l'enveloppe associée à la paire centrale de microtubules (*HYDIN*) (revu dans Werner, Onnebrink, et Omran 2015). De façon intéressante, ces mutations n'entraînent jamais de *situs inversus* puisque les cils motiles du nœud embryonnaire ne possèdent ni ponts radiaires ni paire centrale. Par ailleurs, chez ces patients, les cils des voies respiratoires observent un mouvement circulaire, comme les cils du nœud embryonnaire, confirmant le rôle des ponts radiaires et de la paire centrale de microtubules dans les mouvements de va et vient (Castleman et al. 2009; Olbrich et al. 2012).

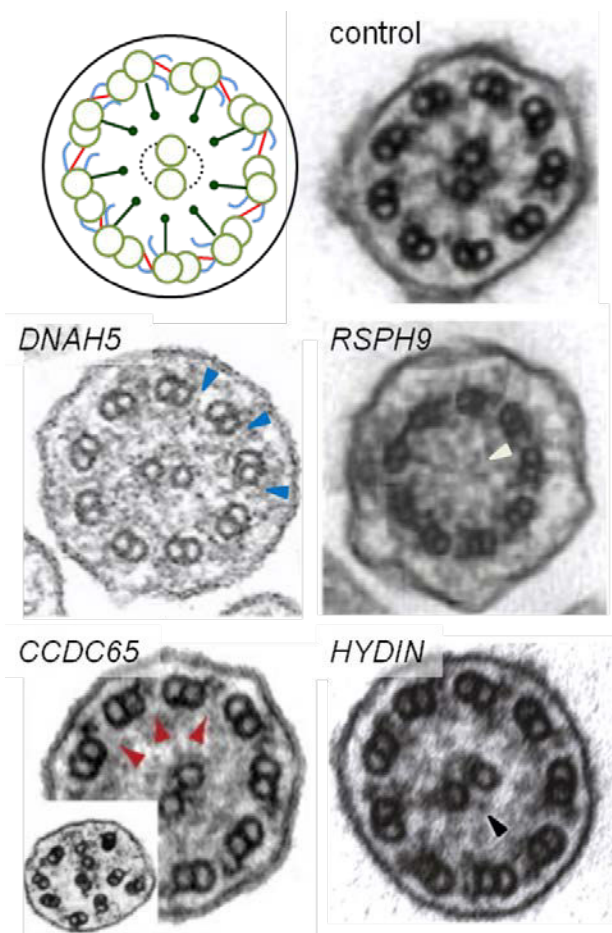


Figure 20 : Les défauts de structure des cils motiles retrouvés chez les patients atteints de DCP

En cas de mutations de *DNAH5*, les bras externes de dynéines peuvent être absents (têtes de flèches bleues). Les mutations de *RSPH9* peuvent entraîner la perte des ponts radiaires et de la paire centrale de microtubules (tête de flèche blanche). Les mutations de *CCDC65* peuvent être responsables de la perte des bras internes de dynéines et des liens de nexines (têtes de flèche rouges) ainsi que de la désorganisation des microtubules de l'axonème. Enfin, les mutations de *HYDIN* peuvent conduire à l'absence de l'enveloppe entourant la paire centrale de microtubules (tête de flèche noire). Issu de Olbrich 2002, Castleman 2009, Austin-Tsé 2013 et Olbrich 2012.

DNAH11, qui code une protéine de la chaîne lourde des bras de dynéines, représente, à ce jour, la seule exception de gène ciliaire muté conduisant à des défauts de motilité sans défaut d'ultrastructure visible en microscopie électronique (pas de perte des bras de dynéines ni des ponts radiaires ; Bartoloni et al. 2002). Cela indique que la physiologie des DCP n'est pas toujours causée par des défauts structurels (Schwabe et al. 2008). Au total, 30% des cas de DCP ne présentent pas de défaut d'ultrastructure dont 22% sont porteurs de mutations de *DNAH11* suggérant que d'autres gènes seraient responsables de dyskinesies ciliaires sans défaut structurel. *A contrario*, des mutations dans des gènes non ciliaires (*DNAAF2/Ktu*, *CCDC103*, *DNAAF3*, *DNAAF1*, *LRRC6*, *HEATR2*, *ZMYND10*, *C21orf59*, *SPAG1*, *DYX1C1*) causent des défauts des bras de dynéines internes et externes. En effet, ces gènes codent des protéines cytoplasmiques qui seraient impliquées dans l'assemblage des bras de dynéines avant leur entrée dans le cil (Omran et al. 2008; Panizzi et al. 2012; Mitchison et al. 2012; Duquesnoy et al. 2009; Kott et al. 2012; Horani et al. 2012; D. J. Moore et al. 2013; Austin-Tse et al. 2013; Knowles, Ostrowski, et al. 2013; Tarkar et al. 2013). Enfin, des

mutations ont été identifiées dans des gènes qui ne sont pas impliqués dans la motilité ciliaire (*OFD1*, *RPGR*, *CCNO*, *MCIDAS*) (Budny et al. 2006; A. Moore et al. 2006; Wallmeier et al. 2014; Boon et al. 2014). Ces mutations entraînent une diminution du nombre de cils à la surface des cellules multiciliées avec (*MCIDAS*) ou sans (*CCNO*) défaut de motilité chez des patients présentant des atteintes des voies respiratoires hautes et basses, des problèmes de fertilité mais jamais de *situs inversus* suggérant que ces gènes ne sont pas impliqués dans la fonction des cils motiles du nœud embryonnaire.

Tableau 1: Les gènes associés à la dyskinésie ciliaire primitive. Adapté de Praveen, Davis, et Katsanis 2015

Défaut de l'ultrastructure et fonctions perturbées	Gènes	Situs inversus	Détresse respiratoire	Infections respiratoires	Bronchiectasie	Otites	Défaut de fertilité	Effets sur la motilité ciliaire	Références
Bras externes de dynéines	<i>DNAH5; DNAI1; NME81/TXNDC3; DNAI2; DNAL1; ARMC4; CCDC114; CCDC151</i>	x	x	x	x	x	x	immobilité	Olbrich et al. 2002; Zariwala et al. 2006; Duriez et al. 2007; Pennarun et al. 2000; Mazor et al. 2011; Hjeij et al. 2013; Knowles et al. 2013 ; Hjeij et al. 2014
Bras internes et externes de dynéines Assemblage et ancrage	<i>CCDC103; DNAAF3; DNAAF1/LRRC50; DNAAF2/Ktu; LRRC6; HEATR2; ZMYND10; C210rf59; SPAG1; DYX1C1</i>	x	x	x	x	x	chez la femme	immobilité	Panizzi et al. 2012; Mitchison et al. 2012; Duquesnoy et al. 2009; Heymut Omran et al. 2008; Kott et al. 2012; Horani et al. 2012; D. J. Moore et al. 2013; Austin-Tse et al. 2013; Knowles, Ostrowski, et al. 2013; Tarkar et al. 2013
Bras internes de dynéines et paire centrale de MT Assemblage des nexines et complexes régulateurs	<i>CCDC40; CCDC39; CCDC65</i>	x	x	x	x	x	x	amplitude diminuée / immobilité / dyskinésie	Blanchon et al. 2012; Austin-Tse et al. 2013
Absence des liens de nexines	<i>DRC1 / CCDC164</i>		x	x	x	x	NA	fréquence augmentée / amplitude diminuée	Wirschell et al. 2013
Paire centrale de microtubules et ponts radiaires	<i>RSPH4A; RSPH9; RSPH1, RSPH3</i>		x	x	x	x	chez la femme	mouvement rotationnel	Castleman et al. 2009; Kott et al. 2013; Jeanson et al. 2015
Paire centrale de microtubules	<i>HYDIN</i>		x	x	x	x	NA	amplitude diminuée et dyskinésie	Olbrich et al. 2012
Sous unité de la chaîne lourde des dynéines	<i>DNAH11</i>	x	NA	x	x	x		vitesse augmentée	Schwabe et al. 2008
NA	<i>DNAH8</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Watson et al. 2014
Ancrage des centrioles, IFT ?	<i>OFD1</i>	NA	x	x	NA	NA	NA	dyskinésie	Budny et al. 2006
Absence des bras de dynéines, de la paire centrale et/ou des liens de nexines	<i>RPGR</i>			x	x	x		hétérogène	A. Moore et al. 2006
Ancrage des centrioles	<i>CCNO</i>		x	x	x	NA	femme		Wallmeier et al. 2014
Transcription des gènes requis pour l'amplification centriolaire	<i>MCIDAS</i>		x	x	x	x	chez la femme	immobilité	Boon et al. 2014

II.2. Les atteintes des cils primaires

Le lien entre le cil primaire et les maladies génétiques a été établi par les travaux fondateurs de G. J. Pazour et al. (2000). Ils ont montré que le gène *Tg737*, muté dans un modèle de polykystose rénale chez la souris, était l'orthologue du gène *IFT88*, cloné chez *Chlamydomonas*, et qu'il jouait un rôle essentiel dans la biogénèse des cils primaires dans les cellules tubulaires rénales. Ces travaux ont été déterminants car ils ont permis de découvrir le rôle essentiel du cil dans le développement des vertébrés et son implication dans des maladies humaines. Toutefois, Barr et Sternberg (1999) avaient déjà montré que les produits des gènes *PKD1* et *PKD2*, mutés dans la polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD) (Torres 1998), sont localisés au niveau des cils des neurones sensoriels de *Caenorhabditis elegans*. Les gènes *PKD1* et *PKD2* codent les polycystines PC1 et PC2, respectivement. Elles s'associent au niveau du cil primaire en réponse au flux d'urine pour former un complexe récepteur/canal ionique qui induit la signalisation calcique. Le domaine extracellulaire de PC1 reçoit les signaux mécaniques et active le canal calcique, PC2 (Hanaoka K, Qian F, 2000). Par la suite, la coopération de PC1 et PC2 a été reconnue comme essentielle à la fonction ciliaire (Yoder, Hou, et Guay-Woodford 2002; Gregory J. Pazour et al. 2002) associant ainsi le cil primaire à la formation du rein lors du développement embryonnaire. Il a ensuite été montré que la fibrocystine, codée par *PKDH1*, muté dans la polykystose autosomique récessive (ARPKD) (Park et al. 1999), est également associée au cil (Yoder, Hou, et Guay-Woodford 2002) et interagit avec PC1 et PC2 pour moduler l'activité du canal calcique (Wu et al. 2006). L'ensemble de ces données a démontré le rôle prépondérant du cil dans les maladies rénales kystiques chez l'Homme.

Les kystes dans les maladies rénales

La polykystose rénale (PKD) se caractérise par l'élargissement progressif et très important des reins à cause du développement de nombreux kystes au niveau du cortex et de la médulla rénale qui peuvent atteindre plusieurs centimètres de diamètre (Figure 21A, B). Il a été montré que le développement des kystes était causé par le dysfonctionnement des polycystines dans l'ADPKD ou de la fibrocystine dans l'ARPKD.

Les défauts ciliaires ont été associés à d'autres maladies rénales comme la néphronoptise (voir Chapitre II.2.a) ou le syndrome de Bardet-Biedl (BBS ; voir plus loin) qui entraînent des reins beaucoup moins volumineux (Figure 21C, D), voire de petite taille, et une fibrose interstitielle importante (Figure 21D) contrairement à la PKD. Ces maladies rénales sont également caractérisées par des kystes à des stades tardifs qui sont plus petits que dans la PKD et ont une distribution différente. L'ensemble des gènes mutés dans ces pathologies codent des protéines associées au cil primaire.

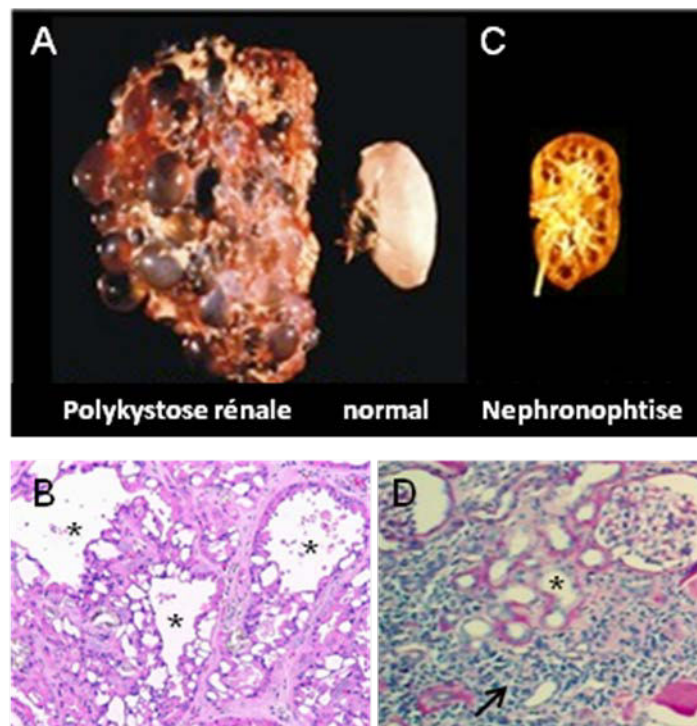


Figure 21 : Les reins d'individus atteints de maladies kystiques rénales

A-B) Les reins de patients atteints de polykystose rénale sont très volumineux (A) par rapport aux reins normaux à cause de la formation de nombreux kystes de plusieurs centimètres de diamètre dans tout le parenchyme rénal, indiqués par une étoile sur l'image d'histologie (B). C) Les reins de patients de NPH sont de taille normale. D) Ils sont caractérisés par une fibrose interstitielle importante (flèche) et de petits kystes à la transition cortico-médullaire (étoile).

Le mécanisme expliquant comment des défauts ciliaires entraînent la formation de kystes n'est toutefois pas encore très clair. Une étude a même montré que des défauts de l'IFT chez des souris adultes n'entraînent pas la formation de kystes dans les reins malgré la perte de cils (Patel et al. 2008). Il est donc vraisemblable que la formation des kystes soit liée à la combinaison de plusieurs événements au cours du développement tels que la prolifération

cellulaire, la perte de la polarité cellulaire et de la différenciation épithéliale. Les différents gènes associés aux ciliopathies rénales pourraient être d'avantage impliqués dans l'un ou l'autre de ces processus, ce qui expliquerait les différences de phénotypes entre les maladies.

Il a été suggéré que des défauts de polarité planaire et une mauvaise orientation du fuseau mitotique lors de l'élongation des tubules au cours de la formation des néphrons seraient à l'origine des kystes dans les reins (Fischer et al. 2006). En effet, en l'absence de cil ou en cas de dysfonctionnement ciliaire, la voie de la PCP est inhibée (voir Chapitre I.5) et ne contrôle plus l'axe de division des cellules par rapport à l'axe longitudinal des tubes rénaux ce qui entrainerait la dilatation des tubes (revu dans Fischer et Pontoglio 2009). Par ailleurs, on observe des défauts d'organisation de la lame basale et des jonctions serrées dans les reins des patients qui pourraient être causés par des anomalies de polarisation apico-basale des cellules épithéliales de rein (Delous et al. 2009).

L'allongement des tubules lors de leur morphogénèse est aussi contrôlé par le phénomène de convergence-extension. Il s'agit du mouvement des cellules qui s'intercalent entre elles pour diminuer le diamètre du tube et l'allonger (Lienkamp et al. 2012; Castelli et al. 2013). Les défauts de convergence-extension entraineraient l'augmentation de la pression hydrostatique dans les tubes ce qui participerait aussi à l'augmentation de leur diamètre et à la formation des kystes (Karner et al. 2009).

La formation de kystes est également corrélée à l'augmentation de la prolifération (Patel et al. 2008) qui explique les reins très volumineux des patients atteints d'ADPKD (Figure 21A ; Ong et Harris 2005). La suractivation des voies impliquées dans la prolifération des cellules épithéliales comme la voie Shh, par exemple, pourrait être à l'origine de la formation de kystes dans le rein (voir Chapitre I.5 ; Tran et al. 2014). La suractivation de la voie Wnt- β -caténine dans les reins entrainerait aussi une surprolifération (voir Chapitre I.5) et la formation de kystes (Saadi-Kheddoui et al. 2001). D'ailleurs, des niveaux élevés de β -caténine dans le cytoplasme et le noyau de cellules épithéliales rénales ont été rapportés dans les reins polykystiques de souris invalidées de manière conditionnelle pour le gène *Kif3a* (Lin et al. 2003). Cependant, les reins des patients atteints de NPH ou de BBS sont de

taille normale voire réduite (Figure 21C), ce qui suggère que le processus de prolifération n'est pas toujours en cause.

Au cours du développement rénal, il a aussi été montré que la voie Sonic-Hedgehog était active lors de la transition mésenchyme-épithélium de la tubulogénèse (J. Yu, Carroll, et McMahon 2002). On peut alors supposer que la perte de fonction des effecteurs ciliaires de la voie Shh, due à un défaut des cils, pourrait entraîner le processus de dédifférenciation épithéliale et aboutir à une fibrose rénale massive chez les patients NPH (Attanasio et al. 2007).

L'ensemble de ces données montrent que, bien que toutes les deux associées à des défauts du cil primaire, la PKD et la NPH sont vraisemblablement liées à des fonctions et des voies de signalisation différentes.

Autres organes touchés par des défauts des cils primaires

Les ciliopathies peuvent aussi toucher d'autres organes que les reins tels que le foie dans le syndrome de Caroli (dilatations des canaux biliaires et fibrose hépatique congénitale), l'œil dans l'amaurose congénitale de Leber (LCA ; dystrophie et/ou une dysplasie rétinienne congénitale) ou l'apraxie oculomotrice congénitale de type Cogan (AOMC ; anomalie de l'initiation des saccades volontaires horizontales des yeux), le système nerveux central dans la maladie de Joubert ou le squelette dans les syndromes polydactylie – côtes courtes (voir Chapitre II.2.b). A cause de l'ubiquité des cils primaires dans l'organisme, plusieurs organes peuvent être touchés chez un même patient et la combinaison des signes cliniques forme des syndromes.

Le syndrome de Bardet-Biedl

Le syndrome de Bardet-Biedl est un exemple typique de la grande variabilité phénotypique des ciliopathies. C'est une ciliopathie autosomale récessive aux manifestations pléiotropiques, dont la prévalence est d'environ 1/160 000 en Europe (Forsythe et Beales 2013). Les anomalies du rein et de la rétine sont retrouvées le plus souvent mais peuvent aussi être associées à des troubles cognitifs et endocriniens et d'anomalies du squelette. Ainsi, six signes cliniques sont considérés comme caractéristiques du BBS : la

dégénérescence rétinienne, l'obésité, l'hypogonadisme, la polydactylie, le dysfonctionnement rénal (dysplasie rénale et kystes tubulaires) et un retard mental. À ce jour, le BBS est l'une des ciliopathies les plus étudiées avec une vingtaine de gènes identifiés (*BBS1-12, MKS1, NPHP6/CEP290, IFT27*). Les protéines BBS sont essentiellement localisées au corps basal et au cil ; plusieurs d'entre elles appartiennent au BBSome (Chapitre I.4.b ; revu dans Zaghoul et Katsanis 2009).

Les ciliopathies létales

Les formes de ciliopathies les plus sévères regroupent le syndrome de Meckel, l'hydrolethalus et les chondrodysplasies létales. Il s'agit de maladies létales *in utero* ou peu après la naissance.

Le syndrome de Meckel se caractérise par une polykystose rénale, une polydactylie et des anomalies graves de développement du système nerveux central, souvent causées par un défaut de fermeture du tube neural, provoquant une encéphalocèle occipitale. Une dysplasie des voies biliaires et des kystes hépatiques et pancréatiques peuvent aussi caractériser ce syndrome (Johnson, Gissen, et Sergi 2003; Barker, Thomas, et Dawe 2014). La fréquence de cette maladie autosomale récessive varie entre 1/135 000 en Allemagne à 1/9000 en Finlande où ce syndrome est particulièrement fréquent en raison d'un effet fondateur. A ce jour, 12 gènes ont été identifiés en association avec le syndrome de Meckel et codent des protéines ciliaires ou centrosomales (MKS, Szymanska, Hartill, et Johnson 2014).

L'hydrolethalus est caractérisé par une dysmorphie cranio-faciale et des malformations du système nerveux central dues une hydrocéphalie et une agénésie des structures médianes (corps calleux, vermis cérébelleux ou le septum pellucidum). Ces symptômes sont associés à une polydactylie post-axiale des mains et pré-axiale des pieds, des problèmes pulmonaires et cardiaques dans la moitié des cas. Le syndrome est présent surtout dans des familles originaires de Finlande, où l'incidence à été estimée à 1/20.000. Des mutations dans 3 gènes ont été rapportées : *HYLS1, KIF7* et *Talpid3* (Mee et al. 2005; Putoux et al. 2011; Alby et al. 2015, annexe 2).

Les chondrodysplasies létales sont les formes les plus sévères des syndromes polydactylie – côtes courtes car la polydactylie et le raccourcissement des os longs s'associent à des

anomalies cérébrales comme l'agénésie cérébelleuse ou une hydrocéphalie. De plus, des anomalies viscérales comme une sténose digestive, une hypoplasie et/ou une polykystose rénale ou des problèmes cardiaques peuvent également être associées.

II.2.a. La néphronophtise

Une des autres manifestations rénales communément associée aux ciliopathies est la néphronophtise (NPH). C'est une néphropathie tubulo-interstitielle chronique qui se caractérise par un trouble de concentration des urines avec polyurie et polydipsie et une dégradation progressive de la fonction rénale, sans protéinurie, entraînant une insuffisance rénale généralement dans l'enfance. Les enfants présentent souvent une déshydratation chronique pouvant entraîner un retard de croissance qui s'aggrave à mesure que l'insuffisance rénale progresse. D'autres signes tels que l'anémie, l'acidose métabolique, les nausées, l'anorexie et la fatigue sont aussi observés (Rémi Salomon, Saunier, et Niaudet 2009).

La NPH est une maladie génétique à transmission autosomique récessive. Son incidence est évaluée à environ 1/100 000 naissances (R. Salomon 2007; Friedhelm Hildebrandt, Attanasio, et Otto 2009) et il s'agit donc d'une maladie rare. Pourtant, c'est la première cause génétique d'insuffisance rénale chez l'enfant (5 à 10%) (Rémi Salomon, Saunier, et Niaudet 2009). Aujourd'hui encore, les seules options thérapeutiques restent la dialyse et la greffe de rein. Il y a trois présentations cliniques différentes selon l'âge d'apparition de l'insuffisance rénale terminale (IRT) : la forme infantile touche environ 10% des enfants qui présentent une IRT avant l'âge de 5 ans (Gagnadoux et al. 1989), la forme juvénile est la plus fréquente (15 % des IRT ; 13 ans en moyenne) (F. Hildebrandt et al. 1997) et, enfin, la forme affectant les jeunes adultes est la plus rare (H. Omran et al. 2000).

Dans la NPH, les reins ont une taille normale voire réduite lorsque l'insuffisance rénale est déjà importante. Ils sont hyperéchogènes, révélant un remaniement interstitiel anormal, et ont perdu leur différenciation cortico-médullaire (Garel et al. 1984). Si ces signes cliniques permettent d'orienter le diagnostic de NPH, seules les analyses histologique ou génétique permettent de confirmer la maladie.

D'un point de vue histologique, les reins présentent des tubes atrophiés avec un épaissement des membranes basales au stade précoce de la maladie (Antignac et al. 1993). Puis, à des stades plus avancés, on observe aussi des tubes dilatés ou en hypertrophie compensatrice, voire même la formation de kystes dans la région cortico-médullaire. Entre ces tubes atrophiés et/ou hypertrophiques, il y a développement très précoce d'une fibrose interstitielle importante (Figure 21D). La NPH ne présente pas d'atteinte glomérulaire mais, aux stades tardifs de la maladie, l'aggravation de l'insuffisance rénale peut entraîner une sclérose ou des kystiques glomérulaires. Chez les patients atteints de NPH infantile, on observe d'avantage de dilatations tubulaires microkystiques entraînant l'augmentation de la taille des reins (Tory et al. 2009). De plus, une hypertension rénale est souvent associée.

II.2.b. Les syndromes associés à la NPH

Environ la moitié des patients NPH présente une forme syndromique (45% dans la cohorte de Necker ; Friedhelm Hildebrandt, Attanasio, et Otto 2009) c'est-à-dire que les défauts rénaux sont associés à des troubles extra-rénaux.

- Le syndrome de Senior-Løken (SLS) est le plus fréquent (25% des patients atteints de NPH) et associe une dégénérescence de la rétine à la NPH. La dégénérescence rétinienne la plus fréquente est la rétinite pigmentaire (RP ; Friedhelm Hildebrandt, Attanasio, et Otto 2009) et se caractérise par une perte progressive de la vision liée à la dégénérescence des photorécepteurs. Dans les formes plus sévères (amaurose congénitale de Leber, LCA), la cécité peut être congénitale.

- Chez 20-30% des patients atteints d'une NPH (prévalence de 1/100 000 ; Parisi 2009), les atteintes oculaire et rénale sont associées au syndrome de Joubert (JS) et caractérisent le syndrome *cerebello-oculo-renal* (CORS) (Satran, Pierpont, et Dobyns 1999) et le syndrome de Joubert type B (JBTS-B) (F. Hildebrandt et al. 1992). Le JS est une anomalie du système nerveux central caractérisée par un allongement des pédoncules du vermis cérébelleux qui forme alors une « dent molaire » sur l'IRM cérébrale (Maria et al. 1997). Les principaux symptômes sont une ataxie cérébelleuse partielle ou totale (trouble de la coordination des mouvements volontaires), un retard psychomoteur avec hypotonie, des mouvements oculaires anormaux et des épisodes de détresse respiratoire dans la période néonatale. Une

polydactylie et une fibrose hépatique peuvent aussi être retrouvées. Le JBTS est une pathologie génétiquement très hétérogène puisque 23 gènes (*JBTS*) y ont déjà été associés (Szymanska, Hartill, et Johnson 2014).

- Dans 6% des cas, la NPH est associée à des anomalies squelettiques.

Le syndrome de Saldino-Mainzer (MZSDS) se manifeste par une NPH, une RP, une ataxie cérébelleuse et une dysplasie osseuse caractérisée par des phalanges raccourcies avec des épiphyses en forme de cônes et parfois des anomalies de la métaphyse fémorales (Mainzer et al. 1970). Une fibrose hépatique peut aussi être associée.

Le syndrome de Sensenbrenner ou dysplasie cranio-ectodermique (CED) se caractérise par une craniosynostose c'est-à-dire une forme anormale du crâne due à la fusion prématurée d'une ou plusieurs sutures crâniennes. Les patients présentent aussi des anomalies ectodermiques et dentaires, des doigts et orteils anormaux et des traits dysmorphiques (Sensenbrenner, Dorst, et Owens 1975). Ces manifestations peuvent être associées à une NPH, des anomalies hépatiques et oculaires (H. Arts et Knoers 1993).

La dystrophie thoracique asphyxiante de Jeune ou syndrome de Jeune est caractérisée par un thorax étroit, des os longs raccourcis, une polydactylie et des anomalies de la hanche (cotyle en forme de trident) (Jeune, Beraud, et Carron 1955). L'étranglement thoracique peut être à l'origine d'une insuffisance respiratoire en période néonatale et de troubles respiratoires persistants dont dépend beaucoup le pronostic. Elle peut être associée à des anomalies cérébrales comme l'agénésie cérébelleuse ou une hydrocéphalie ainsi qu'à des anomalies viscérales comme une sténose digestive, une hypoplasie rénale et/ou une NPH, des malformations cardiaques... (Baujat et al. 2013)

- Enfin, un *situs inversus* et des défauts cardiaques peuvent aussi être associés à la NPH, principalement dans certaines formes infantiles (Edgar A. Otto et al. 2003).

Le chevauchement phénotypique entre les différents syndromes et les variabilités cliniques des signes présentés par les patients peuvent rendre le diagnostic difficile et controversé. L'identification du gène responsable est alors un recours indispensable au diagnostic.

II.2.c. Les gènes NPHP

La NPH et les syndromes associés sont des maladies génétiques très hétérogènes. Des mutations ont été découvertes dans une vingtaine de gènes différents (*NPHP* ; Tableau 2) dont les produits ont été initialement appelés néphrocystines puis protéines NPHP (Figure 22). La quasi-totalité d'entre elles est localisée au niveau du corps basal, de la zone de transition ou de l'axonème du cil et contribuent à sa formation et à la transduction des voies de signalisation ciliaires telles que Wnt et Hedgehog, ce qui a permis de classer la NPH et les syndromes associés parmi les ciliopathies.

Le complexe NPHP1/4/8 à la zone de transition

Le premier gène à avoir été impliqué dans la NPH est *NPHP1*. Une étude de liaison génétique a abouti à l'identification de grandes délétions homozygotes de 290 kb dans le gène *NPHP1* sur le chromosome 2 (Saunier 2000) chez des patients atteints, pour la plupart, de NPH juvénile (IRT vers 13 ans environ). Des mutations ponctuelles du gène ont ensuite été identifiées associées à une délétion hétérozygote sur l'autre allèle (F. Hildebrandt et al. 1997; Saunier et al. 1997). Les délétions du gène *NPHP1* représentent près d'un quart des cas de NPH (cohorte Necker), soit la moitié des patients dont le gène responsable a été identifié, ce qui en fait un gène majeur de la NPH. De même que *NPHP1*, le gène *NPHP4* est généralement impliqué dans la NPH isolée et parfois associée à des atteintes oculaires. De plus, des mutations de *NPHP1* et *NPHP4* sont retrouvées chez des patients atteints de syndrome de Senior-Løken (SLS) et d'apraxie oculomotrice congénitale de Cogan (AOMC) (Betz et al. 2000; Mollet et al. 2002; Hoefele et al. 2005). Des anomalies cérébelleuses de type syndrome de Joubert, sont également retrouvées dans 20% des patients avec une délétion *NPHP1* (Caridi et al. 2006).

De manière intéressante, les modèles de souris invalidées pour les gènes *nphp1* et *nphp4* présentent une cécité et une infertilité (Jiang et al. 2008; Won et al. 2011) mais pas de phénotype rénal, suggérant que ces gènes ne sont pas cruciaux pour le développement rénal dans cette espèce. Par contre, lorsque des lésions rénales sont provoquées (néphrectomie), l'absence de ces gènes entraînent la formation de kystes dans les reins suggérant leur importance dans les phénomènes de régénération (données non publiées). L'invalidation de

nphp4 chez le poisson zèbre conduit à la formation de kystes dans le pronephros à cause de l'obstruction du cloaque et des défauts de convergence extension. Les poissons invalidés présentent aussi des défauts d'élongation, un défaut de latéralisation gauche-droite et des anomalies rétiniennes, caractéristiques des phénotypes ciliaires (Burcklé et al. 2011).

Les mutations du gène *NPHP8* n'entraînent pas de NPH isolée mais sont responsables de syndrome de Joubert ou de Meckel (Delous et al. 2007).

La néphrocystine-1 (NPHP1) est localisée au niveau de la zone de transition où elle interagit avec les protéines NPHP4 et NPHP8/RPGRIP1L. Elles participent à la fonction de filtre moléculaire à la base du cil et régulent sa composition (Mollet et al. 2002; Mollet et al. 2005; Delous et al. 2007). Il a été montré que NPHP4 recrutait NPHP1 et RPGRIP1L au niveau de la zone de transition dans les cellules épithéliales rénales de souris (Sang et al. 2011) et dans les cellules pigmentaires de la rétine (Winkelbauer et al. 2005). Ce complexe NPHP est aussi localisé au niveau des jonctions cellulaires où il participe à la mise en place de la polarité apico-basale et la morphogénèse épithéliale (Mollet et al. 2005; Delous et al. 2009). RPGRIP1L jouerait aussi un rôle important dans la régulation de la PCP par la stabilisation de Disheveled à la base du cil primaire (Mahuzier et al. 2012).

Le complexe NPHP5/6 à la zone de transition

Des mutations de *NPHP5* ont été retrouvées chez des cas de SLS alors que celles identifiées dans *CEP290/NPHP6* sont responsables de phénotypes très hétérogènes allant de la RP ou de la NPH isolée à des anomalies développementales sévères (JBTS, MKS).

NPHP5 (IQCB1) et NPHP6 (CEP290) forment aussi un complexe mais le rôle de cette interaction n'est pas clair. Ces 2 protéines ont été observées au corps basal (Sang et al. 2011) ainsi qu'au niveau de la zone de transition des cellules épithéliales rénales (Heymut Omran 2010). Elles participeraient à l'assemblage du cil et réguleraient le trafic intraflagellaire (Sang et al. 2011). CEP290 a été observée au niveau des projections en « Y » de la zone de transition (Craigie et al. 2010) où elle participerait à la filtration des protéines ciliaires en interagissant directement avec la membrane ciliaire (Drivas, Holzbaur, et Bennett 2013).

Il a été proposé que les complexes NPHP1/4/8 et NPHP5/6 participent à la formation de la zone de transition en association avec les complexes protéiques formés par les produits des

gènes *MKS* et *JBTS* (Sang et al. 2011). Cela pourrait expliquer le chevauchement phénotypique de la NPH et des syndromes de Meckel et Joubert. En plus, des mutations dans les mêmes gènes ont été retrouvés chez des patients NPH ou MKS comme *CEP290/NPHP6/MKS4*, *RPGRIP1L/NPHP8/MKS5* et *TMEM67/NPHP11/MKS3* (Sayer et al. 2006; Delous et al. 2007; E. A. Otto et al. 2009). *TMEM67* code aussi une protéine de la zone de transition qui est importante pour la composition normale du cil et les voies de signalisation (Shh, Wnt/PCP ; Leightner et al. 2013).

La région distale du corps basal

Comme pour *CEP290*, des mutations dans d'autres gènes codant des protéines localisées au niveau de la partie distale des centrioles entraînent des ciliopathies. Les mutations de *SDCCAG8/NPHP10* sont souvent à l'origine de SLS (Edgar A. Otto et al. 2010). *SDCCAG8* est une protéine retrouvée à la partie distale des centrioles qui serait impliquée dans le recrutement centrosomal de protéines péricentriolaires indispensables à la nucléation et à l'organisation des microtubules (Insolera et al. 2014).

De plus, les mutations du gène *CEP164/NPHP15*, codant une protéine des fibres de transition (voir Chapitre I.2.a), entraînent une NPH infantile pouvant être associée à une rétinite pigmentaire (Chaki et al. 2012).

Le compartiment inversine

Les mutations dans les gènes *INVS/NPHP2*, *NPHP3* et *NEK8/NPHP9*, codant les protéines du compartiment inversine, sont responsables d'une NPH infantile associée à des malformations cardiaques et un *situs inversus*. Les reins des patients mutés pour *INVS* ont la particularité d'avoir de gros kystes, rarement observés dans les autres cas de NPH (Tory et al. 2009). Récemment, des mutations ont été identifiées dans le gène *NPHP16/ANKS6* chez des patients atteints de maladies kystiques rénales avec début précoce et associées à des défauts cardiaques (Taskiran et al. 2014; Hoff et al. 2013). *ANKS6* est aussi une protéine localisée au compartiment inversine où elle participe à la formation du complexe *NPHP2-NEK8*. Toutes ces protéines sont exprimées au niveau du nœud embryonnaire pendant l'embryogénèse, où elles auraient donc un rôle spécifique, et qui explique que les mutations

peuvent aussi entraîner des *situs inversus* et des problèmes cardiaques (Edgar A. Otto et al. 2003; Bergmann et al. 2008; Manning et al. 2013). La structure, de même que la fonction, du compartiment inversine ne sont pas très bien connues. Il semble être important pour la composition protéique du cil et certaines voies de signalisation comme la voie Wnt-non canonique (voir Chapitres I.3.e et I.5).

L'IFT

Des mutations récessives dans les 6 gènes codant les sous-unités du complexe IFT-A ont été retrouvées tandis que seuls 3 des 14 gènes codant les sous-unités du complexe IFT-B (*IFT80*, *IFT172/NPHP17*, *IFT27/BBS19*) ont été impliqués dans les ciliopathies et particulièrement des ciliopathies squelettiques (voir Chapitre I.4.b). Les mutations retrouvées dans les gènes *IFT* entraînent toutes des atteintes précoces comme dans les syndromes de Jeune, Sensenbrenner et Saldino-Mainzer. Seules les mutations de 3 gènes codant des protéines IFT-A ont été rapportées dans des cas de NPH isolée (*TTC21B/IFT139/NPHP12*, *IFT140* et *WDR19/IFT144/NPHP13*). Cependant, il semble que les 3 autres gènes *IFT-A* soient aussi associés à des atteintes rénales (données du laboratoire).

L'axonème

Des mutations ont été mises en évidence dans des gènes directement impliqués dans la signalisation ciliaire. Deux familles présentant une NPH juvénile isolée ont été identifiées portant des mutations récessives du gène *GLIS2/NPHP7* (Attanasio et al. 2007). La protéine *GLIS2* est l'un des 3 membres (*GLIS1–3*) apparentés à la famille des facteurs de transcription Gli impliqués dans la voie de signalisation Hedgehog (B. Li et al. 2011).

Très récemment, deux individus souffrant de NPH juvénile associée à une hépatosplénomégalie et une fibrose hépatique ont été retrouvés porteurs de mutations dans le gène *DCDC2/NPHP19* (Schueler et al. 2015). *DCDC2* est une protéine associée aux microtubules, localisée le long de l'axonème et requise pour la ciliogenèse (voir Chapitre I.4.c). Les données de Schueler et al montrent également que *DCDC2* interagit avec les protéines Disheveled pour inhiber la voie Wnt/ β caténine.

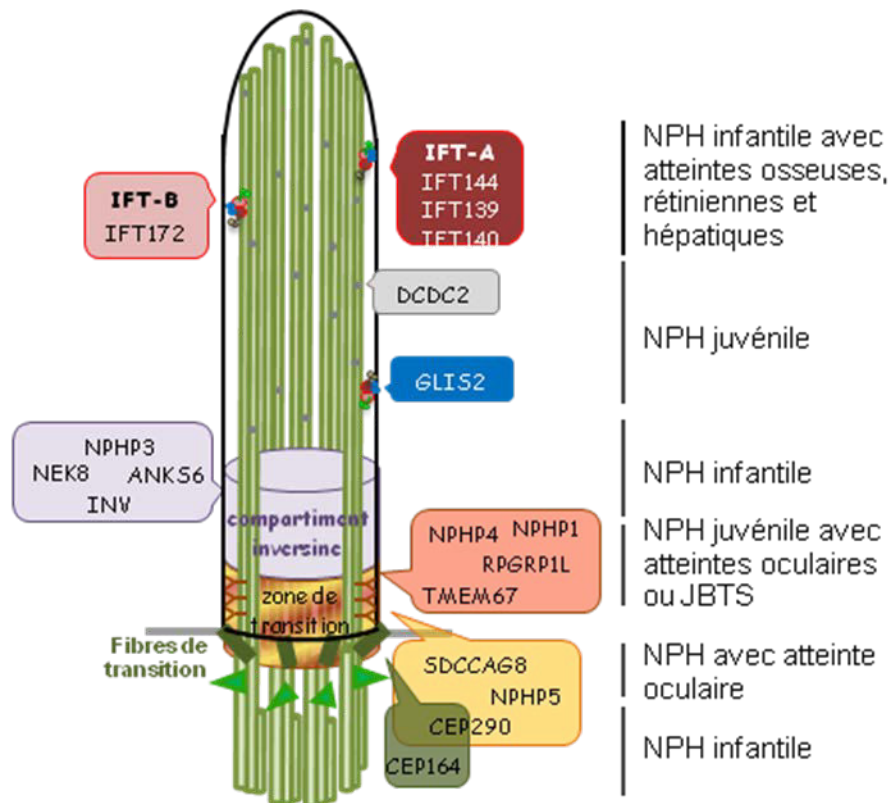


Figure 22 : Localisation ciliaire des protéines NPHP et corrélation avec le phénotype

Les protéines NPHP sont retrouvées tout le long du cil primaire. Au niveau de l'axonème, les mutations des protéines de l'IFT sont principalement responsables de NPH syndromiques avec atteintes squelettiques, oculaires et/ou hépatiques. Les mutations dans leur cargo, GLIS2, et dans la protéine associée aux microtubules, DCDC2, sont à l'origine de NPH juvéniles ; tout comme celles des protéines du complexe NPHP1-4-8 de la zone de transition qui peuvent aussi être associées à des atteintes oculaires ou un syndrome de Joubert (JBTS). Les mutations des protéines du compartiment inversine sont le plus souvent retrouvées dans les cas de NPH infantile comme celles des protéines des fibres de transition (CEP164, CEP290). Enfin, les mutations des protéines de la zone de transition, NPHP5-CEP290 et SDCCAG8, conduisent souvent à des SLS.

La réponse aux dommages de l'ADN

Certaines ciliopathies ont aussi été associées à des défauts de la réparation de l'ADN. Il s'agit d'un processus cellulaire complexe nécessaire à la stabilité du génome et constitué de différentes voies de signalisation selon le stade du cycle cellulaire et selon les défauts subits par l'ADN (Ciccia et Elledge 2010). Il a été montré que le stress au moment de la réplication pouvait contribuer à l'étiologie de la NPH et des syndromes associés. Sur les 20 gènes retrouvés mutés dans la maladie, au moins 4 seraient impliqués dans la réponse aux dommages de l'ADN. Les premières études des gènes *ZNF423/NPHP14* et *CEP164/NPHP15* ont révélé que les protéines correspondantes colocalisaient avec des protéines impliquées

dans la réponse aux dommages de l'ADN dans le noyau (Chaki et al. 2012). De plus, l'expression de *CEP164* est dépendante du cycle cellulaire et augmente en fin de phase S alors que les cellules ne sont pas ciliées suggérant le rôle non ciliaire de *CEP164* (Sivasubramaniam et al. 2008). Des mutations de *NEK8* (NIMA-related kinase)/*NPHP9* ont été identifiées dans un cas de NPH infantile ou dans des cas de dysplasies kystiques rénales associées à des anomalies de plusieurs organes et du développement (Frank et al. 2013). *NEK8* est indispensable à l'activation de la voie de réparation de l'ADN (Moniz et al. 2011; Fry et al. 2012) et son invalidation dans les cellules conduit à une réponse défectueuse au stress de réplication et aux erreurs spontanées de l'ADN. La protéine *SDCCAG8/NPHP10* est aussi impliquée dans la progression de la phase S et l'inhibition de son expression conduit à une activation aberrante de la réponse au stress de réplication (Airik et al. 2014). Ces fonctions non ciliaires des gènes *NPHP* pourraient être à l'origine de l'augmentation de l'apoptose et de la fibrose tubuluo-interstitielle observées dans les reins des patients atteints de NPH et pourraient expliquer les différences phénotypiques avec les autres maladies kystiques telles que les polykystoses.

II.2.d. Les corrélations génotype-phénotype

Considérant l'hétérogénéité clinique et génétique, des corrélations entre le phénotype des patients et la nature du gène muté ont été recherchées. Par exemple, *NPHP11/TMEM67* et *NPHP19/DCDC2* ont été impliqués chez des patients avec fibrose hépatique (E. A. Otto et al. 2009; Schueler et al. 2015). Les protéines *IQCB1*, *CEP290* et *SDCCAG8*, respectivement codées par les gènes *NPHP5*, *NPHP6* et *NPHP10*, sont associées au niveau du cil connecteur avec le complexe *RPGR-RPGRIP* en route pour le segment externe (Edgar A. Otto et al. 2005; Edgar A. Otto et al. 2010; B. Chang et al. 2006). Ce complexe participerait à la sélection et/ou au transport des cargos tels que la rhodopsine et l'arrestine en interagissant avec les IFT et la kinésine-II le long du cil connecteur (Khanna et al. 2005). Cela pourrait expliquer que 80% et 100% des patients portant des mutations dans *NPHP10* et *NPHP5*, respectivement, soient atteints de rétinite pigmentaire et que 20% des patients atteints de LCA portent une mutation hypomorphique de *NPHP6/CEP290* (den Hollander et al. 2006). Les gènes *NPHP2* et *NPHP15*, codant, respectivement, les protéines inversine et *CEP164*, sont souvent retrouvés mutés chez des individus atteints de NPH infantile.

De façon intéressante, la plupart des syndromes associés à la NPH sont associés à des gènes *NPHP* codant des protéines localisées au niveau de la zone de transition ou à la base du cil, alors que les patients atteints de défauts squelettiques ont des mutations dans les gènes *IFT*. Parmi les *IFT*, les mutations du gène *TTC21B* ont la particularité d'être responsables d'une atteinte glomérulaire à l'origine d'une augmentation de la protéinurie chez les patients.

Des corrélations génotype-phénotype sont également décrites dans les cas où les mutations d'un même gène entraînent des tableaux cliniques différents. Par exemple, les mutations identifiées dans *NPHP13/WDR19*, qui code la protéine IFT144 du complexe IFT-A, sont retrouvées chez des patients présentant des phénotypes sévères comme les syndromes de Jeune ou de Sensenbrenner. Par contre, l'association d'une mutation non sens et d'une variation bénigne est à l'origine de manifestations plus tardives comme la NPH juvénile (Bredrup et al. 2011). Ces corrélations sont également observées chez les souris portant différentes mutations du gène *ift144* (Ashe et al. 2012). De plus, des mutations hétérozygotes composites (non sens et faux sens) dans la partie 3' du gène *WDR35*, codant la protéine IFT121 du complexe B, entraîne un syndrome de Sensenbrenner (Gilissen et al. 2010) tandis que des mutations homozygotes, modifiant les sites d'épissage dans la partie 5', provoquent un syndrome de Jeune (Caparrós-Martín et al. 2015).

Une même mutation peut également avoir des conséquences différentes selon qu'elle est à l'état homozygote ou associée à une autre variation en *trans* (hétérozygote composite). La mutation c.3533G>A (p.Arg1198Gln) retrouvée dans *WDR19* peut être à l'origine de défauts squelettiques associés à une insuffisance rénale très précoce (avant 1 an, NPH infantile) et une atteinte oculaire et hépatique lorsqu'elle est à l'état homozygote (Halbritter, Porath, et al. 2013, données non publiées). En revanche, cette mutation à l'état hétérozygote composite n'entraîne pas de manifestations squelettiques et selon la pathogénicité de la mutation avec laquelle elle est associée, la NPH peut être très précoce dans le cas de mutations non sens ou plus tardive dans le cas de mutations faux sens. Par contre, l'atteinte oculaire et surtout l'atteinte hépatique sont retrouvées chez la plupart des patients portant cette mutation p.Arg1198Gln (J. M. Lee et al. 2015). Cela a également été décrit pour la mutation p.Pro209Leu du gène *TTC21B*, qui à l'état homozygote entraîne une NPH juvénile

et une atteinte hépatique alors qu'associée à une mutation tronquante, elle est responsable d'insuffisance rénale précoce et d'anomalies osseuses (Huynh Cong et al. 2014). Cette mutation est principalement retrouvée chez des patients originaires d'Afrique du Nord ou du Portugal en accord avec l'effet fondateur rapporté.

La pathogénicité de certaines variations peut aussi dépendre de la mutation avec laquelle elles sont associées. En effet, des mutations à l'état homozygote sont asymptomatiques alors qu'associées à une autre mutation dans le gène, elles sont responsables d'un phénotype rénal. C'est le cas du variant c.1034T>G (p.Val345Gly) de *WDR19* retrouvé à l'état homozygote chez la mère, asymptomatique, de 4 enfants porteurs de cette variation en *trans* avec une mutation non-sens (c.3068dupA [p.Tyr1023*]) et atteints de NPH isolée. Le variant p.Val345Gly, situé à la fin d'un domaine protéique fonctionnel (WD40), ne doit affecter que légèrement la fonction de la protéine IFT144 mais son association avec une mutation tronquante doit faire ressortir son effet hypomorphique (Bredrup et al. 2011).

Tableau 2 : Les gènes NPHP associés à la néphronophthie et aux syndromes associés. Adapté de Delous, Gaudé, et Saunier 2013.

Gènes	% des cas	NPH isolée	NPH syndromique					autres	Références
			Fibrose hépatique	Défaut de latéralisation	Rétinite pigmentaire (SLS)	SNC (JBTS-B)	Anomalies osseuses (MSS, JATD, SS)		
NPHP1	25%	juvénile			x	x		LCA	(Saunier et al. 1997; F. Hildebrandt et al. 1997)
INVS/NPHP2	2%	infantile	x	x					Edgar A. Otto et al. 2003
NPHP3	2,8%	infantile / juvénile		x	x			MKS	Olbrich et al. 2003
NPHP4	2,2%	x			x				Mollet et al. 2002; Hoefele et al. 2005
IQCB1/NPHP5	1,7%				x				Edgar A. Otto et al. 2005
CEP290/NPHP6	2,3%	infantile			x			LCA / BBS-like / MKS	B. Chang et al. 2006
GLIS2/NPHP7	-	juvénile							Attanasio et al. 2007
RPGRIP1L/NPHP8/MKS5	0,7%						x	LCA / MKS	Delous et al. 2007; Wolf et al. 2007
NEK8/NPHP9	0,2%	infantile		x					Edgar A. Otto et al. 2008
SDCCAG8/NPHP10	0,5%				x			BBS-like	(Edgar A. Otto et al. 2010)
TMEM67/NPHP11	0,7%		x				x	BBS-like / MKS	E. A. Otto et al. 2009
TTC21B/NPHP12	1,8%	x	x	x				FSGS	Davis et al. 2011; Huynh Cong et al. 2014
WDR19/NPHP13	0,6%	x	x	x			x		Bredrup et al. 2011
ZNF423/NPHP14	-					x	x		Chaki et al. 2012
CEP164/NPHP15	0,2%	infantile			x		x		Chaki et al. 2012
ANKS6/NPHP16	0,2%	infantile					x		Hoff et al. 2013
IFT172/NPHP17	0,3%	x	x	x				BBS	Halbritter, Bizet, et al. 2013
DCDC2/NPHP19	-		x						Schueler et al. 2015
IFT140	0,8	x					x		Perrault et al. 2012

II.3. L'identification et la validation des mutations causales retrouvées chez les patients

Les ciliopathies étant des maladies génétiques, le diagnostic définitif est apporté par l'étude des exons des gènes d'intérêt et la découverte de mutations délétères chez les patients. Le diagnostic génétique est très important pour les familles. D'une part, il est indispensable à la compréhension de leur pathologie et à l'amélioration de leur prise en charge. D'autre part, le diagnostic anténatal permet la recherche des mutations causales lors d'une nouvelle grossesse.

La mise en évidence des mutations responsables

Les nouvelles technologies de séquençage haut débit ont progressivement remplacé les approches « gènes candidats » pour la mise en évidence des mutations responsables des maladies à transmission récessive. L'approche « gènes candidats » consiste à identifier les régions de l'ADN qui ségrégent dans les familles des patients grâce à des études de liaison puis à séquencer les gènes de ces régions d'intérêt. Les études de liaison sont encore réalisées aujourd'hui, en association avec des analyses d'exomes pour définir la mutation causale parmi le grand nombre de variations identifiées.

Le séquençage de l'exome complet permet d'analyser la quasi-totalité des exons du génome (environ 22 000 gènes) simultanément et augmente la probabilité d'identifier toutes les variations présentes dans les séquences codantes de l'individu. Cette méthode permet aussi d'utiliser les échantillons d'ADN de plusieurs individus en même temps et de diminuer encore le temps nécessaire au séquençage. La meilleure couverture de séquençage par les amorces de capture utilisées par le séquençage de nouvelle génération a permis d'augmenter la précision des variations mises en évidence. Avec un rendement augmenté et un coût diminué, cette technique est désormais utilisée pour le diagnostic génétique des patients et a accéléré la découverte de nouveaux gènes impliqués dans les maladies à transmission mendélienne comme la NPH.

A cause du très grand nombre de variations présentes dans la séquence d'ADN de chaque individu, le séquençage de l'exome complet génère énormément de données et rend parfois

difficile l'identification du gène candidat et des variations responsables de la maladie. Le séquençage ciblé de gènes potentiellement spécifiques de la maladie est alors possible. L'équipe de Sophie Saunier a ainsi mis en place une librairie de capture des exons des gènes dits ciliaires. Le concept de « ciliome » guide le séquençage génomique en ciblant les régions codantes d'un ensemble de plus de 1200 gènes suspectés ou connus pour être impliqués dans le fonctionnement du cil. Ces gènes regroupent les gènes de ciliopathies déjà rapportés, ceux connus pour être essentiels à la structure et la fonction du cil, les gènes identifiés grâce à des études du protéome ciliaire ou des interactomes et enfin les homologues des gènes ciliaires identifiés dans les modèles animaux (Cildb). Le « ciliome » offre ainsi une base de données essentielle pour l'identification de gènes candidats et a montré son efficacité dans l'identification du gène causal de nombreux patients atteints de ciliopathies.

La complexité des données obtenues, leur analyse et, enfin, leur interprétation nécessitent des outils bioinformatiques performants et appropriés (interface Polyweb de la plateforme Bioinformatique de l'Université Paris Descartes). Des stratégies de filtres ont alors été mises en place pour aider à l'identification des mutations causales parmi tous les variants identifiés par le séquençage (Renkema et al. 2014). Les filtres reposent sur la qualité de capture des fragments d'ADN (nombre de lecture), le nombre de fois que les variations sont trouvées dans les bases de données (1000 génomes, Exome Aggregation Consortium (ExAC), Exome Variant Server (EVS)) et dans la cohorte de Necker, leur localisation dans les régions introniques ou UTR, la prédiction de leur pathogénicité (par les logiciels SIFT/Polyphen)...

A l'hôpital Necker, la stratégie d'analyse des patients adressés pour un diagnostic génétique repose sur le phénotype clinique. Les patients présentant une NPH juvénile susceptible d'être causée par une délétion du gène *NPHP1* sont tout d'abord testés par la technique d'amplification quantitative, QMPSF (quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments) qui permet la détection des grands remaniements géniques à l'état homozygote ou hétérozygote. Chez les patients présentant une atteinte rénale (+/- atteinte hépatique) associée à une protéinurie et/ou une pression artérielle élevée et originaires d'Afrique du nord ou d'Espagne, la mutation tronquante p.Pro209Leu est recherchée par séquençage

classique de l'exon 6 du gène *TTC21B*. Lorsque le tableau clinique présente des signes de ciliopathies et qu'aucun événement mutationnel n'a été détecté dans les gènes *NPHP1* ou *TTC21B*, une analyse « ciliome » est proposée.

Ainsi, à partir d'une large cohorte de patients NPH (> 900 familles) recueillie à travers un réseau clinique multicentrique, cette approche a permis au laboratoire d'identifier les mutations responsables dans environ 53% des cas de NPH isolée ou syndromique. De plus, il a participé à l'identification des mutations récessives dans 14 des 20 gènes *NPHP* connus à ce jour (Saunier et al. 1997; Mollet et al. 2002; Edgar A. Otto et al. 2003; Delous et al. 2007; E. A. Otto et al. 2009), dont 10 grâce aux stratégies innovantes de séquençage d'exome total ou ciblé (« ciliome » ; Edgar A. Otto et al. 2010; Davis et al. 2011; Bredrup et al. 2011; Chaki et al. 2012; Perrault et al. 2012; Hoff et al. 2013, 201; Schueler et al. 2015).

La validation des variations et les études fonctionnelles

Les mutations des gènes étant, la plupart du temps, des mutations faux-sens avec parfois un score de prédiction de pathogénicité faible, il peut être difficile d'évaluer leur effet causal et de rendre un diagnostic. Par ailleurs, la variabilité des phénotypes peut dépendre de l'impact des mutations sur la fonction de la protéine, du profil d'expression du gène muté et de la charge mutationnelle de l'ensemble des gènes ciliaires (Zaghloul et Katsanis 2009). De plus, dans de très nombreux cas, les variations identifiées dans les gènes ne permettent pas, à elles seules, d'expliquer la pathologie des patients ; cela laisse penser que les manifestations cliniques seraient causées par l'association de variations de plusieurs gènes différents. Cette complexité doit être mise en perspective avec la diversité des cils, qui porte aussi bien sur leur structure que leur composition moléculaire et donc leur fonction. Cela nécessite alors la réalisation d'études fonctionnelles visant à valider l'effet pathogène des variations identifiées dans des modèles cellulaires et/ou animaux.

Les tissus de patients sont des outils indispensables à l'étude de leurs mutations puisqu'ils les expriment intrinsèquement. Hormis les biopsies des patients qui permettent de réaliser des coupes histologiques observables en microscopie (lumière blanche, immunohistochimie, microscopie électronique) et indispensables pour établir le diagnostic clinique, il est également possible d'utiliser les cellules de patients (fibroblastes cutanés, cellules

multiciliées de l'épithélium nasal) pour étudier l'implication des mutations au niveau moléculaires. Les modèles cellulaires ciliées (RPE1, IMCD3, MCDK) invalidés de façon constitutive ou conditionnelle pour les gènes d'intérêt et réexprimant les formes mutées sont aussi d'une grande aide pour étudier l'effet des mutations sur la structure, la formation et la fonction ciliaire.

L'utilisation d'organismes modèles est aussi cruciale pour élucider les mécanismes subtils sous-jacents à chaque pathologie. Les cils et flagelles présentent un degré de conservation élevé au cours de l'évolution, au niveau structural et moléculaire. Cela permet de recourir à de nombreux organismes modèles. De nombreuses découvertes majeures proviennent ainsi d'organismes simples, comme le nématode *C. elegans*, l'algue unicellulaire *Chlamydomonas*, les ciliés *Paramecium* et *Tetrahymena*, ou le kinétoplastidé *Trypanosoma*. La souris, le poisson zèbre et le xénope constituent aussi des modèles très intéressants pour étudier le cil et les ciliopathies chez les vertébrés.

Le modèle d'expérimentation choisi par le laboratoire est le poisson zèbre car il présente de nombreux avantages. L'embryon de poisson se développe rapidement, à l'extérieur de l'organisme maternel, et possède de nombreux organes ciliés aux stades précoces de l'embryogénèse. De plus, le fait qu'il soit transparent facilite l'observation des cils et leur mouvement. Enfin, le rein fonctionnel de l'embryon de poisson zèbre, appelé pronephros, est similaire au rein en développement des mammifères. Il est constitué d'un glomérule d'où partent deux tubes qui longent tout le corps de l'animal jusqu'au cloaque. Le pronephros est constitué de cellules multiciliées et de cellules mono-ciliées (Y. Liu et al. 2007; Ma et Jiang 2007), les deux types de cils disposant d'une structure 9+2. Bien que l'axonème des cils du pronephros du poisson n'ont pas la même structure que ceux de l'épithélium rénal des mammifères, des défauts ciliaires entraînent aussi la formation de kystes (Drummond 2003).

L'extinction du gène d'intérêt dans le poisson zèbre est possible grâce à l'injection d'ARN interférant (morpholino) ce qui permet de caractériser rapidement les fonctions de ce gène *in vivo* et d'éclairer les mécanismes liés à la pathogénèse des ciliopathies. Ensuite, il est possible de compléter les morphants avec la version humaine du gène pour étudier les conséquences fonctionnelles des variations identifiées chez les patients.

Les modèles animaux comme le poisson zèbre ont également permis de manipuler le génome *in situ* et insérer des mutations, des séquences nucléotidiques ou bien des délétions. Le système CRISPR/Cas9 consiste à injecter simultanément un guide d'ARN (sgRNA) et une nucléase Cas9 dans les embryons de poisson au stade une cellule. Le sgRNA est une séquence d'une vingtaine de nucléotides complémentaire à la séquence d'ADN cible. Son interaction avec l'ADN permet à la Cas9 d'introduire des cassures double-brin au niveau de la région d'intérêt. Les lignées de poissons fondateurs générées grâce au CRISPR sont croisées avec des poissons portant le gène sauvage puis les poissons portant la mutation du gène cible sont sélectionnés afin d'étudier leur phénotype (Auer et Del Bene 2014 ; revu dans Boettcher et McManus, 2015).

Les variations identifiées grâce au « ciliome » ainsi que le développement de modèles d'inactivation de gènes *in vitro* et *in vivo* ont déjà permis d'appréhender la pathogénicité de mutations hypomorphes identifiées chez les patients. Poursuivre nos efforts est crucial pour poser un diagnostic génétique chez les patients dont le gène muté n'a pas encore été identifié, pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques des ciliopathies associées et enfin, pour la mise en place de nouvelles thérapeutiques.

RESULTATS

PARTIE I : Le gène CEP83 est muté chez des patients atteints de néphronoptose infantile et de retard mental.

Résumé

Dix-sept gènes ont déjà été associés à la néphronoptose (NPH). La plupart code des protéines localisées au niveau des cils primaires et/ou du corps basal confirmant le rôle crucial du cil dans la physiopathologie de cette maladie. Toutefois, malgré la découverte de ces nombreux gènes, la cause génétique de la maladie n'a été identifiée que chez la moitié des patients. Afin d'identifier de nouveaux gènes de NPH, l'équipe de Sophie Saunier a mis au point le séquençage ciblé des exons de 1221 gènes codant pour des protéines ou des familles de protéines jouant un rôle direct ou indirect au cil primaire et qui a déjà permis la découverte de mutations dans de nouveaux gènes de NPH.

L'approche du « ciliome » a également mis en évidence des mutations dans un nouveau gène candidat, *CEP83*, chez 12 individus atteints de NPH infantile. Les résultats que nous avons obtenus ont démontré que les cellules de patients présentaient des défauts de ciliogenèse probablement dus aux anomalies d'assemblage des appendices distaux causées par les mutations identifiées qui perturberaient l'ancrage du corps basal à la membrane. L'identification de ces mutations dans *CEP83* a ainsi permis d'impliquer un second constituant des appendices distaux dans la physiopathologie des formes infantiles de NPH, après *CEP164/NPHP15*, et ainsi d'ajouter un 18^{ème} gène à la liste des causes génétiques de NPH (*NPHP18*).

ARTICLE 1

Mutations of CEP83 cause infantile nephronophthisis and intellectual disability

Failler M, Gee HY, Krug P, Joo K, Halbritter J, Belkacem L, Filhol E, Porath JD, Braun DA, Schueler M, Frigo A, Alibeu O, Masson C, Brochard K, Hurault de Ligny B, Novo R, Pietrement C, Kayserili H, Salomon R, Gubler MC, Otto EA, Antignac C, Kim J, Benmerah A, Hildebrandt F, Saunier S. *Am J Hum Genet.* 2014 Jun 5;94(6):905-14.

Au cours de ce travail, j'ai réalisé les études dans les cellules et les tissus de patients (Figures 3, 5 et supplémentaires) et contribué à l'analyse des cellules surexprimant les plasmides mutés (Figures 4 et S6).

Mutations of *CEP83* Cause Infantile Nephronophthisis and Intellectual Disability

Marion Failler,^{1,2,16} Heon Yung Gee,^{3,16} Pauline Krug,^{1,2,4} Kwangsic Joo,⁵ Jan Halbritter,³ Lilya Belkacem,^{1,2} Emilie Filhol,^{1,2} Jonathan D. Porath,³ Daniela A. Braun,³ Markus Schueler,³ Amandine Frigo,^{1,2} Olivier Alibeu,⁶ Cécile Masson,² Karine Brochard,⁷ Bruno Hurault de Ligny,⁸ Robert Novo,⁹ Christine Pietrement,¹⁰ Hulya Kayserili,¹¹ Rémi Salomon,^{1,4,12} Marie-Claire Gubler,^{1,2,4} Edgar A. Otto,¹³ Corinne Antignac,^{1,2,14} Joon Kim,⁵ Alexandre Benmerah,^{1,2} Friedhelm Hildebrandt,^{3,15,17,*} and Sophie Saunier^{1,2,17,*}

Ciliopathies are a group of hereditary disorders associated with defects in cilia structure and function. The distal appendages (DAPs) of centrioles are involved in the docking and anchoring of the mother centriole to the cellular membrane during ciliogenesis. The molecular composition of DAPs was recently elucidated and mutations in two genes encoding DAPs components (*CEP164/NPHP15*, *SCLT1*) have been associated with human ciliopathies, namely nephronophthisis and orofacioidigital syndrome. To identify additional DAP components defective in ciliopathies, we independently performed targeted exon sequencing of 1,221 genes associated with cilia and 5 known DAP protein-encoding genes in 1,255 individuals with a nephronophthisis-related ciliopathy. We thereby detected biallelic mutations in a key component of DAP-encoding gene, *CEP83*, in seven families. All affected individuals had early-onset nephronophthisis and four out of eight displayed learning disability and/or hydrocephalus. Fibroblasts and tubular renal cells from affected individuals showed an altered DAP composition and ciliary defects. In summary, we have identified mutations in *CEP83*, another DAP-component-encoding gene, as a cause of infantile nephronophthisis associated with central nervous system abnormalities in half of the individuals.

Nephronophthisis (MIM 256100) is the most frequent genetic cause of chronic renal failure in children. It is an autosomal-recessive chronic tubulointerstitial nephritis that generally progresses to end-stage renal disease (ESRD) in childhood. With regards to the age of onset of ESRD, three clinical presentations have been described: (1) the infantile form, with ESRD appearing before 5 years, (2) the juvenile form (mean age of onset 13 years), and (3) the young adult form. These different forms share histological features characterized by the development of massive interstitial fibrosis with abnormal thickness of the tubular basement membranes and at the later stage formation of cysts mainly distributed at the cortico-medullary junction. Infantile nephronophthisis is generally characterized by hyperechogenic kidneys with variable kidney sizes.¹ Some affected individuals with nephronophthisis also present with extrarenal symptoms: retinitis pigmentosa, intellectual disability, cerebellar ataxia, bone anomalies, or liver fibrosis, defining syndromes referred as nephronophthisis-related ciliopathies (NPHP-RCs).²

Ciliopathies are clinically and genetically heterogeneous disorders associated with dysfunction of cilia, either pri-

mary and/or motile cilia (primary ciliary dyskinesia [MIM 244400]). Primary cilia, sensory generally nonmotile cilia, are present on most cells in vertebrates and control key signaling pathways during development and tissue homeostasis.^{2,3} In total, more than 17 genes have been associated with the NPHP-RCs and causative mutations in these genes account for approximately 30%–50% of the NPHP-RC cases.^{4,5} Almost all these genes encode for proteins localized to the proximal region of the primary cilium either at the transition zone (including *NPHP1* [MIM 607100], *NPHP4* [MIM 6007215], and *RPGRIP1L/NPHP8* [MIM 610937]) or at the inversin compartment (*INVS/NPHP2* [MIM 243305], *NPHP3* [MIM 608002], *NEK8/NPHP9* [MIM 609799], and *ANKS6/NPHP16* [MIM 615370]) where they are implicated in key cilia-dependent signaling pathways.^{2,4} Notably, mutations in *INVS/NPHP2*, *NPHP3*, and *NEK8/NPHP9* have been associated with infantile nephronophthisis.^{6–8} More recently, our group and others have shown that mutations in genes encoding intraflagellar transport (IFT)-A as well as in some IFT-B subunits and IFT motors result in isolated nephronophthisis as well as in skeletal ciliopathies.^{2,4,5,9–11} The IFT machinery

¹INSERM, UMR 1163, Laboratory of Inherited Kidney Diseases, 75015 Paris, France; ²Paris Descartes - Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, 75015 Paris, France; ³Division of Nephrology, Department of Medicine, Boston Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA; ⁴Department of Pediatric Nephrology, Necker Hospital, AP-HP, 75015 Paris, France; ⁵Graduate School of Medical Science and Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon 305-701, Korea; ⁶Genomic Core Facility, Imagine Institute, 75015 Paris, France; ⁷Department of Pediatrics, Toulouse Hospital, 31400 Toulouse, France; ⁸Department of Nephrology, Clemenceau Hospital, 14033 Caen, France; ⁹Department of Pediatric Nephrology, Jeanne de Flandre Hospital, 59037 Lille, France; ¹⁰Department of Pediatrics, American Memorial Hospital, 51092 Reims, France; ¹¹Medical Genetics Department, Istanbul Medical Faculty, Istanbul University 34093 Istanbul, Turkey; ¹²AP-HP, Centre de Référence des Maladies Rénales Héritaires de l'Enfant et de l'Adulte (MARHEA), Necker Hospital, 75015 Paris, France; ¹³Department of Pediatrics and Communicable Diseases, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48019, USA; ¹⁴AP-HP, Genetic Department, Necker Hospital, 75015 Paris, France; ¹⁵Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, MD 20815, USA

¹⁶These authors contributed equally to this work

¹⁷These authors contributed equally to this work

*Correspondence: friedhelm.hildebrandt@childrens.harvard.edu (F.H.), sophie.saunier@inserm.fr (S.S.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.05.002>. ©2014 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.

mediates the transport of the ciliary components into the cilium and along the axoneme.¹²

Ciliogenesis starts with the docking of the basal body to the plasma membrane. This process is mediated by structures present at the mother centriole called distal appendages (DAPs). The DAPs are projected radially from the distal end of the mother centriole and dock onto the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane where they form the transition fibers.¹³ The transition fibers together with the adjacent transition zone are thought to constitute a molecular filter limiting the exchanges between the ciliary compartment and the cytoplasm.¹⁴ The molecular composition of DAPs was recently characterized and their function in ciliogenesis has been partially elucidated (see below).^{15–18} Mutations in genes encoding DAP components have been associated with NPHP-RC, including *CEP164/NPHP15* (MIM 614848) in Joubert syndrome¹⁹ (MIM 613820) and more recently *SCLT1* (MIM 611399) in one individual with a severe ciliopathy phenotype consistent with orofacioidigital syndrome type IX (MIM 258865).²⁰

In order to identify additional genes mutated in ciliopathies, we performed two independent NGS approaches on a large cohort of affected individuals. First, we analyzed a cohort of 200 individuals with NPHP-RCs by applying exon-enriched NGS targeting up to 1,221 genes associated with cilia including all known genes associated with ciliopathies (“ciliome sequencing”)^{9,21,22} and consecutive barcoded NGS on a *Solid5500* (Life tech) or *HiSeq 2500* (Illumina) platform. Written informed consent was obtained from all individuals enrolled in this study and/or from parents and approved by the Comité de Protection des Personnes pour la Recherche Biomédicale Ile de France II. Compound heterozygous mutations in *CEP83* (*CCDC41*) were identified in three unrelated individuals with NPHP-RC (Table 1, Figure 1, and Figure S1 available online). All three affected individuals (NPH2036, NPH1402, and NPH1412-II1) presented with a severe renal involvement progressing to ESRD before the age of 5 years. We subsequently screened 19 unrelated individuals with early-onset nephronophthisis for *CEP83* mutations in the coding exons by Sanger sequencing. Recessive mutations were identified in two additional unrelated persons, individuals NPH982 and NPH1018 (Table 1, Figures 1 and S1). Segregation of the identified mutations was confirmed whenever the parental DNA was available (Figure S1). Notably, individual NPH1412-III1 carried the same mutations as his brother, NPH1412-II2, who presents a similar phenotype (Table 1 and Figure S1). In parallel, we screened a worldwide cohort of 1,056 individuals with NPHP-RCs by exon sequencing of DAP components (*CEP89* [*CCDC123/CEP123*, MIM 615470], *CEP83*, *SCLT1*, and *FBF1*) by a high-throughput barcoded NGS technique.²³ Written informed consent was obtained from all individuals enrolled in this study and approved by the institutional review boards at the University of Michigan and the Boston Children’s Hospital. Two homozygous mutations in *CEP83* were identified in two unrelated persons with

early-onset nephronophthisis, individuals F374-21 and A4037-21 (Table 1, Figures 1 and S1). In these two families, the 17 genes already known to be associated with NPHP-RC were screened in order to exclude another genetic cause but no explanatory mutations were detected.

In total, we identified ten different biallelic mutations in *CEP83* in eight individuals with isolated (three individuals) or syndromic (five individuals) nephronophthisis. The affected individuals reached ESRD at 1 to 4 years of age (mean age of 3). Severe tubulointerstitial lesions were present in all individuals (Figure 2). Similar to what we previously reported for *INVS/NPHP2* and *NPHP3* mutations,⁸ two types of nephrohistological alterations were found in individuals with *CEP83* mutations: (1) in three individuals (NPH1412, A4037-21, and NPH982), microcystic tubular dilations were prominent and associated with tubular atrophy and interstitial fibrosis and (2) in two individuals (NPH2036 and NPH982), atrophic tubules with thickening of the basement membranes and massive interstitial fibrosis were observed. Moreover, high blood pressure was present in two individuals (Table 1) as already described in the early onset of the kidney disease.⁸ Four affected persons (NPH1402, NPH2036, A4037-21, NPH1018) presented with neurological alterations, including speech delay, intellectual disability, and/or hydrocephalus supported by cerebral MRI in combination with ophthalmologic defects, strabismus and retinal degeneration, in two individuals (NPH2036 and NPH1018, respectively). Two individuals presented with liver alterations, hepatic cytolysis and cholestasis (NPH2036) and severe portal septal fibrosis with mild thickening of arterial walls and increase in the number of the biliary canalicules on liver biopsy (NPH982). Moreover, individual A4037-21 exhibited a more severe phenotype with ESRD at 1 year of age, hydrocephalus, intellectual disability, facial dysmorphism, and heart anomaly complicated by triple X syndrome (47, XXX), which could not explain this clinical association (Table 1, Figures 1 and S1).

Three affected individuals carried homozygous mutations of *CEP83* (RefSeq accession number NM_016122.2): one missense mutation (c.260T>C [p.Leu87Pro]), one in-frame deletion (c.2050_2052del [p.Glu684del]), and one frameshift mutation in the last exon (c.2007del [p.Glu669Aspfs*14]) leading to a truncated protein (Table 1, Figures 1 and S1). Four families carried compound heterozygous mutations of *CEP83*: one truncating mutation (c.121C>T [p.Arg41*]; c.241C>T [p.Gln81*]; c.625C>T [p.Arg209*]; c.1530C>A [p.Cys510*]) in *trans* with a missense mutation (c.1532G>C [p.Arg511Pro]) or an in-frame deletion (c.335_352del [p.Pro112_Leu117del]; c.2075_2077del [p.Gln692del]). All the mutated or deleted amino acids are evolutionarily highly conserved and amino acid changes are predicted to be damaging (Figure 1D, Table 1). Almost all individuals carried at least one missense mutation or an in-frame deletion resulting in loss of one or a few amino acids, indicating that the function of the protein may be partially preserved (Figure 1,

Table 1. Genetic and Clinical Characteristics of Individuals with CEP83 Mutations

Individual(s)	Ethnic Origin	Parental Consanguinity	Nucleotide Alteration(s) ^a	Deduced Protein Change	Exon (Zygosity, Segregation)	AA Conservation	PolyPhen2, Mut.taster	Nephronophthisis Age of ESRD	Additional Clinical Features
NPH2036-III	European (France)	no	c.121C>T c.335_352del	p.Arg41* p.Pro112_Leu117del	3 (Het, p) 5 (Het, m)	NA NA	NA NA	3 years	mild intellectual disability, strabismus, hepatic cytolysis, cholestasis
NPH1402	European (France)	no	c.241C>T c.2075_2077del	p.Gln81* p.Gln692del	4 (Het, m) 17 (Het, p)	NA NA	NA NA	4.5 years	speech delay, hydrocephalus
F374-21	European	no	c.260T>C	p.Leu87Pro	4 (Hom)	<i>D. rerio</i> (except <i>Xenopus</i>)	D(0.944), DC(0.99)	ND	ND
NPH1018	European (France)	no	c.625C>T c.1532G>C	p.Arg209* p.Arg511Pro	7 (Het) 13 (Het)	NA <i>G. gallus</i>	NA D(0.915), DC(0.941)	4 years	intellectual disability, retinitis
NPH1412-III, -II2	European (Poland/France)	no	c.1530C>A c.1532G>C	p.Cys510* p.Arg511Pro	13 (Het, m) 13 (Het, p)	NA <i>G. gallus</i>	NA D(0.915), DC(0.941)	3 years	high blood pressure
NPH982	Turkish	yes	c.2050_2052del	p.Glu684del	17 (Hom)	<i>D. rerio</i> ^b	NA	3 years	high blood pressure, hepatic fibrosis
A4037-21	Latino	no	c.2007del	p.Glu669Aspfs*14	17 (Hom)	NA	NA, DC(1.00)	1 year	hydrocephalus, intellectual disability, dysmorphism, triple X syndrome (47, XXX), heart anomaly

Abbreviations are as follows: D, predicted "Damaging;" DC, predicted "Disease causing;" Het, heterozygous; Hom, homozygous; m, maternal; NA, not applicable; ND, no data; NPH, nephronophthisis; p, paternal.

^acDNA mutations are numbered according to human cDNA reference sequence NM_016122.2 (CEP83), where +1 corresponds to the A of ATG start translation codon.

^bthis residue (Glu at 684) is conserved down to *D. rerio* except *G. gallus* and *X. tropicalis*, which have Asp instead.

A CEP83

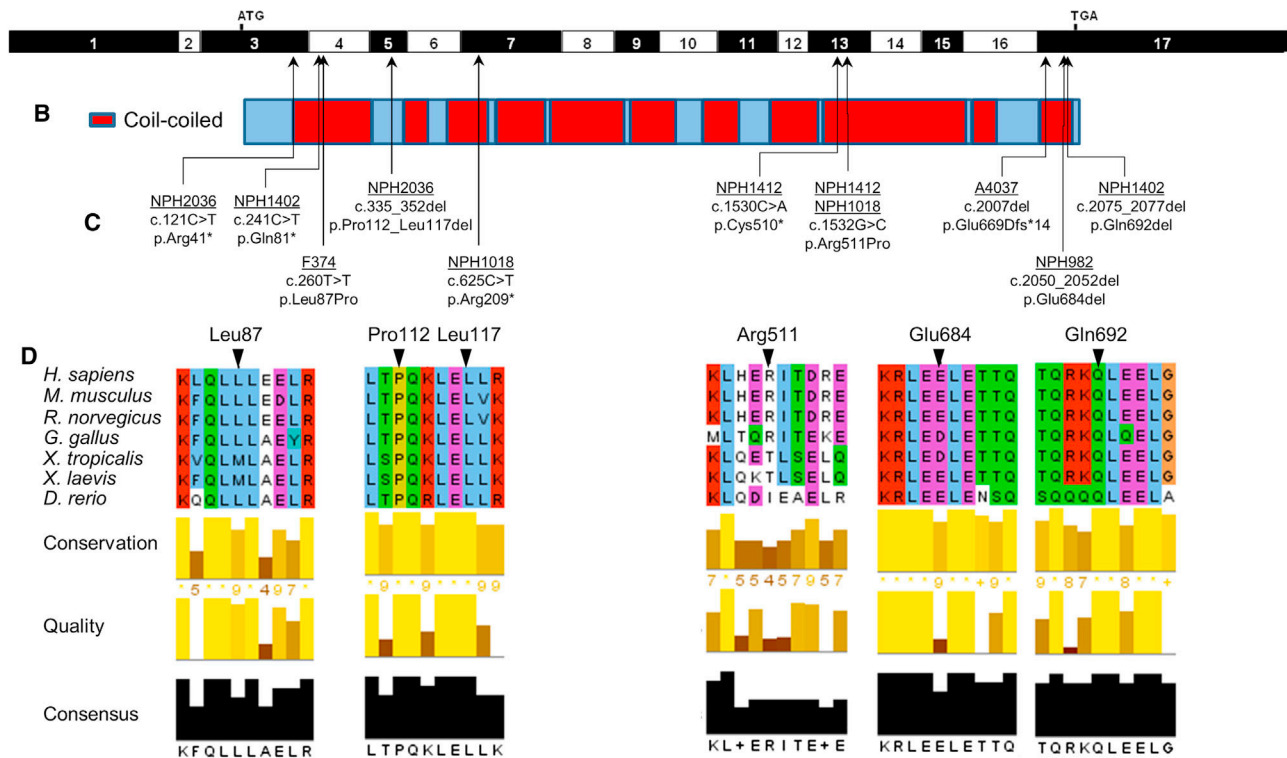


Figure 1. Identification of Ten Different CEP83 Mutations in Seven Families with NPHP-RC

(A) Exon structure of human CEP83 cDNA (RefSeq NM_016122.2). Positions of start codon (ATG) and of stop codon (TGA) are indicated in exons 3 and 17, respectively.

(B) Domain structure of the respective protein. CEP83 contains multiple coiled-coil (red) domains.

(C) Ten homozygous or compound-heterozygous CEP83 mutations. For the mutations detected, black arrows indicate positions in relation to exons and protein domains. Except for the c.335_352del mutation, all mutations concern amino acids found in coiled-coil domains, mostly in the N-terminal and C-terminal parts of the protein. Family numbers are underlined and predicted translational changes are indicated. Affected individuals had at least one missense mutation and a deletion.

(D) Partial protein alignment of CEP83 shows evolutionary conservation of the amino acids affected by the identified mutations (p.Leu87Pro, p.Pro112_Leu117del, p.Arg511Pro, p.Glu684del, and p.Gln692del).

Table 1). Notably, only the individual A4037-21 carrying a homozygous frameshift mutation leading to a truncated protein exhibited a more severe phenotype of multiple organ involvement (Table 1, Figures 1 and S1).

CEP83 encodes Centrosomal Protein 83 kDa, CEP83, a 701-residue protein predicted to be mainly composed of coiled-coil domains (Figure 1B, red). Most of the mutations result in amino acid alteration in coiled-coil domains except for the p.Pro112_Leu117del variant (Figures 1B and 1C) and substitutions in highly conserved residues (Figure 1D). Deletion of a single amino acid (p.Glu684del and p.Gln692del) or the introduction of a proline residue (p.Leu87Pro and p.Arg511Pro) are predicted to affect the organization of coiled-coil domains through the modification of canonical repetition of hydrophobic amino acids along the alpha helix (Figure 1D).

CEP83 has been recently characterized as a key component of DAPs^{16,17} and is required for the recruitment of the other components, including its partner CEP164/NPHP15, to the mother centriole.^{16,17} As previously shown for CEP164,^{15,24} depletion of CEP83 affects early steps of ciliogenesis by preventing docking of the mother centriole

to the primary ciliary vesicle (Figure S2).^{16,17} In retinal pigment epithelial (RPE1) cells, CEP83 colocalizes with CEP164 at DAPs^{16,17} and is also found at the Golgi apparatus.¹⁷ We observed a similar distribution in primary human skin fibroblasts of healthy controls by using a CEP83 antibody, with a predominant staining of one of the two centrioles (Figure 3A, insets, arrows). As previously shown in other cell types,^{15,19} CEP164 showed a centriolar ring-shaped distribution (Figure 3B, insets, arrows) and was also present in the nucleus.

To evaluate the impact of the identified mutations on the subcellular distribution of CEP83 and their functional consequences on DAP biogenesis, the localizations of CEP83 and CEP164 were analyzed in primary skin fibroblasts from two affected individuals (NPH1402 and NPH1412). Notably, both children carried compound heterozygous CEP83 mutations resulting in truncated protein (p.Gln81* and p.Cys510*) in association with an in-frame deletion or a missense (p.Gln692del and p.Arg511Pro, respectively; Table 1 and Figure 1). Importantly, the resulting truncated proteins, if expressed, cannot be detected by the CEP83 antibody used in this

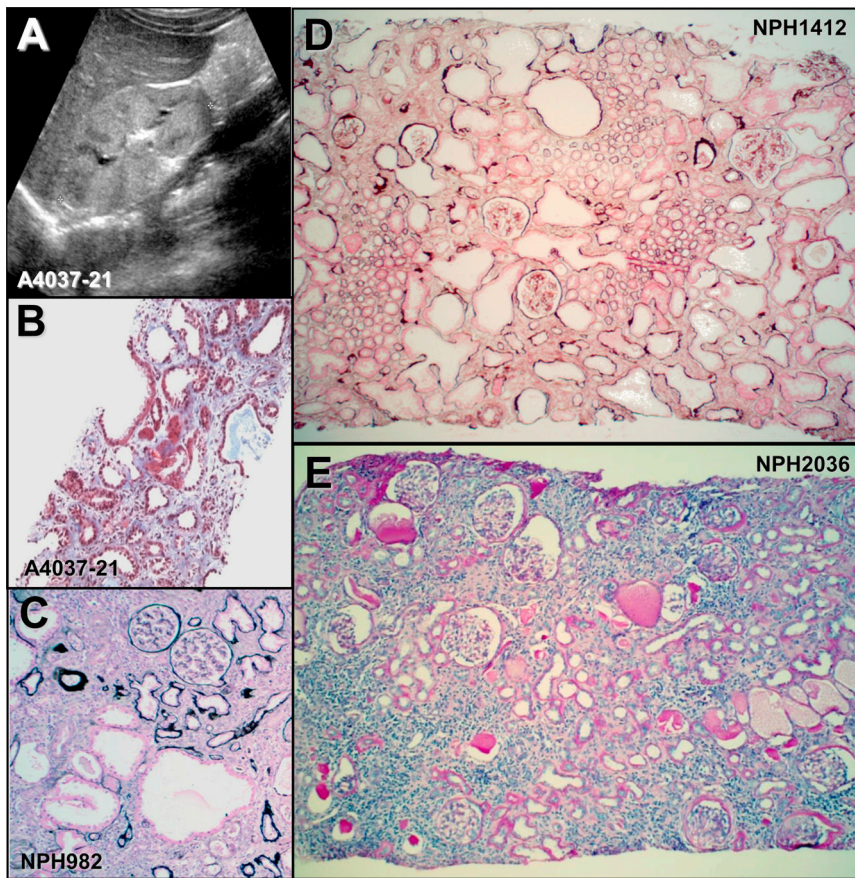


Figure 2. Sonographic and Histological Lesions in Individuals with *CEP83* Mutations

(A) Renal ultrasound of individual A4037-21 shows corticomedullary cysts and increased echogenicity.

(B–E) Renal biopsy findings in individuals A4037-21 (B), NPH982 (C), NPH1412 (D), and NPH2036 (E).

(B) Tubular dilatations are associated with diffuse interstitial fibrosis in individual A4037-21. Trichrome light green.

(C–E) Numerous glomeruli are preserved and others show a retracted glomerular tuft surrounded by a thickened capsular basement membrane.

(C) Microcystic tubular dilatations are associated with foci of tubular atrophy and interstitial fibrosis in individual NPH982.

(D) In individual NPH1412, most cortical tubules are dilated and surrounded by interstitial fibrosis.

(C and D) Silver impregnation.

(E) Diffuse tubular atrophy, massive interstitial fibrosis, and focal interstitial infiltration are associated in individual NPH2036. PAS.

study. Accordingly, CEP83 staining at the centrosome appeared fainter and dispersed around the centrioles in fibroblasts from affected individuals compared to control cells, as shown by CEP83 colabeling with centrin or γ -tubulin (Figure 3A, insets, arrows, and data not shown) and confirmed by quantification analysis (Figure 3A, graph). Remarkably, localization of CEP164 was severely altered in mutated cells with an incomplete ring-shaped centriolar distribution or even a loss of staining at the centrosome in some cells (Figures 3B, graph, and S3, arrows). The distribution of other markers, of DAPs (CEP89)¹⁸ or subdistal appendages (ODF2),^{16,25} did not appear to be affected by CEP83 variants (Figure S4, arrows). These results are in agreement with a partial impairment of DAP assembly in fibroblasts with CEP83 variants, sparing the overall organization of the mother centriole. This was further confirmed by high-resolution 3D fluorescence microscopy (structured illumination microscopy [SIM]; Figure 3C). Indeed, in affected individuals fibroblasts of the normal CEP164 ring-shaped organization appeared clearly defective according to this technique (Figure 3C, green), whereas ODF2 staining did not appear to be perturbed, instead presenting the typical ring-shaped organization (Figure 3C, red). Finally, immunoblotting in cells from affected individuals confirmed a reduced CEP83 level (Figure 3D), whereas CEP164 level was unchanged, indicating that CEP83 variations affect recruitment of

CEP164 at the centrosome without any change in its total protein level.

We further confirmed the effects of CEP83 mutations in kidney biopsies.

In control kidneys, CEP83 and

CEP164 localized at one of the two centrioles (Figures S5A and S5B, insets, arrows). In kidney biopsy from individual NPH2036, CEP83 staining appeared fainter at the centrosome (Figure S5C, arrows) and CEP164 was not even detected in some centrosomes (50.1% of CEP164-positive centrosomes versus 83.6% for control; Figure S5D). Altogether, these results on tissues and cells from affected individuals suggest that both decreased CEP83 level (truncated variants) and partial impairment of the variant proteins, induced by the presence of the missense or in-frame deletions, probably account for its inability to assemble properly at the mother centriole, as well as to recruit CEP164 at the distal part of the mother centriole.

We next investigated the consequences of amino acid alterations in CEP83 on its targeting to the centrosome as well as on its interactions with known partners in vitro. In transiently transfected RPE1 cells, FLAG-CEP83 wild-type (WT) was diffusely distributed in the cytoplasm and nucleus and was also present at the centrosome where it forms a typical ring-shaped structure (Figures 4A and S6A, insets). Interestingly, endogenous CEP164 staining at the centrosome was strongly decreased in cells transfected with FLAG-CEP83 WT compared to neighboring nontransfected cells (Figures 4A, 4C, and S6A), indicating that excess of CEP83 resulted in a dominant-negative effect on DAP biogenesis. Among

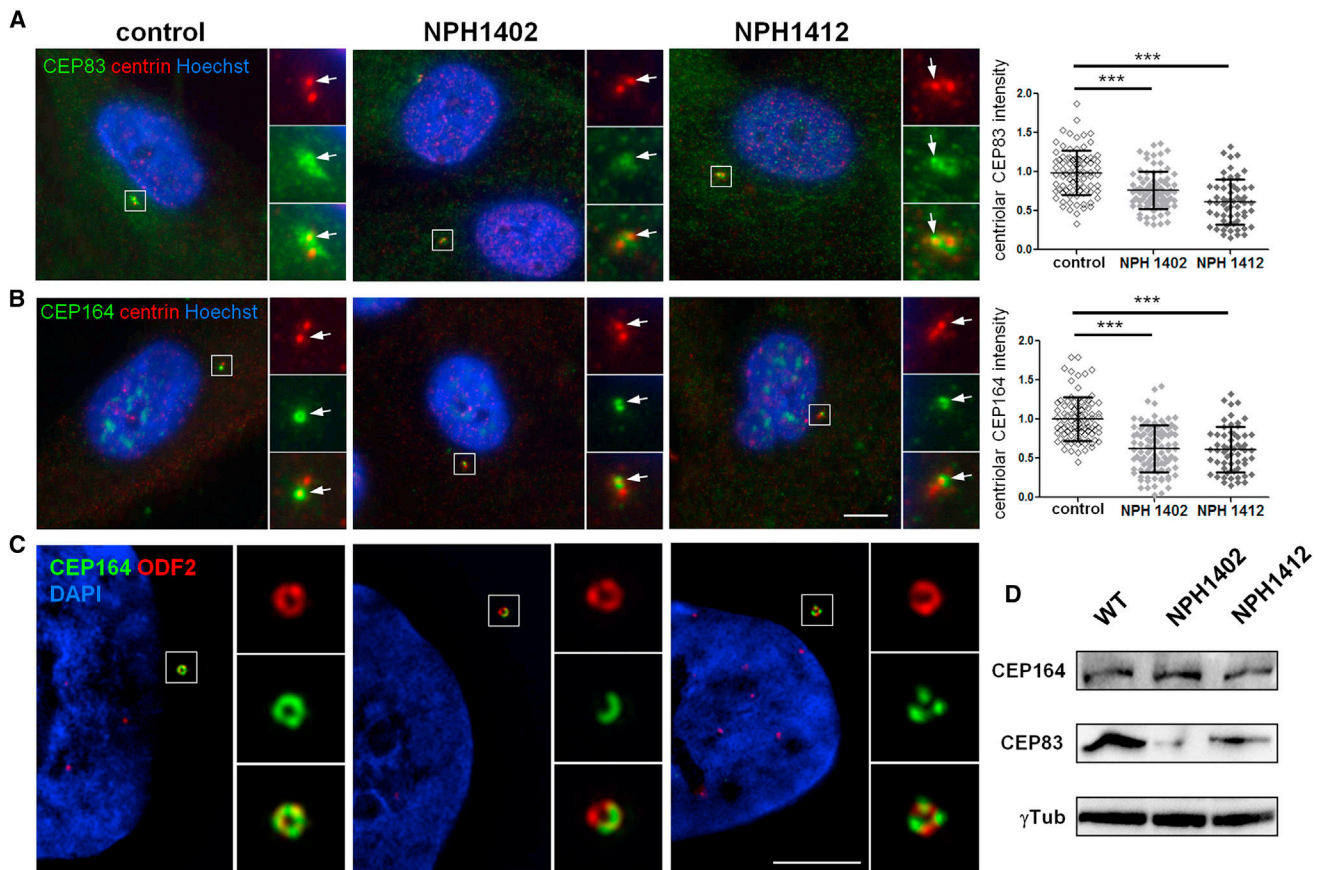
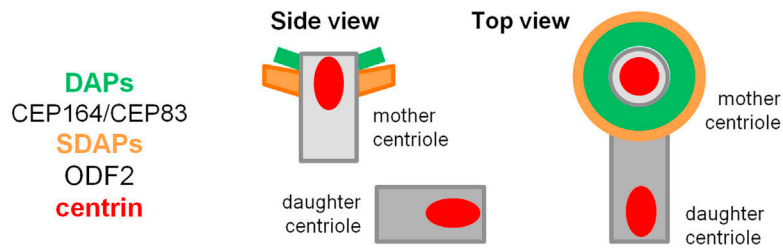


Figure 3. Individuals Carrying *CEP83* Mutations Show Abnormal DAP Organization

Top: Schematic representation of the structural organization of the centrosome where the localization of different markers of centriolar subdomains (distal [DAPs] and subdistal [SDAPs]) are stressed.

(A–C) Fibroblasts from control or affected individuals (NPH1402 and NPH1412) were processed for immunofluorescence with antibodies against centrin (A and B, red; mouse monoclonal [Millipore, 04-1624]) to stain centrioles and CEP83 (A, green; rabbit polyclonal [Sigma, HPA038161]) or CEP164 (B, green; rabbit polyclonal [Sigma, HPA037606]) or with antibodies against ODF2 (C, red; mouse monoclonal antibody [clone 1A1, Novus Biological]) to stain SDAPs and CEP164 (C, green). Insets on the right show higher magnification of representative centrosomes indicated by a white square in the corresponding images. Arrows indicate CEP83 or CEP164 staining. The intensity of CEP83 (A) and CEP164 (B) staining at the centrosome was quantified by ImageJ (normalized arbitrary units, one representative experiment out of three [*** $p < 0.0001$]), were calculated via Dunn's Multiple Comparison Test after the analysis of variance ANOVA test and shows a reduction in intensity of either CEP83 or CEP164 in affected individual cells compared to control.

(C) Samples were imaged with an n-SIM microscope (Nikon). Acquisitions were performed in 3D SIM mode, before image reconstruction with the NIS-Elements software (Nikon) based on Gustafsson et al.²⁹

Scale bars represent 5 μm .

(D) Cell lysates from fibroblasts were collected and protein levels of CEP83, CEP164, and γ -tubulin (mouse monoclonal [Sigma, T5326]) were analyzed by immunoblotting with indicated antibodies. CEP83 level is decreased in affected individuals fibroblasts compared to control and CEP164 level remains the same.

the variant forms of CEP83, p.Pro112_Leu117del, p.Arg511Pro, and p.Leu87Pro showed similar centrosomal localization and dominant-negative effects on CEP164 localization as WT protein (data not shown). In contrast, CEP83 p.Gln692del, p.Glu669Aspfs*14, and p.Glu684del

variants accumulated into the nucleus and failed to localize at the centrosome (Figures 4A, 4B, and S6B). CEP164 distribution was not perturbed in cells transfected with these variants compared to neighboring nontransfected cells (Figure 4A, arrows), thereby showing higher

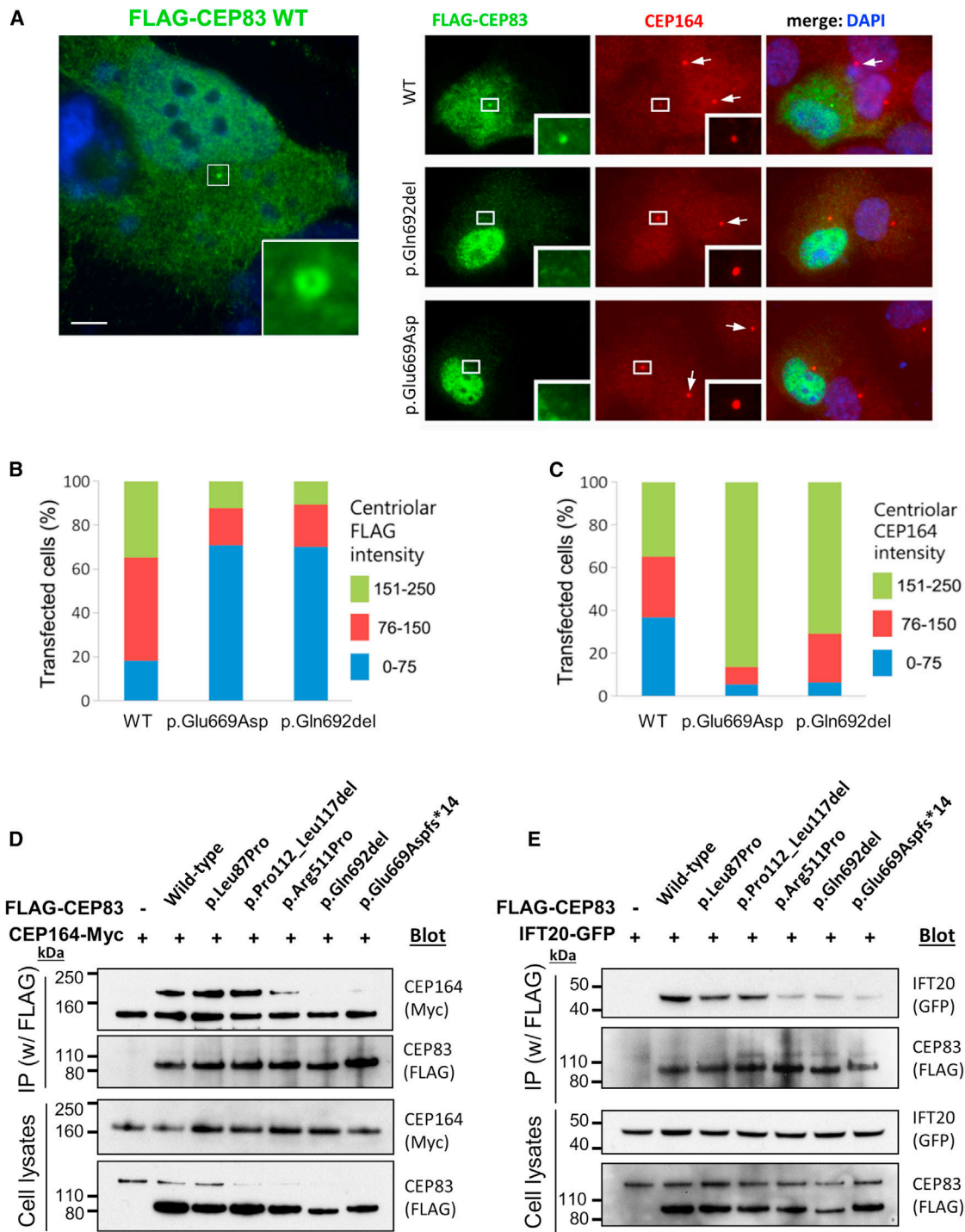


Figure 4. CEP83 Mutations Affect Centrosomal Localization and Interaction of CEP83 with CEP164

(A) RPE1 cells were transiently transfected (Lipofectamine LTX, Life Technologies) with plasmids encoding for FLAG-tagged wild-type (WT) or c.2007del (p.Glu669Aspfs*14) or c.2075_2077del (p.Gln692del) CEP83 variants, fixed, and stained for FLAG (green; mouse monoclonal [Sigma, F3165]) and CEP164 (red). Scale bar represents 5 μ m.

(B and C) Levels of CEP164 (C) and FLAG (CEP83, B) staining at the centrosome were quantified with ImageJ. Centriolar CEP164 intensity is decreased in cells transfected with CEP83 WT compared to cells transfected with CEP83 p.Glu669Aspfs*14 and p.Gln692del variants (arrows).

(D and E) NIH 3T3 cells were transiently cotransfected with plasmids encoding for FLAG-tagged WT and variant forms of CEP83, Cep164-myc, and IFT20-GFP. Cell lysates were immunoprecipitated with an anti-FLAG antibody (mouse monoclonal, Sigma, M2). Cell lysates (bottom) and immunoprecipitates (IP, top) were analyzed by immunoblotting with antibodies against myc (CEP164, rabbit polyclonal [Santa Cruz Biotechnology, C-19]), FLAG (CEP83, rabbit polyclonal [Cell Signaling Technology, #2368]), and GFP (IFT20, rabbit polyclonal [Life Technologies, A-6455]) as indicated. Note that three C-terminal CEP83 variants affected the interaction with CEP164 and IFT120, whereas two N-terminal CEP83 variants did not.

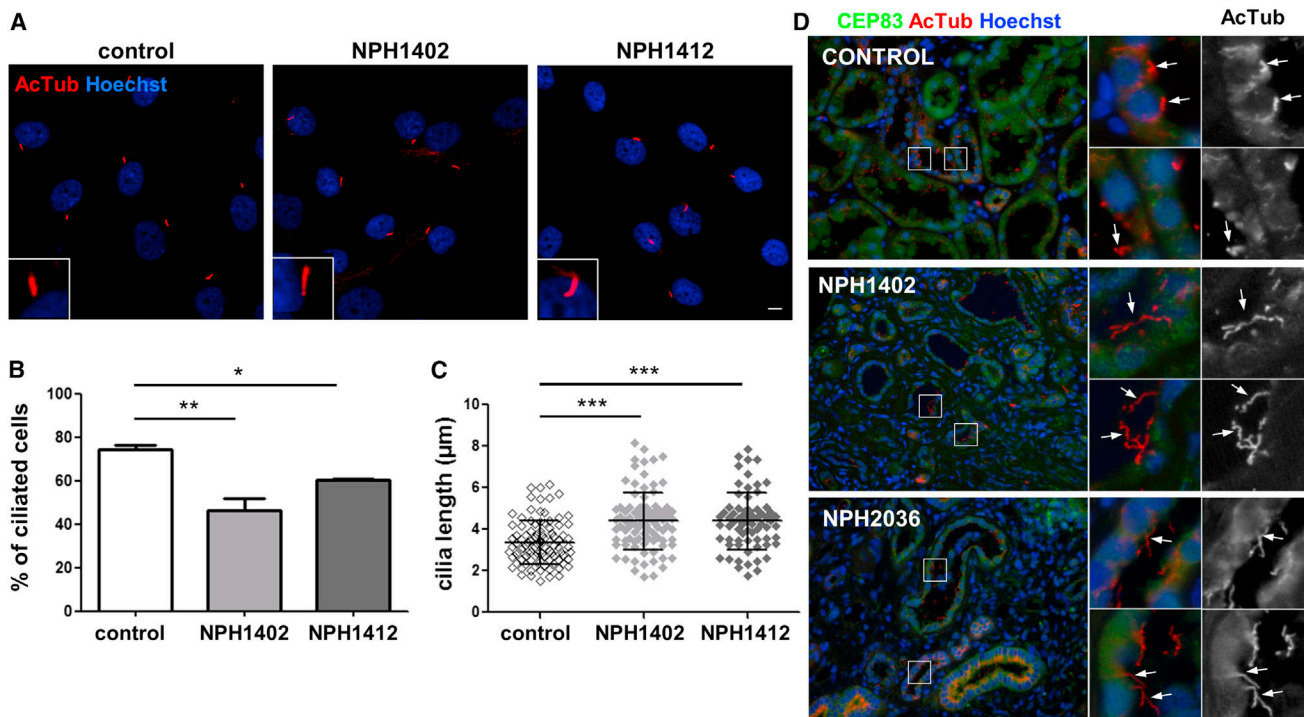


Figure 5. Fibroblasts from Individuals with *CEP83* Mutations Show Mild Ciliary Defects

(A) Fibroblasts from control and affected individuals (NPH1402 and NPH1412) were grown on coverslips, serum starved for 48 hr, then fixed and processed for immunofluorescence with antibodies against acetylated tubulin (AcTub, red) to stain cilia. Insets show higher magnification of representative cilia. Scale bar represents 5 μm .

(B) The ability of cells to form cilia, cells with a unique rod like AcTub staining, was quantified from images obtained in (A). Graphs show the mean \pm SEM of at least three independent experiments in which at least 100 cells were counted.

(C) The length of cilia was measured (μm) based on AcTub staining and the results for one representative experiment out of three are shown.

(B and C) * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, and *** $p < 0.0001$ were calculated via Dunn's Multiple Comparison Test after the analysis of variance ANOVA test. Ciliogenesis is reduced in fibroblasts of affected individuals which present longer cilia.

(D) Sections of kidney biopsies from control, NPH1402, and NPH2036 individuals were stained for CEP83 (green) and AcTub (red). Nuclei were stained with Hoechst (blue). Higher magnifications of representative tubules regions are shown on the right panels and cilia are indicated by white arrows. Cilia present in the lumen of tubules are longer in affected individuals biopsies compared to control.

CEP164 staining intensity at the centrosome compared to cells transfected with WT CEP83 (Figures 4A and 4C). These results indicate that these variants present a decreased affinity for the mother centriole and as a result do not show dominant-negative effects on DAP formation.

We next investigated the ability of CEP83 variants to interact with its binding partners CEP164 and IFT20¹⁷ in NIH 3T3 cells by coimmunoprecipitation. As shown in Figures 4D and 4E, CEP164-myc and IFT20-GFP were efficiently coimmunoprecipitated together with FLAG-CEP83 WT, showing that these three proteins form complexes. The C-terminal CEP83 variants (p.Arg511Pro, p.Glu669Aspfs*14, and p.Gln692del) were impaired in their ability to interact with CEP164, whereas proteins harboring p.Leu87Pro and p.Pro112_Leu117del were not (Figure 4D). Similarly, the interaction with IFT20 appeared to be decreased by C-terminal CEP83 variants although it was not affected by N-terminal CEP83 variant proteins (Figure 4E).

In summary, transfection of wild-type CEP83 results in a dominant-negative effect on the recruitment of endoge-

nous CEP164 onto the centrosome (Figures 4A–4C). It is likely that high level of exogenous CEP83 might somehow prevent the coordinated assembly of CEP164/DAPs onto the mother centriole by a mechanism that remains to be characterized. This dominant-negative effect is conserved for all variants that are efficiently recruited to the centrosome independently of their capacity to interact with CEP164 or IFT20 (p.Leu87Pro, p.Pro112_Leu117del, and p.Arg511Pro) (Figures 4D and 4E). In contrast, variants p.Gln692del, p.Glu669Aspfs*14, and p.Glu684del are affected for both centrosome localization and interactions with their partners CEP164 and IFT20, highlighting the important role of the last coiled-coil domain encoded by exon 17 of *CEP83* (summarized in Table S1).

As mentioned above, DAPs play a crucial role during ciliogenesis (Figure S2). We confirmed that CEP83 localizes at the base of both primary and motile cilia in vitro and in vivo (Figures S7 and S8). This is consistent with the ciliary dysfunction phenotype observed in affected individuals, associated primary cilia defects (nephronophthisis and retinal degeneration), and possibly motile cilia defects

as suggested by ventricular dilatation and hydrocephalus observed in some of the affected individuals (A4037-21) similar to those described for individuals with variations in *SDCCAG8/NPHP10*.²⁶ We therefore examined the ability of fibroblasts from affected individuals (NPH1402 and NPH1412) to form primary cilia. Upon serum starvation, ciliogenesis was mildly but statistically significantly affected in fibroblasts from affected individuals with the percentage of ciliated cells decreased compared to control fibroblasts (Figures 5A and 5B). The formed cilia presented no obvious change in the ciliary composition because localization of the ciliary components CEP290, ANKS6, IFT140, or ARL13B were not perturbed (Figure S9 and data not shown). However, cilia present in both fibroblasts (Figures 5C) of affected individuals were significantly longer compared to controls. This phenotype was also observed in kidney biopsies from affected individuals NPH1402 and NPH2036 (Figure 5D, right panels, arrows), similar to our observations in other NPHP-RC proteins.^{9,27}

Together, our results show that fibroblasts and tubular renal cells from affected individuals exhibit ciliogenesis defects probably resulting from an altered assembly of DAPs, which would affect docking of altered mother centriole to the ciliary primary vesicle (Figure S2). In addition, defects in IFT20 interaction by most of the variants probably contribute to ciliary defects because IFT20 was shown to participate in ciliogenesis through vesicular trafficking from the Golgi apparatus.²⁸

In summary, we have identified mutations in *CEP83* as causing early-onset nephronophthisis and intellectual disability, adding another component of the DAPs of centrioles to the list of defective proteins in NPHP-RC. We therefore propose “NPHP18” as an alias for CEP83.

Supplemental Data

Supplemental Data include nine figures and one table and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.05.002>.

Acknowledgments

The authors thank the families who contributed to this study. We thank Vivette D. D’Agati and Michael B. Stokes (Columbia University) for a kidney biopsy report and images, as well as Gérard Pivert (Pathology Department, Necker Hospital) for kidney biopsy. We are grateful to James Sillibourne for his kind gift of the CEP89 antibody. We also thank Patrick Nitschké and the bioinformatic Plateform (Université Paris Descartes, Institut Imagine) as well as Christine Bole-Feysot, Solenn Pruvost, and Mohammed Zarhrate for their support in exome sequencing and Ludovic Lecompte and Lucie Sengmanivong from the Nikon Imaging Centre at Institut Curie-CNRS (Paris, France) for the help with the n-SIM. This research was supported by a grant from the NIH to F.H. (DK068306). H.Y.G. is a Research Fellow of the American Society of Nephrology (ASN). F.H. is an Investigator of the Howard Hughes Medical Institute and Warren E. Grupe Professor of Pediatrics at

the Harvard Medical School. This work was supported by grants from the “Agence Nationale de la Recherche” (ANR) to S.S. (20100BLAN112202) and investments for the future program-ANR-10-IAHY-01 to S.S., the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM) to S.S. (DEQ20071210558) and to P.K. (DEA20120624188); M.F. is supported by a fellowship from the “Région ile de France, CORDDIM” (RPH12173KKA).

Received: March 2, 2014

Accepted: May 9, 2014

Published: May 29, 2014

Web Resources

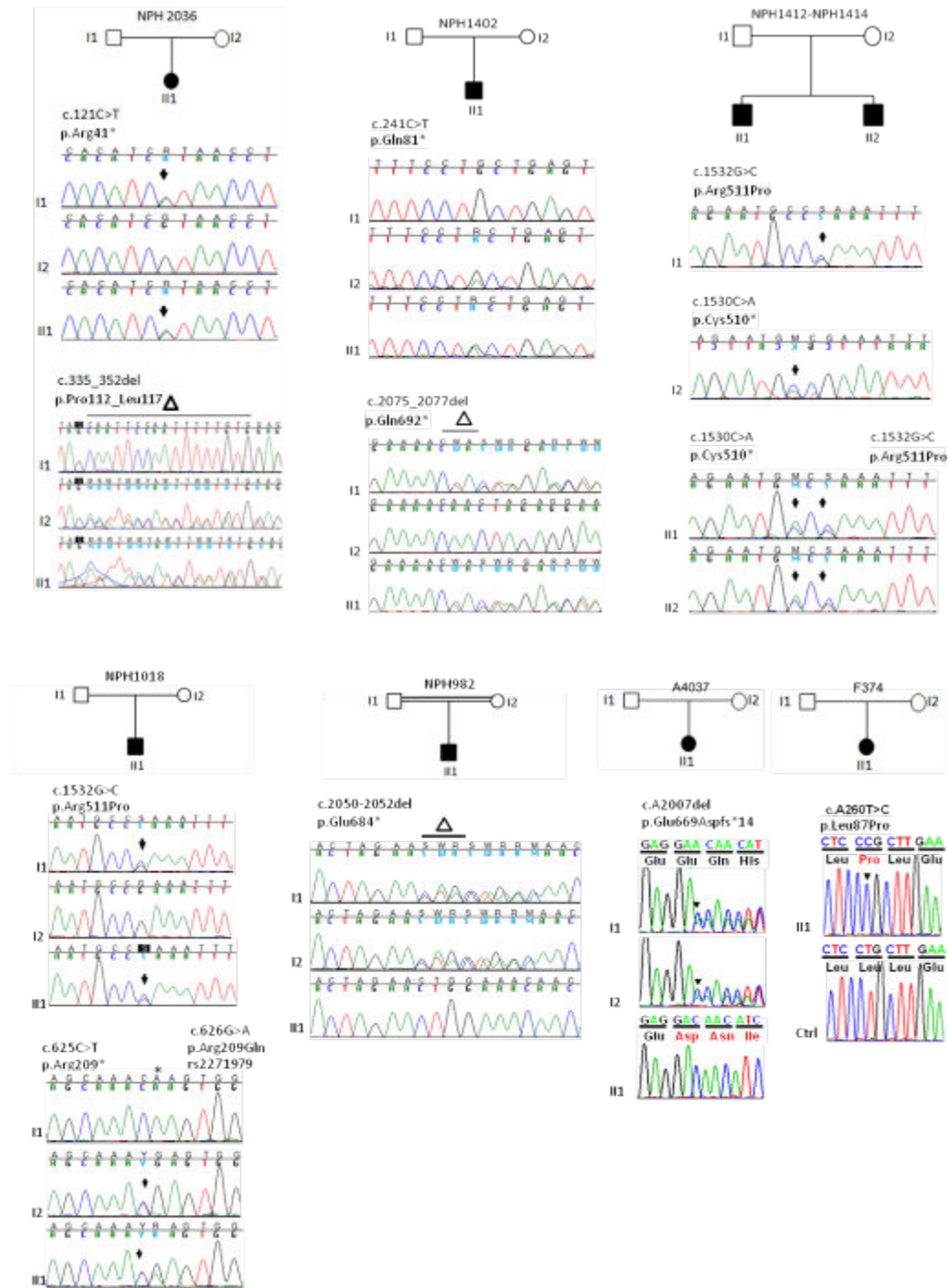
The URLs for data presented herein are as follows:

COILS, http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html
Ensembl Genome Browser, <http://www.ensembl.org/index.html>
MutationTaster, <http://www.mutationtaster.org/>
NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server, <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.omim.org/>
PolyPhen-2, <http://www.genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
RefSeq, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>
UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu>

References

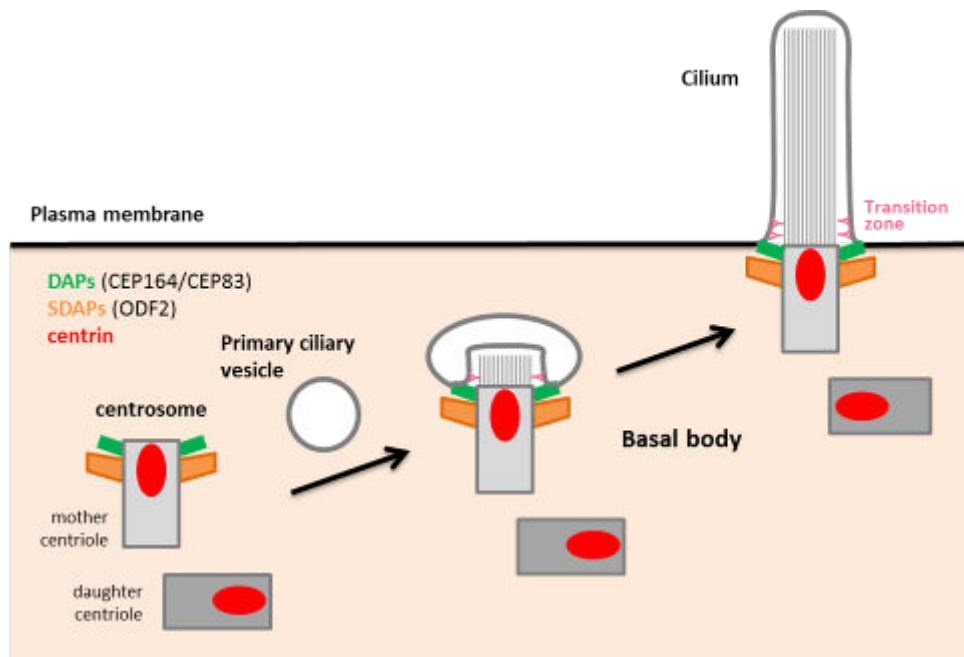
1. Salomon, R., Saunier, S., and Niaudet, P. (2009). Nephronophthisis. *Pediatr. Nephrol.* *24*, 2333–2344.
2. Hildebrandt, F., Benzing, T., and Katsanis, N. (2011). Ciliopathies. *N. Engl. J. Med.* *364*, 1533–1543.
3. Satir, P., and Christensen, S.T. (2007). Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu. Rev. Physiol.* *69*, 377–400.
4. Delous, M., Gaudé, H.M., and Saunier, S. (2013). Genetic bases and pathogenic mechanisms of nephronophthisis. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* Published online November 5, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddmec.2013.10.001>.
5. Arts, H.H., and Knoers, N.V.A.M. (2013). Current insights into renal ciliopathies: what can genetics teach us? *Pediatr. Nephrol.* *28*, 863–874.
6. Otto, E.A., Schermer, B., Obara, T., O’Toole, J.F., Hiller, K.S., Mueller, A.M., Ruf, R.G., Hoefele, 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*, 413–420.
7. Otto, E.A., Trapp, M.L., Schultheiss, U.T., Helou, J., Quarmby, L.M., and Hildebrandt, F. (2008). *NEK8* mutations affect ciliary and centrosomal localization and may cause nephronophthisis. *J. Am. Soc. Nephrol.* *19*, 587–592.
8. Tory, K., Rousset-Rouvière, C., Gubler, M.-C., Morinière, V., Pawtowski, A., Becker, C., Guyot, C., Gié, S., Frishberg, Y., Nivet, H., et al. (2009). Mutations of *NPHP2* and *NPHP3* in infantile nephronophthisis. *Kidney Int.* *75*, 839–847.
9. Halbritter, J., Bizet, A.A., Schmidts, M., Porath, J.D., Braun, D.A., Gee, H.Y., McInerney-Leo, A.M., Krug, P., Filhol, E., Davis, E.E., et al.; UK10K Consortium (2013). Defects in the IFT-B component IFT172 cause Jeune and Mainzer-Saldino syndromes in humans. *Am. J. Hum. Genet.* *93*, 915–925.

10. Huber, C., Wu, S., Kim, A.S., Sigaudy, S., Sarukhanov, A., Serre, V., Baujat, G., Le Quan Sang, K.-H., Rimoin, D.L., Cohn, D.H., et al. (2013). WDR34 mutations that cause short-rib polydactyly syndrome type III/severe asphyxiating thoracic dysplasia reveal a role for the NF- κ B pathway in cilia. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 926–931.
11. Schmidts, M., Vodopiutz, J., Christou-Savina, S., Cortés, C.R., McInerney-Leo, A.M., Emes, R.D., Arts, H.H., Tüysüz, B., D’Silva, J., Leo, P.J., et al.; UK10K (2013). Mutations in the gene encoding IFT dynein complex component WDR34 cause Jeune asphyxiating thoracic dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 932–944.
12. Morga, B., and Bastin, P. (2013). Getting to the heart of intraflagellar transport using *Trypanosoma* and *Chlamydomonas* models: the strength is in their differences. *Cilia* **2**, 16.
13. Bornens, M. (2012). The centrosome in cells and organisms. *Science* **335**, 422–426.
14. Reiter, J.F., Blacque, O.E., and Leroux, M.R. (2012). The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO Rep.* **13**, 608–618.
15. 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**, 321–330.
16. Tanos, B.E., Yang, H.-J., Soni, R., Wang, W.-J., Macaluso, F.P., Asara, J.M., and Tsou, M.-F.B. (2013). Centriole distal appendages promote membrane docking, leading to cilia initiation. *Genes Dev.* **27**, 163–168.
17. Joo, K., Kim, C.G., Lee, M.-S., Moon, H.-Y., Lee, S.-H., Kim, M.J., Kweon, H.-S., Park, W.-Y., Kim, C.-H., Gleeson, J.G., and Kim, J. (2013). CCDC41 is required for ciliary vesicle docking to the mother centriole. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 5987–5992.
18. Sillibourne, J.E., Hurbain, I., Grand-Perret, T., Goud, B., Tran, P., and Bornens, M. (2013). Primary ciliogenesis requires the distal appendage component Cep123. *Biol. Open* **2**, 535–545.
19. Chaki, M., Airik, R., Ghosh, A.K., Giles, R.H., Chen, R., Slaats, G.G., Wang, H., Hurd, T.W., Zhou, W., Cluckey, A., et al. (2012). Exome capture reveals ZNF423 and CEP164 mutations, linking renal ciliopathies to DNA damage response signaling. *Cell* **150**, 533–548.
20. Adly, N., Alhashem, A., Ammari, A., and Alkuraya, F.S. (2014). Ciliary genes TBC1D32/C6orf170 and SCLT1 are mutated in patients with OFD type IX. *Hum. Mutat.* **35**, 36–40.
21. Thomas, S., Legendre, M., Saunier, S., Bessières, B., Alby, C., Bonnière, M., Toutain, A., Loeuillet, L., Szymanska, K., Jossic, F., et al. (2012). TCTN3 mutations cause Mohr-Majewski syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **91**, 372–378.
22. Perrault, I., Saunier, S., Hanein, S., Filhol, E., Bizet, A.A., Collins, F., Salih, M.A.M., Gerber, S., Delphin, N., Bigot, K., et al. (2012). Mainzer-Saldino syndrome is a ciliopathy caused by IFT140 mutations. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 864–870.
23. Halbritter, J., Diaz, K., Chaki, M., Porath, J.D., Tarrier, B., Fu, C., Innis, J.L., Allen, S.J., Lyons, R.H., Stefanidis, C.J., et al. (2012). High-throughput mutation analysis in patients with a nephronophthisis-associated ciliopathy applying multiplexed barcoded array-based PCR amplification and next-generation sequencing. *J. Med. Genet.* **49**, 756–767.
24. Schmidt, K.N., Kuhns, S., Neuner, A., Hub, B., Zentgraf, H., and Pereira, G. (2012). Cep164 mediates vesicular docking to the mother centriole during early steps of ciliogenesis. *J. Cell Biol.* **199**, 1083–1101.
25. Nakagawa, Y., Yamane, Y., Okanou, T., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2001). Outer dense fiber 2 is a widespread centrosome scaffold component preferentially associated with mother centrioles: its identification from isolated centrosomes. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1687–1697.
26. Schaefer, E., Zaloszc, A., Lauer, J., Durand, M., Stutzmann, F., Perdomo-Trujillo, Y., Redin, C., Bennouna Greene, V., Toutain, A., Perrin, L., et al. (2011). Mutations in SDCCAG8/NPHP10 cause Bardet-Biedl syndrome and are associated with penetrant renal disease and absent polydactyly. *Mol. Syndromol.* **1**, 273–281.
27. Tammachote, R., Hommerding, C.J., Sindors, R.M., Miller, C.A., Czarnecki, P.G., Leightner, A.C., Salisbury, J.L., Ward, C.J., Torres, V.E., Gattone, V.H., 2nd, and Harris, P.C. (2009). Ciliary and centrosomal defects associated with mutation and depletion of the Meckel syndrome genes MKS1 and MKS3. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 3311–3323.
28. Follit, J.A., Tuft, R.A., Fogarty, K.E., and Pazour, G.J. (2006). The intraflagellar transport protein IFT20 is associated with the Golgi complex and is required for cilia assembly. *Mol. Biol. Cell* **17**, 3781–3792.
29. Gustafsson, M.G.L., Shao, L., Carlton, P.M., Wang, C.J.R., Golubovskaya, I.N., Cande, W.Z., Agard, D.A., and Sedat, J.W. (2008). Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys. J.* **94**, 4957–4970.



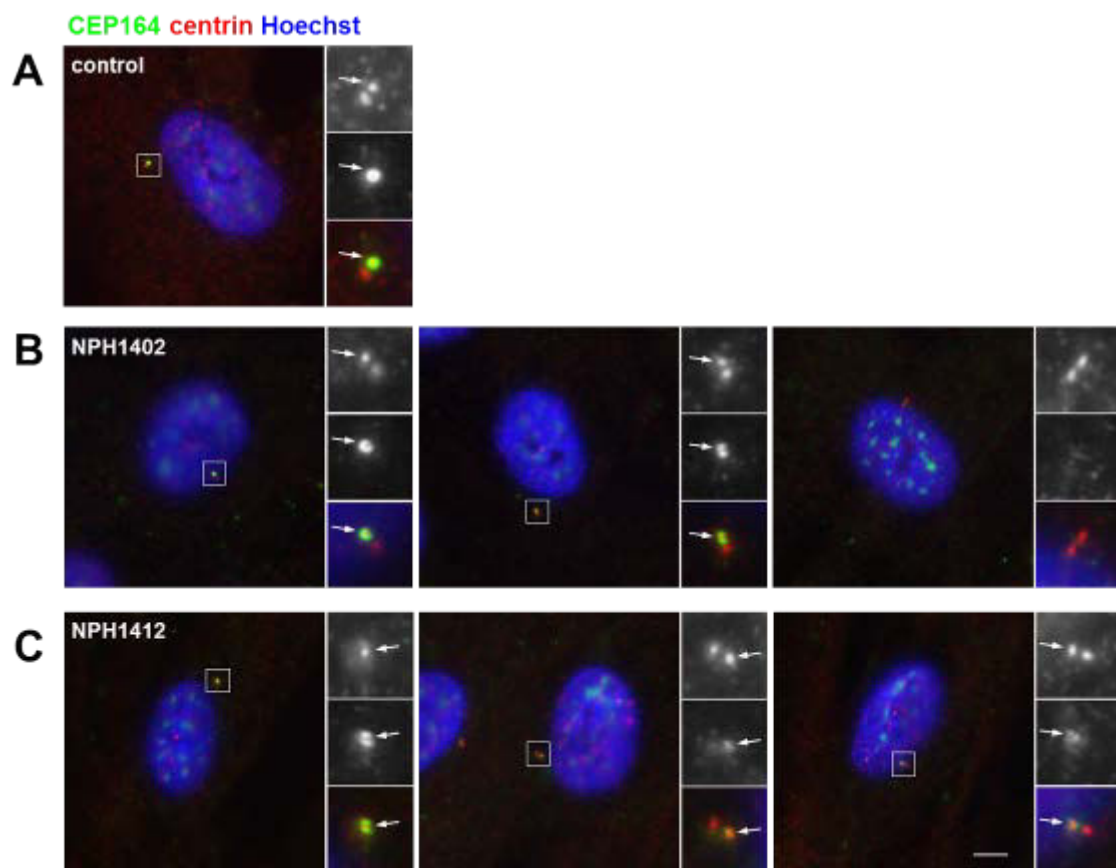
Supplementary Figure S1. Recessive Mutations in CEP83 in Seven Families with Infantile Nephronophthisis and Extrarenal Manifestations.

Family numbers are shown above pedigrees. Mutations and predicted translational changes are indicated. Sequencing traces are labeled according to the numbering in the family pedigree shown above. When segregation was not available, sequence traces are shown for mutations above normal controls. Mutated nucleotide positions are indicated by arrows.



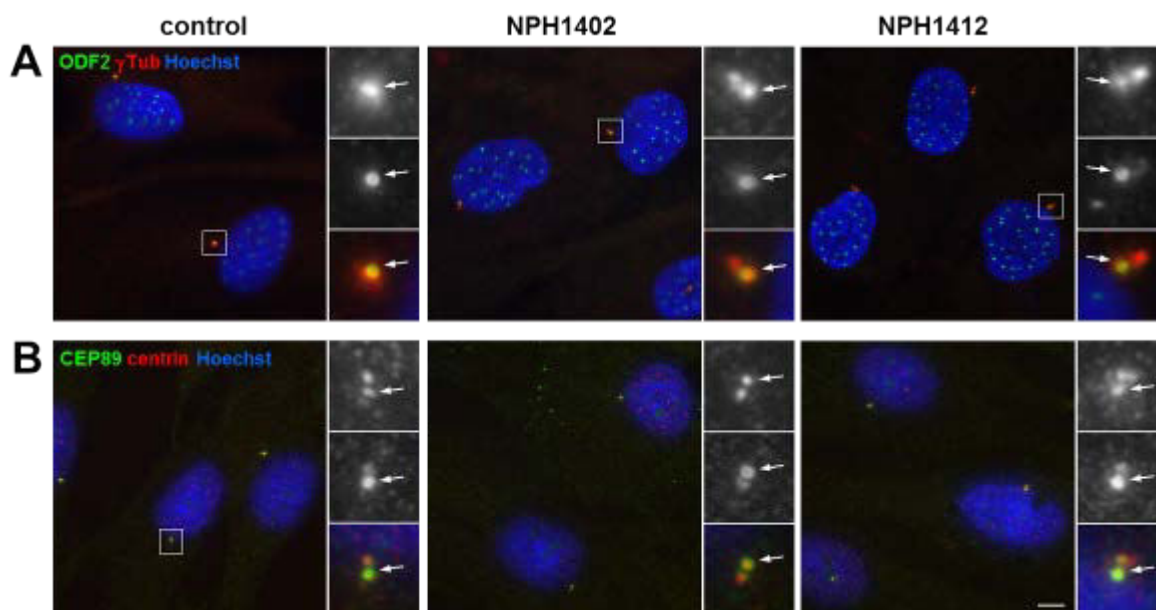
Supplementary Figure S2. DAPs Play a Major role During Ciliogenesis Anchoring the Basal Body to Membranes.

The primary ciliary vesicle interacts with the mother centriole through the distal appendages (DAPs), the axoneme then grows within this vesicle which fuses with the plasma membrane to release the cilium in the extracellular milieu.



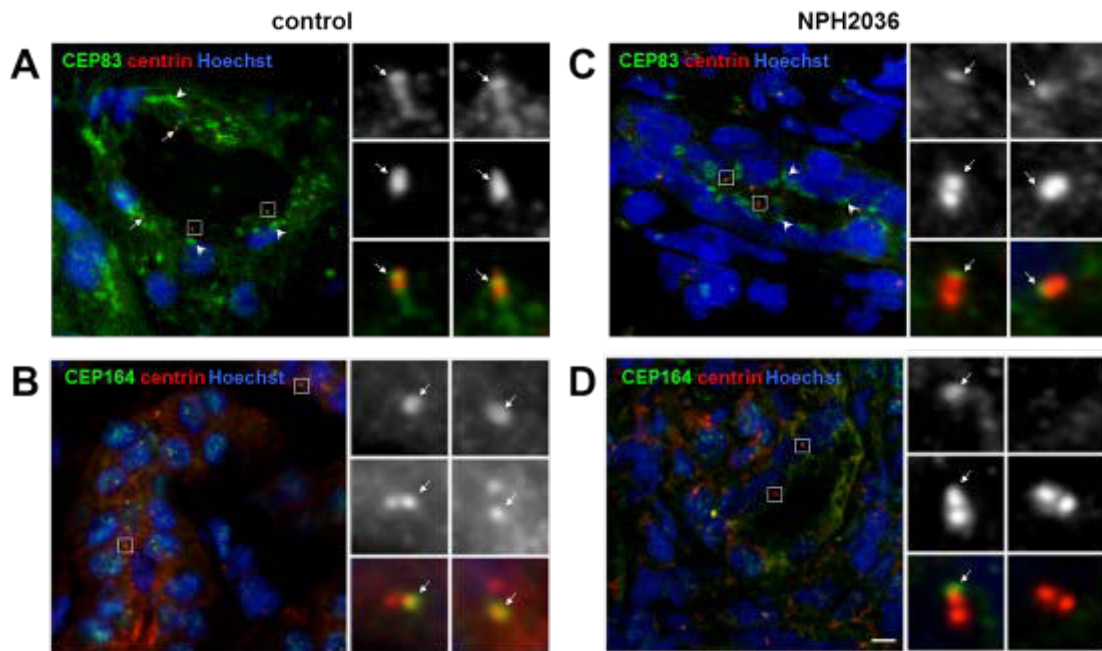
Supplementary Figure S3. CEP164 Distribution at the Centrosome Is Altered in Affected Individuals' Fibroblasts.

(A-C) Fibroblasts from control (A), or NPH1402 (B) and NPH1412 (C) affected individuals were serum-starved for 48 hours, fixed and stained for CEP164 (green) and centrin (red). Nuclei were stained with Hoechst (blue). Higher magnifications of representative centrosomes are shown on the right panels. White arrows indicate CEP164 staining at one of the two centrioles. Scale bar: 5 μ m.



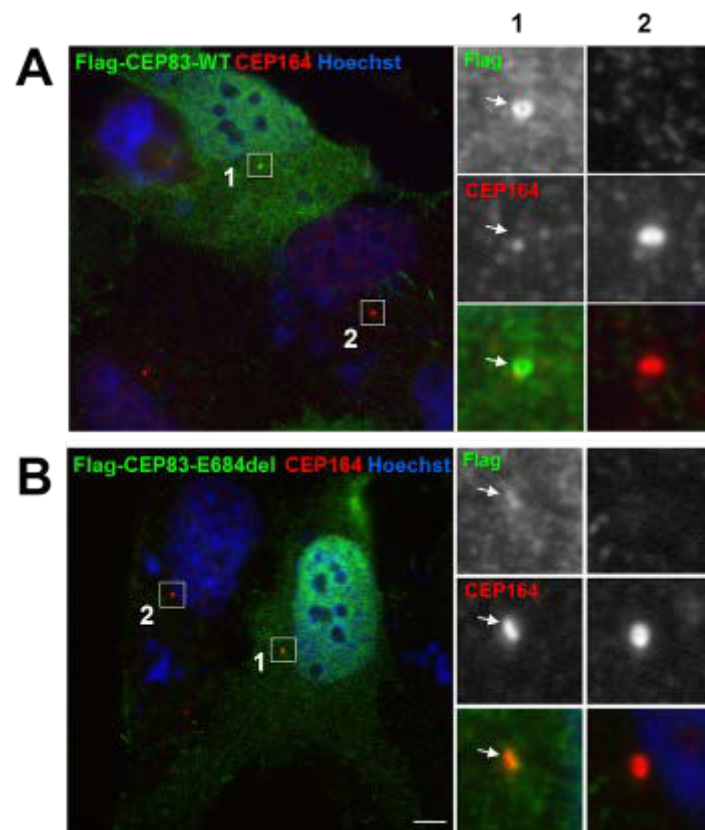
Supplementary Figure S4. ODF2 and CEP89, Subdistal and Distal Appendages Components Respectively, are not Perturbed in Affected Individuals' Fibroblasts.

(A-B) Fibroblasts from control, NPH1402 and NPH1412 individuals were serum-starved for 48 hours, fixed and stained for ODF2 (green, A) and γ -tubulin (red, goat polyclonal antibody (SantaCruz), A) or CEP89 (green, rabbit polyclonal antibody (Sillibourne et al, 2013), B) and centrin (red, B). Nuclei were stained with Hoechst (blue). Higher magnifications of representative centrosomes are shown on the right panels. White arrows indicate ODF2 and CEP89 rings at one of the two centrioles. Scale bar: 5 μ m.



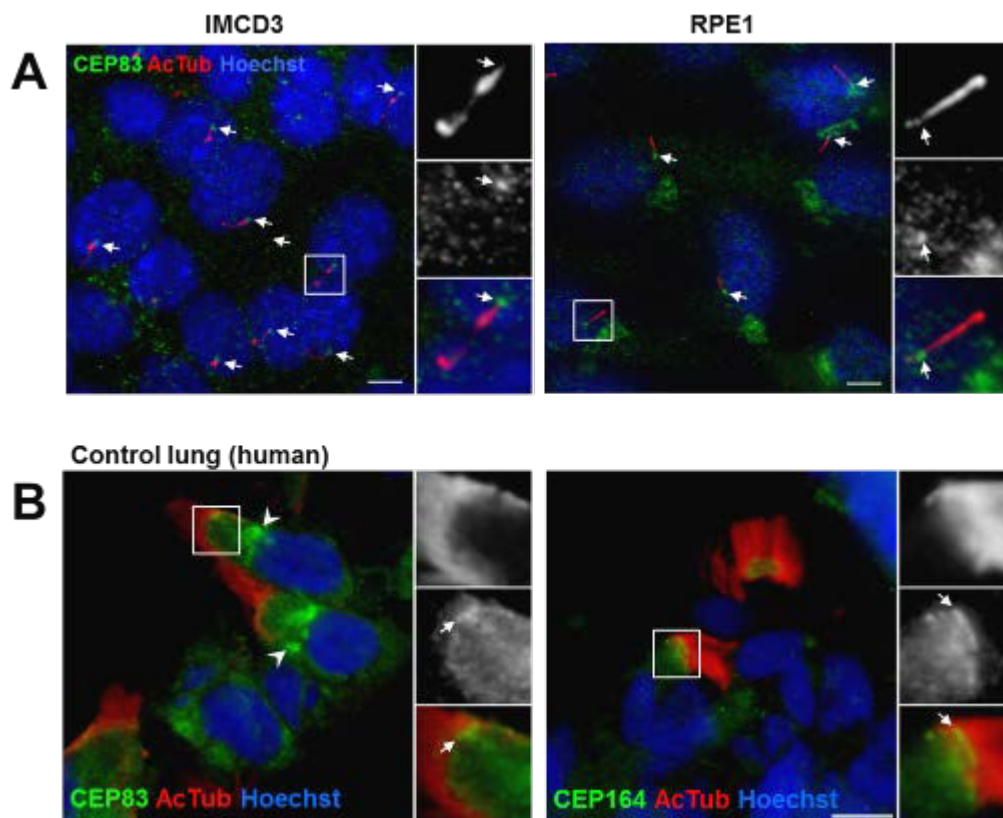
Supplementary Figure S5. Centrosomal Localization of CEP164 is Perturbed in Kidney from Affected Individual.

(A-D) Tissue sections of kidney biopsies from control or affected individual (NPH2036) were stained with antibodies against centrin (red) and either CEP83 ((A-C), green) or CEP164 ((B-D), green). Nuclei were stained with Hoechst (blue). Higher magnifications of representative centrosomes are shown on the right. Centrosomes are stressed with arrows. Arrowheads point to the Golgi staining for CEP83. Scale bar: 5µm.



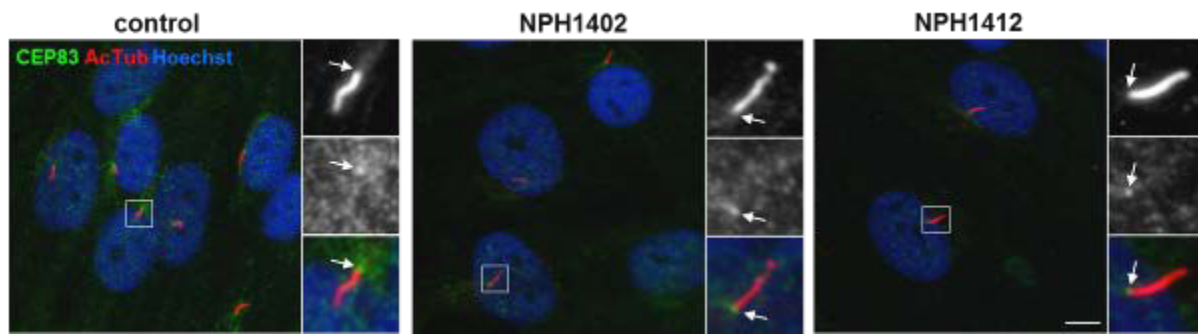
Supplementary Figure S6. The p.Glu684del Variation Affects Localization of CEP83 to the Centrosome.

(A-B) RPE1 cells were transiently transfected with plasmids encoding for FLAG-tagged (WT) or p.Glu684del CEP83 variant, fixed and stained for FLAG (green) and CEP164 (red). Scale bar: 5 μ m.



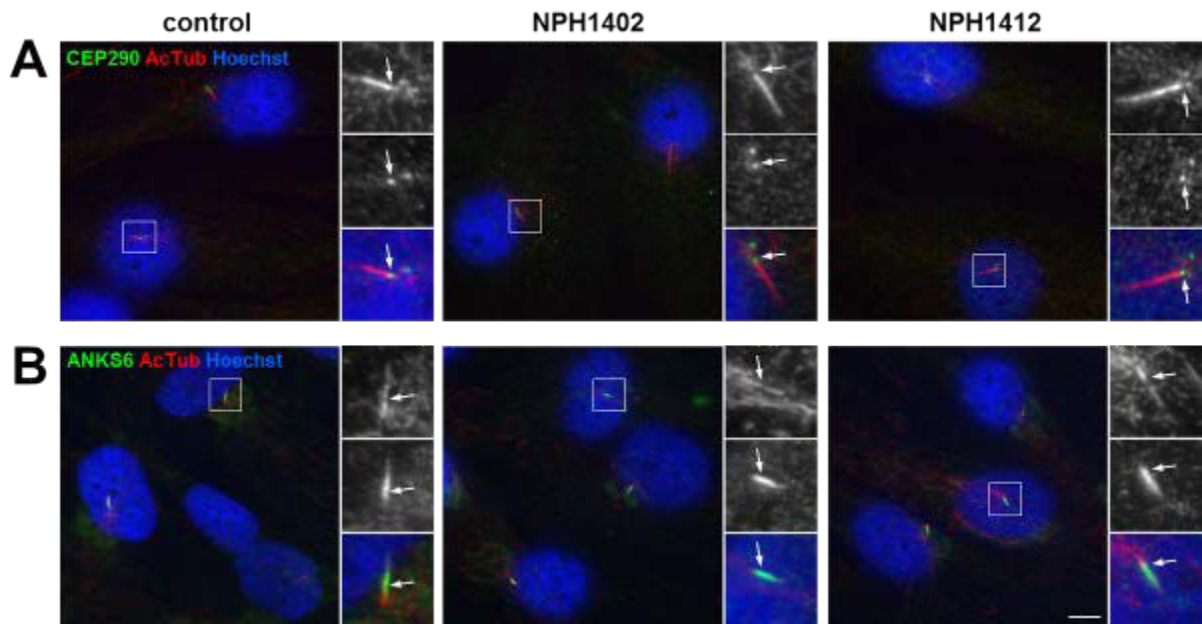
Supplementary Figure S7. CEP83 Localizes to the Cilium Base in IMCD3 and RPE1 Cells and in Pulmonary Multi-ciliated Cells.

(A) IMCD3 cells grown for two days post-confluence or RPE1 cells serum-starved for one day were fixed and stained for CEP83 (green) and acetylated-tubulin (AcTub, red). Nuclei were stained with Hoechst (blue). Higher magnifications of representative cilia are shown on the right panels. White arrows indicate CEP83 staining at the base of cilia. (B) Sections from a human lung biopsy from a control individual were stained for AcTub (red) and CEP83 (green, left) or CEP164 (green, right). Higher magnifications of the base of representative ciliary tufts are shown on the right panels. White arrows indicate CEP83 and CEP164 at the base of cilia and arrowheads indicate CEP83 at the Golgi apparatus. Scale bar: 5 μ m.



Supplementary Figure S8. CEP83 Localizes at the Base of Cilia in Control and Affected Individuals Fibroblasts.

Fibroblasts from control, NPH1402 and NPH1412 individuals were serum-starved for 48 hours, fixed and stained for CEP83 (green) and AcTub (red). Nuclei were stained with Hoechst (blue). Higher magnifications of representative cilia are shown on the right panels. White arrows indicate CEP83 staining at the base of cilia. Scale bar: 5 μ m.



Supplementary Figure S9. Ciliary Distribution of NPHP-RC Proteins is Not Affected in Fibroblasts from Affected Individuals.

(A-B) Fibroblasts from control or affected individuals (NPH1402 and NPH1412) were serum-starved for 48 hours, fixed and stained for CEP290/NPHP6 (green; rabbit polyclonal antibody (Delous et al, 2007)), (A) or ANKS6 (green; rabbit polyclonal (Sigma HPA008355); (B)) and acetylated tubulin (red, (A and B)). Nuclei were stained with Hoechst (blue). Higher magnifications of representative cilia are shown on the right panels. White arrows indicate CEP290 and ANKS6 within the cilium. Scale bar: 5 μ m.

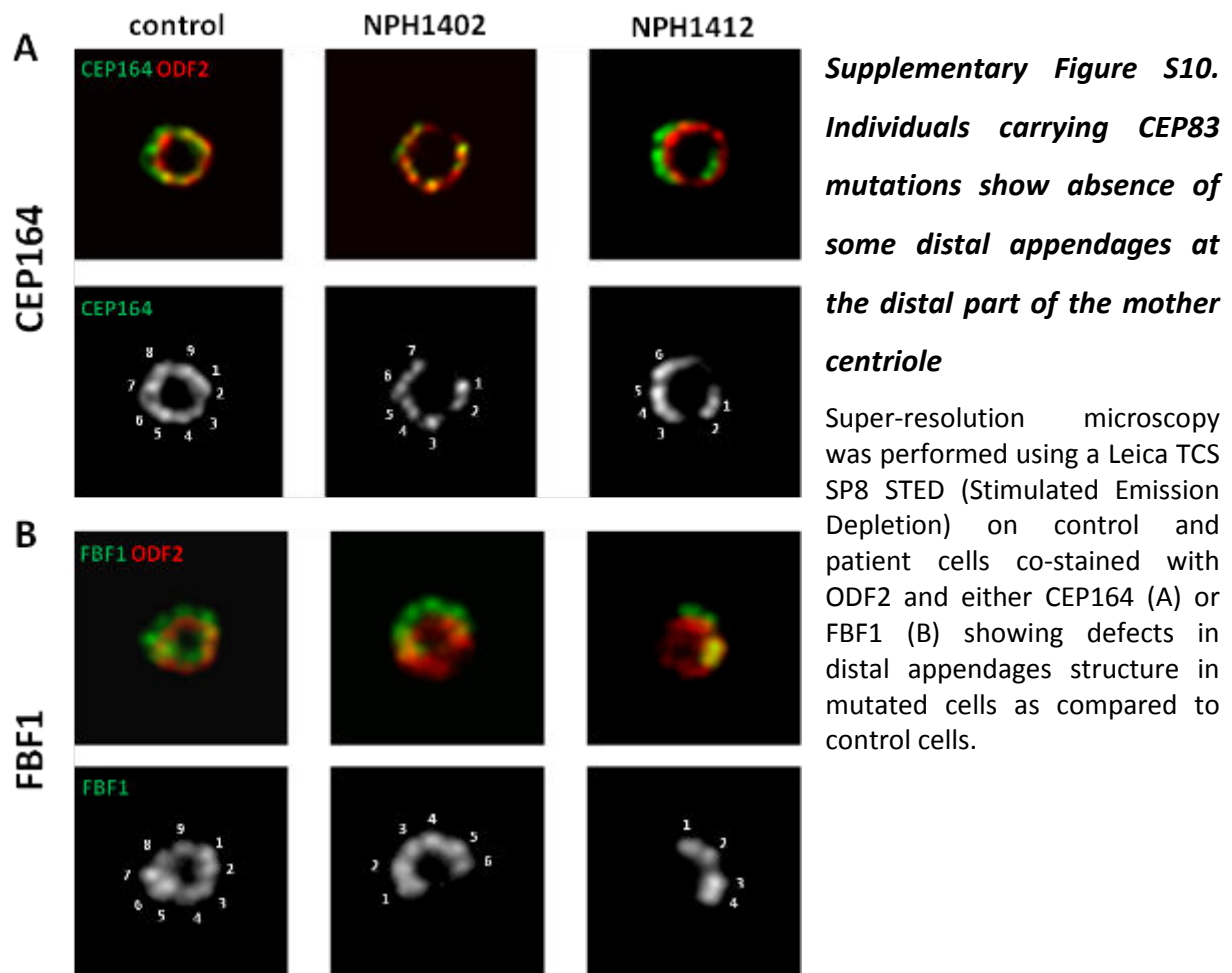
CEP83 variants	Overexpression of CEP83 variants in RPE1 cells		Interaction capacities of CEP83 variants		Mislocalization of endogenous CEP164
	Localization at the centrosome	Dominant negative effect on CEP164	CEP164	IFT20	
p.Leu87Pro	+	+	+	+	nd
p.Pro112_Leu117del	+	+	+	+	+ (biopsy)
p.Arg511Pro	+	+	-	-	+ (fibroblasts)
p.Glu669Asp*fs14	-	-	-	-	nd
p.Glu684del	-	-	nd	nd	nd
p.Gln692del	-	-	-	-	+ (fibroblasts)

Supplementary Table S1. Impact of CEP83 Variants on IFT20 and CEP164 Localization at the DAPs.

Transfected C-terminal CEP83 variants (p.Glu669Aspfs*14, p.Glu684del and p.Gln692del) are not able to localize at the centrosome in RPE1 cells, whereas N-terminal (p.Leu87Pro and p.Pro112_Leu117del) and p.Arg511Pro CEP83 variants are correctly assembled to the mother centriole. In addition, C-terminal and p. Arg511Pro variants failed to interact with their partners CEP164 and IFT20. At the endogenous level, all CEP83 variants (p.Pro112_Leu117del, p.Arg511Pro and p.Gln692del) seem to affect centrosomal recruitment of CEP164 and DAPs assembly in affected individuals kidney biopsies or fibroblasts. nd = 'non determined'.

Résultats complémentaires non publiés

Comme la taille des centrioles est proche de la limite de résolution de la microscopie à épifluorescence classique, et que la technique du nSIM ne m'a pas permis de visualiser les appendices distaux (Article 1, Figure 3C), j'ai utilisé la technique de Stimulation Emission-Depletion (STED), précédemment utilisée avec succès pour une étude similaire (Lau et al. 2012). Le marquage d'ODF2 a permis de visualiser les 9 appendices sub-distaux, tandis que le marquage de CEP164 ou FBF1 a permis de visualiser les 9 appendices distaux dans les fibroblastes contrôles (Figure S10A et B, respectivement). Les mêmes marquages ont confirmé que la symétrie en 9 était altérée dans les fibroblastes de patients. Les images obtenues montrent une désorganisation des appendices distaux avec absence de certains appendices (Figure S10A et B).



Dans le but de déterminer si ces défauts d'organisation des appendices distaux perturbaient l'ancrage du centriole à la vésicule ciliaire lors des premières étapes de la ciliogenèse, j'ai utilisé la microscopie électronique pour observer l'organisation membrane/centriole à la base des cils dans les fibroblastes des patients, et notamment l'organisation de la poche ciliaire. Bien que la poche ciliaire ne semble pas altérée dans les cellules mutées, la qualité des échantillons ne m'a malheureusement pas permis de vérifier ce point. Par ailleurs, l'intégrité des appendices distaux n'a pas pu être analysée car ce ne sont pas des structures assez denses aux électrons pour être facilement observables sur des coupes longitudinales de centrioles en microscopie électronique.

Enfin, le « ciliome » a permis d'identifier des mutations de *CEP83* chez deux autres individus présentant une NPH associée à des défauts du système nerveux central. Le premier patient porte la délétion de 3 nucléotides, c. 2050_2052delGAA [p.Glu684del], à l'état homozygote, déjà retrouvée chez un autre patient de la même origine ethnique (Turquie) mais qui ne présentait pas de retard mental. L'autre patient porte la mutation tronquante, c.625C>T [p.Arg209*], déjà identifiée, en association avec une mutation qui modifie le site d'épissage au niveau de l'exon 10 (c.1344-1G>A) et présente des anomalies sévères du système nerveux central avec un retard mental, une malformation cérébelleuse et un hamartome hypothalamique (anomalie de développement de l'hypothalamus). Au total, 11 mutations de *CEP83* ont donc été identifiées chez 12 individus présentant des formes précoces de NPH associées à des défauts du système nerveux central suggérant une forte prévalence des mutations de *CEP83* dans la NPH infantile.

PARTIE II : Effets cumulatifs des mutations des gènes WDR19 et TEKT1 chez une patiente atteinte d'un syndrome de Saldino-Mainzer et d'une dyskinésie ciliaire primitive.

Résumé

Même si les mécanismes requis pour la formation des cils primaires et motiles sont similaires, rares sont les patients qui présentent à la fois des phénotypes causés par des défauts de cils primaires et des cils motiles. De façon intéressante, une patiente présentant un syndrome de Saldino-Mainzer (MZSDS), causé par des défauts de cils primaires, a également été diagnostiquée pour une dyskinésie ciliaire bronchique, associées à des anomalies de motilité ciliaire. Le séquençage ciblé des exons des gènes ciliaires a révélé des mutations hétérozygotes composites dans deux gènes différents *WDR19* et *TEKT1*. *WDR19* code l'IFT144, une sous-unité du complexe de l'IFT-A qui est nécessaire à ciliogenèse et qui a déjà été associée à des ciliopathies squelettiques, mais pas à des phénotypes liés aux cils motiles. *TEKT1* code la tektine-1, un membre non caractérisé de la famille des tektines, impliquées dans la motilité ciliaire.

L'étude des fibroblastes de la patiente a montré que les mutations de *WDR19/IFT144* étaient responsables des défauts des cils primaires à l'origine du MZSDS. Les mutations de *TEKT1*, quant à elles, perturbent la localisation de la tektine-1 le long de l'axonème des cils motiles des cellules multiciliées nasales et au niveau du corps basal des cils primaires. Les résultats préliminaires obtenus par l'inactivation de *tekt1* dans le poisson zèbre semblent conforter l'hypothèse impliquant la tektine-1 dans la motilité ciliaire. De plus, les analyses *in vitro* de *TEKT1* ont aussi montré que tektine-1 aurait un rôle dans la régulation de la taille des cils primaires suggérant que les mutations de *TEKT1* pourraient être responsables à la fois des défauts de la motilité ciliaire et des cils primaires retrouvés chez la patiente. Les effets cumulatifs des variations identifiées dans deux gènes différents expliqueraient ainsi la sévérité et la diversité des phénotypes de la patiente. Enfin, nos résultats mettent en évidence le rôle de la tektine-1 dans la motilité des cils et font de *TEKT1* un nouveau gène candidat à la dyskinésie ciliaire.

ARTICLE 2

Additive effects of TEKT1 and WDR19 mutations in patient with Mainzer-Saldino syndrome and Bronchial Ciliary Dyskinesia.

Marion Failler,^{1,2} Rebecca Ryan,^{1,2} Emilie Filhol,^{1,2} Louise Madeline Reilly,^{1,2} Thérèse Reboul,^{1,2} Véronique Baudouin,³ Marie Legendre,^{4,5} Serge Amselem,^{4,5} Estelle Escudier,^{4,5} Sophie Saunier,^{1,2} Alexandre Benmerah^{1,2}

¹INSERM UMR 1163, Laboratory of Inherited Kidney diseases, 75015 Paris, France

²Paris Descartes – Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, 75015 Paris, France

³Service de néphrologie pédiatrique, hôpital Robert-Debré, Paris, France.

⁴UMR-S 933, INSERM, Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, Paris, France

⁵Service de Génétique et Embryologie Médicales, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Hôpital Armand Trousseau, Paris, France.

Au cours de ce travail, j'ai réalisé les études dans les cellules et les tissus de la patiente ainsi que dans les cellules transfectées par les plasmides mutés ou les siRNA (Figures 4 à 9 et supplémentaires).

Abstract

A patient presenting Mainzer-Saldino syndrome (MZSDS) characterized by renal, eye and bone involvements, was also diagnosed with bronchial ciliary dyskinesia (BCD), including recurrent respiratory infections and brain ventricle dilatation. These manifestations, associated with ciliopathies, are due to defects in either primary or motile cilia, respectively. Targeted exon sequencing revealed biallelic mutations in *WDR19* and *TEKT1*. *WDR19* encodes IFT144, a subunit of the IFT-A complex which is required for ciliogenesis and was previously associated with skeletal ciliopathies but not with ciliary dyskinesia. In contrast, *TEKT1* encodes tektin-1, a non-characterized member of the tektin family involved in ciliary motility. Patient fibroblasts showed ciliogenesis defects, as expected for *WDR19* mutations. Further *in vitro* analyses showed that tektin-1 is present at the centrosome but not at the axoneme of primary cilia and that it acts as a positive regulator of ciliary length. Mutations identified in the patient impaired centrosomal targeting. In addition, analysis of multiciliated cells from nasal brushing showed that tektin-1 localized along the axoneme of motile cilia in control individuals but not in patient cells which showed severe motility defects without major ultrastructural changes. In parallel, zebrafish embryos injected with *tekt1* morpholino showed laterality defects and misshapen and supernumerary otoliths in the otic vesicle, in agreement with a function for *tekt1* in ciliary motility. This model will be used to further analyze the pathogenic effects of the mutations found in the patient. Therefore, our results suggest that this dual ciliary phenotype is due to the additive effects of mutations in *WDR19* and *TEKT1*.

Introduction

Cilia are evolutionarily conserved organelles that project from the surface of most cells in vertebrates. Their axoneme consists of nine peripheral microtubule doublets either surrounding a central pair of microtubules (i.e., “9+2” pattern) or not (i.e., “9+0” pattern). The 9+0 cilia, most commonly primary cilia, are sensory and generally immotile cilia which control key signaling pathways during development and tissue homeostasis (reviewed in Satir et Christensen 2007). The 9+2 cilia correspond to motile cilia (bronchial epithelial cells, ependymal cells...) and flagella (sperm cells) involved either in the generation of extracellular fluid flow or in cell motility, respectively (reviewed in Satir et Christensen 2007). Ciliary and flagellar motility requires extra-axonemal structures, including inner (IDAs) and outer dynein arms (ODAs), directly responsible for motility, as well as radial spokes (RSs), which are believed to serve as sensors that control beating, especially the waveform in motile cilia (Lindemann et Lesich 2010). A third category of motile cilia has been described at the embryonic node (or Kupffers vesicle in the zebrafish) which shows a 9+0 axoneme and dynein arms, facilitating a rotational movement critical for establishing laterality in the body plan during development.

An additional structural component has been described in motile cilia and flagellar axonemes, the ribbon. It consists of several filaments assembled together all along and inside the lumen of the “A” microtubule of each peripheral doublet. These filaments are made of tektins which were mostly studied in sea urchin as well as in *Chlamydomonas* (reviewed in Richard W. Linck et Norrander 2003) and are able to hetero/homo dimerise to form highly stable filaments thanks to their coiled-coil domains. In mammals, the tektin family is composed of five members (tektin-1-5). In mice and humans, they were localized to sperm flagella (tektin-1, tektin-2 and tektin-5), and mice models for *Tekt2*, *Tekt3* and *Tekt4* showed that they are critical for their motility (Larsson et al. 2000; Tanaka et al. 2004; Roy et al. 2007; Roy et al. 2009; Murayama et al. 2008). In agreement with the implication of tektin in ciliary motility, the expression of *TEKT1* and *TEKT2* in human airway epithelial cells is controlled by the transcription factor FOXJ1 (Didon et al. 2013), a master regulator of the expression of genes encoding proteins required for ciliary motility (reviewed in Thomas et al.

2010). Recent data also indicated that tektin-2 and tektin-1 are present at the centrosome and are involved in cytokinesis in mammals (Durcan et al. 2008; R. He et al. 2013).

Primary and motile cilia are assembled from basal bodies corresponding to the mother centriole of the centrosome (primary cilia) or from pre-amplified centrioles (bronchial cilia). All the constituents of the ciliary compartment are synthesized in the cytoplasm and are therefore actively transported into the ciliary compartment. This transport is called the intraflagellar transport (IFT) and mediated by a highly conserved IFT machinery which is thought to select cargo in the cytoplasm and mediate its transport into the ciliary compartment and along the axoneme. The anterograde transport from the base to the distal ciliary tip is mediated by the IFT subcomplex B (IFT-B), consisting of at least 15 different subunits, in association with kinesin II, whereas the retrograde transport, from the ciliary tip back to the base, is mediated by a dynein motor in association with the IFT subcomplex A (IFT-A), composed of six subunits. Loss of most IFT components results in severe ciliogenesis defects *in vitro* as well as *in vivo* (reviewed in Pedersen et Rosenbaum 2008).

Dysfunctions of either primary or motile cilia are associated with genetically heterogeneous disorders which can present a large spectrum of clinical manifestations which are called ciliopathies. Defects in motile cilia are often associated with Primary Ciliary Dyskinesia characterized by neonatal respiratory distress and chronic sinopulmonary disease that may be accompanied by laterality defects (*situs inversus*, ~ 50 % of the patients) and, later, infertility in the males. In most individuals with PCD, the ciliary defect concerns the axonemal associated structures and is linked to mutations in different genes encoding either dynein arms (i.e. *DNAL1* [MIM 610062]) or radial spokes proteins (i.e. *RSPH1* [MIM 609314]) (Mazor et al. 2011; Kott et al. 2013). However, some individuals presenting PCD do not have detectable structural axonemal defects (*DNAH11* [MIM 603339]) (Schwabe et al. 2008).

Dysfunctions of primary cilia are associated with a broad range of clinical features, rarely overlapping with PCD (except for *situs inversus*), affecting many different organs including the kidney, retina, central nervous system, skeleton, liver etc... These manifestations can be either isolated or part of more complex syndromes defined by their

specific association. These primary cilia-related ciliopathies are linked to mutations in genes encoding cilia-associated proteins.

Nephronophthisis (NPH) is one of the kidney involvements associated with ciliopathies, together with multicystic dysplasia or polycystic kidneys. NPH is characterized by end-stage renal disease in childhood due to the development of massive interstitial fibrosis with abnormal thickness of the renal tubular basement membranes and the formation of cysts distributed at the cortico-medullary junction in the later stages (Rémi Salomon, Saunier, et Niaudet 2009). NPH can be either isolated or associated with other manifestations in syndromic forms including retinitis pigmentosa (RP)/Leber amaurosis (Senior Løken) and/or skeletal defects such as thoracic dystrophy (Jeune asphyxiating thoracic dystrophy, JATD, MIM 208500), phalangeal cone-shaped epiphysis (e.g. in Mainzer-Saldino syndrome, MZSDS, MIM 266920) or dolichocephaly and hypo/microdontia (e.g. in Sensenbrenner syndrome/ cranioectodermal dysplasia; CED, MIM 218330). Recently, our group and others have shown that skeletal ciliopathies are associated with mutations in genes encoding IFT-A complex subunits and associated dynein motor proteins (Walczak-Sztulpa et al. 2010; Gilissen et al. 2010; H. H. Arts et al. 2011; Bredrup et al. 2011; Davis et al. 2011; Perrault et al. 2012; Schmidts et al. 2013). Specifically, mutations in *WDR19* which encodes the IFT-A subunit IFT144 result in either Sensenbrenner or Jeune syndromes or isolated NPH, depending on the severity of the mutations (Bredrup et al. 2011).

Interestingly, despite the fact that most, if not all, proteins encoded by ciliopathy genes are present in all types of cilia, lung phenotypes associated with PCD have very rarely been described in patients presenting with primary cilia-related ciliopathies. This is particularly striking for IFT subunits which are required for the assembly of all cilia (reviewed in Pedersen et Rosenbaum 2008). Interestingly, one patient presenting MZSDS with NPH, Leber amaurosis, mental disability, cone shaped epiphyses and liver fibrosis, also presented with additional manifestations including severe lung infections, classically described in PCD patients, and dilatation of brain ventricles, a phenotype rarely described in PCD but potentially linked to motile cilia dysfunctions (L. Lee 2013). To identify the genetic cause of MZSDS in this affected child, we applied exon-enriched NGS targeting up to 1.221 genes associated with cilia including all known genes associated with ciliopathies (“ciliome

sequencing"; S. Thomas et al. 2012; Halbritter, Bizet, et al. 2013). This approach led to the identification of heterozygous variations in two genes, *WDR19* and *TEKT1* which encodes tektin-1, a poorly characterized member of the tektin family. In the present study, we have investigated the possible function of tektin-1 in primary and motile cilia and evaluated the effects of the identified variations in both genes on these ciliary functions. We also investigated the relative contribution of the variations in these two genes to the phenotypes observed in this patient presenting a non-classical form of MZSDS.

Results

The affected individual (NPH1848) is the only child (daughter) of healthy parents from France (Caucasian; mother) and from Japan (father). The diagnosis of MZSDS was made based on the combination of her clinical features. She presented with congenital amaurosis, cystic liver and pancreas diagnosed as Caroli syndrome, and nephropathy which progressed rapidly. An ultrasound showed hyperechoic kidneys with small cysts. The renal disease reached end-stage at the age of 7 months, and a successful renal transplant was performed when she was 4 years old. Histological examination of the kidneys revealed abnormal tubules with thickened basement membrane, associated with interstitial fibrosis and cysts over the entire height of the renal parenchyma, phenotypes compatible with end stage NPH. In addition, the patient also presented cone shaped epiphysis, typical in MZSDS, and intellectual disability associated with ventricular dilatation observed on MRI.

During her first year of life, the affected individual also had recurrent respiratory distress with lung collapses and respiratory syncytial virus infections. Ciliary motility was evaluated by high-speed videomicroscopy (HSVM) on cells obtained from airway brushing and led to the diagnosis of ciliary dyskinesia (4 months). More recently (5 years old), cilia motility was again similarly analyzed from cells obtained from nasal brushing (video 1 and below). Cilia displayed aberrant beating patterns (slow or immotile) and showed heterogenous and non-synchronized movements (video 1). In the HSVM analyses, different populations of cilia were identified: 75% were immotile and 25% displayed dyskinetic movements with reduced amplitude and a very low ciliary beat frequency (4,7Hertz). These defects in cilia motility are relevant for ciliary dyskinesia. However, despite the presence of

brain ventricle dilatations, the absence of *situs inversus* and secretory otitis media did not allow us to clearly diagnose a PCD.

The patient carried compound heterozygous variations in two different genes

In order to identify the genetic cause of this complex and non-classical form of ciliopathy, we applied exon-enriched NGS or “ciliome” sequencing and identified variations in two candidate genes (Fig. 1A). Compound heterozygous variations were identified in *TEKT1* encoding tektin-1, which was not previously involved in ciliopathies and was a good candidate gene for motile cilia defects (see introduction). These variations correspond to a missense variation (c.933G>T [p.Lys311Asn]) which is frequent in the East Asian population (0.0119 in ExAc; rs77092590) and inherited from the father (Fig. 2A). This variation is predicted damaging by sift (0,02) and benign by polyphen (0,286), however the K311 residue is highly conserved across species (mouse, zebrafish; drosophila; Fig.1B) and found in the linker domain between the third and fourth coiled-coil domains (Fig. 1C), expected to have important functions in tektins (Amos 2008). It is associated in *trans* with a rare nonsense variation (c.730C<T [p.Arg244*]; 4.118e-05 in ExAC) inherited from the mother (Fig.2A) and leading to a loss of the two C-terminal helices (Fig. 1C).

Interestingly, we also found a missense heterozygous variation (c.3533G>A [p.Arg1178Gln]) in the exon 32 of *WDR19* (Fig. 1D) which was inherited from the father (Fig. 2B). This variation was previously described as pathogenic when either homozygous or associated with another missense mutation in 8 different patients (Halbritter, Porath, et al. 2013; J. M. Lee et al. 2015, 20135) and we did find this mutation in two other patients from our in-house NPH cohort (Table 1). Interestingly, among these 10 patients, all of them presented NPH, 9 also presented liver involvement (Caroli disease/syndrom or cysts), 6 also presented RP, and 2 presented skeletal defects with polydactily or cone shaped epiphysis. Despite the fact that *WDR19* was an obvious candidate for the MZSDS associated phenotypes no other damaging variation could be detected in *WDR19* in the affected individual. However, Sanger sequencing of cDNA from the patient showed that only the paternal allele (c.3533G>A [p.Arg1178Gln]) is expressed (Fig. 2C), suggesting either RNA decay or no expression of the second allele inherited from the mother.

Going back to the NGS results, we noticed that the number of reads for exons 1 to 4 of *WDR19* was decreased by approximately 50% compared to the mean number of reads for these exons in our patient cohort (Fig. 3A), suggesting a deletion of the corresponding genomic region. The possible deletion was mapped using SNPs localized in the 5'UTR region and intron 4 of *WDR19* for which the two parents presented different alleles. For the three most 5' SNPs (rs4367182; rs1451819; rs6531696), only the SNPs inherited from the father could be detected in the affected individual whereas she inherited SNPs from both parents for the most 3' SNPs in intron 4 (Fig. 3, B-D, and data not shown). These results are therefore in favor of a deletion in one of the two alleles of *WDR19* carried by the mother and inherited by the affected individual. This deletion includes a large region from the 5' UTR region to intron 4 (Fig. 3D) and results in a null allele which is not expressed (Fig. 2B).

In conclusion, the affected individual carries heterozygous compound mutations in *WDR19* including a previously reported pathogenic missense mutation (c.3533G>A [p.Arg1178Gln]) and a null allele presenting a large deletion of the 5' region, as well as heterozygous compound variations in *TEKT1*. We therefore investigated the functional effect of variations/mutations in both genes.

WDR19 mutations impaired IFT144 functions at primary cilia

As expected from the genetic data, expression of IFT144 was decreased in fibroblasts from the affected individual compared to fibroblasts from two different controls (Fig. 4A). Ciliogenesis was analyzed by immunofluorescence using acetylated α -tubulin (AcTub) as a marker of cilia (Fig. 4B). Fibroblasts from the affected individual showed reduced ciliogenesis (% of ciliated cells; Fig. 4B') and shorter cilia (Fig. 4B'') compared to control fibroblasts. Similar defects in ciliogenesis and/or cilium maintenance have been previously described in fibroblasts of patients with *WDR19* mutations (Bredrup et al. 2011). The distribution of IFT144 within cilia was then investigated. In control fibroblasts, IFT144 was accumulated at the cilium base (Fig. 4C; arrowheads) and as a single spot at the ciliary distal tip (arrows), as previously described (Bredrup et al. 2011). In cells from the affected individual, IFT144 was similarly present at the base of cilia but it was absent from the ciliary tip (Fig. 4C, arrows). Moreover, staining with the ciliary membrane marker Arl13b showed that the ciliary tip adopted a spoon-like shape in patient cells (Fig. 4C, arrows), a phenotype previously

associated with defects of retrograde transport (IFT-A; Bredrup et al. 2011). As expected, the IFT-B subunit IFT46 accumulated at the ciliary tip (Fig. S1). Finally, we also analysed the ciliary localization of adenylate cyclase III (ACIII), since it was reported to be absent from cilia in mouse models with hypomorphic mutations in *Wdr19* (Ashe, 2012) and in fibroblasts from several different ciliopathy patients (Halbritter, Bizet, et al. 2013; Caparrós-Martín et al. 2015). ACIII is present in most cilia in control fibroblasts (>80%, Fig. 4D and data not shown) whereas only a minor proportion of cilia were positive for ACIII in patient cells (Fig. 4D, arrows).

In conclusion, the mutations in *WDR19* present in the affected individual result in decreased expression of IFT144 and in its mislocalization from the ciliary tip, likely resulting in defects in retrograde IFT transport as well as transport of ciliary membrane proteins.

Characterization of tektin-1 distribution and variations

TEKT1 encodes tektin-1, a poorly-characterized member of the tektin family. While several tektins are involved in ciliary motility in mammals (Tanaka et al. 2004; Roy et al. 2007; Roy et al. 2009), the role of tektin-1 at cilia has not previously been investigated. We thus aimed to characterize the distribution of tektin-1 in ciliated cells and its possible function at cilia.

We first evaluated two commercial rabbit polyclonal antibodies against tektin-1 (Sigma (TEKT1s) and Proteintech (TEKT1p); Fig. S2A). In western-blot experiments these two antibodies detected a band of the expected size for the endogenously expressed protein (48kD; Fig. S2B, arrowheads) and additional bands of expected sizes in lysates from RPE1 cells transiently expressing WT and variant forms of TEKT1 GFP-fusions (Fig. S2B, arrows). Immunofluorescence experiments also showed that both these antibodies were able to stain TEKT1-GFP in transiently transfected cells fixed either with methanol or PFA (Fig. S2C and data not shown). Altogether, these results indicate that these two antibodies are specific for tektin-1.

We then investigated the distribution of tektin-1 in non-ciliated (HeLa) or ciliated cell lines (IMCD3, RPE1, fibroblasts) as well as in kidney biopsies. The staining obtained with the Sigma antibody (TEKT1s) was very faint and diffuse in the cytoplasm and nucleus and similar in all quiescent ciliated cells tested, it did not stain cilia nor basal bodies neither *in vitro* nor

in vivo (Fig. 5, A and B). The staining obtained with the Proteintech antibody (TEKT1p) was also diffuse in cytoplasm and nucleus (Fig. 5C). No colocalization could be observed with AcTub (Fig. 5C, arrows), showing that tektin-1 does not localize to the axoneme of primary cilia. However, bright spots were observed at the base of cilia with the Proteintech antibody in all cell lines tested (Fig. 5C, arrowheads and data not shown), suggesting the localization of tektin-1 at the basal body/centrosome.

These bright spots decorated by the proteintech antibody colocalized with γ -tubulin (Fig. 6A) confirming that tektin-1 is present at the centriolar region. Though the presence of tektin-1 at the centrosome has been previously reported with another antibody (papier chinois), nonspecific centriolar staining is often observed with rabbit polyclonal antibodies. We then analysed the distribution of a tektin-1 GFP fusion (GFP-TEKT1) upon transient expression in RPE1 (Figs. 6B-D, S3A) or IMCD3 cells (Fig. S3B). Different distribution patterns were observed depending on the expression level of GFP-TEKT1 which was found either in small aggregates, filaments and even more complex structures in the cytoplasm of high expressing cells (Fig. S3, A and B). In low expressing cells, GFP-TEKT1 was present on two bright spots close to the nucleus colocalizing with centrosomal markers. GFP-TEKT1 spots were surrounded by pericentrin (Fig. 6B) and present between centrin and rootletin staining (Fig. 6C), indicating that GFP-TEKT1 localizes to the proximal region of centrioles, in agreement with colocalization of endogenous Tektin-1 with γ -tubulin (Fig. 6A). In addition, GFP-TEKT1 could not be detected in cilia in transfected ciliated RPE1 or IMCD3 cells (Fig. S3, A and B), also in agreement with staining obtained with the two different antibodies for the endogenous protein (Fig. 5 and data not shown). Altogether these data indicate that tektin-1 is present at the centrosome in cycling cells as well at the basal body but not at the axoneme of primary cilia.

To evaluate the impact of the identified *TEKT1* variations (p.Arg244* (R244X) and p.Lys311Asn (K311N)), we tested their effect on the subcellular localization of tektin-1 (Fig. 6D). We first tested the impact of each variation on the distribution of transfected tektin-1 GFP fusion (GFP-TEKT1) in RPE1 cells. As described above, while WT GFP-TEKT1 localized at the centrosome where it colocalized with pericentrin, both R244X and K311N variants remained diffuse in the cytoplasm with no or little accumulation at the centrosome

(arrowheads, Fig. 6D). As an internal control, we analysed the effect of the R232Q variation (p.Arg232Gln), a frequent variation (c.805C/T; rs115985064; 0.002159 in ExAc) predicted as damaging by polyphen and SIFT (0,837/0.03) identified in several patients from our cohort. The resulting GFP fusion (GFP-R232Q) showed a distribution similar to WT GFP-TEKT1, with two bright spots colocalizing with pericentrin, showing that the defect in centrosomal localization is specific to the variations identified in NPH1848 affected individual.

The consequences of *TEKT1* variations were analysed in fibroblasts from the patient. Western-blot analysis indicated that the expression level of tektin-1 was decreased by approximately 50% in patient cells compared to controls (Fig. 7A). Interestingly, the truncated protein resulting from the truncating variation was not detected (R244X; expected size 22kDa). These results suggested that the truncated variation was not expressed due to possible RNA decay and/or protein instability.

The impact of patient variations on the distribution of tektin-1 was then investigated in patient fibroblasts. As expected from results obtained above, the staining observed with the proteintech antibody was globally fainter, including at the centrosome where the intensity of tektin-1 was significantly decreased compared to control cells (Fig. 7B,B'). In addition, in mitotic cells, both tektin-1 antibodies robustly stained the midbody as shown by the observed colocalization with citron rho-interacting kinase (CRIK; Fig. 7C and data not shown), a marker of the cleavage furrow and midbody (Madaule et al. 1998), in agreement with the previously reported localization of tektin-1 in mitotic cells (He, 2013). Again, tektin-1 staining at the midbody was significantly fainter in patient cells compared to controls (Fig. 7C, C'). Altogether these data show that the variations in *TEKT1* result in decreased expression of tektin-1 as well as in decreased localization to both centrosome and midbody.

Because of the impact of *WDR19* mutations on ciliogenesis, it was not possible to investigate the role of tektin-1 in ciliogenesis in cells from the affected individual. Therefore, we used a pool of 4 siRNA sequences (siTEKT1) to transiently knockdown expression of tektin-1 in RPE1 cells. As shown in Fig. 8A, expression of TEKT1 was strongly decreased in siTEKT1-treated cells compared to control cells transfected with a luciferase targeting sequence (siLuc). The effect of tektin-1 depletion on ciliogenesis was analyzed by immunofluorescence (Fig. 8B), as above (Fig. 4). Treatment with siTEKT1 resulted in a

decreased tektin-1 staining intensity at the basal body region (Fig. 8B, arrows, and Fig. 8C), further confirming the specificity of the Proteintech antibody staining at the centrosome. The proportion of ciliated cells and length of cilia were quantified based on AcTub staining. Whereas knockdown of tektin-1 expression did not affect the formation of cilia (Fig. 8D), cilia were significantly shorter in tektin-1-depleted cells compared to control siLuc treated cells ($2.2 \pm 0.67 \mu\text{m}$ versus $3.1 \pm 0.7 \mu\text{m}$ in controls; Fig. 8E). These results indicate that tektin-1 acts as a positive regulator of cilium length and therefore the identified variations in *TEKT1* may contribute to the observed ciliogenesis defects in cells from the affected individual.

Altogether these results show that tektin-1 localises at the basal body but not at the axoneme of primary cilia and seems to act as a positive regulator of cilium length. Variations in *TEKT1* result in a decreased expression of tektin-1 and have an impact on its localization likely contributing to primary cilia defects observed in cells from the affected individual.

Characterization of tektin-1 distribution and variations at motile cilia

Because the tektin family members were previously involved in cilia motility, the distribution of tektin-1 was analysed in bronchial multiciliated epithelial cells. The two antibodies were first tested on lung sections from a control foetus. A strong staining was observed at the apical region of the multiciliated cells partially colocalizing with AcTub (Fig. 9A and data not shown), showing that tektin-1 is present at the axoneme of motile cilia. The distribution of tektin-1 was then analyzed in the ciliated cells collected by nasal brushing (see above). Similar results were obtained with the two different tektin-1 antibodies. While tektin-1 was present all along the axoneme of cilia in cells from the control donor, it was completely absent from cilia in cells from the affected individual (Fig. 9, B and C). To test whether the lack of tektin-1 in cilia affected the subcellular localization of other axonemal proteins, we investigated the distribution of RSPH1 and DNALI1, two markers of radial spokes and inner dynein arms, respectively (Shetty et al. 2007; Pennarun et al. 1999). Both markers similarly colocalized in cilia in cells from control and affected individuals (Fig. 9D), indicating that loss of tektin-1 does not result in severe defects in ciliary composition. Therefore, to better understand the structural basis of the observed motility defect (video 1), transmission electron microscopy (TEM) was performed to analyse cilia at the structural level. No major defect could be detected in transversal sections of cilia in patient cells which

presented apparently normal organization of the axonemal microtubules and extra axonemal structures (Fig. 9E). However, in transverse sections of the apical region of multiciliated cells of the affected individual, few cilia were present and some of them were misoriented (Fig. 9F, arrows). In agreement with the rarefaction of cilia, some basal bodies were found in the apical region of the cytoplasm not docked at the apical plasma membrane (Fig. 9F, arrowheads).

In conclusion, our data show that ciliary motility defects in patient cells is associated with a specific lack of tektin-1 in cilia with no detectable ultrastructural defect of the axoneme.

Tektin-1 in Zebrafish

To investigate the role of tektin-1 in cilia *in vivo*, the expression of *tekt1* was knocked down in zebrafish using a morpholino oligonucleotide (MO) targeting the exon2-intron2 splice site. We looked at phenotypes classically observed in ciliopathy models including body axis curvature, cysts in the pronephros and also phenotypes associated with defects in motile cilia such as defects in otolith formation in the otic vesicle. *Tekt1* morphants presented a mild body curvature phenotype (22.72%; Fig. 10A), cysts in glomeruli (40.90%; Fig. 10B, arrow) and heart defects such as failure of the heart to loop, , midline positioning or heart string (42.42%; Fig. 10C). These phenotypes were not observed in control morphants. A relatively high mortality rate was also observed in *tekt1* morphants (21.21%), in agreement with the observed heart defects. To further confirm laterality defects associated with heart looping defects in *tekt1* morphants, whole mount *in situ* hybridisation experiments were performed to analyse the expression pattern of the L-R asymmetry marker *southpaw (spaw)*, at the 18-20 somite stage. Normal “left-sided” expression of *spaw* was detected in approximately 80% of both WT control and control morpholino-injected embryos (Fig. 10D), whereas *spaw* expression was aberrant in 50% of *tekt1*-MO embryos (bilateral, absent or localised to a discrete region within the developing tail; Fig. 10D). Interestingly, the most relevant observation in the context of motile cilia function was that the *tekt1* morphants presented incorrect patterning and positioning of the otoliths in the otic vesicle. Indeed, *tekt1* morphants presented fused, misshapen or supernumerary otoliths

(Fig. 10D, arrows and arrowheads, respectively), phenotypes previously associated with motile cilia defects (X. Yu et al. 2011).

These results show that loss of *tekt1* is associated with numerous ciliopathy-associated phenotypes including laterality defects and incorrect patterning and positioning of the otoliths, in addition with a role of *tekt1* in ciliary motility.

Table 1. Pathologic findings in patients with c.3533G>A [p.R1178Q] mutation in WDR19

patients	kidney	eyes	liver	bones	Mental disability	Bronchial defects	variations	PP2 / SIFT	references
NPH1848	ESRD 7 months	x	x	x	x	x	He : p.R1178Q	0.948/0.26	
NPH1021	CRF 3	x	x	x			Ho : p.R1178Q	0.948/0.26	
NPH1552	ESRD 24	x					He : p.R1178Q He : p.C542G	0.948/0.26 0,082/0,37	
1-1	ESRD 6		x				He : p.R1178Q He : p.E1235K	0.948/0.26 0.999/0	
1-2	ESRD 9 proteinuria		x				He : p.R1178Q He : p.E1235K	0.948/0.26 0.999/0	
1-3	CRF 8 proteinuria		x				He : p.R1178Q He : p.E1235K	0.948/0.26 0.999/0	J. M. Lee et al. 2015
2	ESRD 15 proteinuria	x	x				He : p.R1178Q He : p.G495C	0.948/0.26 1/0.01	
3	ESRD 5 months		x				He : p.R1178Q He : p.L618P	0.948/0.26 0.978/0.01	
4	ESRD 2	x	x				Ho : p.R1178Q	0.948/0.26	
5	ESRD <1	x	x	x			Ho : p.R1178Q	0.948/0.26	(Halbritter, Porath, et al. 2013)
6	ESRD <1	x	x				He : p.R1178Q He : c.3565+1G>A	0.948/0.26 -	

ESRD: end-stage renal disease; CRF: chronic renal failure; He: Heterozygote; Ho: Homozygote; PP2: Polyphen 2.

Materials and Methods

Patients Mutation Screening using “Ciliome” sequencing

Written informed consent was obtained from participants or their parents, and the study was approved by the Comité de Protection des Personnes “Ile-De-France II”.

Ciliary exome-targeted sequencing and bioinformatics filtering was conducted using custom SureSelect capture kits (Agilent Technologies) targeting 4.5 Mb of 20,168 exons (1,221 ciliary candidate genes), including *WDR19* and *TEKT1* (S. Thomas et al. 2012; Halbritter, Bizet, et al. 2013; Failler et al. 2014). In brief, SureSelect libraries were prepared from 3 µg of 300 genomic DNA samples sheared with an S2 Ultrasonicator, according to the manufacturers’ instructions. Precapture SOLiD libraries were prepared without any barcode. The SOLiD molecular barcodes for traceable ID of samples were added at the end of the capture step. The Ovation Ultralow System (NuGEN Technologies) was used to prepare HiSeq2500 precapture barcoded libraries. The ciliome capture by hybridization was performed on a pool of 10–16 barcoded precapture libraries. Sequencing was performed on pools of barcoded ciliome libraries (64 barcoded ciliome libraries per SOLiD FlowChip,) using SOLiD5500XL (Life Technologies). Paired-end reads were generated (75 + 35 for SOLiD) and mapped on the human genome reference (NCBI build37/hg19 version) using Burrows-Wheeler Aligner or mapread (SOLiD). Downstream processing was performed with the Genome Analysis Toolkit, SAMtools, and Picard Tools, following documented best practices (Van der Auwera et al. 2013). All variants were annotated using a software system developed by the Paris Descartes University Bioinformatics platform. The mean depth of coverage obtained was >90× and >89% of the exome was covered at least 15×. Different filters were applied to exclude all variants located in nonexonic regions, pseudogenes, UTRs, or known polymorphic variants with a frequency ~1% (i.e., present in databases such as dbSNP and 1000 Genome Projects, and all variants identified by in-house exome sequencing of 5,150 exomes and 1,020 ciliomes). The functional consequence of missense variants was predicted using the SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html) and PolyPhen2 programs (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

To validate the variations identified by ciliome sequencing and their segregation within the family, Sanger sequencing was performed on genomic DNA and cDNA using Big Dye Terminator V3.1 kit (Applied Biosystems) on a ABI Prism 3500x1 Genetic Analyser. Extended haplotype analysis using the four microsatellite markers indicated in *WDR19* sequence was performed using Sanger sequencing.

Cell Culture

Telomerase-immortalized retinal Pigment Epithelial cells (RPE1, ATCC) and Inner Medullary Collecting Duct cells (IMCD3) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)/F:12, (Gibco[®], Life Technologies) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), glutamine and penicillin/streptomycin. Fibroblasts from affected and control individuals were cultured in OptiMEM (Gibco[®], Life Technologies) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), uridine, glutamine, fungizone and penicillin/streptomycin. To induce ciliogenesis in RPE1 or fibroblasts, cells were grown to confluence in basic cell culture conditions and then transferred in media without serum for 48 hours. In IMCD3 cells, ciliogenesis was induced by growing the cells two days postconfluence in the presence of serum. HeLa cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) (Gibco[®], Life Technologies) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), glutamine and penicillin/streptomycin.

RNA extraction and RT-PCR

mRNA was isolated from affected individual fibroblasts using Qiagen Extraction Kit and then treated with DNase I. Five micrograms of total RNA was reverse-transcribed using Superscript II (Life Technologies).

Plasmids and antibodies

A plasmid encoding wild-type tektin-1 GFP fusion (GFP-TEKT1) was purchased from gene Copoeia (clone n° EX-T3486-lv103). The identified patient variations were introduced by site directed mutagenesis using *Pfu* Turbo RNA polymerase (Agilent). The presence of the mutations was verified by Sanger sequencing.

Mouse monoclonal antibodies (Mabs) against α -tubulin (T5168) and acetylated-tubulin (clone 6-11B-1) were from Sigma. Mab against GAPDH (MAB374) was from Millipore and Mab against citron-Kinase (CRIK; 611376) was from Bioscience. Mabs against IFT144 (H00057728) and DNALI1 (H00007802-B01P) were from Abnova. Goat polyclonal antibodies against γ -tubulin (sc-7396) and rootletin (sc-67824) were from Santa Cruz. Rabbit polyclonal antibodies against tektin-1 were from either Sigma (HPA044444) or Proteintech (18968-1-AP) and the ones against Arl13b (17711-1-AP), ACIII (sc-588), pericentrin (ab4448) and RSPH1 (HPA017382) were from Proteintech, Santa Cruz, Abcam and Sigma, respectively. Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (Alexa488, Alexa546 and Alexa647) were from Life Technologies (Molecular Probes).

Transfections

Plasmids: Transient transfections of each of encoding expression plasmids were performed using FuGENE[®] HD Transfection (Promega) and 0.5 μ g of plasmid. Cells were cultured in OptiMEM, reduced serum medium, (Gibco[®], Life Technologies) for 24 hours.

siRNA: Pool of 4 siRNA targeting Human *TEKT1* and control non-targeting pools were purchased from Dharmacon (GE Healthcare, #83659). Transfections were performed using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Life Technologies) with 80nM of siRNA. Cells were cultured for 48 hours in DMEM F:12/10% FBS, without antibiotics. After which, fresh DMEM F:12 without FBS nor antibiotics was added for 48 hours to induce ciliogenesis before being fixed and processed for immunofluorescence.

Immunoblotting

Cells were extracted in buffer containing 50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.5% NP40, 1% Triton X-100 and 10 mM protease inhibitor cocktail (Sigma), for 30 mins at 4°C. After centrifugation, cleared lysates were separated by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto polyvinylidene fluoride transfer membranes (PVDF, GE Healthcare). Immunoblotting was performed using the indicated primary antibodies and revealed using the ECL⁺ Detection Kit (GE Healthcare).

Immunofluorescence and Immunohistochemistry

Cells grown on coverslips were fixed on ice either in methanol (MetOH, -20°C) for 5 mins, or in 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 mins. Fixed cells were incubated with primary antibodies in PBS containing 0.1% Triton-X-100 (Sigma) and 1 mg/mL bovine serum albumin (BSA, Sigma) for 1h at room temperature. Then cells were incubated for 30 mins at room temperature in PBS-BSA containing secondary antibodies. Nuclei were stained with Hoechst (#33342, Sigma) at room temperature during 5 mins. Finally coverslips were mounted on microscope slides in mowiol.

Sections from human tissues embedded in OCT and respiratory epithelial cells obtained by nasal brush biopsy, spread onto glass slides and fixed in acetone for 10 min were treated with PBS–0.1% Tween 20–3% BSA–10% donkey serum for 1h and incubated in the same buffer overnight at 4°C with primary antibodies. Secondary antibodies were incubating for 1h at room temperature, Hoechst (#33342, Sigma) was used to label the nuclei and slides were mounted with FLUOPREP (BioMerieux sa, Marcy L’Etoile, France).

Samples were examined with an epi-illumination microscope (DMI 6000, Leica) with a cooled charge-coupled device (CCD) camera (MicroMax, Princeton Instruments). Images were acquired Leica software and processed with ImageJ and Photoshop CS2 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA).

Image and statistical analyses

The percentage of ciliated cells, the length of primary cilium and staining intensities were quantified using fluorescence images and ImageJ as previously described (Ghossoub et al. 2013; Failler et al. 2014). Statistical analyses were performed by using either a *t*-test for two-group comparisons or a One-way ANOVA test followed by Mann-Whitney post-test for three-group comparisons with GraphPad Prism software. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

TEM

Nasal biopsies were taken from the middle turbinate. The sample was fixed in 2.5% glutaraldehyde, washed with 1.3% osmium tetroxide and embedded in 1,2-epoxypropan-epon mixture (1:1) at 4 °C overnight, as previously described (Jeanson et al. 2015). After

polymerization, several sections were picked out onto copper grids. The sections were stained with Reynold's lead citrate. TEM was performed with the Philips CM10.

Human kidney and nasal cells or biopsies were obtained from Necker-Enfants Malades and Trousseau hospitals (Paris, France), respectively. Guidelines to the declaration of Helsinki were followed.

Zebrafish

Breeding and embryo collection: Adult zebrafish were maintained in system water at 28°C, pH 7 and conductivity of 500µS on a 14 h light/10 h dark cycle. They were bred by natural crosses, and embryos were collected and staged as in Kimmel et al. 1995. Embryos were maintained at 28°C in embryo medium (0.1 g/L Instant Ocean Sea Salts, 0.1 g/L sodium bicarbonate, 0.19 g/L calcium sulphate, 0.2 mg/L methylene blue, H₂O) until the desired developmental stage was reached. Embryos were manually dechorionated.

Morpholino: To knockdown the expression of *tektin-1*, the *tekt1* splice blocking morpholino was synthesized targeting the exon2-intron2 boundary, and a 5-base pair mismatch morpholino was designed as a negative control. Dose-response experiments were initially performed to determine the optimum concentration of morpholino which produced no toxic effects. A 4ng/embryo dose of the splice morpholino provided a reproducible phenotype, whereas injection of the 5 base-pair mismatch control did not result in any detectable phenotype at the same dose. The morpholinos were injected into embryos at the 1-2 cells stage with phenol red as a vehicle to visualise injections. Morpholino sequences were designed by and ordered from GeneTools, LCC. After microinjection, embryos were maintained as described above. Embryo development was evaluated at 24 hpf, 48 hpf, and 72 hpf.

Whole-mount in situ hybridisation: T7 was used for *tekt1* transcription and digoxigenin labelling. For whole-mount in situ hybridization, embryos were fixed in 4% paraformaldehyde overnight at 4°C and processed as described in Thisse et Thisse 2008.

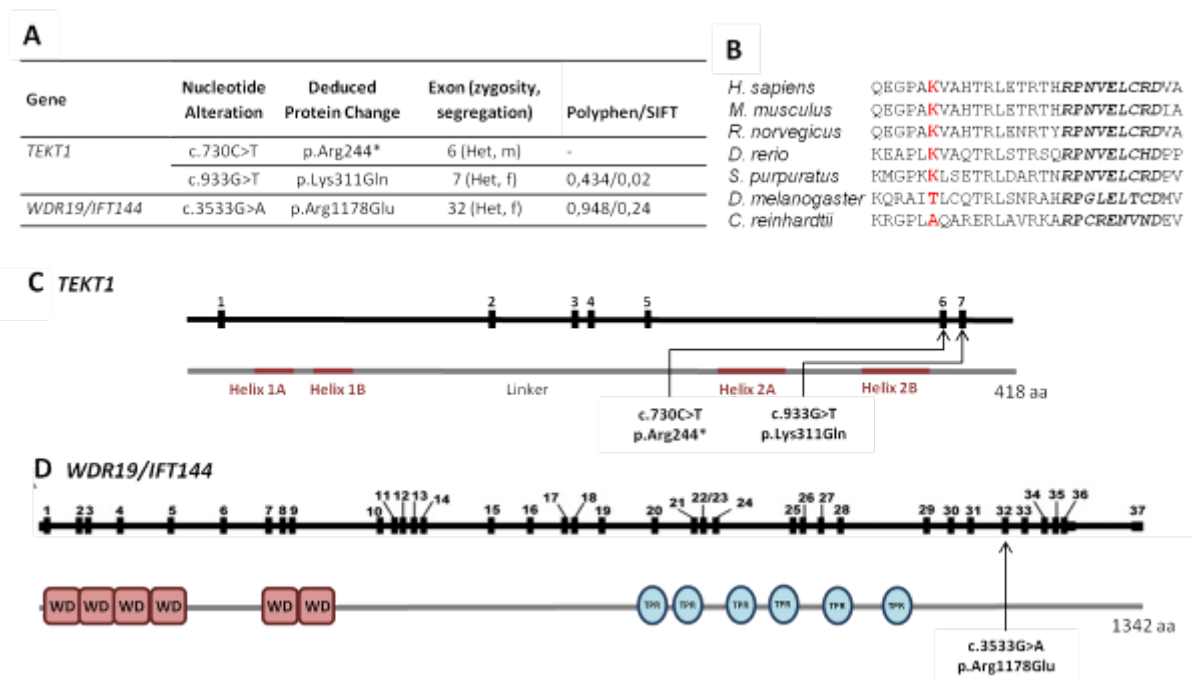


Figure 1: Identification of damaging heterozygous mutations in two different genes, *TEKT1* and *WDR19*.

A. Variations, translational changes and predicted pathogenicity according to SIFT and Polyphen2 algorithms are indicated for both genes. **B.** Partial protein alignment of *TEKT1* shows evolutionary conservation of the lysine 311 affected in the patient (red) and of the nonapeptide characteristic of all tektins (italic bold dark) **C-D.** Exon structure of human *TEKT1* (**B**) and *WDR19* (**C**) cDNA and domain structure of the respective protein. Positions of variations are indicated.

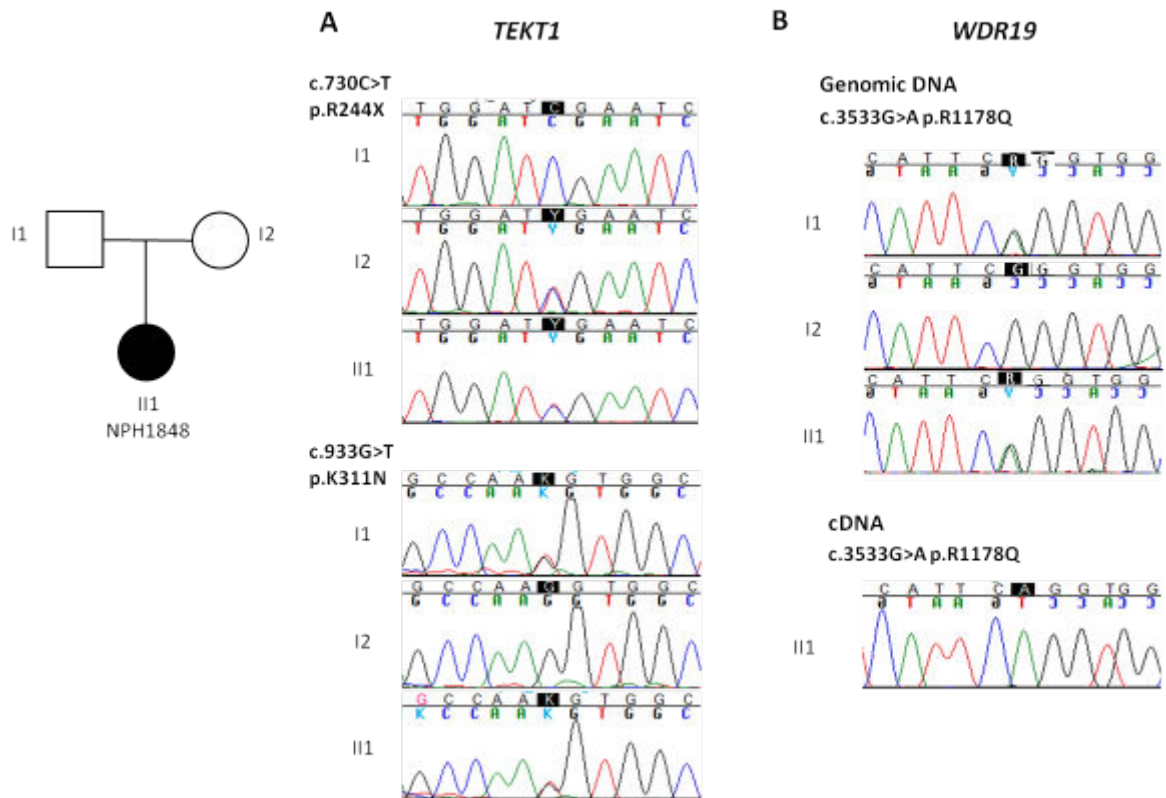


Figure 2. Segregation of the recessive variations in *TEKT1* and *WDR19* in the affected individual.

A. Segregation of both *TEKT1* variations. **B.** Segregation of genomic *WDR19* variation and c.3533G>A variation in *WDR19* in patient cDNA. Sequencing traces are labeled according to the numbering in the family pedigree shown on the left. Mutated nucleotide positions are boxed in black.

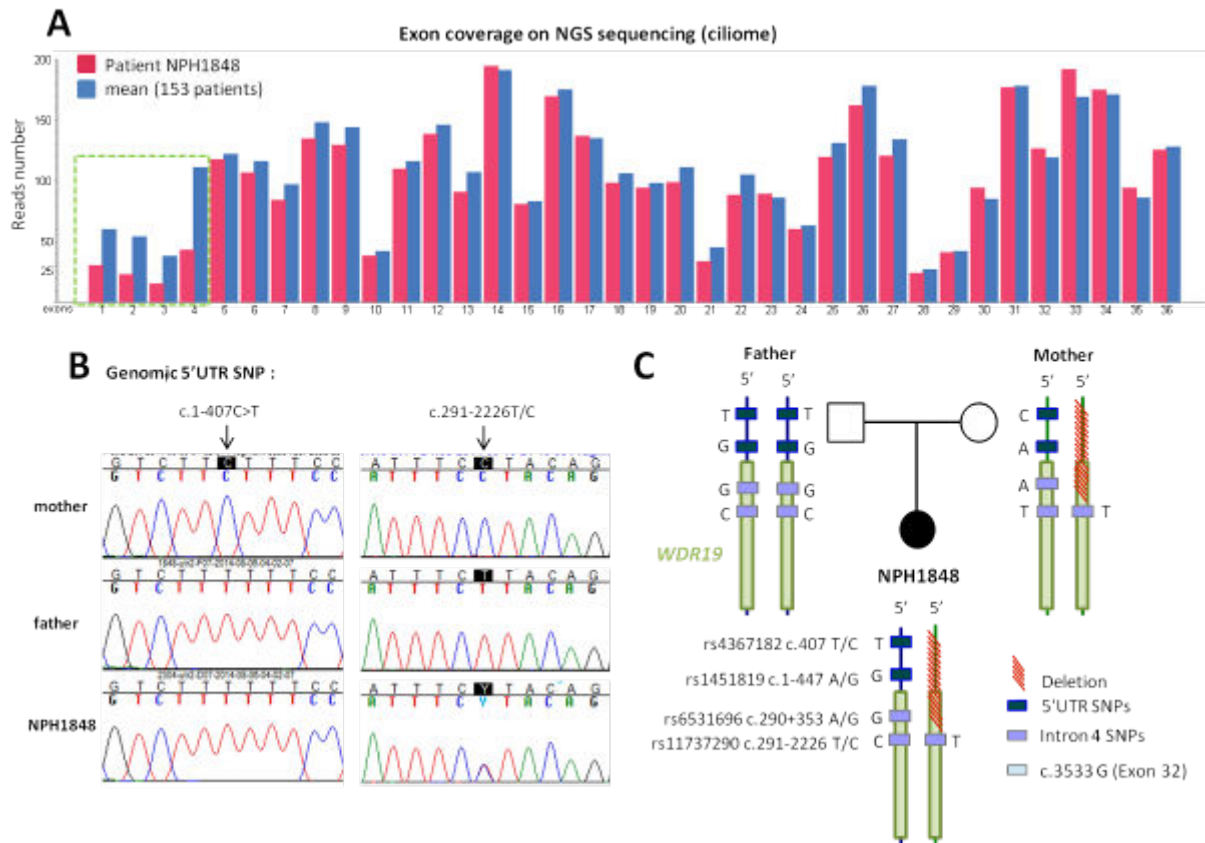


Figure 3. The affected individual carried a heterozygous deletion in the 5'UTR region of *WDR19* inherited from her mother.

A. Characterization of the extent of the deletion in *WDR19* in patient DNA based on reads number for each exon of *WDR19*. Numbers of reads for each exons for the affected individual (pink bars) are compared to the mean number of reads in our patient cohort (153 patients, blue bars). **B.** Sequencing traces for the two flanking SNPs, c.1-407 C/T (rs4367182) and c.291-2226 T/C (rs11737290), are shown. **C.** *WDR19* haplotype in the family.

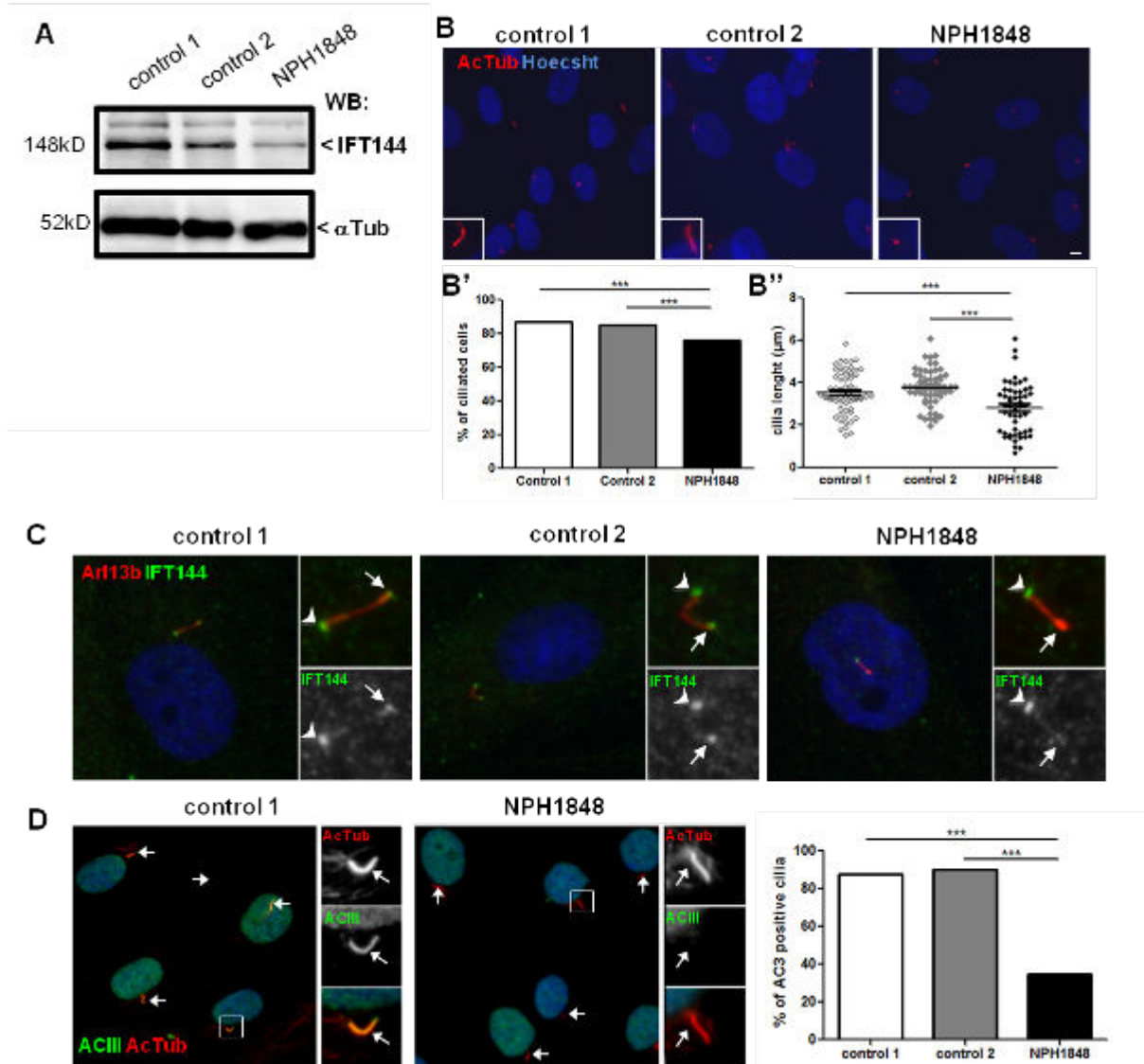


Figure 4. Fibroblasts from the affected individual show typical IFT-A defects.

A. Cells lysates from fibroblasts from two unrelated controls and from the affected individual (NPH1848) were analyzed by western-blot using antibodies against IFT144 and α tubulin as a loading control. **B.** Fibroblasts from control and affected individuals were starved for 48 hours to induce ciliogenesis and stained with acetylated tubulin (AcTub, red) in order to quantify ciliated cells (**B'**) and measure the length of cilia (**B''**) as indicated in Material and Methods. Insets show higher magnifications of representative cilia indicated by white squares in the corresponding images. **C.** Fibroblasts from control and affected individuals were starved for 48 hours to induce ciliogenesis and stained for Arl13b (ciliary membrane, red) and IFT144 (green). Arrows stress distal ciliary tips. **D.** Cilia in control and affected individuals fibroblasts were stained for acetylated tubulin (AcTub, red) and for adenylyl cyclase III (ACIII, green). Insets show higher magnifications of representative cilia stressed by arrows. (**B and D**) [***: $p < 0.001$] was calculated with GraphPadPrism Software from $n=3$ independent experiments *via t*-test for ciliogenesis (**B'**) and ACIII staining (**D'**) and *via* Dunn's Multiple Comparison Test following the Kruskal-Wallis ANOVA test for cilia length (**B''**).

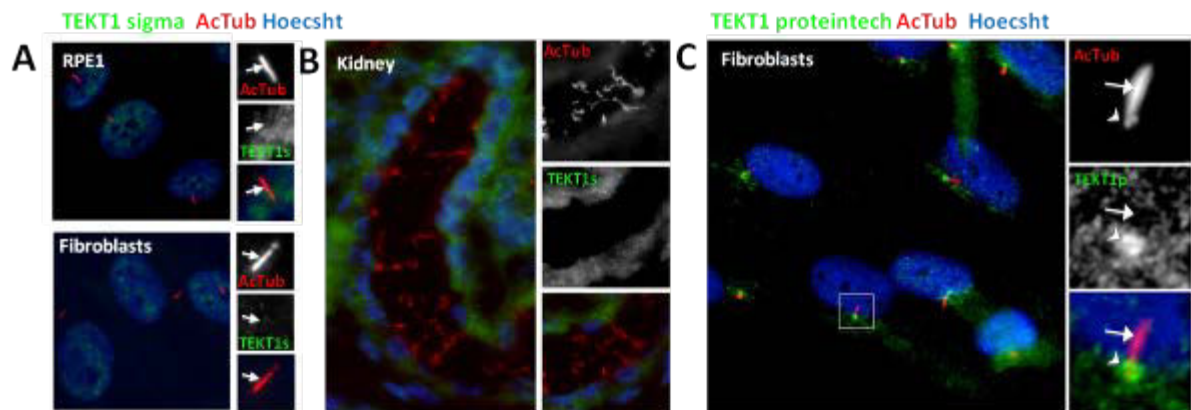


Figure 5. Subcellular localisation of endogenous tektin-1.

A-C. Ciliated RPE1 cells (A), kidney biopsy (B) and control fibroblasts (A and C) were processed for immunofluorescence with antibody against tektin-1 from either Sigma or Proteintech (TEKT1s and TEKT1p, respectively; green) and acetylated tubulin (AcTub, red). Higher magnifications of representative cilia are shown in the right panels where the axoneme and base of cilia are stressed by arrows and arrowheads, respectively.

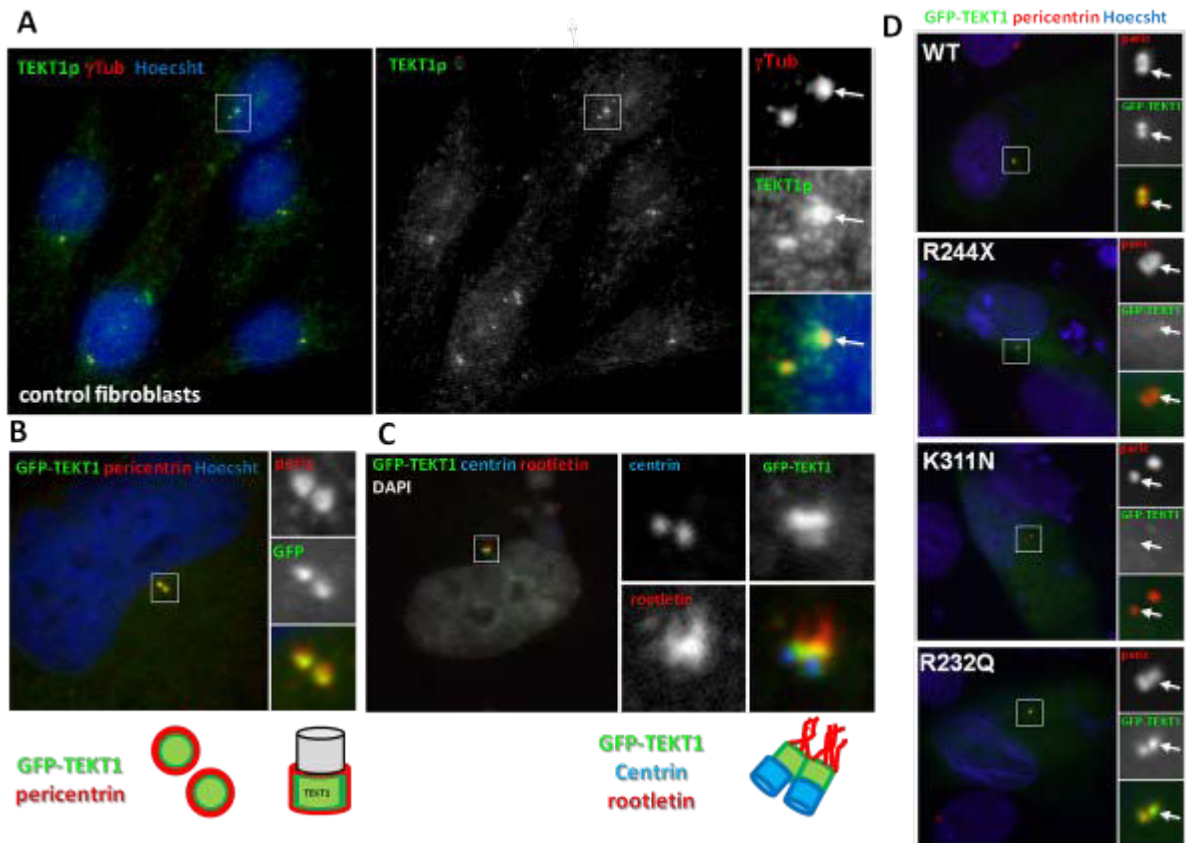


Figure 6. The localization of tektin-1 at the centrosome is affected by the identified variations.

A. Cycling fibroblasts were processed for immunofluorescence with the Proteintech antibody against tektin-1 (TEKT1p, green) and γ -tubulin (red). Higher magnifications of representative centrosomes are shown in the right panels where γ Tub staining is stressed by arrows. **B-C.** RPE1 cells were transfected with WT GFP-TEKT1 encoding constructs, fixed and stained with pericentrin (peric, red; **B**) or centrin (blue, **C**) and rootletin (red, **C**). Higher magnifications of the centrosome-associated staining are shown in the right panels and a schematic representations of the centrosome structural organization are indicated with the localization of the different centriolar subdomains markers. **D.** RPE1 cells were transiently transfected (Fugene, Promega) with plasmids encoding for GFP-tagged wild-type (WT) or c.730C>T/p.Arg244*(R244X) or c.933G>T/p.Lys311Asn (K311N) or c. p.Arg232Gln (R232Q) *TEKT1* variants, fixed in methanol and stained for pericentrin (peric, red) to mark the centrosome. Higher magnifications of representative centrosomes are shown in the right panels where centrioles stained with pericentrin are stressed by arrows.

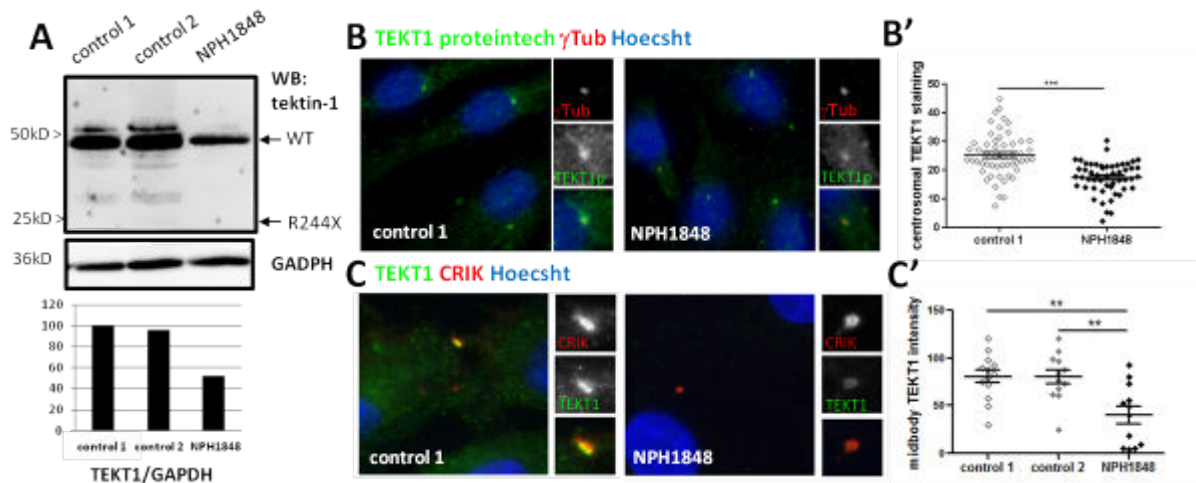


Figure 7. Centrosomal and midbody targeting of tektin-1 is affected in fibroblasts from the affected individual.

A. Cells lysates from fibroblasts from two unrelated controls and from the affected individual (NPH1848) were analyzed by western-blot using antibodies against tektin-1 (Sigma) and GADPH as a loading control. **B.** Cycling fibroblasts from control and affected individuals were stained for the centriolar marker γ -Tubulin (γ Tub, red) and tektin-1 (Proteintech, green). Insets show higher magnification of representative centrosomes. Tektin-1 staining intensity at the centrioles was quantified by ImageJ (normalized arbitrary units, one representative experiment out of 2, [***p<0.0001] was calculated *via t*-test). **C.** Fibroblasts were serum-starved for 24 hours and then put back in serum rich medium for additional 24 hours to synchronize their entry into mitosis and then fixed and stained with antibodies against the midbody marker citron-kinase (CRIK, red) and against tektin-1 (Sigma, green). Insets show higher magnification of representative midbody. Tektin-1 staining intensity at the midbody was quantified by Image J (normalized arbitrary units, one representative experiment out of two, [**p<0.01] was calculated via Newman-Keuls Multiple Comparison Test following the Bartlett's test for equal variances).

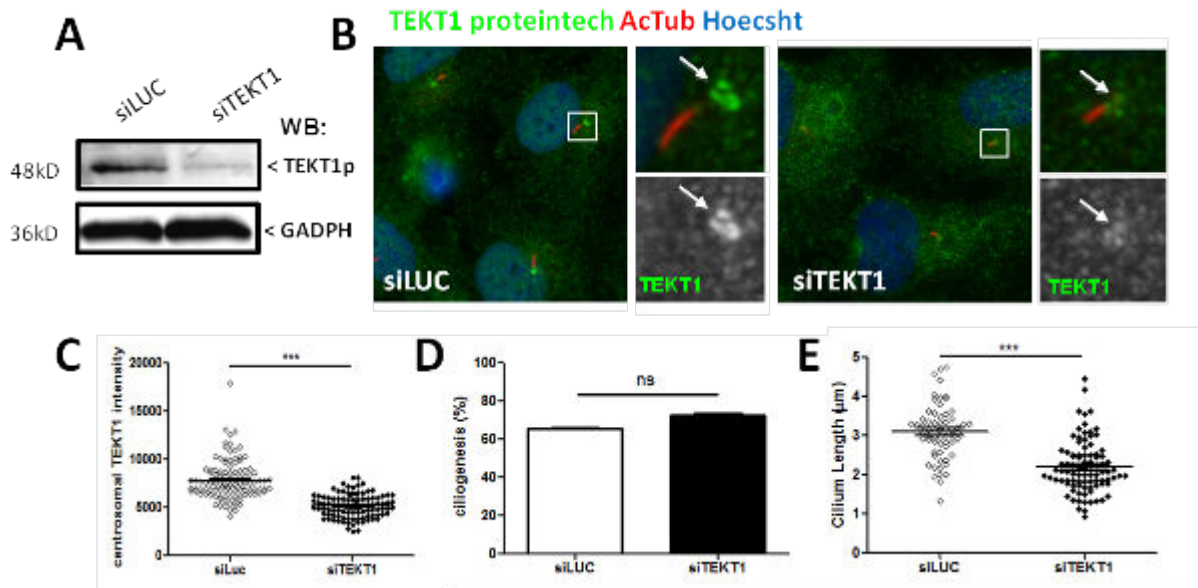


Figure 8. Tektin-1 is a positive regulator of cilium length.

A. RPE1 cells were treated with a control luciferase-targeting siRNA (siLUC) and a pool of 4 different siRNAs targeting *TEKT1* and analyzed by western blot using antibodies against tektin-1 (Proteintech) and GADPH as a loading control. **B.** RPE1 treated with the indicated siRNA for 48h were serum starved for 24h and stained for the ciliary marker acetylated-tubulin (AcTub, red) and for tektin-1 (Proteintech, green). Higher magnifications of representative cilia are shown in the right panels where tektin-1 signal is stressed by white arrows. **C.** tektin-1 intensity staining at the basal body was quantified by ImageJ from images obtained as in **B** (normalized arbitrary units, one representative experiment out of two). **D-E.** The percentage of ciliated cells and length of cilia in siRNA-treated cells was quantified based on AcTub staining using ImageJ similarly as in Fig.4. **C-E.** Statistical analysis [*** $p < 0.0001$] was calculated *via* Mann-Whitney test following the *t*-test.

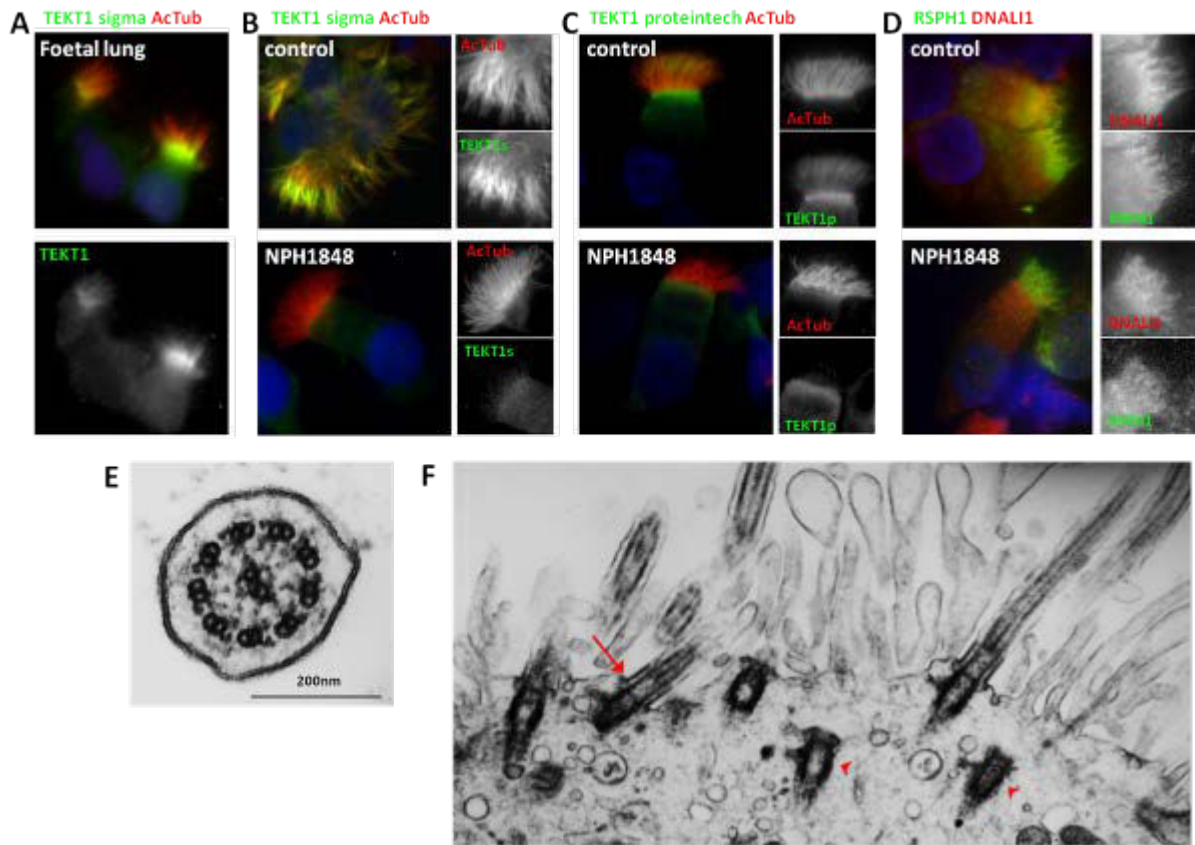


Figure 9. Affected individual multiciliated cells show alterations in tektin-1 ciliary composition

A. Lung section from a control fetus was stained for tektin-1 (Sigma, green) and acetylated tubulin (AcTub, red). **B-D.** Ciliated cells collected by nasal brushing from both affected and control individuals were labeled with acetylated tubulin (AcTub, red) and Sigma (green, **B**) or Proteintech (green, **C**) antibodies against tektin-1, or with RSPH1 (green) and DNAIL1 (red) (**D**). **E-F.** Transmission electron microscopy was performed on ciliated cells from the affected individual. Cross-sections of a representative cilium (**E**) and longitudinal section of the apical region of epithelial cells (**F**) are shown. Mispositioned basal-bodies and misoriented cilium are stressed by red arrowheads and arrows respectively.

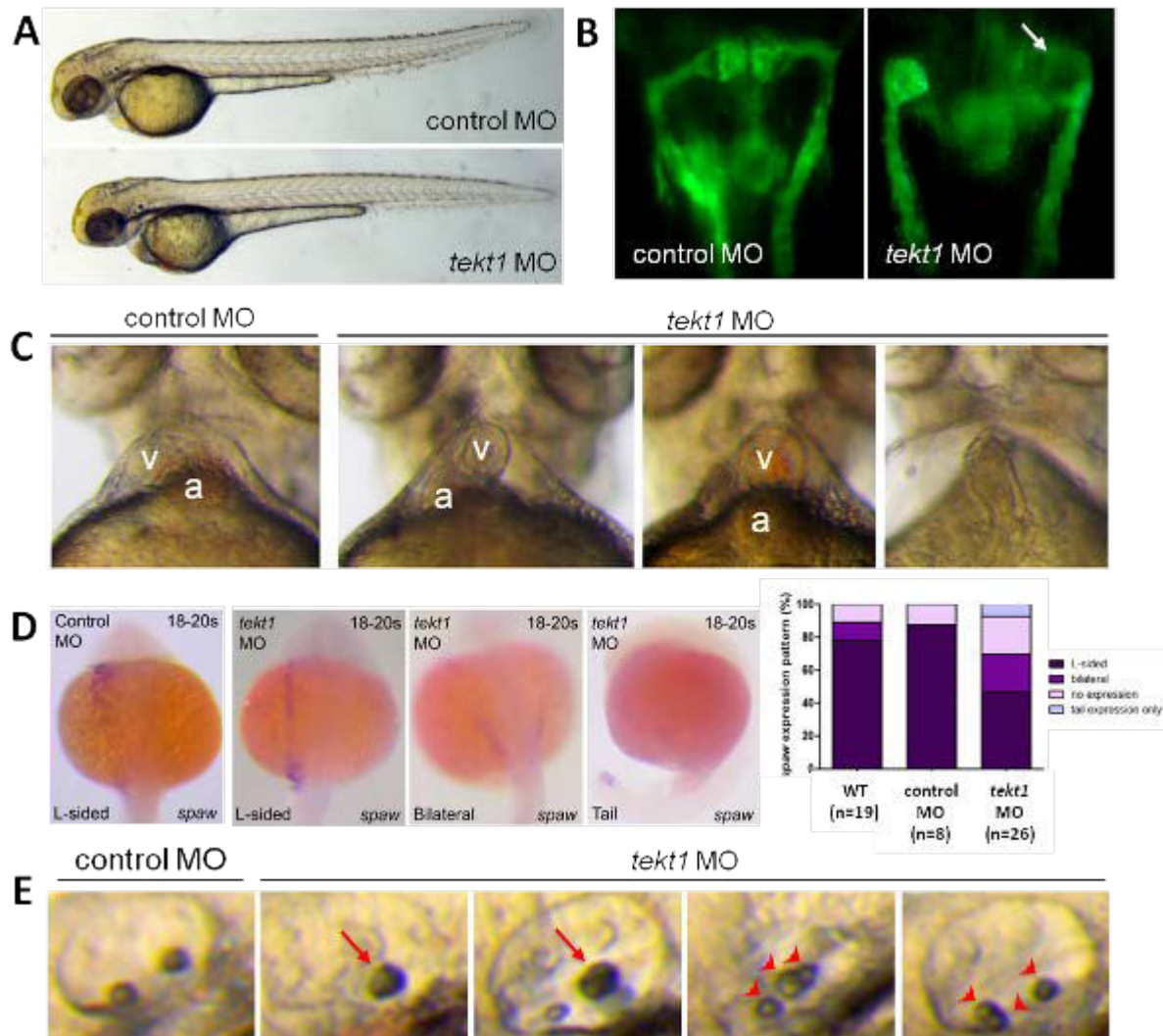
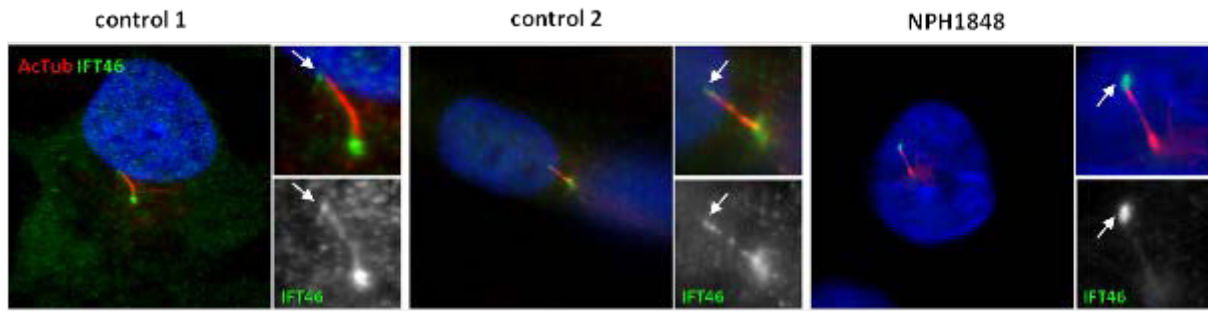


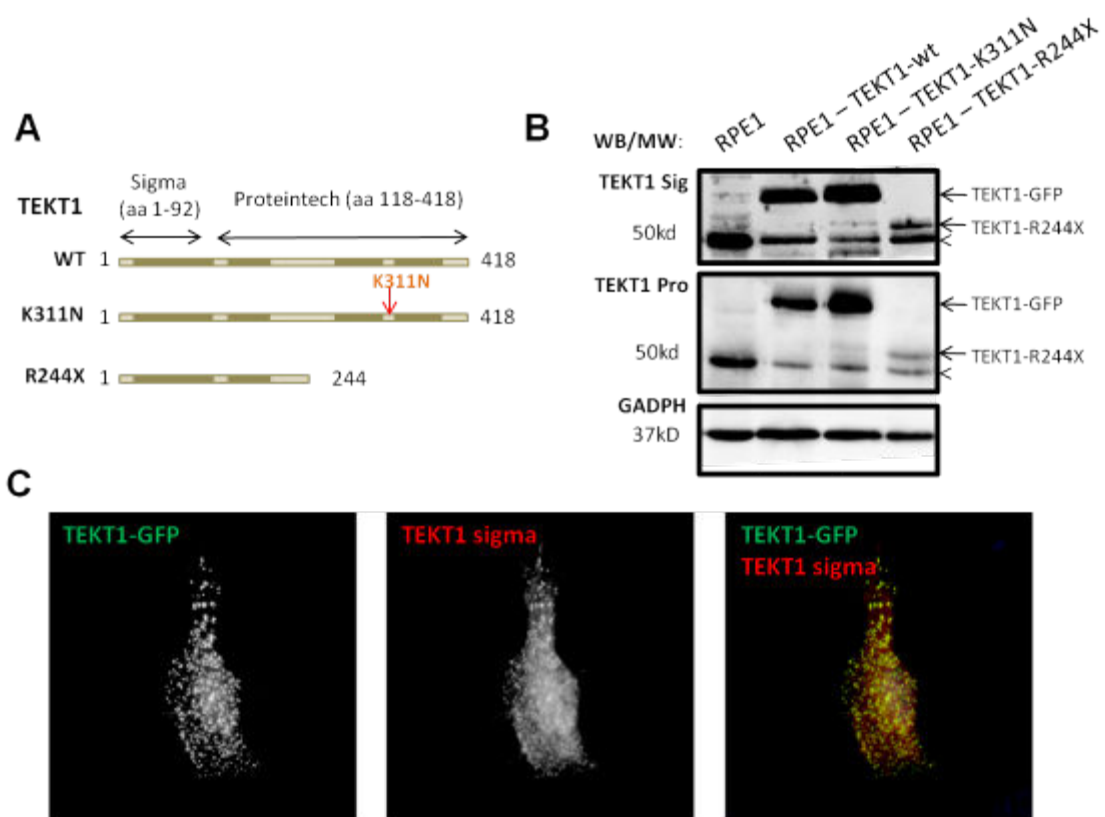
Figure 10. Ciliopathy-associated phenotypes in *tekt1* morphant embryos

A-D. Embryos from wt1b-GFP (Wilms Tumor 1b) stable zebrafish were injected with control and *tekt1* targeting morpholinos were analyzed for several phenotypes including body curvature (**A**), pronephric cysts (**B**), heart morphogenesis (**C**), laterality (**D**) and otolith localisation (**E**). **A.** A small proportion of *tekt1* morphants showed mild body curvature. **B.** Control and *tekt1* morphants were fixed and processed for fluorescence imaging. Some *tekt1* morphants showed pronephric cysts (arrow). **C.** Analysis of heart morphology showed that *tekt1* morphants presented defects in ventricle (v) and atrium (a) positioning. **D.** *In situ* hybridisation was realized for *southpaw* (*spaw*) at the 18-20 somites stage in control and *tekt1* morphants and *spaw* expression pattern was quantified. **E.** The analysis of the shape and number of otoliths in the otic vesicle showed that *tekt1* morphants embryos presented supernumerary (head arrows), misaligned and fused otoliths (arrows).



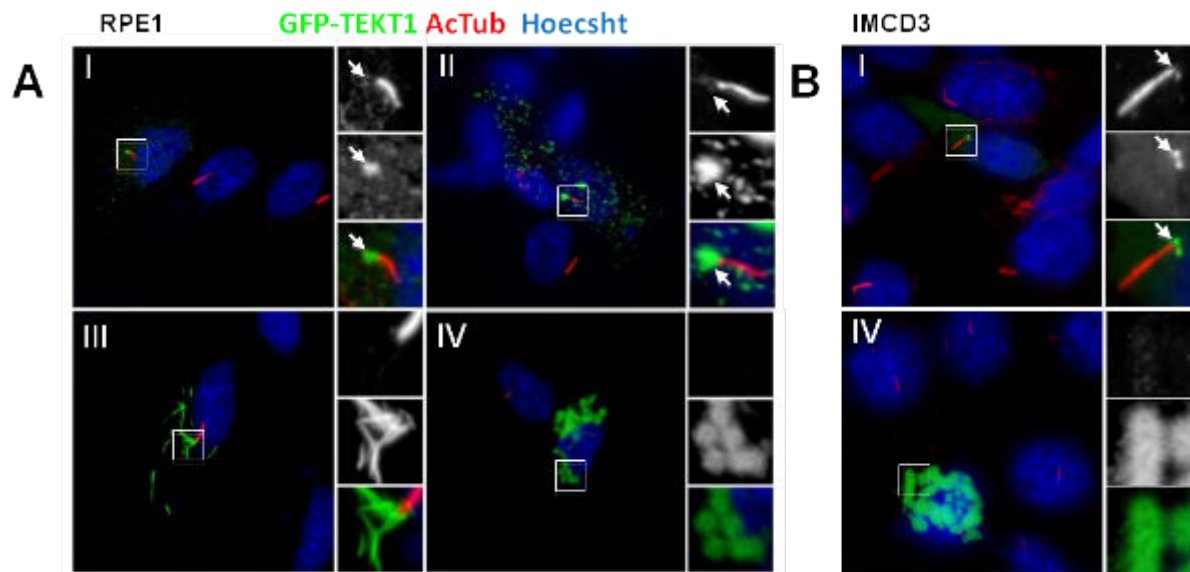
Supplementary Figure 1. IFT46, an IFT-B component, accumulates at the distal tip of cilia in patient fibroblasts.

Fibroblasts from control and affected individuals were starved for 48 hours to induce ciliogenesis and stained for acetylated-tubulin (ciliary axoneme, AcTub, red) and IFT46 (green). Arrows stress distal ciliary tips.



Supplementary Figure 2. Validation of tektin-1 antibodies.

A. Schematic representation of tektin-1 and variants and epitopes recognized by the Sigma and Proteintech antibodies. Both of the antibodies are able to recognize tektin-1 WT and mutated forms. **B.** Cells lysates from RPE1 non-transfected or transfected with either WT or mutated GFP-TEKT1 were collected and expression of tektin-1 GFP fusions was analyzed by immunoblotting with indicated tektin-1 antibodies. Expression of GAPDH was used as a loading control. **C.** RPE1 cells were transfected with WT GFP-TEKT1, fixed and stained with the Sigma antibody.



Supplementary Figure 3. GFP-TEKT1 localizes at the base of cilia and in cytoplasmic filaments

A-B. RPE1 (**A**) or IMCD3 (**B**) cells were transiently transfected with GFP-TEKT1 encoding construct fixed and stained for acetylated-tubulin (AcTub, red) to stain cilia. Insets show representative staining for cells expressing low (I), moderate (II), high (III) and very high (IV) levels of the GFP fusion. Arrows stress for GFP spots present at the base of cilia in low expressing cells.

DISCUSSION

Depuis la découverte de l'implication de la protéine ciliaire IFT88 dans la polykystose rénale, le nombre de gènes impliqués au niveau du cil et/ou du centrosome et dans les maladies génétiques n'a cessé d'augmenter. Les ciliopathies sont des pathologies dont l'hétérogénéité génétique est très importante alors que les gènes responsables n'ont été retrouvés que seulement chez la moitié des patients environ. Les nouvelles technologies de séquençage haut débit se sont révélées être d'excellents outils pour identifier le gène causal. Le séquençage ciblé des gènes ciliaires ou « ciliome » est un outil efficace qui a déjà permis d'identifier des mutations dans de nouveaux gènes chez des patients atteints de NPH ou de formes syndromiques associées.

Au cours de ma thèse, je me suis attachée à caractériser un nouveau gène candidat pour la NPH infantile, *CEP83*, et l'implication de mutations de *TEKT1* et de *WDR19/IFT144* chez une patiente présentant une ciliopathie complexe associant un syndrome de Saldino-Mainzer et une dyskinésie ciliaire bronchique.

***CEP83* : un nouveau gène associé à la NPH infantile**

Nous avons identifié des mutations dans un nouveau gène, *CEP83/NPHP18*, impliqué dans la NPH infantile. Comme la quasi-totalité des gènes *NPHP*, il code une protéine localisée au cil primaire et plus précisément au corps basal. C'est un constituant majeur des appendices distaux du centriole père, requis pour leur assemblage et indispensable aux étapes précoces de la ciliogenèse (Tanos et al. 2013; Joo et al. 2013). Ces mutations ont été identifiées chez 12 individus présentant de sévères lésions tubulointerstitielles au niveau des reins. Comme dans d'autres cas de NPH infantile (Tory et al. 2009), deux types d'altérations rénales sont retrouvées (Article 1, Figure 2). Des dilatations microkystiques des tubes associées à une atrophie tubulaire et une fibrose interstitielle sont observées chez certains patients tandis que d'autres patients présentent des tubes atrophiques avec un épaississement de leur membrane basale et une fibrose interstitielle massive, des phénotypes caractéristiques des

NPH plus tardives. De plus, une hypertension est retrouvée chez 2 patients (Article 1, Tableau 1) et a déjà été décrite dans les cas d'insuffisance rénale précoce (Tory et al. 2009). Six patients présentent aussi des atteintes neurologiques incluant un retard intellectuel, un hydrocéphalie ou une malformation cérébelleuse (Article 1, Tableau 1) qui ont aussi déjà été associées à la NPH infantile (Tory et al. 2009). Enfin, comme souvent dans les ciliopathies, d'autres symptômes sont également associés chez certains individus tels que des défauts ophtalmologiques (strabisme ou rétinite) ou hépatiques (cytolyse, choléstase, fibrose).

La plupart des patients portent des mutations non sens qui entraînent la délétion d'une grande partie de la protéine (p.Arg41*, p.Gln81*, p.Arg209*, p.Cys510*). Ces mutations tronquantes sont associées en *trans* avec, soit une mutation faux sens (p.Leu87Pro, p.Arg511Pro), soit une délétion d'un (p.Gln692del, p.Glu684del) ou quelques acides aminés (p.Pro112-Leu117del), soit la modification d'un site d'épissage (c.1344G>A) (Article 1, Tableau 1). Il est donc probable que la fonction de la protéine soit partiellement préservée chez les patients. Les mutations faux sens identifiées concernent des acides aminés très conservés (Article 1, Figure 1) qui sont modifiés en proline ce qui peut perturber les domaines coiled-coil (hélice- α) dans lesquels ils se trouvent. Toutefois, nous avons montré que les délétions présentes dans la partie C-terminale de CEP83 ont des effets plus drastiques, inhibant son recrutement au niveau du centrosome (Article 1, Figure 3A) ainsi que l'interaction avec ses partenaires, CEP164 et IFT20 (Article 1, Figure 4). Ces mutations sont localisées dans le domaine coiled-coil C-terminal (Article 1, Figure 1B, C) qui joue donc un rôle très important au sein de CEP83. Grâce aux techniques de microscopie à super-résolution, nSIM (Article 1, Figure 3C) et surtout STED (Article 1, Figure S10), j'ai pu confirmer que la diminution d'intensité de marquage de CEP83 (Article 1, Figure 3A), et d'autres constituants des appendices distaux (CEP164, FBF1), au centrosome était associée à des défauts de formation des appendices distaux. Les images de STED, qui permettent de visualiser chaque appendice distal, montrent l'absence d'un ou plusieurs appendices distaux dans les cellules patients qui perdent ainsi leur symétrie en 9 (Article 1 ; Figure S10). Ces résultats sont en accord avec le rôle clé de CEP83 dans l'assemblage des appendices distaux (Tanos et al. 2013; Joo et al. 2013). De plus, le défaut de formation des appendices est partiel, je n'ai que très rarement observé de centriole père totalement dépourvu de

marquage CEP164 ou FBF1. Cette observation est en accord avec les défauts partiels de ciliogenèse (Article 1, Figure 5). L'absence d'un ou de quelques appendices distaux seraient donc suffisants pour permettre l'ancrage aux membranes lors de la ciliogenèse.

L'analyse des images de STED m'a aussi permis de remarquer que quand seuls un ou deux appendices manquent, le diamètre de l'anneau formé par les appendices semble élargi dans les cellules de patients par rapport aux cellules contrôles (Article 1 ; Figure S10A). Cela laisse penser que la présence des 9 appendices distaux permet une certaine cohésion à l'ensemble qui forme ainsi une couronne plus resserrée. On pourrait aussi imaginer une certaine coopérativité lors de l'assemblage des appendices. En effet, les appendices formés dans les cellules de patients sont le plus souvent rassemblés à un même pôle (Article Figure 3B, C et Figure S10B).

Les études d'inactivation *in vitro* (RPE1) ont montré que CEP83 est indispensable à la formation des appendices distaux et au recrutement des autres constituants de ces structures au centriole père (CEP89, SCLT1, FBF1 et CEP164 ; Tanos et al. 2013). De manière intéressante, alors que la localisation de FBF1 et CEP164 semble être affectée par les mutations identifiées (Article Figure 3 et Figure 22), CEP89/CEP123 est toujours présent au niveau du centriole père dans les fibroblastes de patients (Figure S4B). Ainsi, le recrutement de CEP89 aux appendices distaux ne dépendrait pas du domaine coiled-coil C-terminal de CEP83, comme c'est le cas pour FBF1 et CEP164. Ces données sont en accord avec les données obtenues par Tanos et al (Tanos et al. 2013) indiquant que CEP89 et SCLT1-FBF1-CEP164 formeraient deux branchements structurels différents au sein d'un appendice distal.

Il aurait été très intéressant de pouvoir compléter l'ensemble de nos observations par des études basées sur la réexpression de formes portant les mutations identifiées chez les patients, dans un contexte où la forme endogène est invalidée, et pour pouvoir réaliser une analyse structure/fonction de CEP83. Cependant, contrairement à ce qui a été publié (Joo et al. 2013), l'expression de la forme sauvage de *CEP83* a un fort effet dominant négatif sur la formation des appendices distaux et la ciliogenèse et il ne nous a pas été possible de réaliser ces expériences dans les cellules RPE1, après traitement par ARN interférant (siRNA). L'utilisation d'une lignée cellulaire invalidée de façon stable pour *CEP83* et réexprimant les

formes humaines mutantes avec un faible taux d'expression pourrait peut-être éviter ce problème d'effet dominant négatif.

De façon intéressante, les mutations du coiled-coil C-terminal perturbent aussi l'interaction avec IFT20. IFT20 a été impliqué dans le transport vésiculaire entre l'appareil de Golgi et le cil primaire (Follit et al. 2006; Joo et al. 2013). Il est tentant de penser, qu'en plus du mauvais assemblage des appendices distaux, l'ancrage des vésicules qui fusionnent entre-elles pour former la vésicule ciliaire primaire (Lu et al. 2015) est altéré dans les cellules de patients. Toutefois, les défauts de ciliogenèse observés sont légers, suggérant que les centrioles pères sont capables de s'ancrer aux membranes et de permettre la ciliogenèse malgré les défauts des appendices distaux. De plus, bien que l'étude préliminaire des cellules de patients en microscopie électronique n'ait pas été concluante, les images obtenues indiquent que, lorsque les cellules sont ciliées, les corps basaux semblent correctement ancrés à la membrane plasmique et la poche ciliaire a un aspect normal. Nous n'avons pas pu observer d'images indiquant des défauts, même partiels, des étapes précoces de ciliogenèse.

Comme d'autres protéines impliquées dans la NPH, CEP83 est aussi présent au niveau du noyau. On peut alors penser que, comme CEP164 (Chaki et al. 2012), CEP83 pourrait être impliqué dans la réponse aux dommages de l'ADN, une hypothèse que nous n'avons pas testée. Des études complémentaires permettraient ainsi d'identifier les différents rôles de CEP83 et de mieux appréhender la physiopathologie de la maladie. En effet, les fonctions non ciliaires de CEP83, comme des autres NPHP, pourraient être à l'origine de la fibrose caractérisant les reins des patients atteints de NPH. De plus, l'identification des domaines protéiques de CEP83 impliqués dans ces fonctions non ciliaires éventuelles pourrait permettre d'expliquer les différences de phénotypes rénaux observées entre les patients (Article 1, Figure 2).

La moitié des patients présente une atteinte neurologique plus ou moins grave (Article 1, Tableau 1) suggérant que certaines mutations de CEP83 ont également des conséquences au niveau du système nerveux central. Les défauts cérébraux observés dans les ciliopathies sont principalement dus au dysfonctionnement de la voie Sonic-Hedgehog (Shh ; Aguilar et al. 2012). L'implication de CEP83 dans cette voie n'a jamais été étudiée et la localisation de

l'adénylate cyclase 3 (AC3) n'est pas modifiée dans les cellules de patients (données non montrées), ce qui indique que les mutations de *CEP83* ne provoquent pas les mêmes défauts de signalisation ciliaire que les mutations d'autres gènes *NPHP* (voir chapitre I.5). Toutefois, les mutations sont responsables de défauts de ciliogenèse (Article 1, Figure 5) qui peuvent être suffisants pour expliquer des perturbations dans la voie de signalisation Hh et les atteintes neurologiques. L'étude du niveau d'expression des cibles de la voie Hh (ex : GLI1 et Ptch) et du recrutement de Smo au cil dans les fibroblastes de patients permettraient de confirmer cette hypothèse.

Ainsi, 12 mutations ont été rapportées chez 10 patients grâce aux méthodes de séquençage ciblé confirmant leur efficacité dans l'identification de mutations causales associées aux ciliopathies. Toutefois, il est de plus en plus difficile d'identifier des mutations dans un gène chez plusieurs patients. De plus, les résultats du séquençage au débit indiquent que des variations sont présentes dans un grand nombre de gènes suggérant que plusieurs d'entre eux participent aux manifestations cliniques. La variabilité génotypique et l'hétérogénéité génétique des ciliopathies suggèrent, en effet, que plusieurs gènes mutés seraient responsables du phénotype des patients.

***WDR19* et *TEKT1* : les effets cumulatifs des mutations de 2 gènes dans l'expression phénotypique**

Des mutations dans 2 gènes différents, *WDR19* et *TEKT1*, ont été identifiées grâce à l'approche « ciliome », chez une patiente présentant un tableau clinique très complexe de ciliopathie. D'une part, elle est atteinte d'un syndrome de Saldino-Mainzer caractérisé par une NPH précoce, une amaurose congénitale de Leber et des épiphyses en cône mais sans ataxie cérébelleuse. De plus, un syndrome de Caroli avec des kystes hépatiques et pancréatiques a été diagnostiqué. D'autre part, des détresses respiratoires et des infections virales récurrentes au cours des premiers mois de vie ont conduit à réaliser une analyse de la motilité des cils qui a permis de caractériser une dyskinésie ciliaire et une raréfaction des cils dans les cellules multiciliées bronchiques. Cette dyskinésie ciliaire n'étant associée ni à un *situs inversus* ni à des otites séreuses, on ne peut pas établir le diagnostic de dyskinésie

ciliaire primitive (DCP) chez cette patiente. Par ailleurs, les défauts de motilité des cils bronchiques peuvent être causés par des infections des voies respiratoires. On ne peut donc pas exclure que la dyskinésie ciliaire observée dans les cellules nasales de la patiente soit secondaire aux infections qui l'ont touchées au cours de sa première année de vie. Toutefois, bien que ce ne soit pas un phénotype caractéristique de DCP, la dilatation des ventricules cérébraux présente chez la patiente suggère que les cils des cellules épendymaires auraient également des défauts de motilité.

Les analyses génétiques nous ont permis d'identifier une mutation faux sens (Article 2, Figure 1A, D) ainsi qu'une grande délétion dans le gène *WDR19*, codant IFT144, une sous-unité du complexe IFT-A, dont des mutations ont précédemment été retrouvées chez des patients atteints de NPH pouvant être associée à des anomalies osseuses (Bredrup et al. 2011 ; Perrault et al. 2012).

L'analyse approfondie des résultats de séquençage a permis de mettre en évidence la délétion de plusieurs exons dans le gène *WDR19* (Article 2, Figure 3A), qui n'a jamais été rapportée précédemment. La comparaison entre le taux de séquençage des exons du gène d'intérêt de l'individu atteint étudié et la moyenne du taux de couverture de ce gène chez les autres patients de la cohorte semble donc être un bon outil pour détecter de grandes délétions à condition qu'elles concernent au moins un exon entier et que le taux de couverture des exons incriminés soit suffisant (profondeur de lecture d'environ 100). La délétion de *WDR19* chez la patiente a été confirmée grâce à la ségrégation de plusieurs SNPs dans la région incriminée (Article 2, Figure 3B). Cette délétion concerne les 4 premiers exons du gène ainsi que la région 5'UTR contenant le promoteur, empêchant ainsi la transcription de cet allèle de *WDR19*.

Il apparaît donc que seul l'allèle paternel, présentant la mutation faux sens c.3533G>A (p.Arg1178Gln), est exprimé chez la patiente. Cette mutation a déjà été rapportée à l'état hétérozygote composite ou homozygote chez plusieurs patients atteints de NPH, de la maladie de Caroli (Halbritter, Porath, et al. 2013; J. M. Lee et al. 2015) et d'atteintes squelettiques (épiphyses en cône, polydactylie ; Article 2, Tableau 1). De façon intéressante, les patients portant la mutation à l'état homozygote présentent un phénotype plus sévère

avec une NPH infantile (âge de l'insuffisance rénale entre quelques mois et 3 ans) associée à des défauts oculaires et squelettiques, similaire au phénotype de la patiente NPH1848 porteur de la mutation à l'état hémizygote. Pour confirmer l'impact de ses mutations dans le gène *WDR19* sur le phénotype ciliaire, nous avons étudiés les fibroblastes de la patiente. Ils présentaient la plupart des caractéristiques causées par des mutations dans le complexe IFT-A (Bredrup et al. 2011; Ashe et al. 2012) telles qu'une diminution de la taille des cils, un élargissement de l'extrémité distale des cils avec une accumulation de protéines d'IFT-B et une absence d'AC3 à la membrane de la moitié des cils (Article 2, Figures 4 et S1).

Bien que la formation des cils, qu'ils soient primaires ou motiles, repose sur des machineries identiques comme l'IFT, il y a peu de chevauchement phénotypique entre les ciliopathies causées par des défauts de cils primaires et des défauts de cils motiles. Seul le *situs inversus* peut être retrouvé lors de mutations de gènes impliqués dans les cils primaires (i.e. *INVS* ; (Edgar A. Otto et al. 2003) ou des cils motiles (i.e. *DNAH5* ; Olbrich et al. 2002). Toutefois, quelques cas associant des manifestations attribuées à des dysfonctionnements des cils primaires à d'autres liées aux anomalies des cils motiles ont été rapportés. Par exemple, des mutations du gène *RPGR*, impliqué dans la rétinite pigmentaire (RP), sont retrouvées chez des patients présentant une RP associée à des infections respiratoires, une bronchiectasie et/ou des otites. *RPGR* est impliqué dans la régulation du trafic dans le cil connecteur (revu dans Patnaik et al. 2015) mais il a aussi été montré que les mutations de ce gène étaient à l'origine de la perte de bras de dynéines, de la paire centrale de microtubules et/ou des liens de nexines dans les cils (9+2) qui peuvent alors être immotiles (A. Moore et al. 2006). Les mutations du gène *OFD1* (oro-facial-digital syndrome de type I) peuvent aussi entraîner des symptômes respiratoires associés à une dyskinésie des cils motiles (Budny et al. 2006). *OFD1* pourrait être impliqué dans l'ancrage des corps basaux à la membrane et dans l'assemblage du cil *via* les protéines de l'IFT (C. Thauvin-Robinet et al. 2013; Ferrante et al. 2006). Une protéine *OFD1* non fonctionnelle conduirait alors à une raréfaction des cils motiles à la surface de l'épithélium ainsi qu'à des défauts dans la composition des cils et à l'absence de certaines protéines importantes pour la motilité. Dans le cas des complexes IFT, des protéines impliquées dans la motilité ciliaire ont clairement été mises en évidence parmi les rares cargos identifiés à ce jour (Hou et al. 2007; Ahmed et al. 2008 ; Ishikawa et al. 2014)

suggérant que les mutations des gènes IFT pourraient entraîner des anomalies de battement ciliaire. Récemment, Y. Li et al. (2015) ont rapporté pour la première fois des mutations d'un gène de l'IFT-A (*WDR35/IFT121*) dans un cas associant des défauts de cils primaires (dysplasie cranio-ectodermique / syndrome de Sensenbrenner) et de cils motiles (PCD avec *situs inversus totalis*). Toutefois, les auteurs ont exclu les mutations retrouvées dans les 8 autres gènes candidats qu'ils ont identifiées et qui pourraient aussi participer au phénotype complexe de leur patient (voir plus loin). La patiente NPH1848 est le premier cas associant des mutations de *WDR19/IFT144* à des défauts de motilité ciliaire (Article 2, Tableau 1). L'IFT144 se localise le long de l'axonème des cils motiles dans les cellules multiciliées obtenues par brossage nasal (données non montrées). Cependant, alors que les mutations de *WDR19* identifiées chez la patiente perturbent la localisation de la protéine dans les cils primaires (Article 2, Figure 4C), elles ne semblent pas modifier sa distribution dans les cellules multiciliées nasales (données non montrées). De même, la morphologie des cellules multiciliées n'est pas modifiée chez les patients portant des mutations d'autres gènes *NPHP* (Fliegauf et al. 2006) et qui ne présentent pas de symptôme respiratoire, en général. Cela suggère que certaines protéines essentielles aux fonctions des cils primaires ne sont pas indispensables à la formation des cils motiles et qu'il existerait un phénomène de redondance entre les protéines d'un même complexe au niveau des cils motiles.

Nous ne pouvons donc pas formellement éliminer l'implication des mutations de *WDR19* dans la dyskinésie ciliaire bronchique de la patiente. Cependant, des variations ont également été identifiées dans le gène *TEKT1* qui semble être un bon candidat pour expliquer la dyskinésie ciliaire. En effet, les tektines ont été impliquées dans la motilité ciliaire chez différents organismes. *TEKT1*, en particulier, est exprimé dans tous les tissus possédant des cils motiles chez la souris (testis, poumons, cerveau ; J. Norrander et al. 1998). De plus, il s'agit d'une cible du facteur de transcription FOXJ1 qui régule la ciliogenèse des cils motiles (Hellman et al. 2010; Didon et al. 2013). Enfin, nos résultats ont montré que la tektine-1 se localisait au corps basaux des cils primaires et motiles et le long de l'axonème des cils motiles (Article 2, Figures 5C et 9A-C) et que ces deux localisations sont affectées par les variations identifiées chez la patiente. La fonction possible de tektine-1 dans la motilité ciliaire est confortée par nos résultats obtenus chez le poisson zèbre (voir plus loin).

La patiente porte deux variations hétérozygotes composites dans *TEKT1* (Article 2, Figure 1A, C) : une mutation tronquante (p.Arg244*) et une variation faux sens (p.Lys311Asn). La forme tronquée R244* ne semble pas exprimée dans les fibroblastes de la patiente (Article 2, Figure 7A) suggérant une dégradation des messagers (RNA decay) et/ou de la protéine. Cependant, même si la forme tronquée de la protéine était exprimée, il est peu probable qu'elle soit fonctionnelle de par l'absence des deux coiled-coil C-terminaux (Article 2, Figure 1C). En effet, il semble qu'elle ne soit plus capable de s'oligomériser car, lorsqu'elle est fusionnée à la GFP, elle ne forme pas de filaments cytoplasmiques (données non montrées) contrairement à la forme sauvage (Article 2, Figures S2 et S3). Cette forme tronquée n'est pas non plus retrouvée au centrosome (Article 2, Figure 6D).

Si la forme tronquée n'est pas exprimée, alors seule la forme portant la variation p.Lys311Asn est exprimée dans les cellules de la patiente, à un niveau deux fois plus faible que l'expression de la forme sauvage dans les cellules contrôle (Article 2, Figure 7A). Cette variation correspond à un allèle rare enrichi dans la population japonaise à l'état hétérozygote (0.0119 in ExAc; rs77092590) d'où est originaire le père de la patiente. Cette variation touche un acide aminé conservé au cours de l'évolution et est localisé juste avant un domaine très conservé dans l'ensemble des tektines (Article 2, Figure 1B), entre les 2 dernières hélices importantes pour l'homodimérisation de la protéine (Amos 2008). La variation ne semble pas empêcher l'oligomérisation de la protéine puisque que la fusion GFP correspondante est capable de former des filaments après surexpression dans les cellules RPE1 et IMCD3 de façon semblable à la forme sauvage (données non montrées). Il serait intéressant d'étudier l'impact de cette variation sur la capacité de la protéine à s'homooligomériser et à interagir avec les autres membres de la famille puisque il a été montré que les dimères de tektine C (homologue la tektine-1 chez l'oursin de mer) s'associaient avec les hétérodimères de tektines A et B (homologues des tektines 4 et 2) pour former les protofilaments (Amos 2008). La forme mutée K311N-GFP n'est pas retrouvée au niveau du centrosome (Article 2, Figure 6D). De plus, l'intensité du marquage de la protéine endogène au centrosome est fortement diminuée dans les cellules de la patiente (Article 2, Figure 7B, B') et ne se localise plus dans les cils mobiles chez la patiente (Article2, Figure 9B, C). Cela suggère donc un rôle important de la lysine 311 dans l'assemblage du filament de tektines

et/ou dans leur association/stabilisation au sein des triplets (centrioles) ou doublets (axonème) de microtubules. De plus, l'intensité du marquage de la protéine endogène au niveau du midbody diminue aussi dans les cellules de la patiente (Article 2, Figure 7C, C') confirmant l'importance de cet acide aminé pour la localisation et la fonction de la protéine. Ainsi, comme montré pour certains variants d'autres gènes responsables de maladies rénales incluant *NPHS2* dans le cas du syndrome néphrotique (Tory et al. 2014) ou *WDR19* dans le cas de NPH (Bredrup et al. 2011), le variant p.Lys311Asn n'affecterait pas suffisamment les fonctions de tektine-1 lorsqu'il est à l'état homozygote mais son association avec un allèle nul ou une mutation tronquante semble faire ressortir son effet hypomorphe. Cependant, un seul individu possédant cette variation à l'état homozygote a été répertorié dans la base de données ExAc (sur 60695 individus de la population générale) et aucune information n'est disponible concernant son état de santé. On peut donc aussi penser qu'à l'état homozygote, cette variation est délétère.

Bien que le marquage de tektine-1 au centrosome ne soit retrouvé qu'avec un seul des deux anticorps que nous avons utilisés (Article 2, Figure 5), cette localisation semble spécifique. D'une part, les tektines sont observées au niveau du centrosome dans de nombreux modèles animaux et cellulaires (Steffen et Linck 1988; Stephens et Lemieux 1998; Larsson et al. 2000). De plus, une localisation similaire est observée pour la fusion GFP-TEKT1 (Article 2, Figure 6). D'autre part, le marquage obtenu avec l'anticorps Proteintech est fortement diminué dans les cellules de la patiente (Article 2, Figure 7B, B') et dans les cellules traitées avec des siRNA (Article 2, Figure 8B,C). L'absence de marquage centrosomal avec l'anticorps Sigma pourrait alors s'expliquer par le fait que l'épitope reconnu par cet anticorps ne soit pas accessible dans ce contexte. Nos résultats montrent que tektine-1 se localise plus spécifiquement à la partie proximale des centrioles (colocalisation avec la γ -tubuline ; Article 2, Figure 6A). La partie proximale des centrioles est constituée de triplets de microtubules contrairement à la partie distale qui n'est composée que de doublets. On peut alors penser que l'organisation des filaments de tektine-1 est principalement requise pour le maintien des triplets de microtubules au niveau des centrioles. On peut également suggérer que les tektines tapissent aussi l'intérieur du microtubule B des triplets pour servir à l'ancrage de microtubule C, comme proposé précédemment (Amos 2008), augmentant ainsi le nombre

de filaments et donc l'intensité du marquage au niveau de la partie proximale. Par ailleurs, la localisation de tektine-1 au niveau du corps basal semble importante pour la ciliogenèse (voir plus loin).

L'extinction de tektine-1 chez le poisson zèbre par interférence ARN (morpholino) entraîne des phénotypes typiques des ciliopathies (Article 2, Figure 10), tels que des défauts de latéralité et des anomalies des otolithes. Ces phénotypes sont plus spécifiquement associés aux cils motiles (X. Yu et al. 2011) confortant l'implication de tektine-1 dans la motilité ciliaire. Cela suggère donc fortement que les défauts de motilité observés chez la patiente sont liés aux variations de *TEKT1*. Les résultats préliminaires observés dans les lignées mutantes obtenues par la technique CRISPR-CAS9 semblent confirmer ces données. Ainsi, les études menées chez le poisson zèbre permettront de caractériser les fonctions de *tekt1* dans la motilité ciliaire et de valider l'effet pathogène des variations identifiées chez la patiente.

Les données que nous avons obtenues chez la patiente indiquent que la structure axonémale des cils motiles ne semble pas être affectée par l'absence de la tektine-1 (Article 2, Figure 9E). Le rôle de la tektine-1 dans motilité ne serait donc pas lié à sa localisation au niveau du site d'assemblage des ponts radiaires, bras de dynéines et complexes régulateurs sur les brins de microtubules, contrairement à ce qui a été proposé (Richard W. Linck et Norrander 2003). L'analyse de la structure des cils des poissons invalidés pour *tekt1* permettra de confirmer cette observation.

Bien que la tektine-1 ne soit pas retrouvée dans l'axonème des cils primaires (Article 2, Figure 5), elle semble être impliquée dans la ciliogenèse. L'inhibition de l'expression de tektine-1 par siRNA n'entraîne pas de défaut de ciliogenèse (% de cellules ciliées) mais les cils formés sont plus courts (Article 2, Figure 8B, D, E) suggérant un rôle de régulateur positif ou de stabilisateur de la longueur de l'axonème. Cette observation a été récemment confortée par les résultats d'un crible siRNA visant à identifier des acteurs de la ciliogenèse dans les cellules RPE1 dans lequel tektine-1 est retrouvée parmi les candidats les plus intéressants (Roosing et al. 2015). Même absente de l'axonème, la tektine-1 semble donc être importante pour l'élongation des doublets de microtubules. Ces résultats laissent penser

que les mutations de *TEKT1* identifiées dans cette étude pourraient moduler les phénotypes des cils primaires de la patiente.

De manière intéressante, le pourcentage de cellules ciliées n'est pas modifié après traitement des cellules RPE1 par siRNA (Article 2, Figure 8B, D) alors que les observations des cellules multiciliées bronchiques de la patiente montrent une raréfaction des cils mobiles avec défaut d'ancrage des corps basaux (Article 2, vidéo 1 et Figure 9F). Ces données suggèrent que tektine-1 pourrait être impliquée dans les étapes précoces de la formation des cils mobiles comme l'ancrage des corps basaux à la membrane plasmique. Sur la Figure 9F, on devine qu'un des corps basaux est ancré à une vésicule (tête de flèche) suggérant qu'en l'absence de tektine-1, le corps basal peut s'ancrer à la membrane mais que la croissance des microtubules est perturbée empêchant ainsi la fusion de la vésicule ciliaire avec la membrane plasmique et la formation d'un cil. L'analyse de la ciliogenèse dans les lignées mutantes de poissons zèbre pourra confirmer cette hypothèse.

L'accumulation des effets liés aux variations de *WDR19* et *TEKT1* sur la ciliogenèse pourrait être responsables des phénotypes observés dans les cellules multiciliées chez la patiente (motilité et raréfaction des cils) et qui n'ont jamais été rapportés chez les autres patients présentant des mutations de *WDR19* (Article 2 ; Tableau 1). L'association de mutations dans 2 gènes différents a déjà été rapportée dans les cas de ciliopathies. Il a été montré que certaines variations bialléliques retrouvées dans un gène *BBS*, par exemple, n'étaient délétères que lorsqu'elles étaient associées à une variation dans un autre gène *BBS* (Katsanis et al. 2001; Beales et al. 2003). Des mutations hétérozygotes de *NPHP1* ont aussi été retrouvées associées à des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites des gènes *BBS* chez des patients qui présentaient ou non des maladies rénales (kystes, aplasie unilatérale). Les effets cumulatifs de la mutation de *NPHP1* et des mutations du gène *BBS* impliqué pourraient donc moduler le phénotype rénal des patients (Lindstrand et al. 2014). L'oligogénisme peut aussi être suspecté dans la NPH syndromique puisque plusieurs cas présentant des symptômes neurologiques (syndrome de Joubert) ou une rétinite pigmentaire, et porteurs de mutations homozygotes de *NPHP1* et d'une mutation hétérozygote dans un autre gène *NPHP*, ont été rapportés (Tory et al. 2007; Hoefele et al.

2007). Ainsi, on peut également penser que les mutations de *TEKT1* influencent la pénétrance et/ou l'expressivité des mutations de *WDR19* dans les cils bronchiques, expliquant les défauts de motilité ciliaire chez la patiente NPH1848. D'un autre côté, les mutations de *WDR19* pourraient aussi affecter la localisation et la fonction de tektine-1. On peut en effet imaginer que la tektine-1 est un cargo de l'IFT144 qui n'est plus transporté dans les cils motiles chez la patiente (Article 2, Figure 9B, C) à cause de la mutation p.Arg1178Gln. L'étude de l'interaction entre ces 2 protéines permettrait de vérifier cette hypothèse. L'ensemble de ces données indiquent que l'étude génétique approfondie des patients, même après l'identification d'un gène causal, est importante pour déceler d'éventuels variants modificateurs ou des mutations dans un second gène expliquant potentiellement des formes syndromiques complexes. L'ensemble de nos observations génétiques, dans les cellules de patients et chez le poisson zèbre indiquent que tektine-1 est impliquée dans la motilité ciliaire et que les mutations de *TEKT1* seraient principalement responsables de la dyskinésie ciliaire de la patiente. L'identification de mutations dans le gène *TEKT1* chez d'autres patients atteints de dyskinésie ciliaire et/ou de DCP, sans manifestation classiques des ciliopathies associées à des cils primaires, aiderait à préciser son implication comme nouveau gène associé à la dyskinésie ciliaire (primitive) sans défaut de structure de l'axonème.

CONCLUSION

Les ciliopathies sont des maladies génétiquement et cliniquement très hétérogènes caractérisées par des anomalies structurales et/ou fonctionnelles des cils. Les gènes mutés dans ces pathologies codent des protéines localisées au niveau du cil et/ou du flagelle ou indispensables à leur fonction. Le séquençage ciblé de la partie codante des gènes ciliaires ou « ciliome » a déjà permis d'identifier le gène causal chez de nombreux patients et de mettre en évidence de nouveaux gènes impliqués dans les maladies.

L'approche du « ciliome » nous a permis d'identifier des mutations dans les gènes *CEP83*, *WDR19* et *TEKT1*, responsables des ciliopathies chez plusieurs patients. Ces résultats vont permettre de mieux comprendre la physiopathologie de leur maladie et d'améliorer leur prise en charge thérapeutique. Ils vont aussi permettre de réaliser un diagnostic anténatal lors d'une nouvelle grossesse afin d'aider les familles.

Deux de ces gènes identifiés sont impliqués pour la première fois dans les ciliopathies. Ils ont été associés soit à des défauts des cils primaires (*CEP83*) soit à des anomalies de motilité ciliaire (*TEKT1*) confirmant l'efficacité de cette approche innovante dans l'identification de mutations responsables de tous les types de ciliopathies. Ces deux gènes, *CEP83* et *TEKT1*, codent des protéines impliquées dans la structure des cils confirmant l'importance de leur architecture dans leur fonction et dans le développement des maladies.

Enfin, les résultats que nous avons obtenus montrent deux exemples très différents d'un point de vue génétique. Dans le premier cas, des mutations d'un seul gène, *CEP83*, ont été retrouvées chez plusieurs patients non apparentés et présentant un phénotype similaire (NPH infantile). Le deuxième cas est plus complexe, avec une seule patiente atteinte d'une forme syndromique unique, chez laquelle nous avons identifiées des mutations d'un gène de ciliopathie connu, *WDR19*, et des variations d'un autre gène, *TEKT1*, codant une protéine dont la fonction n'avait jamais été étudiée. L'ensemble de nos données indique que les mutations des deux gènes contribuent au phénotype complexe de la patiente. Ce second cas est peut être moins isolé qu'il n'y paraît et des associations de mutations dans plusieurs

gènes pourraient expliquer les formes syndromiques ou les phénotypes plus sévères retrouvés chez certains patients.

BIBLIOGRAPHIE

- Absalon, Sabrina, Thierry Blisnick, Mélanie Bonhivers, Linda Kohl, Nadège Cayet, Géraldine Toutirais, Johanna Buisson, Derrick Robinson, et Philippe Bastin. 2008. « Flagellum Elongation Is Required for Correct Structure, Orientation and Function of the Flagellar Pocket in Trypanosoma Brucei. » *Journal of Cell Science* 121 (Pt 22): 3704- 16. doi:10.1242/jcs.035626.
- Afzelius, B. A. 1976. « A Human Syndrome Caused by Immotile Cilia. » *Science (New York, N.Y.)* 193 (4250): 317- 19.
- Afzelius, Bjorn A., et Unne Stenram. 2006. « Prevalence and Genetics of Immotile-Cilia Syndrome and Left-Handedness. » *The International Journal of Developmental Biology* 50 (6): 571- 73. doi:10.1387/ijdb.052132ba.
- Aguilar, Andrea, Alice Meunier, Laetitia Strehl, Jelena Martinovic, Maryse Bonniere, Tania Attie-Bitach, Féréchté Encha-Razavi, et Nathalie Spassky. 2012. « Analysis of Human Samples Reveals Impaired SHH-Dependent Cerebellar Development in Joubert syndrome/Meckel Syndrome. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (42): 16951- 56. doi:10.1073/pnas.1201408109.
- Ahmed, Noveera T., Chunlei Gao, Ben F. Lucker, Douglas G. Cole, et David R. Mitchell. 2008. « ODA16 Aids Axonemal Outer Row Dynein Assembly through an Interaction with the Intraflagellar Transport Machinery. » *The Journal of Cell Biology* 183 (2): 313- 22. doi:10.1083/jcb.200802025.
- Airik, Rannar, Gisela G. Slaats, Zhi Guo, Anna-Carina Weiss, Naheed Khan, Amiya Ghosh, Toby W. Hurd, et al. 2014. « Renal-Retinal Ciliopathy Gene Sdccag8 Regulates DNA Damage Response Signaling. » *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 25 (11): 2573- 83. doi:10.1681/ASN.2013050565.
- Al Jord, Adel, Anne-Iris Lemaître, Nathalie Delgehyr, Marion Faucourt, Nathalie Spassky, et Alice Meunier. 2014. « Centriole Amplification by Mother and Daughter Centrioles Differs in Multiciliated Cells. » *Nature* 516 (7529): 104- 7. doi:10.1038/nature13770.
- Amos, Linda A. 2008. « The Tektin Family of Microtubule-Stabilizing Proteins. » *Genome Biology* 9 (7): 229. doi:10.1186/gb-2008-9-7-229.
- Angers, Stephane, et Randall T. Moon. 2009. « Proximal Events in Wnt Signal Transduction. » *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (7): 468- 77. doi:10.1038/nrm2717.
- Anniko, M., B. I. Wenggren, et R. Wróblewski. 1988. « Aberrant Elemental Composition of Otoconia in the Dancer Mouse Mutant with a Semidominant Gene Causing a Morphogenetic Type of Inner Ear Defect. » *Acta Oto-Laryngologica* 106 (3-4): 208- 12.
- Ansley, Stephen J., Jose L. Badano, Oliver E. Blacque, Josephine Hill, Bethan E. Hoskins, Carmen C. Leitch, Jun Chul Kim, et al. 2003. « Basal Body Dysfunction Is a Likely Cause of Pleiotropic Bardet-Biedl Syndrome. » *Nature* 425 (6958): 628- 33. doi:10.1038/nature02030.
- Antignac, C., C. H. Arduy, J. S. Beckmann, F. Benessy, F. Gros, M. Medhioub, F. Hildebrandt, J. L. Dufier, C. Kleinknecht, et M. Broyer. 1993. « A Gene for Familial Juvenile

- Nephronophthisis (recessive Medullary Cystic Kidney Disease) Maps to Chromosome 2p. » *Nature Genetics* 3 (4): 342- 45. doi:10.1038/ng0493-342.
- Arts, Heleen H., Ernie M. H. F. Bongers, Dorus A. Mans, Sylvia E. C. van Beersum, Machteld M. Oud, Emine Bolat, Liesbeth Spruijt, et al. 2011. « C14ORF179 Encoding IFT43 Is Mutated in Sensenbrenner Syndrome. » *Journal of Medical Genetics* 48 (6): 390- 95. doi:10.1136/jmg.2011.088864.
- Arts, Heleen H., et Nine V. A. M. Knoers. 2013. « Current insights into renal ciliopathies: what can genetics teach us? » *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)* 28 (6): 863- 74. doi:10.1007/s00467-012-2259-9.
- Arts, Heleen, et Nine Knoers. 1993. « Cranioectodermal Dysplasia. » In *GeneReviews*(®), édité par Roberta A. Pagon, Margaret P. Adam, Holly H. Ardinger, Thomas D. Bird, Cynthia R. Dolan, Chin-To Fong, Richard JH Smith, et Karen Stephens. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK154653/>.
- Asante, David, Nicola L. Stevenson, et David J. Stephens. 2014. « Subunit Composition of the Human Cytoplasmic Dynein-2 Complex. » *Journal of Cell Science* 127 (21): 4774- 87. doi:10.1242/jcs.159038.
- Ashe, Alyson, Natalie C. Butterfield, Liam Town, Andrew D. Courtney, Ashley N. Cooper, Charles Ferguson, Rachael Barry, et al. 2012. « Mutations in Mouse Ift144 Model the Craniofacial, Limb and Rib Defects in Skeletal Ciliopathies. » *Human Molecular Genetics* 21 (8): 1808- 23. doi:10.1093/hmg/ddr613.
- Attanasio, Massimo, N. Henriette Uhlenhaut, Vitor H. Sousa, John F. O'Toole, Edgar Otto, Katrin Anlag, Claudia Klugmann, et al. 2007. « Loss of GLIS2 Causes Nephronophthisis in Humans and Mice by Increased Apoptosis and Fibrosis. » *Nature Genetics* 39 (8): 1018- 24. doi:10.1038/ng2072.
- Auer, Thomas O., et Filippo Del Bene. 2014. « CRISPR/Cas9 and TALEN-Mediated Knock-in Approaches in Zebrafish. » *Methods (San Diego, Calif.)* 69 (2): 142- 50. doi:10.1016/j.ymeth.2014.03.027.
- Austin-Tse, Christina, Jan Halbritter, Maimoona A. Zariwala, Renée M. Gilberti, Heon Yung Gee, Nathan Hellman, Narendra Pathak, et al. 2013. « Zebrafish Ciliopathy Screen Plus Human Mutational Analysis Identifies C21orf59 and CCDC65 Defects as Causing Primary Ciliary Dyskinesia. » *American Journal of Human Genetics* 93 (4): 672- 86. doi:10.1016/j.ajhg.2013.08.015.
- Awata, Junya, Saeko Takada, Clive Standley, Karl F. Lehtreck, Karl D. Bellvé, Gregory J. Pazour, Kevin E. Fogarty, et George B. Witman. 2014. « NPHP4 Controls Ciliary Trafficking of Membrane Proteins and Large Soluble Proteins at the Transition Zone. » *Journal of Cell Science* 127 (21): 4714- 27. doi:10.1242/jcs.155275.
- Barker, Amy R., Rhys Thomas, et Helen R. Dawe. 2014. « Meckel-Gruber Syndrome and the Role of Primary Cilia in Kidney, Skeleton, and Central Nervous System Development. » *Organogenesis* 10 (1): 96- 107. doi:10.4161/org.27375.
- Barnes, B. G. 1961. « Ciliated Secretory Cells in the Pars Distalis of the Mouse Hypophysis. » *Journal of Ultrastructure Research* 5 (octobre): 453- 67.
- Barr, M. M., et P. W. Sternberg. 1999. « A Polycystic Kidney-Disease Gene Homologue Required for Male Mating Behaviour in *C. Elegans*. » *Nature* 401 (6751): 386- 89. doi:10.1038/43913.

- Bartoloni, Lucia, Jean-Louis Blouin, Yanzhen Pan, Corinne Gehrig, Amit K. Maiti, Nathalie Scamuffa, Colette Rossier, 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. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (16): 10282- 86. doi:10.1073/pnas.152337699.
- Bastin, Philippe, Thomas H. MacRae, Susan B. Francis, Keith R. Matthews, et Keith Gull. 1999. « Flagellar Morphogenesis: Protein Targeting and Assembly in the Paraflagellar Rod of Trypanosomes. » *Molecular and Cellular Biology* 19 (12): 8191- 8200.
- Baujatz, Geneviève, Céline Huber, Joyce El Hokayem, Roseline Caumes, Claire Do Ngoc Thanh, Albert David, Anne-Lise Delezoide, et al. 2013. « Asphyxiating Thoracic Dysplasia: Clinical and Molecular Review of 39 Families. » *Journal of Medical Genetics* 50 (2): 91- 98. doi:10.1136/jmedgenet-2012-101282.
- Beales, Philip L., Jose L. Badano, Alison J. Ross, Stephen J. Ansley, Bethan E. Hoskins, Brigitta Kirsten, Charles A. Mein, et al. 2003. « Genetic Interaction of BBS1 Mutations with Alleles at Other BBS Loci Can Result in Non-Mendelian Bardet-Biedl Syndrome. » *American Journal of Human Genetics* 72 (5): 1187- 99. doi:10.1086/375178.
- Benmerah, Alexandre. 2013. « The Ciliary Pocket. » *Current Opinion in Cell Biology* 25 (1): 78- 84. doi:10.1016/j.ceb.2012.10.011.
- Berbari, Nicolas F., Jacqueline S. Lewis, Georgia A. Bishop, Candice C. Askwith, et Kirk Mykytyn. 2008. « Bardet-Biedl Syndrome Proteins Are Required for the Localization of G Protein-Coupled Receptors to Primary Cilia. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (11): 4242- 46. doi:10.1073/pnas.0711027105.
- Bergmann, Carsten, Manfred Fliegauf, Nadina Ortiz Brüchle, Valeska Frank, Heike Olbrich, Jan Kirschner, Bernhard Schermer, et al. 2008. « Loss of Nephrocystin-3 Function Can Cause Embryonic Lethality, Meckel-Gruber-like Syndrome, Situs Inversus, and Renal-Hepatic-Pancreatic Dysplasia. » *American Journal of Human Genetics* 82 (4): 959- 70. doi:10.1016/j.ajhg.2008.02.017.
- Bettencourt-Dias, Mónica, et David M. Glover. 2007. « Centrosome Biogenesis and Function: Centrosomics Brings New Understanding. » *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (6): 451- 63. doi:10.1038/nrm2180.
- Betz, R., C. Rensing, E. Otto, A. Mincheva, D. Zehnder, P. Lichter, et F. Hildebrandt. 2000. « Children with Ocular Motor Apraxia Type Cogan Carry Deletions in the Gene (NPHP1) for Juvenile Nephronophthisis. » *The Journal of Pediatrics* 136 (6): 828- 31.
- Bhogaraju, Sagar, Lukas Cajanek, Cécile Fort, Thierry Blisnick, Kristina Weber, Michael Taschner, Naoko Mizuno, et al. 2013. « Molecular Basis of Tubulin Transport within the Cilium by IFT74 and IFT81. » *Science (New York, N.Y.)* 341 (6149): 1009- 12. doi:10.1126/science.1240985.
- Bhogaraju, Sagar, Benjamin D. Engel, et Esben Lorentzen. 2013. « Intraflagellar Transport Complex Structure and Cargo Interactions. » *Cilia* 2 (1): 10. doi:10.1186/2046-2530-2-10.
- Bisgrove, Brent W., et H. Joseph Yost. 2006. « The Roles of Cilia in Developmental Disorders and Disease. » *Development (Cambridge, England)* 133 (21): 4131- 43. doi:10.1242/dev.02595.

- Blacque, Oliver E., Michael J. Reardon, Chunmei Li, Jonathan McCarthy, Moe R. Mahjoub, Stephen J. Ansley, Jose L. Badano, et al. 2004. « Loss of *C. Elegans* BBS-7 and BBS-8 Protein Function Results in Cilia Defects and Compromised Intraflagellar Transport. » *Genes & Development* 18 (13): 1630- 42. doi:10.1101/gad.1194004.
- Blaineau, Christine, Magali Tessier, Pascal Dubessay, Lena Tasse, Lucien Crobu, Michel Pagès, et Patrick Bastien. 2007. « A Novel Microtubule-Depolymerizing Kinesin Involved in Length Control of a Eukaryotic Flagellum. » *Current Biology: CB* 17 (9): 778- 82. doi:10.1016/j.cub.2007.03.048.
- Blanchon, Sylvain, Marie Legendre, Bruno Copin, Philippe Duquesnoy, Guy Montantin, Esther Kott, Florence Dastot, et al. 2012. « Delineation of CCDC39/CCDC40 Mutation Spectrum and Associated Phenotypes in Primary Ciliary Dyskinesia. » *Journal of Medical Genetics* 49 (6): 410- 16. doi:10.1136/jmedgenet-2012-100867.
- Blatt, E. N., X. H. Yan, M. K. Wuerffel, D. L. Hamilos, et S. L. Brody. 1999. « Forkhead Transcription Factor HFH-4 Expression Is Temporally Related to Ciliogenesis. » *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 21 (2): 168- 76. doi:10.1165/ajrcmb.21.2.3691.
- Bleau, G., C. L. Richer, et D. Bousquet. 1978. « Absence of Dynein Arms in Cilia of Endocervical Cells in a Fertile Woman. » *Fertility and Sterility* 30 (3): 362- 63.
- Bonnafe, E., M. Touka, A. AitLounis, D. Baas, E. Barras, C. Ucla, A. Moreau, et al. 2004. « The Transcription Factor RFX3 Directs Nodal Cilium Development and Left-Right Asymmetry Specification. » *Molecular and Cellular Biology* 24 (10): 4417- 27.
- Boon, Mieke, Mark Jorissen, Marijke Proesmans, et Kris De Boeck. 2013. « Primary Ciliary Dyskinesia, an Orphan Disease. » *European Journal of Pediatrics* 172 (2): 151- 62. doi:10.1007/s00431-012-1785-6.
- Boon, Mieke, Julia Wallmeier, Lina Ma, Niki Tomas Loges, Martine Jaspers, Heike Olbrich, Gerard W. Dougherty, et al. 2014. « MCIDAS Mutations Result in a Mucociliary Clearance Disorder with Reduced Generation of Multiple Motile Cilia. » *Nature Communications* 5: 4418. doi:10.1038/ncomms5418.
- Bornens, Michel. 2002. « Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. » *Current Opinion in Cell Biology* 14 (1): 25- 34. doi:10.1016/S0955-0674(01)00290-3.
- Brazelton, W. J., C. D. Amundsen, C. D. Silflow, et P. A. Lefebvre. 2001. « The *bld1* Mutation Identifies the *Chlamydomonas* Osm-6 Homolog as a Gene Required for Flagellar Assembly. » *Current Biology: CB* 11 (20): 1591- 94.
- Bredrup, Cecilie, Sophie Saunier, Machteld M. Oud, Torunn Fiskerstrand, Alexander Hoischen, Damien Brackman, Sabine M. Leh, et al. 2011. « Ciliopathies with Skeletal Anomalies and Renal Insufficiency due to Mutations in the IFT-A Gene WDR19. » *American Journal of Human Genetics* 89 (5): 634- 43. doi:10.1016/j.ajhg.2011.10.001.
- Brody, S. L., X. H. Yan, M. K. Wuerffel, S. K. Song, et S. D. Shapiro. 2000. « Ciliogenesis and Left-Right Axis Defects in Forkhead Factor HFH-4-Null Mice. » *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 23 (1): 45- 51. doi:10.1165/ajrcmb.23.1.4070.
- Budny, Bartłomiej, Wei Chen, Heymut Omran, Manfred Fliegauf, Andreas Tzschach, Marzena Wisniewska, Lars R. Jensen, et al. 2006. « A Novel X-Linked Recessive Mental Retardation Syndrome Comprising Macrocephaly and Ciliary Dysfunction Is Allelic to

- Oral-Facial-Digital Type I Syndrome. » *Human Genetics* 120 (2): 171- 78. doi:10.1007/s00439-006-0210-5.
- Burcklé, Céline, Helori-Mael Gaudé, Christine Vesque, Flora Silbermann, Rémi Salomon, Cécile Jeanpierre, Corinne Antignac, Sophie Saunier, et Sylvie Schneider-Maunoury. 2011. « Control of the Wnt Pathways by Nephrocystin-4 Is Required for Morphogenesis of the Zebrafish Pronephros. » *Human Molecular Genetics* 20 (13): 2611- 27. doi:10.1093/hmg/ddr164.
- Caparrós-Martín, José A., Alessandro De Luca, François Cartault, Mona Aglan, Samia Temtamy, Ghada A. Otaify, Mennat Mehrez, et al. 2015. « Specific Variants in WDR35 Cause a Distinctive Form of Ellis-van Creveld Syndrome by Disrupting the Recruitment of the EvC Complex and SMO into the Cilium. » *Human Molecular Genetics* 24 (14): 4126- 37. doi:10.1093/hmg/ddv152.
- Caridi, G., M. Dagnino, A. Rossi, E. M. Valente, E. Bertini, E. Fazzi, F. Emma, L. Murer, E. Verrina, et G. M. Ghiggeri. 2006. « Nephronophthisis Type 1 Deletion Syndrome with Neurological Symptoms: Prevalence and Significance of the Association. » *Kidney International* 70 (7): 1342- 47. doi:10.1038/sj.ki.5001768.
- Castelli, Maddalena, Manila Boca, Marco Chiaravalli, Harini Ramalingam, Isaline Rowe, Gianfranco Distefano, Thomas Carroll, et Alessandra Boletta. 2013. « Polycystin-1 Binds Par3/aPKC and Controls Convergent Extension during Renal Tubular Morphogenesis. » *Nature Communications* 4: 2658. doi:10.1038/ncomms3658.
- Castleman, Victoria H., Leila Romio, Rahul Chodhari, Robert A. Hirst, Sandra C. P. de Castro, Keith A. Parker, Patricia Ybot-Gonzalez, et al. 2009. « Mutations in Radial Spoke Head Protein Genes RSPH9 and RSPH4A Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Central-Microtubular-Pair Abnormalities. » *American Journal of Human Genetics* 84 (2): 197- 209. doi:10.1016/j.ajhg.2009.01.011.
- Caudron, Fabrice, et Yves Barral. 2009. « Septins and the Lateral Compartmentalization of Eukaryotic Membranes. » *Developmental Cell* 16 (4): 493- 506. doi:10.1016/j.devcel.2009.04.003.
- Chaki, Moumita, Rannar Airik, Amiya K. Ghosh, Rachel H. Giles, Rui Chen, Gisela G. Slaats, Hui Wang, et al. 2012. « Exome Capture Reveals ZNF423 and CEP164 Mutations, Linking Renal Ciliopathies to DNA Damage Response Signaling. » *Cell* 150 (3): 533- 48. doi:10.1016/j.cell.2012.06.028.
- Chang, Bo, Hemant Khanna, Norman Hawes, David Jimeno, Shirley He, Concepcion Lillo, Sunil K. Parapuram, et al. 2006. « In-Frame Deletion in a Novel Centrosomal/ciliary Protein CEP290/NPHP6 Perturbs Its Interaction with RPGR and Results in Early-Onset Retinal Degeneration in the rd16 Mouse. » *Human Molecular Genetics* 15 (11): 1847- 57. doi:10.1093/hmg/ddl107.
- Chang, Paul, Thomas H. Giddings, Mark Winey, et Tim Stearns. 2003. « Epsilon-Tubulin Is Required for Centriole Duplication and Microtubule Organization. » *Nature Cell Biology* 5 (1): 71- 76. doi:10.1038/ncb900.
- Chebib, Fouad T., Caroline R. Sussman, Xiaofang Wang, Peter C. Harris, et Vicente E. Torres. 2015. « Vasopressin and Disruption of Calcium Signalling in Polycystic Kidney Disease. » *Nature Reviews. Nephrology*, avril. doi:10.1038/nrneph.2015.39.
- Chen, J., H. J. Knowles, J. L. Hebert, et B. P. Hackett. 1998. « Mutation of the Mouse Hepatocyte Nuclear Factor/forkhead Homologue 4 Gene Results in an Absence of

- Cilia and Random Left-Right Asymmetry. » *The Journal of Clinical Investigation* 102 (6): 1077- 82. doi:10.1172/JCI4786.
- Choksi, Semil P., Gilbert Lauter, Peter Swoboda, et Sudipto Roy. 2014. « Switching on Cilia: Transcriptional Networks Regulating Ciliogenesis. » *Development* 141 (7): 1427- 41. doi:10.1242/dev.074666.
- Christensen, Søren T., Christian A. Clement, Peter Satir, et Lotte B. Pedersen. 2012. « Primary Cilia and Coordination of Receptor Tyrosine Kinase (RTK) Signalling. » *The Journal of Pathology* 226 (2): 172- 84. doi:10.1002/path.3004.
- Chung, Mei-I., Taejoon Kwon, Fan Tu, Eric R. Brooks, Rakhi Gupta, Matthew Meyer, Julie C. Baker, Edward M. Marcotte, et John B. Wallingford. 2014. « Coordinated Genomic Control of Ciliogenesis and Cell Movement by RFX2. » *eLife* 3: e01439. doi:10.7554/eLife.01439.
- Ciccia, Alberto, et Stephen J. Elledge. 2010. « The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. » *Molecular Cell* 40 (2): 179- 204. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.019.
- Cole, D. G., D. R. Diener, A. L. Himelblau, P. L. Beech, J. C. Fuster, et J. L. Rosenbaum. 1998. « Chlamydomonas Kinesin-II-Dependent Intraflagellar Transport (IFT): IFT Particles Contain Proteins Required for Ciliary Assembly in Caenorhabditis Elegans Sensory Neurons. » *The Journal of Cell Biology* 141 (4): 993- 1008.
- Cole, Douglas G. 2003. « The Intraflagellar Transport Machinery of Chlamydomonas Reinhardtii. » *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 4 (7): 435- 42.
- Cooper, M. S., et L. A. D'Amico. 1996. « A Cluster of Noninvoluting Endocytic Cells at the Margin of the Zebrafish Blastoderm Marks the Site of Embryonic Shield Formation. » *Developmental Biology* 180 (1): 184- 98. doi:10.1006/dbio.1996.0294.
- Corbit, Kevin C., Pia Aanstad, Veena Singla, Andrew R. Norman, Didier Y. R. Stainier, et Jeremy F. Reiter. 2005. « Vertebrate Smoothed Functions at the Primary Cilium. » *Nature* 437 (7061): 1018- 21. doi:10.1038/nature04117.
- Corbit, Kevin C., Amy E. Shyer, William E. Dowdle, Julie Gauden, Veena Singla, Miao-Hsueh Chen, Pao-Tien Chuang, et Jeremy F. Reiter. 2008. « Kif3a Constrains Beta-Catenin-Dependent Wnt Signalling through Dual Ciliary and Non-Ciliary Mechanisms. » *Nature Cell Biology* 10 (1): 70- 76. doi:10.1038/ncb1670.
- Craige, Branch, Che-Chia Tsao, Dennis R. Diener, Yuqing Hou, Karl-Ferdinand Lehtreck, Joel L. Rosenbaum, et George B. Witman. 2010. « CEP290 Tethers Flagellar Transition Zone Microtubules to the Membrane and Regulates Flagellar Protein Content. » *The Journal of Cell Biology* 190 (5): 927- 40. doi:10.1083/jcb.201006105.
- Czarnecki, Peter G., et Jagesh V. Shah. 2012. « The ciliary transition zone: From Morphology and Molecules to Medicine. » *Trends in Cell Biology* 22 (4): 201- 10. doi:10.1016/j.tcb.2012.02.001.
- Davis, Erica E., Qi Zhang, Qin Liu, Bill H. Diplas, Lisa M. Davey, Jane Hartley, Corinne Stoetzel, et al. 2011. « TTC21B Contributes Both Causal and Modifying Alleles across the Ciliopathy Spectrum. » *Nature Genetics* 43 (3): 189- 96. doi:10.1038/ng.756.
- Delaval, Benedicte, Alison Bright, Nathan D. Lawson, et Stephen Doxsey. 2011. « The Cilia Protein IFT88 Is Required for Spindle Orientation in Mitosis. » *Nature Cell Biology* 13 (4): 461- 68. doi:10.1038/ncb2202.
- Delous, Marion, Lekbir Baala, Rémi Salomon, Christine Laclef, Jeanette Vierkotten, Kàlmàn Tory, Christelle Golzio, et al. 2007. « The Ciliary Gene RPGRIP1L Is Mutated in

- Cerebello-Oculo-Renal Syndrome (Joubert Syndrome Type B) and Meckel Syndrome. » *Nature Genetics* 39 (7): 875- 81. doi:10.1038/ng2039.
- Delous, Marion, Helori M. Gaudé, et Sophie Saunier. 2013. « Genetic bases and pathogenic mechanisms of nephronophthisis. » *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms, Dermatology*, 10 (3–4): e143- 51. doi:10.1016/j.ddmec.2013.10.001.
- Delous, Marion, Nathan E. Hellman, Helori-Maël Gaudé, Flora Silbermann, André Le Bivic, Rémi Salomon, Corinne Antignac, et Sophie Saunier. 2009. « Nephrocystin-1 and Nephrocystin-4 Are Required for Epithelial Morphogenesis and Associate with PALS1/PATJ and Par6. » *Human Molecular Genetics* 18 (24): 4711- 23. doi:10.1093/hmg/ddp434.
- den Hollander, Anneke I., Robert K. Koenekoop, Suzanne Yzer, Irma Lopez, Maarten L. Arends, Krysta E. J. Voesenek, Marijke N. Zonneveld, et al. 2006. « Mutations in the CEP290 (NPHP6) Gene Are a Frequent Cause of Leber Congenital Amaurosis. » *American Journal of Human Genetics* 79 (3): 556- 61. doi:10.1086/507318.
- De Robertis, E. 1956. « Electron Microscopic Observations on the Submicroscopic Morphology of the Meiotic Nucleus and Chromosomes. » *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 2 (6): 785- 96.
- Didon, Lukas, Rachel K. Zwick, Ion Wa Chao, Matthew S. Walters, Rui Wang, Neil R. Hackett, et Ronald G. Crystal. 2013. « RFX3 Modulation of FOXJ1 Regulation of Cilia Genes in the Human Airway Epithelium. » *Respiratory Research* 14: 70. doi:10.1186/1465-9921-14-70.
- Drivas, Theodore G., Erika L. F. Holzbaur, et Jean Bennett. 2013. « Disruption of CEP290 Microtubule/membrane-Binding Domains Causes Retinal Degeneration. » *The Journal of Clinical Investigation* 123 (10): 4525- 39. doi:10.1172/JCI69448.
- Drummond, Iain. 2003. « Making a Zebrafish Kidney: A Tale of Two Tubes. » *Trends in Cell Biology* 13 (7): 357- 65.
- Duquesnoy, Philippe, Estelle Escudier, Laetitia Vincensini, Judy Freshour, Anne-Marie Bridoux, André Coste, Antoine Deschildre, et al. 2009. « Loss-of-Function Mutations in the Human Ortholog of Chlamydomonas Reinhardtii ODA7 Disrupt Dynein Arm Assembly and Cause Primary Ciliary Dyskinesia. » *American Journal of Human Genetics* 85 (6): 890- 96. doi:10.1016/j.ajhg.2009.11.008.
- Durcan, Thomas M., Elizabeth S. Halpin, Trisha Rao, Nicholas S. Collins, Emily K. Tribble, Jessica E. Hornick, et Edward H. Hinchcliffe. 2008. « Tektin 2 Is Required for Central Spindle Microtubule Organization and the Completion of Cytokinesis. » *The Journal of Cell Biology* 181 (4): 595- 603. doi:10.1083/jcb.200711160.
- Duriez, Bénédicte, Philippe Duquesnoy, Estelle Escudier, Anne-Marie Bridoux, Denise Escalier, Isabelle Rayet, Elisabeth Marcos, Anne-Marie Vojtek, Jean-François Bercher, et Serge Amselem. 2007. « A Common Variant in Combination with a Nonsense Mutation in a Member of the Thioredoxin Family Causes Primary Ciliary Dyskinesia. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (9): 3336- 41. doi:10.1073/pnas.0611405104.
- Eliyahu, S., et E. Shalev. 1996. « A Fertile Woman with Kartagener's Syndrome and Three Consecutive Pregnancies. » *Human Reproduction (Oxford, England)* 11 (3): 683.
- El Zein, Loubna, Aouatef Ait-Lounis, Laurette Morlé, Joëlle Thomas, Brigitte Chhin, Nathalie Spassky, Walter Reith, et Bénédicte Durand. 2009. « RFX3 Governs Growth and

- Beating Efficiency of Motile Cilia in Mouse and Controls the Expression of Genes Involved in Human Ciliopathies. » *Journal of Cell Science* 122 (Pt 17): 3180- 89. doi:10.1242/jcs.048348.
- Emery, P., B. Durand, B. Mach, et W. Reith. 1996. « RFX Proteins, a Novel Family of DNA Binding Proteins Conserved in the Eukaryotic Kingdom. » *Nucleic Acids Research* 24 (5): 803- 7.
- Enjolras, Camille, Joëlle Thomas, Brigitte Chhin, Elisabeth Cortier, Jean-Luc Duteyrat, Fabien Soulavie, Maurice J. Kernan, Anne Laurençon, et Bénédicte Durand. 2012. « Drosophila chibby is required for basal body formation and ciliogenesis but not for Wg signaling. » *The Journal of Cell Biology* 197 (2): 313- 25. doi:10.1083/jcb.201109148.
- Escudier, Estelle, Philippe Duquesnoy, Jean François Papon, et Serge Amselem. 2009. « Ciliary Defects and Genetics of Primary Ciliary Dyskinesia. » *Paediatric Respiratory Reviews* 10 (2): 51- 54. doi:10.1016/j.prrv.2009.02.001.
- Essner, Jeffrey J., Jeffrey D. Amack, Molly K. Nyholm, Erin B. Harris, et H. Joseph Yost. 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 (Cambridge, England)* 132 (6): 1247- 60. doi:10.1242/dev.01663.
- Failler, Marion, Heon Yung Gee, Pauline Krug, Kwangsic Joo, Jan Halbritter, Lilya Belkacem, Emilie Filhol, et al. 2014. « Mutations of CEP83 Cause Infantile Nephronophthisis and Intellectual Disability. » *American Journal of Human Genetics* 94 (6): 905- 14. doi:10.1016/j.ajhg.2014.05.002.
- Fang, M., Y. Lu, G.-J. Chen, L. Shen, Y.-M. Pan, et X.-F. Wang. 2011. « Increased Expression of Sonic Hedgehog in Temporal Lobe Epileptic Foci in Humans and Experimental Rats. » *Neuroscience* 182 (mai): 62- 70. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.02.060.
- Ferrante, Maria Immacolata, Alessandro Zullo, Adriano Barra, Sabrina Bimonte, Nadia Messaddeq, Michèle Studer, Pascal Dollé, et Brunella Franco. 2006. « Oral-Facial-Digital Type I Protein Is Required for Primary Cilia Formation and Left-Right Axis Specification. » *Nature Genetics* 38 (1): 112- 17. doi:10.1038/ng1684.
- Finetti, Francesca, Silvia Rossi Paccani, Maria Giovanna Riparbelli, Emiliana Giacomello, Giuseppe Perinetti, Gregory J. Pazour, Joel L. Rosenbaum, et Cosima T. Baldari. 2009. « Intraflagellar Transport Is Required for Polarized Recycling of the TCR/CD3 Complex to the Immune Synapse. » *Nature Cell Biology* 11 (11): 1332- 39. doi:10.1038/ncb1977.
- Finetti, Francesca, Laura Patrussi, Giulia Masi, Anna Onnis, Donatella Galgano, Orso Maria Lucherini, Gregory J. Pazour, et Cosima T. Baldari. 2014. « Specific Recycling Receptors Are Targeted to the Immune Synapse by the Intraflagellar Transport System. » *Journal of Cell Science* 127 (Pt 9): 1924- 37. doi:10.1242/jcs.139337.
- Fischer, Evelyne, Emilie Legue, Antonia Doyen, Faridabano Nato, Jean-François Nicolas, Vicente Torres, Moshe Yaniv, et Marco Pontoglio. 2006. « Defective Planar Cell Polarity in Polycystic Kidney Disease. » *Nature Genetics* 38 (1): 21- 23. doi:10.1038/ng1701.
- Fischer, Evelyne, et Marco Pontoglio. 2009. « Planar cell polarity and cilia. » *Seminars in Cell & Developmental Biology, Imaging in Cell and Developmental Biology Planar Cell Polarity*, 20 (8): 998- 1005. doi:10.1016/j.semcdb.2009.09.016.

- Fliegau, Manfred, Judit Horvath, Christian von Schnakenburg, Heike Olbrich, Dominik Müller, Julia Thumfart, Bernhard Schermer, et al. 2006. « Nephrocystin Specifically Localizes to the Transition Zone of Renal and Respiratory Cilia and Photoreceptor Connecting Cilia. » *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 17 (9): 2424- 33. doi:10.1681/ASN.2005121351.
- Follit, John A., Richard A. Tuft, Kevin E. Fogarty, et Gregory J. Pazour. 2006. « The Intraflagellar Transport Protein IFT20 Is Associated with the Golgi Complex and Is Required for Cilia Assembly. » *Molecular Biology of the Cell* 17 (9): 3781- 92. doi:10.1091/mbc.E06-02-0133.
- Forsythe, Elizabeth, et Philip L. Beales. 2013. « Bardet-Biedl Syndrome. » *European Journal of Human Genetics: EJHG* 21 (1): 8- 13. doi:10.1038/ejhg.2012.115.
- Francis, Richard J. B., Adam Christopher, William A. Devine, Lawrence Ostrowski, et Cecilia Lo. 2012. « Congenital Heart Disease and the Specification of Left-Right Asymmetry. » *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 302 (10): H2102- 11. doi:10.1152/ajpheart.01118.2011.
- Frank, Valeska, Sandra Habbig, Malte P. Bartram, Tobias Eisenberger, Hermine E. Veenstra-Knol, Christian Decker, Reinder A. C. Boorsma, et al. 2013. « Mutations in NEK8 Link Multiple Organ Dysplasia with Altered Hippo Signalling and Increased c-MYC Expression. » *Human Molecular Genetics* 22 (11): 2177- 85. doi:10.1093/hmg/ddt070.
- Fry, Andrew M., Laura O'Regan, Sarah R. Sabir, et Richard Bayliss. 2012. « Cell Cycle Regulation by the NEK Family of Protein Kinases. » *Journal of Cell Science* 125 (Pt 19): 4423- 33. doi:10.1242/jcs.111195.
- Gagnadoux, M. F., J. L. Bacri, M. Broyer, et R. Habib. 1989. « Infantile Chronic Tubulo-Interstitial Nephritis with Cortical Microcysts: Variant of Nephronophthisis or New Disease Entity? » *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)* 3 (1): 50- 55.
- Gajiwala, K. S., H. Chen, F. Cornille, B. P. Roques, W. Reith, B. Mach, et S. K. Burley. 2000. « Structure of the Winged-Helix Protein hRFX1 Reveals a New Mode of DNA Binding. » *Nature* 403 (6772): 916- 21. doi:10.1038/35002634.
- Garcia-Gonzalo, Francesc R., Kevin C. Corbit, María Salomé Sirerol-Piquer, Gokul Ramaswami, Edgar A. Otto, Thomas R. Noriega, Allen D. Seol, et al. 2011. « A Transition Zone Complex Regulates Mammalian Ciliogenesis and Ciliary Membrane Composition. » *Nature Genetics* 43 (8): 776- 84. doi:10.1038/ng.891.
- Garel, L. A., R. Habib, D. Pariente, M. Broyer, et J. Sauvegrain. 1984. « Juvenile Nephronophthisis: Sonographic Appearance in Children with Severe Uremia. » *Radiology* 151 (1): 93- 95. doi:10.1148/radiology.151.1.6701346.
- Gerdes, Jantje M., Yangfan Liu, Norann A. Zaghoul, Carmen C. Leitch, Shaneka S. Lawson, Masaki Kato, Philip A. Beachy, et al. 2007. « Disruption of the Basal Body Compromises Proteasomal Function and Perturbs Intracellular Wnt Response. » *Nature Genetics* 39 (11): 1350- 60. doi:10.1038/ng.2007.12.
- Getchell, T. V. 1986. « Functional Properties of Vertebrate Olfactory Receptor Neurons. » *Physiological Reviews* 66 (3): 772- 818.
- Ghossoub, Rania, Qicong Hu, Marion Failler, Marie-Christine Rouyez, Benjamin Spitzbarth, Serge Mostowy, Uwe Wolfrum, et al. 2013. « Septins 2, 7 and 9 and MAP4 Colocalize

- along the Axoneme in the Primary Cilium and Control Ciliary Length. » *Journal of Cell Science* 126 (Pt 12): 2583- 94. doi:10.1242/jcs.111377.
- Ghossoub, Rania, Anahi Molla-Herman, Philippe Bastin, et Alexandre Benmerah. 2011. « The Ciliary Pocket: A Once-Forgotten Membrane Domain at the Base of Cilia. » *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 103 (3): 131- 44. doi:10.1042/BC20100128.
- Gibbons, I. R. 1981. « Cilia and Flagella of Eukaryotes. » *The Journal of Cell Biology* 91 (3 Pt 2): 107s - 124s.
- Gilissen, Christian, Heleen H. Arts, Alexander Hoischen, Liesbeth Spruijt, Dorus A. Mans, Peer Arts, Bart van Lier, et al. 2010. « Exome Sequencing Identifies WDR35 Variants Involved in Sensenbrenner Syndrome. » *American Journal of Human Genetics* 87 (3): 418- 23. doi:10.1016/j.ajhg.2010.08.004.
- Gilula, N. B., et P. Satir. 1972. « The Ciliary Necklace. A Ciliary Membrane Specialization. » *The Journal of Cell Biology* 53 (2): 494- 509.
- Goetz, Sarah C., et Kathryn V. Anderson. 2010. « The Primary Cilium: A Signalling Centre during Vertebrate Development. » *Nature Reviews. Genetics* 11 (5): 331- 44. doi:10.1038/nrg2774.
- Goetz, Sarah C., Karel F. Liem, et Kathryn V. Anderson. 2012. « The Spinocerebellar Ataxia-Associated Gene Tau Tubulin Kinase 2 Controls the Initiation of Ciliogenesis. » *Cell* 151 (4): 847- 58. doi:10.1016/j.cell.2012.10.010.
- Goodenough, U. W., et J. E. Heuser. 1985. « Substructure of Inner Dynein Arms, Radial Spokes, and the Central Pair/projection Complex of Cilia and Flagella. » *The Journal of Cell Biology* 100 (6): 2008- 18.
- Gordon, R. E. 1982. « Three-Dimensional Organization of Microtubules and Microfilaments of the Basal Body Apparatus of Ciliated Respiratory Epithelium. » *Cell Motility* 2 (4): 385- 91.
- Graser, Susanne, York-Dieter Stierhof, Sébastien B. Lavoie, Oliver S. Gassner, Stefan Lamla, Mikael Le Clech, et Erich A. Nigg. 2007. « Cep164, a Novel Centriole Appendage Protein Required for Primary Cilium Formation. » *The Journal of Cell Biology* 179 (2): 321- 30. doi:10.1083/jcb.200707181.
- Gromley, Adam, Agata Jurczyk, James Sillibourne, Ensar Halilovic, Mette Mogensen, Irina Groisman, Maureen Blomberg, et Stephen Doxsey. 2003. « A Novel Human Protein of the Maternal Centriole Is Required for the Final Stages of Cytokinesis and Entry into S Phase. » *The Journal of Cell Biology* 161 (3): 535- 45. doi:10.1083/jcb.200301105.
- Guarguaglini, Giulia, Peter I. Duncan, York D. Stierhof, Tim Holmström, Stefan Duensing, et Erich A. Nigg. 2005. « The Forkhead-Associated Domain Protein Cep170 Interacts with Polo-like Kinase 1 and Serves as a Marker for Mature Centrioles. » *Molecular Biology of the Cell* 16 (3): 1095- 1107. doi:10.1091/mbc.E04-10-0939.
- Guichard, Paul, Denis Chrétien, Sergio Marco, et Anne-Marie Tassin. 2010. « Procentriole assembly revealed by cryo-electron tomography. » *The EMBO Journal* 29 (9): 1565- 72. doi:10.1038/emboj.2010.45.
- Habbig, Sandra, Malte P. Bartram, Josef G. Sägmüller, Anabel Griessmann, Mareike Franke, Roman-Ulrich Müller, Ricarda Schwarz, et al. 2012. « The Ciliopathy Disease Protein NPHP9 Promotes Nuclear Delivery and Activation of the Oncogenic Transcriptional

- Regulator TAZ. » *Human Molecular Genetics* 21 (26): 5528- 38. doi:10.1093/hmg/dds408.
- Hackett, B. P., S. L. Brody, M. Liang, I. D. Zeitz, L. A. Bruns, et J. D. Gitlin. 1995. « Primary Structure of Hepatocyte Nuclear Factor/forkhead Homologue 4 and Characterization of Gene Expression in the Developing Respiratory and Reproductive Epithelium. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (10): 4249- 53.
- Haddon, C., et J. Lewis. 1996. « Early Ear Development in the Embryo of the Zebrafish, *Danio Rerio*. » *The Journal of Comparative Neurology* 365 (1): 113- 28. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960129)365:1<113::AID-CNE9>3.0.CO;2-6.
- Halbert, S. A., D. L. Patton, P. W. Zarutskie, et M. R. Soules. 1997. « Function and Structure of Cilia in the Fallopian Tube of an Infertile Woman with Kartagener's Syndrome. » *Human Reproduction (Oxford, England)* 12 (1): 55- 58.
- Halbritter, Jan, Albane A. Bizet, Miriam Schmidts, Jonathan D. Porath, Daniela A. Braun, Heon Yung Gee, Aideen M. McInerney-Leo, et al. 2013. « Defects in the IFT-B Component IFT172 Cause Jeune and Mainzer-Saldino Syndromes in Humans. » *American Journal of Human Genetics* 93 (5): 915- 25. doi:10.1016/j.ajhg.2013.09.012.
- Halbritter, Jan, Jonathan D. Porath, Katrina A. Diaz, Daniela A. Braun, Stefan Kohl, Moumita Chaki, Susan J. Allen, et al. 2013. « Identification of 99 Novel Mutations in a Worldwide Cohort of 1,056 Patients with a Nephronophthisis-Related Ciliopathy. » *Human Genetics* 132 (8): 865- 84. doi:10.1007/s00439-013-1297-0.
- Hanaoka, K., F. Qian, A. Boletta, A. K. Bhunia, K. Piontek, L. Tsiokas, V. P. Sukhatme, W. B. Guggino, et G. G. Germino. 2000. « Co-Assembly of Polycystin-1 and -2 Produces Unique Cation-Permeable Currents. » *Nature* 408 (6815): 990- 94. doi:10.1038/35050128.
- Haycraft, Courtney J., Boglarka Banizs, Yesim Aydin-Son, Qihong Zhang, Edward J. Michaud, et Bradley K. Yoder. 2005. « Gli2 and Gli3 Localize to Cilia and Require the Intraflagellar Transport Protein Polaris for Processing and Function. » *PLoS Genetics* 1 (4): e53. doi:10.1371/journal.pgen.0010053.
- Hellman, Nathan E., Yan Liu, Erin Merkel, Christina Austin, Stephanie Le Corre, David R. Beier, Zhaoxia Sun, Neeraj Sharma, Bradley K. Yoder, et Iain A. Drummond. 2010. « The Zebrafish foxj1a Transcription Factor Regulates Cilia Function in Response to Injury and Epithelial Stretch. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (43): 18499- 504. doi:10.1073/pnas.1005998107.
- He, Mu, Radhika Subramanian, Fiona Bangs, Tatiana Omelchenko, Karel F. Liem, Tarun M. Kapoor, et Kathryn V. Anderson. 2014. « The Kinesin-4 Protein Kif7 Regulates Mammalian Hedgehog Signalling by Organizing the Cilium Tip Compartment. » *Nature Cell Biology* 16 (7): 663- 72. doi:10.1038/ncb2988.
- He, Runsheng, Qixi Wu, Haining Zhou, Ning Huang, Jianguo Chen, et Junlin Teng. 2013. « Cep57 Protein Is Required for Cytokinesis by Facilitating Central Spindle Microtubule Organization. » *The Journal of Biological Chemistry* 288 (20): 14384- 90. doi:10.1074/jbc.M112.441501.
- Hildebrandt, Friedhelm, Massimo Attanasio, et Edgar Otto. 2009. « Nephronophthisis: Disease Mechanisms of a Ciliopathy. » *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 20 (1): 23- 35. doi:10.1681/ASN.2008050456.

- Hildebrandt, F., B. Strahm, H. G. Nothwang, N. Gretz, B. Schnieders, I. Singh-Sawhney, R. Kutt, M. Vollmer, et M. Brandis. 1997. « Molecular Genetic Identification of Families with Juvenile Nephronophthisis Type 1: Rate of Progression to Renal Failure. APN Study Group. Arbeitsgemeinschaft Für Pädiatrische Nephrologie. » *Kidney International* 51 (1): 261- 69.
- Hildebrandt, F., R. Waldherr, R. Kutt, et M. Brandis. 1992. « The Nephronophthisis Complex: Clinical and Genetic Aspects. » *The Clinical Investigator* 70 (9): 802- 8.
- Hirokawa, Nobutaka, Yosuke Tanaka, Yasushi Okada, et Sen Takeda. 2006. « Nodal Flow and the Generation of Left-Right Asymmetry. » *Cell* 125 (1): 33- 45. doi:10.1016/j.cell.2006.03.002.
- Hjeij, Rim, Anna Lindstrand, Richard Francis, Maimoona A. Zariwala, Xiaoqin Liu, You Li, Rama Damerla, et al. 2013. « ARMC4 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Randomization of Left/right Body Asymmetry. » *American Journal of Human Genetics* 93 (2): 357- 67. doi:10.1016/j.ajhg.2013.06.009.
- Hoefele, Julia, Ralf Sudbrak, Richard Reinhardt, Silvia Lehrack, Steffen Hennig, Anita Imm, Ulla Muerb, et al. 2005. « Mutational Analysis of the NPHP4 Gene in 250 Patients with Nephronophthisis. » *Human Mutation* 25 (4): 411. doi:10.1002/humu.9326.
- Hoefele, Julia, Matthias T. F. Wolf, John F. O'Toole, Edgar A. Otto, Ulla Schultheiss, Georges Dêschenes, Massimo Attanasio, Boris Utsch, Corinne Antignac, et Friedhelm Hildebrandt. 2007. « Evidence of Oligogenic Inheritance in Nephronophthisis. » *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 18 (10): 2789- 95. doi:10.1681/ASN.2007020243.
- Hoff, Sylvia, Jan Halbritter, Daniel Epting, Valeska Frank, Thanh-Minh T. Nguyen, Jeroen van Reeuwijk, Christopher Boehlke, et al. 2013. « ANKS6 Is a Central Component of a Nephronophthisis Module Linking NEK8 to INVS and NPHP3. » *Nature Genetics* 45 (8): 951- 56. doi:10.1038/ng.2681.
- Horani, Amjad, Todd E. Druley, Maimoona A. Zariwala, Anand C. Patel, Benjamin T. Levinson, Laura G. Van Arendonk, Katherine C. Thornton, et al. 2012. « Whole-Exome Capture and Sequencing Identifies HEATR2 Mutation as a Cause of Primary Ciliary Dyskinesia. » *American Journal of Human Genetics* 91 (4): 685- 93. doi:10.1016/j.ajhg.2012.08.022.
- Hou, Yuqing, Hongmin Qin, John A. Follit, Gregory J. Pazour, Joel L. Rosenbaum, et George B. Witman. 2007. « Functional Analysis of an Individual IFT Protein: IFT46 Is Required for Transport of Outer Dynein Arms into Flagella. » *The Journal of Cell Biology* 176 (5): 653- 65. doi:10.1083/jcb.200608041.
- Huangfu, Danwei, et Kathryn V. Anderson. 2005. « Cilia and Hedgehog Responsiveness in the Mouse. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (32): 11325- 30. doi:10.1073/pnas.0505328102.
- Huangfu, Danwei, Aimin Liu, Andrew S. Rakeman, Noel S. Murcia, Lee Niswander, et Kathryn V. Anderson. 2003. « Hedgehog Signalling in the Mouse Requires Intraflagellar Transport Proteins. » *Nature* 426 (6962): 83- 87. doi:10.1038/nature02061.
- Huang, Kaiyao, Dennis R. Diener, et Joel L. Rosenbaum. 2009. « The Ubiquitin Conjugation System Is Involved in the Disassembly of Cilia and Flagella. » *The Journal of Cell Biology* 186 (4): 601- 13. doi:10.1083/jcb.200903066.

- Huang, Peng, et Alexander F. Schier. 2009. « Dampened Hedgehog signaling but normal Wnt signaling in zebrafish without cilia. » *Development (Cambridge, England)* 136 (18): 3089- 98. doi:10.1242/dev.041343.
- Huber, Céline, Sulin Wu, Ashley S. Kim, Sabine Sigaudy, Anna Sarukhanov, Valérie Serre, Genevieve Baujat, et al. 2013. « WDR34 Mutations That Cause Short-Rib Polydactyly Syndrome Type III/severe Asphyxiating Thoracic Dysplasia Reveal a Role for the NF- κ B Pathway in Cilia. » *American Journal of Human Genetics* 93 (5): 926- 31. doi:10.1016/j.ajhg.2013.10.007.
- Hu, Qicong, Ljiljana Milenkovic, Hua Jin, Matthew P. Scott, Maxence V. Nachury, Elias T. Spiliotis, et W. James Nelson. 2010. « A Septin Diffusion Barrier at the Base of the Primary Cilium Maintains Ciliary Membrane Protein Distribution. » *Science (New York, N.Y.)* 329 (5990): 436- 39. doi:10.1126/science.1191054.
- Hu, Qicong, et W. James Nelson. 2011. « Ciliary Diffusion Barrier: The Gatekeeper for the Primary Cilium Compartment. » *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 68 (6): 313- 24. doi:10.1002/cm.20514.
- Huynh Cong, Evelyne, Albane A. Bizet, Olivia Boyer, Stéphanie Woerner, Olivier Gribouval, Emilie Filhol, Christelle Arrondel, et al. 2014. « A Homozygous Missense Mutation in the Ciliary Gene TTC21B Causes Familial FSGS. » *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 25 (11): 2435- 43. doi:10.1681/ASN.2013101126.
- Hu, Zhangfeng, Yinwen Liang, Dan Meng, Liang Wang, et Junmin Pan. 2015. « Chapter Five - Microtubule-Depolymerizing Kinesins in the Regulation of Assembly, Disassembly, and Length of Cilia and Flagella. » In *International Review of Cell and Molecular Biology*, édité par Kwang W. Jeon, 317:241- 65. Academic Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S193764481500009X>.
- Inaba, Kazuo. 2003. « Molecular Architecture of the Sperm Flagella: Molecules for Motility and Signaling. » *Zoological Science* 20 (9): 1043- 56.
- Insolera, Ryan, Wei Shao, Rannar Airik, Friedhelm Hildebrandt, et Song-Hai Shi. 2014. « SDCCAG8 Regulates Pericentriolar Material Recruitment and Neuronal Migration in the Developing Cortex. » *Neuron* 83 (4): 805- 22. doi:10.1016/j.neuron.2014.06.029.
- Iomini, C., V. Babaev-Khaimov, M. Sassaroli, et G. Piperno. 2001. « Protein Particles in Chlamydomonas Flagella Undergo a Transport Cycle Consisting of Four Phases. » *The Journal of Cell Biology* 153 (1): 13- 24.
- Ishikawa, Hiroaki, Takahiro Ide, Toshiki Yagi, Xue Jiang, Masafumi Hirono, Hiroyuki Sasaki, Haruaki Yanagisawa, et al. 2014. « TTC26/DYF13 Is an Intraflagellar Transport Protein Required for Transport of Motility-Related Proteins into Flagella. » *eLife* 3: e01566.
- Ishikawa, Hiroaki, et Wallace F. Marshall. 2011. « Ciliogenesis: Building the Cell's Antenna. » *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12 (4): 222- 34. doi:10.1038/nrm3085.
- Jacquet, Benoit V., Raul Salinas-Mondragon, Huixuan Liang, Blair Therit, Justin D. Buie, Michael Dykstra, Kenneth Campbell, Lawrence E. Ostrowski, Steven L. Brody, et H. Troy Ghashghaei. 2009. « FoxJ1-Dependent Gene Expression Is Required for Differentiation of Radial Glia into Ependymal Cells and a Subset of Astrocytes in the Postnatal Brain. » *Development (Cambridge, England)* 136 (23): 4021- 31. doi:10.1242/dev.041129.

- Jain, B., I. Rubinstein, R. A. Robbins, K. L. Leise, et J. H. Sisson. 1993. « Modulation of Airway Epithelial Cell Ciliary Beat Frequency by Nitric Oxide. » *Biochemical and Biophysical Research Communications* 191 (1): 83- 88. doi:10.1006/bbrc.1993.1187.
- Jauregui, Andrew R., Ken C. Q. Nguyen, David H. Hall, et Maureen M. Barr. 2008. « The Caenorhabditis Elegans Nephrocystins Act as Global Modifiers of Cilium Structure. » *The Journal of Cell Biology* 180 (5): 973- 88. doi:10.1083/jcb.200707090.
- Jeanson, Ludovic, Bruno Copin, Jean-François Papon, Florence Dastot-Le Moal, Philippe Duquesnoy, Guy Montantin, Jacques Cadranel, et al. 2015. « RSPH3 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Central-Complex Defects and a Near Absence of Radial Spokes. » *American Journal of Human Genetics* 97 (1): 153- 62. doi:10.1016/j.ajhg.2015.05.004.
- Jean, Y., J. Langlais, K. D. Roberts, A. Chapdelaine, et G. Bleau. 1979. « Fertility of a Woman with Nonfunctional Ciliated Cells in the Fallopian Tubes. » *Fertility and Sterility* 31 (3): 349- 50.
- Jenkins, Paul M., Toby W. Hurd, Lian Zhang, Dyke P. McEwen, R. Lane Brown, Ben Margolis, Kristen J. Verhey, et Jeffrey R. Martens. 2006. « Ciliary Targeting of Olfactory CNG Channels Requires the CNGB1b Subunit and the Kinesin-2 Motor Protein, KIF17. » *Current Biology: CB* 16 (12): 1211- 16. doi:10.1016/j.cub.2006.04.034.
- Jeune, M., C. Beraud, et R. Carron. 1955. « [Asphyxiating thoracic dystrophy with familial characteristics]. » *Archives Françaises De Pédiatrie* 12 (8): 886- 91.
- Jiang, Si-Tse, Yuan-Yow Chiou, Ellian Wang, Hsiu-Kuan Lin, Sue-Ping Lee, Hsin-Yi Lu, Chi-Kuang Leo Wang, Ming-Jer Tang, et Hung Li. 2008. « Targeted Disruption of Nphp1 Causes Male Infertility due to Defects in the Later Steps of Sperm Morphogenesis in Mice. » *Human Molecular Genetics* 17 (21): 3368- 79. doi:10.1093/hmg/ddn231.
- Jin, Hua, Susan Roehl White, Toshinobu Shida, Stefan Schulz, Mike Aguiar, Steven P. Gygi, J. Fernando Bazan, et Maxence V. Nachury. 2010. « The conserved Bardet-Biedl Syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia. » *Cell* 141 (7): 1208- 19. doi:10.1016/j.cell.2010.05.015.
- Johnson, C. A., P. Gissen, et C. Sergi. 2003. « Molecular Pathology and Genetics of Congenital Hepatorenal Fibrocystic Syndromes. » *Journal of Medical Genetics* 40 (5): 311- 19.
- Jones, Sherri M., Lawrence C. Erway, Kenneth R. Johnson, Heping Yu, et Timothy A. Jones. 2004. « Gravity Receptor Function in Mice with Graded Otoconial Deficiencies. » *Hearing Research* 191 (1-2): 34- 40. doi:10.1016/j.heares.2004.01.008.
- Joo, Kwangsic, Chang Gun Kim, Mi-Sun Lee, Hyun-Yi Moon, Sang-Hee Lee, Mi Jeong Kim, Hee-Seok Kweon, et al. 2013. « CCDC41 Is Required for Ciliary Vesicle Docking to the Mother Centriole. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (15): 5987- 92. doi:10.1073/pnas.1220927110.
- Kaplan, Oktay I., Anahi Molla-Herman, Sebiha Cevik, Rania Ghossoub, Katarzyna Kida, Yoshishige Kimura, Paul Jenkins, et al. 2010. « The AP-1 Clathrin Adaptor Facilitates Cilium Formation and Functions with RAB-8 in C. Elegans Ciliary Membrane Transport. » *Journal of Cell Science* 123 (22): 3966- 77. doi:10.1242/jcs.073908.
- Karner, Courtney M., Rani Chirumamilla, Shigehisa Aoki, Peter Igarashi, John B. Wallingford, et Thomas J. Carroll. 2009. « Wnt9b Signaling Regulates Planar Cell Polarity and Kidney Tubule Morphogenesis. » *Nature Genetics* 41 (7): 793- 99. doi:10.1038/ng.400.

- Katsanis, N., S. J. Ansley, J. L. Badano, E. R. Eichers, R. A. Lewis, B. E. Hoskins, P. J. Scambler, W. S. Davidson, P. L. Beales, et J. R. Lupski. 2001. « Triallelic Inheritance in Bardet-Biedl Syndrome, a Mendelian Recessive Disorder. » *Science (New York, N.Y.)* 293 (5538): 2256- 59. doi:10.1126/science.1063525.
- Kennedy, Marcus P., Heymut Omran, Margaret W. Leigh, Sharon Dell, Lucy Morgan, Paul L. Molina, Blair V. Robinson, et al. 2007. « Congenital Heart Disease and Other Heterotaxic Defects in a Large Cohort of Patients with Primary Ciliary Dyskinesia. » *Circulation* 115 (22): 2814- 21. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.649038.
- Ke, Yi-Ni, et Wan-Xi Yang. 2014. « Primary Cilium: An Elaborate Structure That Blocks Cell Division? » *Gene* 547 (2): 175- 85. doi:10.1016/j.gene.2014.06.050.
- Khanna, Hemant, Toby W. Hurd, Concepcion Lillo, Xinhua Shu, Sunil K. Parapuram, Shirley He, Masayuki Akimoto, et al. 2005. « RPGR-ORF15, Which Is Mutated in Retinitis Pigmentosa, Associates with SMC1, SMC3, and Microtubule Transport Proteins. » *The Journal of Biological Chemistry* 280 (39): 33580- 87. doi:10.1074/jbc.M505827200.
- Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, et T. F. Schilling. 1995. « Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. » *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 203 (3): 253- 310. doi:10.1002/aja.1002030302.
- King, Stephen M. 2010. « Axonemal Dyneins Winch the Cilium. » *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (6): 673- 74. doi:10.1038/nsmb0610-673.
- . 2013. « Biochemical and Physiological Analysis of Axonemal Dyneins. » *Methods in Enzymology* 524: 123- 45. doi:10.1016/B978-0-12-397945-2.00008-1.
- Klos Dehring, Deborah A., Eszter K. Vldar, Michael E. Werner, Jennifer W. Mitchell, Peter Hwang, et Brian J. Mitchell. 2013. « Deuterosome Mediated Centriole Biogenesis. » *Developmental cell* 27 (1). doi:10.1016/j.devcel.2013.08.021.
- Knowles, Michael R., Leigh Anne Daniels, Stephanie D. Davis, Maimoona A. Zariwala, et Margaret W. Leigh. 2013. « Primary Ciliary Dyskinesia. Recent Advances in Diagnostics, Genetics, and Characterization of Clinical Disease. » *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 188 (8): 913- 22. doi:10.1164/rccm.201301-0059CI.
- Knowles, Michael R., Margaret W. Leigh, Lawrence E. Ostrowski, Lu Huang, Johnny L. Carson, Milan J. Hazucha, Weining Yin, et al. 2013. « Exome Sequencing Identifies Mutations in CCDC114 as a Cause of Primary Ciliary Dyskinesia. » *American Journal of Human Genetics* 92 (1): 99- 106. doi:10.1016/j.ajhg.2012.11.003.
- Knowles, Michael R., Lawrence E. Ostrowski, Niki T. Loges, Toby Hurd, Margaret W. Leigh, Lu Huang, Whitney E. Wolf, et al. 2013. « Mutations in SPAG1 Cause Primary Ciliary Dyskinesia Associated with Defective Outer and Inner Dynein Arms. » *American Journal of Human Genetics* 93 (4): 711- 20. doi:10.1016/j.ajhg.2013.07.025.
- Kobayashi, Tetsuo, Keiko Gengyo-Ando, Takeshi Ishihara, Isao Katsura, et Shohei Mitani. 2007. « IFT-81 and IFT-74 Are Required for Intraflagellar Transport in *C. Elegans*. » *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 12 (5): 593- 602. doi:10.1111/j.1365-2443.2007.01076.x.
- Kobayashi, Tetsuo, Sehyun Kim, Yu-Chun Lin, Takanari Inoue, et Brian David Dynlacht. 2014. « The CP110-Interacting Proteins Talpid3 and Cep290 Play Overlapping and Distinct

- Roles in Cilia Assembly.» *The Journal of Cell Biology* 204 (2): 215- 29. doi:10.1083/jcb.201304153.
- Kobayashi, Tetsuo, William Y. Tsang, Ji Li, William Lane, et Brian David Dynlacht. 2011. « Centriolar Kinesin Kif24 Interacts with CP110 to Remodel Microtubules and Regulate Ciliogenesis. » *Cell* 145 (6): 914- 25. doi:10.1016/j.cell.2011.04.028.
- Kott, Esther, Philippe Duquesnoy, Bruno Copin, Marie Legendre, Florence Dastot-Le Moal, Guy Montantin, Ludovic Jeanson, 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. » *American Journal of Human Genetics* 91 (5): 958- 64. doi:10.1016/j.ajhg.2012.10.003.
- Kott, Esther, Marie Legendre, Bruno Copin, Jean-François Papon, Florence Dastot-Le Moal, Guy Montantin, Philippe Duquesnoy, et al. 2013. « Loss-of-Function Mutations in RSPH1 Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Central-Complex and Radial-Spoke Defects. » *American Journal of Human Genetics* 93 (3): 561- 70. doi:10.1016/j.ajhg.2013.07.013.
- Kozminski, K. G., P. L. Beech, et J. L. Rosenbaum. 1995. « The Chlamydomonas Kinesin-like Protein FLA10 Is Involved in Motility Associated with the Flagellar Membrane. » *The Journal of Cell Biology* 131 (6 Pt 1): 1517- 27.
- Kramer-Zucker, Albrecht G., Felix Olale, Courtney J. Haycraft, Bradley K. Yoder, Alexander F. Schier, et Iain A. Drummond. 2005. « Cilia-Driven Fluid Flow in the Zebrafish Pronephros, Brain and Kupffer's Vesicle Is Required for Normal Organogenesis. » *Development (Cambridge, England)* 132 (8): 1907- 21. doi:10.1242/dev.01772.
- Kubo, Tomohiro, Haru-aki Yanagisawa, Toshiki Yagi, Masafumi Hirono, et Ritsu Kamiya. 2010. « Tubulin Polyglutamylolation Regulates Axonemal Motility by Modulating Activities of Inner-Arm Dyneins. » *Current Biology: CB* 20 (5): 441- 45. doi:10.1016/j.cub.2009.12.058.
- Kunimoto, Koshi, Yuji Yamazaki, Tomoki Nishida, Kyosuke Shinohara, Hiroaki Ishikawa, Toshiaki Hasegawa, Takeshi Okanoue, et al. 2012. « Coordinated Ciliary Beating Requires Odf2-Mediated Polarization of Basal Bodies via Basal Feet. » *Cell* 148 (1-2): 189- 200. doi:10.1016/j.cell.2011.10.052.
- Kuo, Yung-Che, Yi-Ru Shen, Hau-Inh Chen, Ying-Hung Lin, Ya-Yun Wang, Yet-Ran Chen, Chia-Yih Wang, et Pao-Lin Kuo. 2015. « SEPT12 Orchestrates the Formation of Mammalian Sperm Annulus by Organizing Core Octameric Complexes with Other SEPT Proteins. » *Journal of Cell Science* 128 (5): 923- 34. doi:10.1242/jcs.158998.
- Lancet, D. 1986. « Vertebrate Olfactory Reception. » *Annual Review of Neuroscience* 9: 329- 55. doi:10.1146/annurev.ne.09.030186.001553.
- Lange, B. M., et K. Gull. 1995. « A Molecular Marker for Centriole Maturation in the Mammalian Cell Cycle. » *The Journal of Cell Biology* 130 (4): 919- 27.
- Larkins, Christine E., Gladys D. Gonzalez Aviles, Michael P. East, Richard A. Kahn, et Tamara Caspary. 2011. « Arl13b Regulates Ciliogenesis and the Dynamic Localization of Shh Signaling Proteins. » *Molecular Biology of the Cell* 22 (23): 4694- 4703. doi:10.1091/mbc.E10-12-0994.
- Larsson, M., J. Norrander, S. Gräslund, E. Brundell, R. Linck, S. Ståhl, et C. Höög. 2000. « The Spatial and Temporal Expression of Tekt1, a Mouse Tektin C Homologue, during Spermatogenesis Suggest That It Is Involved in the Development of the Sperm Tail

- Basal Body and Axoneme. » *European Journal of Cell Biology* 79 (10): 718- 25. doi:10.1078/0171-9335-00097.
- Lau, Lana, Yin Loon Lee, Steffen J. Sahl, Tim Stearns, et W. E. Moerner. 2012. « STED Microscopy with Optimized Labeling Density Reveals 9-Fold Arrangement of a Centriole Protein. » *Biophysical Journal* 102 (12): 2926- 35. doi:10.1016/j.bpj.2012.05.015.
- Laurençon, Anne, Raphaëlle Dubruille, Evgeni Efimenko, Guillaume Grenier, Ryan Bissett, Elisabeth Cortier, Vivien Rolland, Peter Swoboda, et Bénédicte Durand. 2007. « Identification of Novel Regulatory Factor X (RFX) Target Genes by Comparative Genomics in Drosophila Species. » *Genome Biology* 8 (9): R195. doi:10.1186/gb-2007-8-9-r195.
- Lechtreck, Karl-Ferdinand, Eric C. Johnson, Tsuyoshi Sakai, Deborah Cochran, Bryan A. Ballif, John Rush, Gregory J. Pazour, Mitsuo Ikebe, et George B. Witman. 2009. « The Chlamydomonas Reinhardtii BBSome Is an IFT Cargo Required for Export of Specific Signaling Proteins from Flagella. » *The Journal of Cell Biology* 187 (7): 1117- 32. doi:10.1083/jcb.200909183.
- Lee, Jiwon M., Yo Han Ahn, Hee Gyung Kang, li Soo Ha, Kyoungbun Lee, Kyung Chul Moon, Joo Hoon Lee, et al. 2015. « Nephronophthisis 13: Implications of Its Association with Caroli Disease and Altered Intracellular Localization of WDR19 in the Kidney. » *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, mars. doi:10.1007/s00467-015-3068-8.
- Lee, Lance. 2013. « Riding the Wave of Ependymal Cilia: Genetic Susceptibility to Hydrocephalus in Primary Ciliary Dyskinesia. » *Journal of Neuroscience Research* 91 (9): 1117- 32. doi:10.1002/jnr.23238.
- Lee, Yin Loon, Joshua Santé, Colin J. Comerchi, Benjamin Cyge, Luis F. Menezes, Feng-Qian Li, Gregory G. Germino, W. E. Moerner, Ken-Ichi Takemaru, et Tim Stearns. 2014. « Cby1 Promotes Ahi1 Recruitment to a Ring-Shaped Domain at the Centriole-Cilium Interface and Facilitates Proper Cilium Formation and Function. » *Molecular Biology of the Cell* 25 (19): 2919- 33. doi:10.1091/mbc.E14-02-0735.
- Leightner, Amanda C., Cynthia J. Hommerding, Ying Peng, Jeffrey L. Salisbury, Vladimir G. Gainullin, Peter G. Czarnecki, Caroline R. Sussman, et Peter C. Harris. 2013. « The Meckel syndrome protein meckelin (TMEM67) is a key regulator of cilia function but is not required for tissue planar polarity. » *Human Molecular Genetics* 22 (10): 2024- 40. doi:10.1093/hmg/ddt054.
- Lemullois, M., P. Gounon, et D. Sandoz. 1987. « Relationships between Cytokeratin Filaments and Centriolar Derivatives during Ciliogenesis in the Quail Oviduct. » *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 61 (1-2): 39- 49.
- L'Hernault, S. W., et J. L. Rosenbaum. 1985. « Chlamydomonas Alpha-Tubulin Is Posttranslationally Modified by Acetylation on the Epsilon-Amino Group of a Lysine. » *Biochemistry* 24 (2): 473- 78.
- Li, Binghua, Alysha A. Rauhauser, Julie Dai, Ramanavelan Sakthivel, Peter Igarashi, Anton M. Jetten, et Massimo Attanasio. 2011. « Increased Hedgehog Signaling in Postnatal Kidney Results in Aberrant Activation of Nephron Developmental Programs. » *Human Molecular Genetics* 20 (21): 4155- 66. doi:10.1093/hmg/ddr339.
- Lidow, M. S., et B. P. Menco. 1984. « Observations on Axonemes and Membranes of Olfactory and Respiratory Cilia in Frogs and Rats Using Tannic Acid-Supplemented

- Fixation and Photographic Rotation. » *Journal of Ultrastructure Research* 86 (1): 18- 30.
- Liem, Karel F., Alyson Ashe, Mu He, Peter Satir, Jennifer Moran, David Beier, Carol Wicking, et Kathryn V. Anderson. 2012. « The IFT-A Complex Regulates Shh Signaling through Cilia Structure and Membrane Protein Trafficking. » *The Journal of Cell Biology* 197 (6): 789- 800. doi:10.1083/jcb.201110049.
- Lienkamp, Soeren S., Kun Liu, Courtney M. Karner, Thomas J. Carroll, Olaf Ronneberger, John B. Wallingford, et Gerd Walz. 2012. « Vertebrate Kidney Tubules Elongate Using a Planar Cell Polarity-Dependent, Rosette-Based Mechanism of Convergent Extension. » *Nature Genetics* 44 (12): 1382- 87. doi:10.1038/ng.2452.
- Liew, Gerald M., Fan Ye, Andrew R. Nager, J. Patrick Murphy, Jaclyn S. Lee, Mike Aguiar, David K. Breslow, Steven P. Gygi, et Maxence V. Nachury. 2014. « The Intraflagellar Transport Protein IFT27 Promotes BBSome Exit from Cilia through the GTPase ARL6/BBS3. » *Developmental Cell* 31 (3): 265- 78. doi:10.1016/j.devcel.2014.09.004.
- Lim, D. J., et M. Anniko. 1985. « Developmental Morphology of the Mouse Inner Ear. A Scanning Electron Microscopic Observation. » *Acta Oto-Laryngologica. Supplementum* 422: 1- 69.
- Linck, Richard, Xiaofeng Fu, Jianfeng Lin, Christna Ouch, Alexandra Scheffter, Walter Steffen, Peter Warren, et Daniela Nicastro. 2014. « Insights into the Structure and Function of Ciliary and Flagellar Doublet Microtubules: Tektins, Ca²⁺-Binding Proteins, and Stable Protofilaments. » *The Journal of Biological Chemistry* 289 (25): 17427- 44. doi:10.1074/jbc.M114.568949.
- Linck, Richard W., et Jan M. Norrander. 2003. « Protofilament Ribbon Compartments of Ciliary and Flagellar Microtubules. » *Protist* 154 (3-4): 299- 311. doi:10.1078/143446103322454086.
- Linck, R. W., L. A. Amos, et W. B. Amos. 1985. « Localization of Tektin Filaments in Microtubules of Sea Urchin Sperm Flagella by Immunoelectron Microscopy. » *The Journal of Cell Biology* 100 (1): 126- 35. doi:10.1083/jcb.100.1.126.
- Lindemann, Charles B., et Kathleen A. Lesich. 2010. « Flagellar and Ciliary Beating: The Proven and the Possible. » *Journal of Cell Science* 123 (Pt 4): 519- 28. doi:10.1242/jcs.051326.
- Lindstrand, Anna, Erica E. Davis, Claudia M. B. Carvalho, Davut Pehlivan, Jason R. Willer, I.-Chun Tsai, Subhadra Ramanathan, et al. 2014. « Recurrent CNVs and SNVs at the NPHP1 Locus Contribute Pathogenic Alleles to Bardet-Biedl Syndrome. » *American Journal of Human Genetics* 94 (5): 745- 54. doi:10.1016/j.ajhg.2014.03.017.
- Lin, Fangming, Thomas Hiesberger, Kimberly Cordes, Angus M. Sinclair, Lawrence S. B. Goldstein, Stefan Somlo, et Peter Igarashi. 2003. « Kidney-Specific Inactivation of the KIF3A Subunit of Kinesin-II Inhibits Renal Ciliogenesis and Produces Polycystic Kidney Disease. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (9): 5286- 91. doi:10.1073/pnas.0836980100.
- Liu, Aimin, Baolin Wang, et Lee A. Niswander. 2005. « Mouse Intraflagellar Transport Proteins Regulate Both the Activator and Repressor Functions of Gli Transcription Factors. » *Development (Cambridge, England)* 132 (13): 3103- 11. doi:10.1242/dev.01894.

- Liu, Yan, Narendra Pathak, Albrecht Kramer-Zucker, et Iain A. Drummond. 2007. « Notch Signaling Controls the Differentiation of Transporting Epithelia and Multiciliated Cells in the Zebrafish Pronephros. » *Development (Cambridge, England)* 134 (6): 1111- 22. doi:10.1242/dev.02806.
- Li, You, Andrea S Garrod, Suneeta Madan-Khetarpal, Gayathri Sreedher, Marianne McGuire, Hisato Yagi, Nikolai T Klena, et al. 2015. « Respiratory Motile Cilia Dysfunction in a Patient with Cranioectodermal Dysplasia. » *American Journal of Medical Genetics. Part A*, avril. doi:10.1002/ajmg.a.37133.
- Louie, Ryan K., Shirin Bahmanyar, Kathleen A. Siemers, Violet Votin, Paul Chang, Tim Stearns, W. James Nelson, et Angela I. M. Barth. 2004. « Adenomatous Polyposis Coli and EB1 Localize in Close Proximity of the Mother Centriole and EB1 Is a Functional Component of Centrosomes. » *Journal of Cell Science* 117 (Pt 7): 1117- 28. doi:10.1242/jcs.00939.
- Lu, Quanlong, Christine Insinna, Carolyn Ott, Jimmy Stauffer, Petra A. Pintado, Juliati Rahajeng, Ulrich Baxa, et al. 2015. « Early Steps in Primary Cilium Assembly Require EHD1/EHD3-Dependent Ciliary Vesicle Formation. » *Nature Cell Biology* 17 (3): 228- 40. doi:10.1038/ncb3109.
- Madaule, P., M. Eda, N. Watanabe, K. Fujisawa, T. Matsuoka, H. Bito, T. Ishizaki, et S. Narumiya. 1998. « Role of Citron Kinase as a Target of the Small GTPase Rho in Cytokinesis. » *Nature* 394 (6692): 491- 94. doi:10.1038/28873.
- Madhivanan, Kayalvizhi, et Ruben Claudio Aguilar. 2014. « Ciliopathies: The Trafficking Connection. » *Traffic* 15 (10): 1031- 56. doi:10.1111/tra.12195.
- Mahuzier, Alexia, Helori-Mael Gaudé, Valentina Grampa, Isabelle Anselme, Flora Silbermann, Margot Leroux-Berger, Delphine Delacour, et al. 2012. « Dishevelled Stabilization by the Ciliopathy Protein Rpgrip1l Is Essential for Planar Cell Polarity. » *The Journal of Cell Biology* 198 (5): 927- 40. doi:10.1083/jcb.201111009.
- Mainzer, F., R. M. Saldino, M. B. Ozonoff, et H. Minagi. 1970. « Familial Nephropathy Associated with Retinitis Pigmentosa, Cerebellar Ataxia and Skeletal Abnormalities. » *The American Journal of Medicine* 49 (4): 556- 62.
- Ma, Ming, et Yun-Jin Jiang. 2007. « Jagged2a-Notch Signaling Mediates Cell Fate Choice in the Zebrafish Pronephric Duct. » *PLoS Genetics* 3 (1): e18. doi:10.1371/journal.pgen.0030018.
- Manning, Danielle K., Mikhail Sergeev, Roy G. van Heesbeen, Michael D. Wong, Jin-Hee Oh, Yan Liu, R. Mark Henkelman, Iain Drummond, Jagesh V. Shah, et David R. Beier. 2013. « Loss of the Ciliary Kinase Nek8 Causes Left-Right Asymmetry Defects. » *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 24 (1): 100- 112. doi:10.1681/ASN.2012050490.
- Maria, B. L., K. B. Hoang, R. J. Tusa, A. A. Mancuso, L. M. Hamed, R. G. Quisling, M. T. Hove, et al. 1997. « "Joubert Syndrome" Revisited: Key Ocular Motor Signs with Magnetic Resonance Imaging Correlation ». *Journal of Child Neurology* 12 (7): 423- 30.
- Marszalek, J. R., P. Ruiz-Lozano, E. Roberts, K. R. Chien, et L. S. Goldstein. 1999. « Situs Inversus and Embryonic Ciliary Morphogenesis Defects in Mouse Mutants Lacking the KIF3A Subunit of Kinesin-II. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (9): 5043- 48.

- Massinen, Satu, Marie-Estelle Hokkanen, Hans Matsson, Kristiina Tammimies, Isabel Tapiá-Páez, Vanina Dahlström-Heuser, Juha Kuja-Panula, et al. 2011. « Increased Expression of the Dyslexia Candidate Gene DCDC2 Affects Length and Signaling of Primary Cilia in Neurons. » *PLoS One* 6 (6): e20580. doi:10.1371/journal.pone.0020580.
- May, Scott R., Amir M. Ashique, Mattias Karlen, Baolin Wang, Yiguo Shen, Kostantinos Zarbalis, Jeremy Reiter, Johan Ericson, et Andrew S. Peterson. 2005. « Loss of the Retrograde Motor for IFT Disrupts Localization of Smo to Cilia and Prevents the Expression of Both Activator and Repressor Functions of Gli. » *Developmental Biology* 287 (2): 378- 89. doi:10.1016/j.ydbio.2005.08.050.
- Mazor, Masha, Soliman Alkrinawi, Vered Chalifa-Caspi, Esther Manor, Val C. Sheffield, Micha Aviram, et Ruti Parvari. 2011. « Primary Ciliary Dyskinesia Caused by Homozygous Mutation in DNAL1, Encoding Dynein Light Chain 1. » *American Journal of Human Genetics* 88 (5): 599- 607. doi:10.1016/j.ajhg.2011.03.018.
- McInerney-Leo, Aideen M., Miriam Schmidts, Claudio R. Cortés, Paul J. Leo, Blanca Gener, Andrew D. Courtney, Brooke Gardiner, et al. 2013. « Short-Rib Polydactyly and Jeune Syndromes Are Caused by Mutations in WDR60. » *American Journal of Human Genetics* 93 (3): 515- 23. doi:10.1016/j.ajhg.2013.06.022.
- Mee, Lisa, Heli Honkala, Outi Kopra, Jouni Vesa, Saara Finnilä, Ilona Visapää, Tzu-Kang Sang, et al. 2005. « Hydrolethalus Syndrome Is Caused by a Missense Mutation in a Novel Gene HYLS1. » *Human Molecular Genetics* 14 (11): 1475- 88. doi:10.1093/hmg/ddi157.
- Mergen, Miriam, Christina Engel, Barbara Müller, Marie Follo, Tobias Schäfer, Manfred Jung, et Gerd Walz. 2013. « The Nephronophthisis Gene Product NPHP2/Inversin Interacts with Aurora A and Interferes with HDAC6-Mediated Cilia Disassembly. » *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 28 (11): 2744- 53. doi:10.1093/ndt/gft316.
- Mitchison, Hannah M., Miriam Schmidts, Niki T. Loges, Judy Freshour, Athina Dritsoula, Rob A. Hirst, Christopher O'Callaghan, et al. 2012. « Mutations in Axonemal Dynein Assembly Factor DNAAF3 Cause Primary Ciliary Dyskinesia. » *Nature Genetics* 44 (4): 381- 89, S1- 2. doi:10.1038/ng.1106.
- Miyamoto, Tatsuo, Kosuke Hosoba, Hiroshi Ochiai, Ekaterina Royba, Hideki Izumi, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Brian David Dynlacht, et Shinya Matsuura. 2015. « The Microtubule-Depolymerizing Activity of a Mitotic Kinesin Protein KIF2A Drives Primary Cilia Disassembly Coupled with Cell Proliferation. » *Cell Reports*, février. doi:10.1016/j.celrep.2015.01.003.
- Mogensen, M. M., A. Malik, M. Piel, V. Bouckson-Castaing, et M. Bornens. 2000. « Microtubule Minus-End Anchorage at Centrosomal and Non-Centrosomal Sites: The Role of Ninein. » *Journal of Cell Science* 113 (Pt 17) (septembre): 3013- 23.
- Mollet, Géraldine, Rémi Salomon, Olivier Gribouval, Flora Silbermann, Delphine Bacq, Gilbert Landthaler, David Milford, et al. 2002. « The Gene Mutated in Juvenile Nephronophthisis Type 4 Encodes a Novel Protein That Interacts with Nephrocystin. » *Nature Genetics* 32 (2): 300- 305. doi:10.1038/ng996.
- Mollet, Géraldine, Flora Silbermann, Marion Delous, Rémi Salomon, Corinne Antignac, et Sophie Saunier. 2005. « Characterization of the Nephrocystin/nephrocystin-4

- Complex and Subcellular Localization of Nephrocystin-4 to Primary Cilia and Centrosomes. » *Human Molecular Genetics* 14 (5): 645- 56. doi:10.1093/hmg/ddi061.
- Moniz, Larissa, Previn Dutt, Nasir Haider, et Vuk Stambolic. 2011. « Nek Family of Kinases in Cell Cycle, Checkpoint Control and Cancer. » *Cell Division* 6: 18. doi:10.1186/1747-1028-6-18.
- Moore, A., S. Amselem, B. Duriez, et E. Escudier. 2004. « [Molecular basis of the primary ciliary dyskinesias]. » *Revue Des Maladies Respiratoires* 21 (3 Pt 1): 521- 26.
- Moore, A., E. Escudier, G. Roger, A. Tamalet, B. Pelosse, S. Marlin, A. Clément, et al. 2006. « RPGR Is Mutated in Patients with a Complex X Linked Phenotype Combining Primary Ciliary Dyskinesia and Retinitis Pigmentosa. » *Journal of Medical Genetics* 43 (4): 326- 33. doi:10.1136/jmg.2005.034868.
- Moore, Daniel J., Alexandros Onoufriadis, Amelia Shoemark, Michael A. Simpson, Petra I. zur Lage, Sandra C. de Castro, Lucia Bartoloni, 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. » *American Journal of Human Genetics* 93 (2): 346- 56. doi:10.1016/j.ajhg.2013.07.009.
- Morga, Benjamin, et Philippe Bastin. 2013. « Getting to the heart of intraflagellar transport using Trypanosoma and Chlamydomonas models: the strength is in their differences. » *Cilia* 2 (novembre): 16. doi:10.1186/2046-2530-2-16.
- Morgan, David, Lorraine Eley, John Sayer, Tom Strachan, Laura M. Yates, A. Scott Craighead, et Judith A. Goodship. 2002. « Expression Analyses and Interaction with the Anaphase Promoting Complex Protein Apc2 Suggest a Role for Inversin in Primary Cilia and Involvement in the Cell Cycle. » *Human Molecular Genetics* 11 (26): 3345- 50. doi:10.1093/hmg/11.26.3345.
- Morris, R. L., et J. M. Scholey. 1997. « Heterotrimeric Kinesin-II Is Required for the Assembly of Motile 9+2 Ciliary Axonemes on Sea Urchin Embryos. » *The Journal of Cell Biology* 138 (5): 1009- 22.
- Mourão, André, Andrew R. Nager, Maxence V. Nachury, et Esben Lorentzen. 2014. « Structural Basis for Membrane Targeting of the BBSome by ARL6. » *Nature Structural & Molecular Biology* 21 (12): 1035- 41. doi:10.1038/nsmb.2920.
- Mukhopadhyay, Saikat, Xiaohui Wen, Ben Chih, Christopher D. Nelson, William S. Lane, Suzie J. Scales, et Peter K. Jackson. 2010. « TULP3 Bridges the IFT-A Complex and Membrane Phosphoinositides to Promote Trafficking of G Protein-Coupled Receptors into Primary Cilia. » *Genes & Development* 24 (19): 2180- 93. doi:10.1101/gad.1966210.
- Murayama, Emi, Etsuko Yamamoto, Takane Kaneko, Yosaburo Shibata, Tetsuichiro Inai, et Hiroshi Iida. 2008. « Tektin5, a New Tektin Family Member, Is a Component of the Middle Piece of Flagella in Rat Spermatozoa. » *Molecular Reproduction and Development* 75 (4): 650- 58. doi:10.1002/mrd.20804.
- Mykytyn, Kirk, Robert F. Mullins, Michael Andrews, Annie P. Chiang, Ruth E. Swiderski, Baoli Yang, Terry Braun, Thomas Casavant, Edwin M. Stone, et Val C. Sheffield. 2004. « Bardet-Biedl Syndrome Type 4 (BBS4)-Null Mice Implicate Bbs4 in Flagella Formation but Not Global Cilia Assembly. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (23): 8664- 69. doi:10.1073/pnas.0402354101.

- Nachury, Maxence V., Alexander V. Loktev, Qihong Zhang, Christopher J. Westlake, Johan Peränen, Andreas Merdes, Diane C. Slusarski, et al. 2007. « A Core Complex of BBS Proteins Cooperates with the GTPase Rab8 to Promote Ciliary Membrane Biogenesis. » *Cell* 129 (6): 1201- 13. doi:10.1016/j.cell.2007.03.053.
- Nakagawa, Y., Y. Yamane, T. Okanoue, S. Tsukita, et S. Tsukita. 2001. « Outer Dense Fiber 2 Is a Widespread Centrosome Scaffold Component Preferentially Associated with Mother Centrioles: Its Identification from Isolated Centrosomes. » *Molecular Biology of the Cell* 12 (6): 1687- 97.
- Nakazawa, Yuki, Madoka Hiraki, Ritsu Kamiya, et Masafumi Hirono. 2007. « SAS-6 Is a Cartwheel Protein That Establishes the 9-Fold Symmetry of the Centriole. » *Current Biology: CB* 17 (24): 2169- 74. doi:10.1016/j.cub.2007.11.046.
- Nakhleh, Nader, Richard Francis, Rachel A. Giese, Xin Tian, You Li, Maimoona A. Zariwala, Hisato Yagi, et al. 2012. « High Prevalence of Respiratory Ciliary Dysfunction in Congenital Heart Disease Patients with Heterotaxy. » *Circulation* 125 (18): 2232- 42. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.079780.
- Narita, Keishi, et Sen Takeda. 2015. « Cilia in the Choroid Plexus: Their Roles in Hydrocephalus and beyond. » *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9: 39. doi:10.3389/fncel.2015.00039.
- Niwa, Shinsuke, Kazuo Nakajima, Harukata Miki, Yusuke Minato, Doudou Wang, et Nobutaka Hirokawa. 2012. « KIF19A Is a Microtubule-Depolymerizing Kinesin for Ciliary Length Control. » *Developmental Cell* 23 (6): 1167- 75. doi:10.1016/j.devcel.2012.10.016.
- Nojima, D., R. W. Linck, et E. H. Egelman. 1995. « At Least One of the Protofilaments in Flagellar Microtubules Is Not Composed of Tubulin. » *Current Biology: CB* 5 (2): 158- 67.
- Nonaka, S., Y. Tanaka, Y. Okada, S. Takeda, A. Harada, Y. Kanai, M. Kido, et N. Hirokawa. 1998. « Randomization of Left-Right Asymmetry due to Loss of Nodal Cilia Generating Leftward Flow of Extraembryonic Fluid in Mice Lacking KIF3B Motor Protein. » *Cell* 95 (6): 829- 37.
- Norrander, Jan, Magnus Larsson, Stefan Ståhl, Christer Höög, et Richard Linck. 1998. « Expression of Ciliary Tektins in Brain and Sensory Development. » *The Journal of Neuroscience* 18 (21): 8912- 18.
- Norrander, J. M., C. A. Perrone, L. A. Amos, et R. W. Linck. 1996. « Structural Comparison of Tektins and Evidence for Their Determination of Complex Spacings in Flagellar Microtubules. » *Journal of Molecular Biology* 257 (2): 385- 97. doi:10.1006/jmbi.1996.0170.
- Ocbina, Polloneal Jymmiel R., Miquel Tuson, et Kathryn V. Anderson. 2009. « Primary Cilia Are Not Required for Normal Canonical Wnt Signaling in the Mouse Embryo. » *PLoS ONE* 4 (8). doi:10.1371/journal.pone.0006839.
- Oda, Toshiaki, Shuhei Chiba, Tomoaki Nagai, et Kensaku Mizuno. 2014. « Binding to Cep164, but Not EB1, Is Essential for Centriolar Localization of TTBK2 and Its Function in Ciliogenesis. » *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 19 (12): 927- 40. doi:10.1111/gtc.12191.
- Olbrich, Heike, Manfred Fliegauf, Julia Hoefele, Andreas Kispert, Edgar Otto, Andreas Volz, Matthias T. Wolf, et al. 2003. « Mutations in a Novel Gene, NPHP3, Cause Adolescent

- Nephronophthisis, Tapeto-Retinal Degeneration and Hepatic Fibrosis.» *Nature Genetics* 34 (4): 455- 59. doi:10.1038/ng1216.
- Olbrich, Heike, Karsten Häffner, Andreas Kispert, Alexander Völkel, Andreas Volz, Gürsel Sasmaz, Richard Reinhardt, et al. 2002. « Mutations in DNAH5 Cause Primary Ciliary Dyskinesia and Randomization of Left-Right Asymmetry. » *Nature Genetics* 30 (2): 143- 44. doi:10.1038/ng817.
- Olbrich, Heike, Miriam Schmidts, Claudius Werner, Alexandros Onoufriadis, Niki T. Loges, Johanna Raidt, Nora Fanni Banki, et al. 2012. « Recessive HYDIN Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia without Randomization of Left-Right Body Asymmetry. » *American Journal of Human Genetics* 91 (4): 672- 84. doi:10.1016/j.ajhg.2012.08.016.
- Omori, Yoshihiro, Taro Chaya, Kimiko Katoh, Naoko Kajimura, Shigeru Sato, Koichiro Muraoka, Shinji Ueno, Toshiyuki Koyasu, Mineo Kondo, et Takahisa Furukawa. 2010. « Negative Regulation of Ciliary Length by Ciliary Male Germ Cell-Associated Kinase (Mak) Is Required for Retinal Photoreceptor Survival. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (52): 22671- 76. doi:10.1073/pnas.1009437108.
- Omori, Yoshihiro, Chengtian Zhao, Arunesh Saras, Saikat Mukhopadhyay, Woong Kim, Takahisa Furukawa, Piali Sengupta, Alexey Veraksa, et Jarema Malicki. 2008. « Elipsa Is an Early Determinant of Ciliogenesis That Links the IFT Particle to Membrane-Associated Small GTPase Rab8. » *Nature Cell Biology* 10 (4): 437- 44. doi:10.1038/ncb1706.
- Omran, Heymut. 2010. « NPHP Proteins: Gatekeepers of the Ciliary Compartment. » *The Journal of Cell Biology* 190 (5): 715- 17. doi:10.1083/jcb.201008080.
- Omran, Heymut, Daisuke Kobayashi, Heike Olbrich, Tatsuya Tsukahara, Niki T. Loges, Haruo Hagiwara, Qi Zhang, et al. 2008. « Ktu/PF13 Is Required for Cytoplasmic Pre-Assembly of Axonemal Dyneins. » *Nature* 456 (7222): 611- 16. doi:10.1038/nature07471.
- Omran, H., C. Fernandez, M. Jung, K. Häffner, B. Fargier, A. Villaquiran, R. Waldherr, et al. 2000. « Identification of a New Gene Locus for Adolescent Nephronophthisis, on Chromosome 3q22 in a Large Venezuelan Pedigree. » *American Journal of Human Genetics* 66 (1): 118- 27. doi:10.1086/302705.
- Ong, Albert C. M., et Peter C. Harris. 2005. « Molecular Pathogenesis of ADPKD: The Polycystin Complex Gets Complex. » *Kidney International* 67 (4): 1234- 47. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00201.x.
- Orozco, J. T., K. P. Wedaman, D. Signor, H. Brown, L. Rose, et J. M. Scholey. 1999. « Movement of Motor and Cargo along Cilia. » *Nature* 398 (6729): 674. doi:10.1038/19448.
- Oteíza, Pablo, Mathias Köppen, Miguel L. Concha, et Carl-Philipp Heisenberg. 2008. « Origin and Shaping of the Laterality Organ in Zebrafish. » *Development (Cambridge, England)* 135 (16): 2807- 13. doi:10.1242/dev.022228.
- Otto, E. A., K. Tory, M. Attanasio, W. Zhou, M. Chaki, Y. Paruchuri, E. L. Wise, et al. 2009. « Hypomorphic Mutations in Meckelin (MKS3/TMEM67) Cause Nephronophthisis with Liver Fibrosis (NPHP11). » *Journal of Medical Genetics* 46 (10): 663- 70. doi:10.1136/jmg.2009.066613.
- Otto, Edgar A., Toby W. Hurd, Rannar Airik, Moumita Chaki, Weibin Zhou, Corinne Stoetzel, Suresh B. Patil, et al. 2010. « Candidate Exome Capture Identifies Mutation of

- SDCCAG8 as the Cause of a Retinal-Renal Ciliopathy. » *Nature Genetics* 42 (10): 840- 50. doi:10.1038/ng.662.
- Otto, Edgar A., Bart Loeys, Hemant Khanna, Jan Hellems, Ralf Sudbrak, Shuling Fan, Ulla Muerb, et al. 2005. « Nephrocystin-5, a Ciliary IQ Domain Protein, Is Mutated in Senior-Loken Syndrome and Interacts with RPGR and Calmodulin. » *Nature Genetics* 37 (3): 282- 88. doi:10.1038/ng1520.
- Otto, Edgar A., Bernhard Schermer, Tomoko Obara, John F. O'Toole, Karl S. Hiller, Adelheid M. Mueller, Rainer G. Ruf, 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. » *Nature Genetics* 34 (4): 413- 20. doi:10.1038/ng1217.
- Otto, Edgar A., Melissa L. Trapp, Ulla T. Schultheiss, Juliana Helou, Lynne M. Quarmby, et Friedhelm Hildebrandt. 2008. « NEK8 Mutations Affect Ciliary and Centrosomal Localization and May Cause Nephronophthisis. » *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 19 (3): 587- 92. doi:10.1681/ASN.2007040490.
- Ou, Guangshuo, Oliver E. Blacque, Joshua J. Snow, Michel R. Leroux, et Jonathan M. Scholey. 2005. « Functional Coordination of Intraflagellar Transport Motors. » *Nature* 436 (7050): 583- 87. doi:10.1038/nature03818.
- Paintrand, M., M. Moudjou, H. Delacroix, et M. Bornens. 1992. « Centrosome Organization and Centriole Architecture: Their Sensitivity to Divalent Cations. » *Journal of Structural Biology* 108 (2): 107- 28.
- Palmer, Krysten J., Lucy MacCarthy-Morrogh, Nicola Smyllie, et David J. Stephens. 2011. « A Role for Tctex-1 (DYNLT1) in Controlling Primary Cilium Length. » *European Journal of Cell Biology* 90 (10): 865- 71. doi:10.1016/j.ejcb.2011.05.003.
- Pan, Duoja. 2010. « The Hippo Signaling Pathway in Development and Cancer. » *Developmental Cell* 19 (4): 491- 505. doi:10.1016/j.devcel.2010.09.011.
- Panizzi, Jennifer R., Anita Becker-Heck, Victoria H. Castleman, Dalal A. Al-Mutairi, Yan Liu, Niki T. Loges, Narendra Pathak, et al. 2012. « CCDC103 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia by Disrupting Assembly of Ciliary Dynein Arms. » *Nature Genetics* 44 (6): 714- 19. doi:10.1038/ng.2277.
- Paoletti, A., M. Moudjou, M. Paintrand, J. L. Salisbury, et M. Bornens. 1996. « Most of Centrin in Animal Cells Is Not Centrosome-Associated and Centrosomal Centrin Is Confined to the Distal Lumen of Centrioles. » *Journal of Cell Science* 109 (Pt 13) (décembre): 3089- 3102.
- Parisi, Melissa A. 2009. « Clinical and Molecular Features of Joubert Syndrome and Related Disorders. » *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* 151C (4): 326- 40. doi:10.1002/ajmg.c.30229.
- Park, J. H., M. P. Dixit, L. F. Onuchic, G. Wu, A. N. Goncharuk, S. Kneitz, L. B. Santarina, et al. 1999. « A 1-Mb BAC/PAC-Based Physical Map of the Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease Gene (PKHD1) Region on Chromosome 6. » *Genomics* 57 (2): 249- 55. doi:10.1006/geno.1999.5777.
- Patel, Vishal, Ling Li, Patricia Cobo-Stark, Xinli Shao, Stefan Somlo, Fangming Lin, et Peter Igarashi. 2008. « Acute Kidney Injury and Aberrant Planar Cell Polarity Induce Cyst Formation in Mice Lacking Renal Cilia. » *Human Molecular Genetics* 17 (11): 1578- 90. doi:10.1093/hmg/ddn045.

- Patnaik, Sarita Rani, Rakesh Kotapati Raghupathy, Xun Zhang, David Mansfield, et Xinhua Shu. 2015. « The Role of RPGR and Its Interacting Proteins in Ciliopathies. » *Journal of Ophthalmology* 2015. doi:10.1155/2015/414781.
- Pazour, G. J., B. L. Dickert, Y. Vucica, E. S. Seeley, J. L. Rosenbaum, G. B. Witman, et D. G. Cole. 2000. « Chlamydomonas IFT88 and Its Mouse Homologue, Polycystic Kidney Disease Gene tg737, Are Required for Assembly of Cilia and Flagella. » *The Journal of Cell Biology* 151 (3): 709- 18.
- Pazour, G. J., B. L. Dickert, et G. B. Witman. 1999. « The DHC1b (DHC2) Isoform of Cytoplasmic Dynein Is Required for Flagellar Assembly. » *The Journal of Cell Biology* 144 (3): 473- 81.
- Pazour, Gregory J., Jovenal T. San Agustin, John A. Follit, Joel L. Rosenbaum, et George B. Witman. 2002. « Polycystin-2 Localizes to Kidney Cilia and the Ciliary Level Is Elevated in Orpk Mice with Polycystic Kidney Disease. » *Current Biology: CB* 12 (11): R378- 80.
- Pedersen, Lotte B., et Joel L. Rosenbaum. 2008. « Intraflagellar Transport (IFT) Role in Ciliary Assembly, Resorption and Signalling. » *Current Topics in Developmental Biology* 85: 23- 61. doi:10.1016/S0070-2153(08)00802-8.
- Pennarun, G., C. Chapelin, E. Escudier, A. M. Bridoux, F. Dastot, V. Cacheux, M. Goossens, S. Amselem, et B. Duriez. 2000. « The Human Dynein Intermediate Chain 2 Gene (DNAI2): Cloning, Mapping, Expression Pattern, and Evaluation as a Candidate for Primary Ciliary Dyskinesia. » *Human Genetics* 107 (6): 642- 49.
- Pennarun, G., E. Escudier, C. Chapelin, A. M. Bridoux, V. Cacheux, G. Roger, A. Clément, M. Goossens, S. Amselem, et B. Duriez. 1999. « Loss-of-Function Mutations in a Human Gene Related to Chlamydomonas Reinhardtii Dynein IC78 Result in Primary Ciliary Dyskinesia. » *American Journal of Human Genetics* 65 (6): 1508- 19. doi:10.1086/302683.
- Peränen, Johan. 2011. « Rab8 GTPase as a Regulator of Cell Shape. » *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 68 (10): 527- 39. doi:10.1002/cm.20529.
- Perkins, L. A., E. M. Hedgecock, J. N. Thomson, et J. G. Culotti. 1986. « Mutant Sensory Cilia in the Nematode Caenorhabditis Elegans. » *Developmental Biology* 117 (2): 456- 87.
- Perrault, Isabelle, Sophie Saunier, Sylvain Hanein, Emilie Filhol, Albane A. Bizet, Felicity Collins, Mustafa A. M. Salih, et al. 2012. « Mainzer-Saldino Syndrome Is a Ciliopathy Caused by IFT140 Mutations. » *American Journal of Human Genetics* 90 (5): 864- 70. doi:10.1016/j.ajhg.2012.03.006.
- Pfister, K. Kevin, Elizabeth M. C. Fisher, Ian R. Gibbons, Thomas S. Hays, Erika L. F. Holzbaur, J. Richard McIntosh, Mary E. Porter, et al. 2005. « Cytoplasmic Dynein Nomenclature. » *The Journal of Cell Biology* 171 (3): 411- 13. doi:10.1083/jcb.200508078.
- Piperno, G., et K. Mead. 1997. « Transport of a Novel Complex in the Cytoplasmic Matrix of Chlamydomonas Flagella. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (9): 4457- 62.
- Piperno, G., E. Siuda, S. Henderson, M. Segil, H. Vaananen, et M. Sassaroli. 1998. « Distinct Mutants of Retrograde Intraflagellar Transport (IFT) Share Similar Morphological and Molecular Defects. » *The Journal of Cell Biology* 143 (6): 1591- 1601.

- Plotnikova, Olga V., Erica A. Golemis, et Elena N. Pugacheva. 2008. « Cell Cycle-Dependent Ciliogenesis and Cancer. » *Cancer Research* 68 (7): 2058- 61. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5838.
- Porter, M. E., R. Bower, J. A. Knott, P. Byrd, et W. Dentler. 1999. « Cytoplasmic Dynein Heavy Chain 1b Is Required for Flagellar Assembly in Chlamydomonas. » *Molecular Biology of the Cell* 10 (3): 693- 712.
- Praveen, Kavita, Erica E. Davis, et Nicholas Katsanis. 2015. « Unique among Ciliopathies: Primary Ciliary Dyskinesia, a Motile Cilia Disorder. » *F1000prime Reports* 7: 36. doi:10.12703/P7-36.
- Prosser, Suzanna L., et Ciaran G. Morrison. 2015. « Centrin2 Regulates CP110 Removal in Primary Cilium Formation. » *The Journal of Cell Biology* 208 (6): 693- 701. doi:10.1083/jcb.201411070.
- Pugacheva, Elena N., Sandra A. Jablonski, Tiffiney R. Hartman, Elizabeth P. Henske, et Erica A. Golemis. 2007. « HEF1-Dependent Aurora A Activation Induces Disassembly of the Primary Cilium. » *Cell* 129 (7): 1351- 63. doi:10.1016/j.cell.2007.04.035.
- Putoux, Audrey, Sophie Thomas, Karlien L. M. Coene, Erica E. Davis, Yasemin Alanay, Gönül Ogur, Elif Uz, et al. 2011. « KIF7 Mutations Cause Fetal Hydroletharus and Acrocallosal Syndromes. » *Nature Genetics* 43 (6): 601- 6. doi:10.1038/ng.826.
- Reese, T. S. 1965. « OLFATORY CILIA IN THE FROG. » *The Journal of Cell Biology* 25 (2): 209- 30.
- Renkema, Kirsten Y., Marijn F. Stokman, Rachel H. Giles, et Nine V. A. M. Knoers. 2014. « Next-Generation Sequencing for Research and Diagnostics in Kidney Disease. » *Nature Reviews. Nephrology* 10 (8): 433- 44. doi:10.1038/nrneph.2014.95.
- Rieke, F., et D. A. Baylor. 1998. « Origin of Reproducibility in the Responses of Retinal Rods to Single Photons. » *Biophysical Journal* 75 (4): 1836- 57. doi:10.1016/S0006-3495(98)77625-8.
- Riley, B. B., C. Zhu, C. Janetopoulos, et K. J. Aufderheide. 1997. « A Critical Period of Ear Development Controlled by Distinct Populations of Ciliated Cells in the Zebrafish. » *Developmental Biology* 191 (2): 191- 201. doi:10.1006/dbio.1997.8736.
- Rompolas, Panteleimon, Lotte B. Pedersen, Ramila S. Patel-King, et Stephen M. King. 2007. « Chlamydomonas FAP133 Is a Dynein Intermediate Chain Associated with the Retrograde Intraflagellar Transport Motor. » *Journal of Cell Science* 120 (Pt 20): 3653- 65. doi:10.1242/jcs.012773.
- Roosing, Susanne, Matan Hofree, Sehyun Kim, Eric Scott, Brett Copeland, Marta Romani, Jennifer L. Silhavy, et al. 2015. « Functional Genome-Wide siRNA Screen Identifies KIAA0586 as Mutated in Joubert Syndrome. » *eLife* 4. doi:10.7554/eLife.06602.
- Roy, Angshumoy, Yi-Nan Lin, Julio E. Agno, Francesco J. DeMayo, et Martin M. Matzuk. 2007. « Absence of Tektin 4 Causes Asthenozoospermia and Subfertility in Male Mice. » *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (4): 1013- 25. doi:10.1096/fj.06-7035com.
- . 2009. « Tektin 3 is required for progressive sperm motility in mice. » *Molecular reproduction and development* 76 (5): 453- 59. doi:10.1002/mrd.20957.
- Ruiz i Altaba, Ariel, Verónica Palma, et Nadia Dahmane. 2002. « Hedgehog-Gli Signalling and the Growth of the Brain. » *Nature Reviews. Neuroscience* 3 (1): 24- 33. doi:10.1038/nrn704.

- Saadi-Kheddouci, S., D. Berrebi, B. Romagnolo, F. Cluzeaud, M. Peuchmaur, A. Kahn, A. Vandewalle, et C. Perret. 2001. « Early Development of Polycystic Kidney Disease in Transgenic Mice Expressing an Activated Mutant of the Beta-Catenin Gene. » *Oncogene* 20 (42): 5972- 81. doi:10.1038/sj.onc.1204825.
- Salomon, R. 2007. « [Renal hypodysplasia]. » *Archives De Pédiatrie: Organe Officiel De La Société Française De Pédiatrie* 14 (6): 689- 91. doi:10.1016/j.arcped.2007.02.053.
- Salomon, Rémi, Sophie Saunier, et Patrick Niaudet. 2009. « Nephronophthisis. » *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)* 24 (12): 2333- 44. doi:10.1007/s00467-008-0840-z.
- Sang, Liyun, Julie J. Miller, Kevin C. Corbit, Rachel H. Giles, Matthew J. Brauer, Edgar A. Otto, Lisa M. Baye, et al. 2011. « Mapping the NPHP-JBTS-MKS Protein Network Reveals Ciliopathy Disease Genes and Pathways. » *Cell* 145 (4): 513- 28. doi:10.1016/j.cell.2011.04.019.
- Sarpal, Ritu, Sokol V. Todi, Elena Sivan-Loukianova, Seema Shirolkar, Narayan Subramanian, Elizabeth C. Raff, James W. Erickson, Krishanu Ray, et Daniel F. Eberl. 2003. « Drosophila KAP Interacts with the Kinesin II Motor Subunit KLP64D to Assemble Chordotonal Sensory Cilia, but Not Sperm Tails. » *Current Biology: CB* 13 (19): 1687- 96.
- Satir, Peter, et Søren Tvorup Christensen. 2007. « Overview of Structure and Function of Mammalian Cilia. » *Annual Review of Physiology* 69: 377- 400. doi:10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236.
- Satran, D., M. E. Pierpont, et W. B. Dobyns. 1999. « Cerebello-Oculo-Renal Syndromes Including Arima, Senior-Löken and COACH Syndromes: More than Just Variants of Joubert Syndrome. » *American Journal of Medical Genetics* 86 (5): 459- 69.
- Saunier, S., J. Calado, R. Heilig, F. Silbermann, F. Benessy, G. Morin, M. Konrad, et al. 1997. « A Novel Gene That Encodes a Protein with a Putative Src Homology 3 Domain Is a Candidate Gene for Familial Juvenile Nephronophthisis. » *Human Molecular Genetics* 6 (13): 2317- 23.
- Sayer, John A., Edgar A. Otto, John F. O'Toole, Gudrun Nurnberg, Michael A. Kennedy, Christian Becker, Hans Christian Hennies, et al. 2006. « The Centrosomal Protein Nephrocystin-6 Is Mutated in Joubert Syndrome and Activates Transcription Factor ATF4. » *Nature Genetics* 38 (6): 674- 81. doi:10.1038/ng1786.
- Schäfer, Tobias, Michael Pütz, Soeren Lienkamp, Athina Ganner, Astrid Bergbreiter, Haribaskar Ramachandran, Verena Gieloff, et al. 2008. « Genetic and Physical Interaction between the NPHP5 and NPHP6 Gene Products. » *Human Molecular Genetics* 17 (23): 3655- 62. doi:10.1093/hmg/ddn260.
- Schmidt, Katja, et Benjamin J. Nichols. 2004. « A Barrier to Lateral Diffusion in the Cleavage Furrow of Dividing Mammalian Cells. » *Current Biology: CB* 14 (11): 1002- 6. doi:10.1016/j.cub.2004.05.044.
- Schmidt, Kerstin N., Stefanie Kuhns, Annett Neuner, Birgit Hub, Hanswalter Zentgraf, et Gislene Pereira. 2012. « Cep164 Mediates Vesicular Docking to the Mother Centriole during Early Steps of Ciliogenesis. » *The Journal of Cell Biology* 199 (7): 1083- 1101. doi:10.1083/jcb.201202126.
- Schmidts, Miriam, Julia Vodopiutz, Sonia Christou-Savina, Claudio R. Cortés, Aideen M. McInerney-Leo, Richard D. Emes, Heleen H. Arts, et al. 2013. « Mutations in the Gene Encoding IFT Dynein Complex Component WDR34 Cause Jeune Asphyxiating Thoracic

- Dystrophy.» *American Journal of Human Genetics* 93 (5): 932- 44. doi:10.1016/j.ajhg.2013.10.003.
- Schmidt, Thorsten I., Julia Kleylein-Sohn, Jens Westendorf, Mikael Le Clech, Sébastien B. Lavoie, York-Dieter Stierhof, et Erich A. Nigg. 2009. « Control of Centriole Length by CPAP and CP110. » *Current Biology: CB* 19 (12): 1005- 11. doi:10.1016/j.cub.2009.05.016.
- Schneider, Mark E., Inna A. Belyantseva, Ricardo B. Azevedo, et Bechara Kachar. 2002. « Rapid Renewal of Auditory Hair Bundles. » *Nature* 418 (6900): 837- 38. doi:10.1038/418837a.
- Schneider, Mark J., Megan Ulland, et Roger D. Sloboda. 2008. « A Protein Methylation Pathway in Chlamydomonas Flagella Is Active during Flagellar Resorption. » *Molecular Biology of the Cell* 19 (10): 4319- 27. doi:10.1091/mbc.E08-05-0470.
- Scholey, Jonathan M. 2003. « Intraflagellar Transport. » *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19: 423- 43. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.111401.091318.
- . 2012. « Kinesin-2 Motors Transport IFT-particles, Dyneins and Tubulin Subunits to the Tips of C. elegans Sensory Cilia: Relevance to Vision Research? » *Vision research* 75 (décembre): 44- 52. doi:10.1016/j.visres.2012.06.015.
- Schueler, Markus, Daniela A. Braun, Gayathri Chandrasekar, Heon Yung Gee, Timothy D. Klasson, Jan Halbritter, Andrea Bieder, et al. 2015. « DCDC2 Mutations Cause a Renal-Hepatic Ciliopathy by Disrupting Wnt Signaling. » *American Journal of Human Genetics* 96 (1): 81- 92. doi:10.1016/j.ajhg.2014.12.002.
- Schwabe, Georg C., Katrin Hoffmann, Niki Tomas Loges, Daniel Birker, Colette Rossier, Margherita M. de Santi, Heike Olbrich, et al. 2008. « Primary Ciliary Dyskinesia Associated with Normal Axoneme Ultrastructure Is Caused by DNAH11 Mutations. » *Human Mutation* 29 (2): 289- 98. doi:10.1002/humu.20656.
- Sensenbrenner, J. A., J. P. Dorst, et R. P. Owens. 1975. « New Syndrome of Skeletal, Dental and Hair Anomalies. » *Birth Defects Original Article Series* 11 (2): 372- 79.
- Shetty, Jagathpala, Kenneth L. Klotz, Michael J. Wolkowicz, Charles J. Flickinger, et John C. Herr. 2007. « Radial Spoke Protein 44 (human Meichroacidin) Is an Axonemal Alloantigen of Sperm and Cilia. » *Gene* 396 (1): 93- 107. doi:10.1016/j.gene.2007.02.031.
- Shiba, Dai, Danielle K. Manning, Hisashi Koga, David R. Beier, et Takahiko Yokoyama. 2010. « Inv Acts as a Molecular Anchor for Nphp3 and Nek8 in the Proximal Segment of Primary Cilia. » *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 67 (2): 112- 19. doi:10.1002/cm.20428.
- Signor, D., K. P. Wedaman, J. T. Orozco, N. D. Dwyer, C. I. Bargmann, L. S. Rose, et J. M. Scholey. 1999. « Role of a Class DHC1b Dynein in Retrograde Transport of IFT Motors and IFT Raft Particles along Cilia, but Not Dendrites, in Chemosensory Neurons of Living Caenorhabditis Elegans. » *The Journal of Cell Biology* 147 (3): 519- 30.
- Silflow, C. D., et P. A. Lefebvre. 2001. « Assembly and Motility of Eukaryotic Cilia and Flagella. Lessons from Chlamydomonas Reinhardtii. » *Plant Physiology* 127 (4): 1500- 1507.
- Sillibourne, James E., Christian G. Specht, Ignacio Izeddin, Ilse Hurbain, Phong Tran, Antoine Triller, Xavier Darzacq, Maxime Dahan, et Michel Bornens. 2011. « Assessing the Localization of Centrosomal Proteins by PALM/STORM Nanoscopy. » *Cytoskeleton* 68 (11): 619- 27. doi:10.1002/cm.20536.

- Simons, Matias, Joachim Gloy, Athina Ganner, Axel Bullerkotte, Mikhail Bashkurov, Corinna Krönig, Bernhard Schermer, et al. 2005. « Inversin, the Gene Product Mutated in Nephronophthisis Type II, Functions as a Molecular Switch between Wnt Signaling Pathways. » *Nature Genetics* 37 (5): 537- 43. doi:10.1038/ng1552.
- Singla, Veena, et Jeremy F. Reiter. 2006. « The Primary Cilium as the Cell's Antenna: Signaling at a Sensory Organelle. » *Science (New York, N.Y.)* 313 (5787): 629- 33. doi:10.1126/science.1124534.
- Singla, Veena, Miriam Romaguera-Ros, Jose Manuel Garcia-Verdugo, et Jeremy F. Reiter. 2010. « Odf1, a Human Disease Gene, Regulates the Length and Distal Structure of Centrioles. » *Developmental Cell* 18 (3): 410- 24. doi:10.1016/j.devcel.2009.12.022.
- Sivasubramaniam, Sudhakar, Xuemin Sun, Yen-Ru Pan, Shaohui Wang, et Eva Y.-H. P. Lee. 2008. « Cep164 Is a Mediator Protein Required for the Maintenance of Genomic Stability through Modulation of MDC1, RPA, and CHK1. » *Genes & Development* 22 (5): 587- 600. doi:10.1101/gad.1627708.
- Smith, Elizabeth F., et Pinfen Yang. 2004. « The Radial Spokes and Central Apparatus: Mechano-Chemical Transducers That Regulate Flagellar Motility. » *Cell Motility and the Cytoskeleton* 57 (1): 8- 17. doi:10.1002/cm.10155.
- Smith, Laurie A., Nikolay O. Bukanov, Hervé Husson, Ryan J. Russo, Tiffany C. Barry, Ava L. Taylor, David R. Beier, et Oxana Ibraghimov-Beskrovnaya. 2006. « Development of Polycystic Kidney Disease in Juvenile Cystic Kidney Mice: Insights into Pathogenesis, Ciliary Abnormalities, and Common Features with Human Disease. » *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 17 (10): 2821- 31. doi:10.1681/ASN.2006020136.
- Snow, Joshua J., Guangshuo Ou, Amy L. Gunnarson, M. Regina S. Walker, H. Mimi Zhou, Ingrid Brust-Mascher, et Jonathan M. Scholey. 2004. « Two Anterograde Intraflagellar Transport Motors Cooperate to Build Sensory Cilia on *C. Elegans* Neurons. » *Nature Cell Biology* 6 (11): 1109- 13. doi:10.1038/ncb1186.
- Sohara, Eisei, Ying Luo, Jingjing Zhang, Danielle K. Manning, David R. Beier, et Jing Zhou. 2008. « Nek8 Regulates the Expression and Localization of Polycystin-1 and Polycystin-2. » *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 19 (3): 469- 76. doi:10.1681/ASN.2006090985.
- Sorokin, Sergei. 1962. « Centrioles and the Formation of Rudimentary Cilia by Fibroblasts and Smooth Muscle Cells. » *The Journal of Cell Biology* 15 (2): 363- 77. doi:10.1083/jcb.15.2.363.
- Sorokin, S. P. 1968. « Reconstructions of Centriole Formation and Ciliogenesis in Mammalian Lungs. » *Journal of Cell Science* 3 (2): 207- 30.
- Spektor, Alexander, William Y. Tsang, David Khoo, et Brian David Dynlacht. 2007. « Cep97 and CP110 Suppress a Cilia Assembly Program. » *Cell* 130 (4): 678- 90. doi:10.1016/j.cell.2007.06.027.
- Spira, A. W., et G. E. Milman. 1979. « The Structure and Distribution of the Cross-Striated Fibril and Associated Membranes in Guinea Pig Photoreceptors. » *The American Journal of Anatomy* 155 (3): 319- 37. doi:10.1002/aja.1001550304.
- Steffen, W., et R. W. Linck. 1988. « Evidence for Tektins in Centrioles and Axonemal Microtubules. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (8): 2643- 47.

- Stephens, R. E. 1992. « Tubulin in Sea Urchin Embryonic Cilia: Post-Translational Modifications during Regeneration. » *Journal of Cell Science* 101 (Pt 4) (avril): 837- 45.
- Stephens, R. E., et N. A. Lemieux. 1998. « Tektins as Structural Determinants in Basal Bodies. » *Cell Motility and the Cytoskeleton* 40 (4): 379- 92. doi:10.1002/(SICI)1097-0169(1998)40:4<379::AID-CM6>3.0.CO;2-6.
- Stubbs, Jennifer L., Isao Oishi, Juan Carlos Izpisua Belmonte, et Chris Kintner. 2008. « The Forkhead Protein Foxj1 Specifies Node-like Cilia in Xenopus and Zebrafish Embryos. » *Nature Genetics* 40 (12): 1454- 60. doi:10.1038/ng.267.
- Sui, Haixin, et Kenneth H. Downing. 2006. « Molecular Architecture of Axonemal Microtubule Doublets Revealed by Cryo-Electron Tomography. » *Nature* 442 (7101): 475- 78. doi:10.1038/nature04816.
- Swoboda, P., H. T. Adler, et J. H. Thomas. 2000. « The RFX-Type Transcription Factor DAF-19 Regulates Sensory Neuron Cilium Formation in *C. Elegans*. » *Molecular Cell* 5 (3): 411- 21.
- Szymanska, Katarzyna, Verity L. Hartill, et Colin A. Johnson. 2014. « Unraveling the Genetics of Joubert and Meckel-Gruber Syndromes. » *Journal of Pediatric Genetics* 3 (2): 65- 78. doi:10.3233/PGE-14090.
- Tada, Tomoko, Alyson Simonetta, Matthew Batterton, Makoto Kinoshita, Dieter Edbauer, et Morgan Sheng. 2007. « Role of Septin Cytoskeleton in Spine Morphogenesis and Dendrite Development in Neurons. » *Current Biology: CB* 17 (20): 1752- 58. doi:10.1016/j.cub.2007.09.039.
- Takeda, S., Y. Yonekawa, Y. Tanaka, Y. Okada, S. Nonaka, et N. Hirokawa. 1999. « Left-Right Asymmetry and Kinesin Superfamily Protein KIF3A: New Insights in Determination of Laterality and Mesoderm Induction by kif3A^{-/-} Mice Analysis. » *The Journal of Cell Biology* 145 (4): 825- 36.
- Tanaka, Hiromitsu, Naoko Iguchi, Yoshiro Toyama, Kouichi Kitamura, Tohru Takahashi, Kazuhiro Kaseda, Mamiko Maekawa, et Yoshitake Nishimune. 2004. « Mice Deficient in the Axonemal Protein Tektin-T Exhibit Male Infertility and Immotile-Cilium Syndrome due to Impaired Inner Arm Dynein Function. » *Molecular and Cellular Biology* 24 (18): 7958- 64. doi:10.1128/MCB.24.18.7958-7964.2004.
- Tanos, Barbara E., Hui-Ju Yang, Rajesh Soni, Won-Jing Wang, Frank P. Macaluso, John M. Asara, et Meng-Fu Bryan Tsou. 2013. « Centriole Distal Appendages Promote Membrane Docking, Leading to Cilia Initiation. » *Genes & Development* 27 (2): 163- 68. doi:10.1101/gad.207043.112.
- Tarkar, Aarti, Niki T. Loges, Christopher E. Slagle, Richard Francis, Gerard W. Dougherty, Joel V. Tamayo, Brett Shook, et al. 2013. « DYX1C1 Is Required for Axonemal Dynein Assembly and Ciliary Motility. » *Nature Genetics* 45 (9): 995- 1003. doi:10.1038/ng.2707.
- Taschner, Michael, Fruzsina Kotsis, Philipp Braeuer, E. Wolfgang Kuehn, et Esben Lorentzen. 2014. « Crystal Structures of IFT70/52 and IFT52/46 Provide Insight into Intraflagellar Transport B Core Complex Assembly. » *The Journal of Cell Biology* 207 (2): 269- 82. doi:10.1083/jcb.201408002.
- Taskiran, Ekim Z., Emine Korkmaz, Safak Gucer, Can Kosukcu, Figen Kaymaz, Cansu Koyunlar, Elizabeth C. Bryda, et al. 2014. « Mutations in ANKS6 Cause a Nephronophthisis-like

- Phenotype with ESRD. » *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 25 (8): 1653- 61. doi:10.1681/ASN.2013060646.
- Tateishi, Kazuhiro, Yuji Yamazaki, Tomoki Nishida, Shin Watanabe, Koshi Kunimoto, Hiroaki Ishikawa, et Sachiko Tsukita. 2013. « Two Appendages Homologous between Basal Bodies and Centrioles Are Formed Using Distinct Odf2 Domains. » *The Journal of Cell Biology* 203 (3): 417- 25. doi:10.1083/jcb.201303071.
- Thauvin-Robinet, Christel, Jaclyn S. Lee, Estelle Lopez, Vicente Herranz-Pérez, Toshinobu Shida, Brunella Franco, Laurence Jegou, et al. 2014. « The Oral-Facial-Digital Syndrome Gene C2CD3 Encodes a Positive Regulator of Centriole Elongation. » *Nature Genetics* 46 (8): 905- 11. doi:10.1038/ng.3031.
- Thauvin-Robinet, C., S. Thomas, M. Sinico, B. Aral, L. Burglen, N. Gigot, H. Dollfus, et al. 2013. « OFD1 Mutations in Males: Phenotypic Spectrum and Ciliary Basal Body Docking Impairment. » *Clinical Genetics* 84 (1): 86- 90. doi:10.1111/cge.12013.
- Thiel, Christian, Kristin Kessler, Andreas Giessl, Arno Dimmler, Stavit A. Shalev, Sigrun von der Haar, Martin Zenker, et al. 2011. « NEK1 Mutations Cause Short-Rib Polydactyly Syndrome Type Majewski. » *American Journal of Human Genetics* 88 (1): 106- 14. doi:10.1016/j.ajhg.2010.12.004.
- Thisse, Christine, et Bernard Thisse. 2008. « High-Resolution in Situ Hybridization to Whole-Mount Zebrafish Embryos. » *Nature Protocols* 3 (1): 59- 69. doi:10.1038/nprot.2007.514.
- Thomas, Joëlle, Laurette Morlé, Fabien Soulavie, Anne Laurençon, Sébastien Sagnol, et Bénédicte Durand. 2010. « Transcriptional Control of Genes Involved in Ciliogenesis: A First Step in Making Cilia. » *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 102 (9): 499- 513. doi:10.1042/BC20100035.
- Thomas, Sophie, Marine Legendre, Sophie Saunier, Bettina Bessières, Caroline Alby, Maryse Bonnière, Annick Toutain, et al. 2012. « TCTN3 Mutations Cause Mohr-Majewski Syndrome. » *American Journal of Human Genetics* 91 (2): 372- 78. doi:10.1016/j.ajhg.2012.06.017.
- Torres, V. E. 1998. « New Insights into Polycystic Kidney Disease and Its Treatment. » *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 7 (2): 159- 69.
- Tory, Kálmán, Tiphonie Lacoste, Lydie Burglen, Vincent Morinière, Nathalie Boddart, Marie-Alice Macher, Brigitte Llanas, et al. 2007. « High NPHP1 and NPHP6 Mutation Rate in Patients with Joubert Syndrome and Nephronophthisis: Potential Epistatic Effect of NPHP6 and AHI1 Mutations in Patients with NPHP1 Mutations. » *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 18 (5): 1566- 75. doi:10.1681/ASN.2006101164.
- Tory, Kálmán, Dóra K. Menyhárd, Stéphanie Woerner, Fabien Nevo, Olivier Gribouval, Andrea Kerti, Pál Stráner, et al. 2014. « Mutation-Dependent Recessive Inheritance of NPHS2-Associated Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. » *Nature Genetics* 46 (3): 299- 304. doi:10.1038/ng.2898.
- Tory, Kálmán, Caroline Rousset-Rouvière, Marie-Claire Gubler, Vincent Morinière, Audrey Pawtowski, Céline Becker, Claude Guyot, et al. 2009. « Mutations of NPHP2 and NPHP3 in Infantile Nephronophthisis. » *Kidney International* 75 (8): 839- 47. doi:10.1038/ki.2008.662.

- Tran, Pamela V., Courtney J. Haycraft, Tatiana Y. Besschetnova, Annick Turbe-Doan, Rolf W. Stottmann, Bruce J. Herron, Allyson L. Chesebro, et al. 2008. « THM1 Negatively Modulates Mouse Sonic Hedgehog Signal Transduction and Affects Retrograde Intraflagellar Transport in Cilia. » *Nature Genetics* 40 (4): 403-10. doi:10.1038/ng.105.
- Tran, Pamela V., George C. Talbott, Annick Turbe-Doan, Damon T. Jacobs, Michael P. Schonfeld, Luciane M. Silva, Anindita Chatterjee, Mary Prysak, Bailey A. Allard, et David R. Beier. 2014. « Downregulating Hedgehog Signaling Reduces Renal Cystogenic Potential of Mouse Models. » *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 25 (10): 2201-12. doi:10.1681/ASN.2013070735.
- Tsang, William Y., Carine Bossard, Hemant Khanna, Johan Peränen, Anand Swaroop, Vivek Malhotra, et Brian David Dynlacht. 2008. « CP110 Suppresses Primary Cilia Formation through Its Interaction with CEP290, a Protein Deficient in Human Ciliary Disease. » *Developmental Cell* 15 (2): 187-97. doi:10.1016/j.devcel.2008.07.004.
- Tsang, William Y., Alexander Spektor, Daniel J. Luciano, Vahan B. Indjeian, Zhihong Chen, Jeffery L. Salisbury, Irma Sánchez, et Brian David Dynlacht. 2006. « CP110 Cooperates with Two Calcium-Binding Proteins to Regulate Cytokinesis and Genome Stability. » *Molecular Biology of the Cell* 17 (8): 3423-34. doi:10.1091/mbc.E06-04-0371.
- Van der Auwera, Geraldine A., Mauricio O. Carneiro, Chris Hartl, Ryan Poplin, Guillermo Del Angel, Ami Levy-Moonshine, Tadeusz Jordan, et al. 2013. « From FastQ Data to High Confidence Variant Calls: The Genome Analysis Toolkit Best Practices Pipeline. » *Current Protocols in Bioinformatics / Editorial Board, Andreas D. Baxevanis ... [et Al.]* 11 (1110): 11.10.1-11.10.33. doi:10.1002/0471250953.bi1110s43.
- Vasilyev, Aleksandr, Yan Liu, Sudha Mudumana, Steve Mangos, Pui-Ying Lam, Arindam Majumdar, Jinhua Zhao, et al. 2009. « Collective Cell Migration Drives Morphogenesis of the Kidney Nephron. » *PLoS Biology* 7 (1): e9. doi:10.1371/journal.pbio.1000009.
- Vieillard, Jennifer, Julie Jerber, et Bénédicte Durand. 2014. « [Transcriptional control of ciliary genes]. » *Médecine Sciences: M/S* 30 (11): 968-75. doi:10.1051/medsci/20143011010.
- Vij, Shubha, Jochen C. Rink, Hao Kee Ho, Deepak Babu, Michael Eitel, Vijayashankaranarayanan Narasimhan, Varnesh Tikku, Jody Westbrook, Bernd Schierwater, et Sudipto Roy. 2012. « Evolutionarily Ancient Association of the FoxJ1 Transcription Factor with the Motile Ciliogenic Program. » *PLoS Genetics* 8 (11): e1003019. doi:10.1371/journal.pgen.1003019.
- Walczak-Sztulpa, Joanna, Jonathan Eggenschwiler, Daniel Osborn, Desmond A. Brown, Francesco Emma, Claus Klingenberg, Raoul C. Hennekam, et al. 2010. « Cranioectodermal Dysplasia, Sensenbrenner Syndrome, Is a Ciliopathy Caused by Mutations in the IFT122 Gene. » *American Journal of Human Genetics* 86 (6): 949-56. doi:10.1016/j.ajhg.2010.04.012.
- Wallmeier, Julia, Dalal A. Al-Mutairi, Chun-Ting Chen, Niki Tomas Loges, Petra Pennekamp, Tabea Menchen, Lina Ma, et al. 2014. « Mutations in CCNO Result in Congenital Mucociliary Clearance Disorder with Reduced Generation of Multiple Motile Cilia. » *Nature Genetics* 46 (6): 646-51. doi:10.1038/ng.2961.

- Wang, B., J. F. Fallon, et P. A. Beachy. 2000. « Hedgehog-Regulated Processing of Gli3 Produces an Anterior/posterior Repressor Gradient in the Developing Vertebrate Limb. » *Cell* 100 (4): 423- 34.
- Watanabe, Daisuke, Yukio Saijoh, Shigenori Nonaka, Genta Sasaki, Yayoi Ikawa, Takahiko Yokoyama, et Hiroshi Hamada. 2003. « The Left-Right Determinant Inversin Is a Component of Node Monocilia and Other 9+0 Cilia. » *Development* 130 (9): 1725- 34. doi:10.1242/dev.00407.
- Watson, Christopher M., Laura A. Crinnion, Joanne E. Morgan, Sally M. Harrison, Christine P. Diggle, Julian Adlard, Helen A. Lindsay, et al. 2014. « Robust Diagnostic Genetic Testing Using Solution Capture Enrichment and a Novel Variant-Filtering Interface. » *Human Mutation* 35 (4): 434- 41. doi:10.1002/humu.22490.
- Wei, Qing, Kun Ling, et Jinghua Hu. 2015. « The essential roles of transition fibers in the context of cilia. » *Current Opinion in Cell Biology, Cell organelles*, 35 (août): 98- 105. doi:10.1016/j.ceb.2015.04.015.
- Wei, Qing, Qingwen Xu, Yuxia Zhang, Yujie Li, Qing Zhang, Zeng Hu, Peter C. Harris, Vicente E. Torres, Kun Ling, et Jinghua Hu. 2013. « Transition Fibre Protein FBF1 Is Required for the Ciliary Entry of Assembled Intraflagellar Transport Complexes. » *Nature Communications* 4: 2750. doi:10.1038/ncomms3750.
- Wei, Qing, Yuxia Zhang, Yujie Li, Qing Zhang, Kun Ling, et Jinghua Hu. 2012. « The BBSome Controls IFT Assembly and Turnaround in Cilia. » *Nature Cell Biology* 14 (9): 950- 57. doi:10.1038/ncb2560.
- Werner, Claudius, Jörg Große Onnebrink, et Heymut Omran. 2015. « Diagnosis and Management of Primary Ciliary Dyskinesia. » *Cilia* 4 (1): 2. doi:10.1186/s13630-014-0011-8.
- Westlake, Christopher J., Lisa M. Baye, Maxence V. Nachury, Kevin J. Wright, Karen E. Ervin, Lilian Phu, Cecile Chalouni, et al. 2011. « Primary Cilia Membrane Assembly Is Initiated by Rab11 and Transport Protein Particle II (TRAPP II) Complex-Dependent Trafficking of Rabin8 to the Centrosome. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (7): 2759- 64. doi:10.1073/pnas.1018823108.
- White, Mark C., et Lynne M. Quarmany. 2008. « The NIMA-Family Kinase, Nek1 Affects the Stability of Centrosomes and Ciliogenesis. » *BMC Cell Biology* 9: 29. doi:10.1186/1471-2121-9-29.
- Williams, Corey L., Chunmei Li, Katarzyna Kida, Peter N. Inglis, Swetha Mohan, Lucie Semenec, Nathan J. Bialas, et al. 2011. « MKS and NPHP Modules Cooperate to Establish Basal Body/transition Zone Membrane Associations and Ciliary Gate Function during Ciliogenesis. » *The Journal of Cell Biology* 192 (6): 1023- 41. doi:10.1083/jcb.201012116.
- Winkelbauer, Marlene E., Jenny C. Schafer, Courtney J. Haycraft, Peter Swoboda, et Bradley K. Yoder. 2005. « The C. Elegans Homologs of Nephrocystin-1 and Nephrocystin-4 Are Cilia Transition Zone Proteins Involved in Chemosensory Perception. » *Journal of Cell Science* 118 (Pt 23): 5575- 87. doi:10.1242/jcs.02665.
- Wirschell, Maureen, Heike Olbrich, Claudius Werner, Douglas Tritschler, Raquel Bower, Winfield S. Sale, Niki T. Loges, et al. 2013. « The Nexin-Dynein Regulatory Complex

- Subunit DRC1 Is Essential for Motile Cilia Function in Algae and Humans. » *Nature Genetics* 45 (3): 262- 68. doi:10.1038/ng.2533.
- Wolf, M. T. F., S. Saunier, J. F. O'Toole, N. Wanner, T. Groshong, M. Attanasio, R. Salomon, et al. 2007. « Mutational Analysis of the RPGRIP1L Gene in Patients with Joubert Syndrome and Nephronophthisis. » *Kidney International* 72 (12): 1520- 26. doi:10.1038/sj.ki.5002630.
- Wolken, J. J. 1956. « Photoreceptor Structures. I. Pigment Monolayers and Molecular Weight. » *Journal of Cellular Physiology* 48 (3): 349- 69.
- Won, Jungyeon, Caralina Marín de Evsikova, Richard S. Smith, Wanda L. Hicks, Malia M. Edwards, Chantal Longo-Guess, Tiansen Li, Jürgen K. Naggert, et Patsy M. Nishina. 2011. « NPHP4 Is Necessary for Normal Photoreceptor Ribbon Synapse Maintenance and Outer Segment Formation, and for Sperm Development. » *Human Molecular Genetics* 20 (3): 482- 96. doi:10.1093/hmg/ddq494.
- Worley, L.G., E. Fischbein, et J.E. Shapiro. 1953. « The structure of ciliated epithelial cells as revealed by the electron microscope and in phase contrast. » *Journal of Morphology* 92: 545- 77.
- Wu, Yuliang, Xiao-Qing Dai, Qiang Li, Carl X. Chen, Weiyi Mai, Zahir Hussain, Wentong Long, et al. 2006. « Kinesin-2 Mediates Physical and Functional Interactions between Polycystin-2 and Fibrocystin. » *Human Molecular Genetics* 15 (22): 3280- 92. doi:10.1093/hmg/ddl404.
- Xia, L., B. Hai, Y. Gao, D. Burnette, R. Thazhath, J. Duan, M. H. Bré, N. Levilliers, M. A. Gorovsky, et J. Gaertig. 2000. « Polyglycylation of Tubulin Is Essential and Affects Cell Motility and Division in *Tetrahymena Thermophila*. » *The Journal of Cell Biology* 149 (5): 1097- 1106.
- Xu, M., Z. Zhou, C. Cheng, W. Zhao, R. Tang, Y. Huang, W. Wang, et al. 2001. « Cloning and Characterization of a Novel Human TEKTIN1 Gene. » *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33 (12): 1172- 82.
- Yang, Jun, Jiangang Gao, Michael Adamian, Xiao-Hong Wen, Basil Pawlyk, Luo Zhang, Michael J. Sanderson, Jian Zuo, Clint L. Makino, et Tiansen Li. 2005. « The Ciliary Rootlet Maintains Long-Term Stability of Sensory Cilia. » *Molecular and Cellular Biology* 25 (10): 4129- 37. doi:10.1128/MCB.25.10.4129-4137.2005.
- Yang, Jun, Xiaoqing Liu, Guohua Yue, Michael Adamian, Oleg Bulgakov, et Tiansen Li. 2002. « Rootletin, a Novel Coiled-Coil Protein, Is a Structural Component of the Ciliary Rootlet. » *The Journal of Cell Biology* 159 (3): 431- 40. doi:10.1083/jcb.200207153.
- Yao, Gang, Xuefeng Su, Vy Nguyen, Kristina Roberts, Xiaogang Li, Ayumi Takakura, Markus Plomann, et Jing Zhou. 2014. « Polycystin-1 Regulates Actin Cytoskeleton Organization and Directional Cell Migration through a Novel PC1-Pacsin 2-N-Wasp Complex. » *Human Molecular Genetics* 23 (10): 2769- 79. doi:10.1093/hmg/ddt672.
- Ye, Xuan, Huiqing Zeng, Gang Ning, Jeremy F. Reiter, et Aimin Liu. 2014. « C2cd3 Is Critical for Centriolar Distal Appendage Assembly and Ciliary Vesicle Docking in Mammals. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (6): 2164- 69. doi:10.1073/pnas.1318737111.
- Yoder, Bradley K., Xiaoying Hou, et Lisa M. Guay-Woodford. 2002. « The Polycystic Kidney Disease Proteins, Polycystin-1, Polycystin-2, Polaris, and Cystin, Are Co-Localized in Renal Cilia. » *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 13 (10): 2508- 16.

- You, Yingjian, Tao Huang, Edward J. Richer, Jens-Erik Harboe Schmidt, Joseph Zabner, Zea Borok, et Steven L. Brody. 2004. « Role of F-Box Factor foxj1 in Differentiation of Ciliated Airway Epithelial Cells. » *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 286 (4): L650- 57. doi:10.1152/ajplung.00170.2003.
- Yu, Jing, Thomas J. Carroll, et Andrew P. McMahon. 2002. « Sonic Hedgehog Regulates Proliferation and Differentiation of Mesenchymal Cells in the Mouse Metanephric Kidney. » *Development (Cambridge, England)* 129 (22): 5301- 12.
- Yu, Xianwen, Doreen Lau, Chee Peng Ng, et Sudipto Roy. 2011. « Cilia-Driven Fluid Flow as an Epigenetic Cue for Otolith Biomineralization on Sensory Hair Cells of the Inner Ear. » *Development (Cambridge, England)* 138 (3): 487- 94. doi:10.1242/dev.057752.
- Yu, Xianwen, Chee Peng Ng, Hermann Habacher, et Sudipto Roy. 2008. « Foxj1 Transcription Factors Are Master Regulators of the Motile Ciliogenic Program. » *Nature Genetics* 40 (12): 1445- 53. doi:10.1038/ng.263.
- Zaghloul, Norann A., et Nicholas Katsanis. 2009. « Mechanistic Insights into Bardet-Biedl Syndrome, a Model Ciliopathy. » *The Journal of Clinical Investigation* 119 (3): 428- 37. doi:10.1172/JCI37041.
- Zariwala, Maimoona A., Margaret W. Leigh, Franck Ceppia, Marcus P. Kennedy, Peadar G. Noone, Johnny L. Carson, Milan J. Hazucha, et al. 2006. « Mutations of DNAI1 in Primary Ciliary Dyskinesia: Evidence of Founder Effect in a Common Mutation. » *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 174 (8): 858- 66. doi:10.1164/rccm.200603-370OC.
- Zhang, Qihong, Darryl Nishimura, Seongjin Seo, Tim Vogel, Donald A. Morgan, Charles Searby, Kevin Bugge, Edwin M. Stone, Kamal Rahmouni, et Val C. Sheffield. 2011. « Bardet-Biedl Syndrome 3 (Bbs3) Knockout Mouse Model Reveals Common BBS-Associated Phenotypes and Bbs3 Unique Phenotypes. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (51): 20678- 83. doi:10.1073/pnas.1113220108.
- Zhang, Qihong, Dahai Yu, Seongjin Seo, Edwin M. Stone, et Val C. Sheffield. 2012. « Intrinsic Protein-Protein Interaction-Mediated and Chaperonin-Assisted Sequential Assembly of Stable Bardet-Biedl Syndrome Protein Complex, the BBSome. » *Journal of Biological Chemistry* 287 (24): 20625- 35. doi:10.1074/jbc.M112.341487.
- Zhao, Huijie, Lei Zhu, Yunlu Zhu, Jingli Cao, Shanshan Li, Qiongping Huang, Tao Xu, Xiao Huang, Xiumin Yan, et Xueliang Zhu. 2013. « The Cep63 Paralogue Deup1 Enables Massive de Novo Centriole Biogenesis for Vertebrate Multiciliogenesis. » *Nature Cell Biology* 15 (12): 1434- 44. doi:10.1038/ncb2880.

ANNEXES

Annexe 1 : Septins 2, 7 and 9 and MAP4 colocalize along the axoneme in the primary cilium and control ciliary length

Rania Ghossoub^{1,2,3}, Qicong Hu⁴, Marion Failler^{1,2,3,5}, Marie-Christine Rouyez^{1,2,3}, Benjamin Spitzbarth⁶, Serge Mostowy^{7,8,9}, Uwe Wolfrum⁶, Sophie Saunier^{3,5}, Pascale Cossart^{7,8,9}, W. James Nelson^{4,10}, and Alexandre Benmerah^{1,2,3,5},

¹INSERM U1016, Insitut Cochin, Paris, France

²CNRS UMR8104, Paris, France

³Universite´ Paris Descartes, Sorbonne Paris Citee´, Institut Imagine, Paris, France

⁴Department of Biology, Stanford University, Stanford, CA, USA

⁵INSERM, U983, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

⁶Department of Cell and Matrix Biology, Institute of Zoology, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany

⁷Institut Pasteur, Unité des Interactions Bactéries-Cellules, Département de Biologie Cellulaire et Infection, Paris, France

⁸INSERM, U604, Paris, France

⁹INRA, USC2020, Paris, France

¹⁰Department of Molecular and Cellular Physiology, Stanford University, Stanford, CA, USA

Septins 2, 7 and 9 and MAP4 colocalize along the axoneme in the primary cilium and control ciliary length

Rania Ghossoub^{1,2,3}, Qicong Hu⁴, Marion Failler^{1,2,3,5}, Marie-Christine Rouyez^{1,2,3}, Benjamin Spitzbarth⁶, Serge Mostowy^{7,8,9,*}, Uwe Wolfrum⁶, Sophie Saunier^{3,5}, Pascale Cossart^{7,8,9}, W. James Nelson^{4,10,†,§} and Alexandre Benmerah^{1,2,3,5,†,§}

¹INSERM U1016, Institut Cochin, Paris, France

²CNRS UMR8104, Paris, France

³Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine, Paris, France

⁴Department of Biology, Stanford University, Stanford, CA, USA

⁵INSERM, U983, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

⁶Department of Cell and Matrix Biology, Institute of Zoology, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany

⁷Institut Pasteur, Unité des Interactions Bactéries-Cellules, Département de Biologie Cellulaire et Infection, Paris, France

⁸INSERM, U604, Paris, France

⁹INRA, USC2020, Paris, France

¹⁰Department of Molecular and Cellular Physiology, Stanford University, Stanford, CA, USA

*Present address: Section of Microbiology, MRC Centre for Molecular Bacteriology and Infection, Imperial College London, London, UK

†These authors contributed equally to this work

§Authors for correspondence (wjnelson@stanford.edu; alexandre.benmerah@inserm.fr)

Accepted 20 March 2013

Journal of Cell Science 126, 2583–2594

© 2013. Published by The Company of Biologists Ltd

doi: 10.1242/jcs.111377

Summary

Septins are a large, evolutionarily conserved family of GTPases that form hetero-oligomers and interact with the actin-based cytoskeleton and microtubules. They are involved in scaffolding functions, and form diffusion barriers in budding yeast, the sperm flagellum and the base of primary cilia of kidney epithelial cells. We investigated the role of septins in the primary cilium of retinal pigmented epithelial (RPE) cells, and found that SEPT2 forms a 1:1:1 complex with SEPT7 and SEPT9 and that the three members of this complex colocalize along the length of the axoneme. Similar to observations in kidney epithelial cells, depletion of cilium-localized septins by siRNA-based approaches inhibited ciliogenesis. MAP4, which is a binding partner of SEPT2 and controls the accessibility of septins to microtubules, was also localized to the axoneme where it appeared to negatively regulate ciliary length. Taken together, our data provide new insights into the functions and regulation of septins and MAP4 in the organization of the primary cilium and microtubule-based activities in cells.

Key words: Primary cilium, Septins, MAP4, Microtubules, Actin

Introduction

Septins are a highly conserved family of small GTPases that form hetero-oligomers that assemble into filaments, rings and spirals. Originally, septins were identified as important regulators of cytokinesis in organisms ranging from yeast to mammals. In yeast, septins assemble at the neck between the mother and daughter bud into interlocking rings that form a barrier to the lateral diffusion of proteins and mRNAs from the mother to the daughter cell, and a scaffold for the assembly of the contractile ring. In mammals, septins localize to the cleavage furrow and midbody, and perturbation of septin functions leads to cytokinesis defects (reviewed by Saarikangas and Barral, 2011; Mostowy and Cossart, 2012).

In mammals, septins have been linked to scaffolding functions with the cytoskeleton. In most cells, septins colocalize with actin stress fibers in cells in interphase and with cortical actin at the cleavage furrow during mitosis (reviewed by Saarikangas and Barral, 2011; Mostowy and Cossart, 2012). Septins also colocalize with, and bind to subpopulations of microtubules, and regulate microtubule stability, post-translational modifications and microtubule-vesicle interactions (reviewed by Spiliotis, 2010).

Septin 2 (SEPT2) directly interacts with MAP4, a ubiquitously expressed microtubule-associated protein (MAP) of the MAP2/TAU family, which positively regulates polymerization/stability of cytoplasmic microtubules. MAP4, which directly binds and bundles microtubules (reviewed by Holmfeldt et al., 2009), is thought to regulate septin-microtubule interactions (Kremer et al., 2005; Spiliotis et al., 2008) (reviewed by Spiliotis, 2010). Septins also associate with sub-domains of the plasma membrane by binding phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and, thereby, participate in mitosis, vesicular trafficking and morphogenesis of neurons (reviewed by Saarikangas and Barral, 2011; Mostowy and Cossart, 2012). Several septin binding partners have been identified including non-muscle myosin II and anillin in cytokinesis (Oegema et al., 2000; Kinoshita et al., 2002; Joo et al., 2007), and the sec6/sec8 subunits of the exocyst complex (Hsu et al., 1998). Finally, septins are also involved in the formation of cage-like structures around intracellular bacteria indicating that they also participate in host defense against pathogens (Mostowy et al., 2010).

Septins organize lateral membrane diffusion barriers between the ciliary compartment and the surrounding plasma membrane

in the sperm flagellum (Kissel et al., 2005; Ihara et al., 2005), primary cilium (Hu et al., 2010) and motile cilia (Kim et al., 2010b) (reviewed by Hu and Nelson, 2011). Flagella and cilia are highly conserved structures in eukaryotes that are involved in sensing and transducing environmental cues (primary and motile cilia), the movement of fluids (motile cilia), and in cell motility (motile cilia and flagella). Cilia are composed of a bundle of microtubules, termed the axoneme, which is assembled from a modified centriole called the basal body. The assembly of the cilium (ciliogenesis) is a complex process that requires an evolutionarily conserved machinery termed intraflagellar transport (IFT). The IFT machinery is thought to select, import and transport ciliary components (IFT particles or trains) into and along the axoneme towards the assembling distal end of the axoneme; this kinesin-based anterograde transport is balanced by dynein-dependent retrograde transport of IFT trains back to the basal body (reviewed by Pedersen et Rosenbaum, 2008; Ishikawa and Marshall, 2011).

The primary cilium, a specific subtype of sensory non-motile cilia, is present in most cells in vertebrates during development and in the adult depending on the cell type. The primary cilium controls key signaling pathways during development and tissue homeostasis. This was clearly demonstrated by the identification of genes mutated in complex genetic diseases associated with polycystic kidney, retinal degeneration, polydactyly and obesity that are generally referred to as ciliopathies (reviewed by Hildebrandt et al., 2011). Many, if not all the proteins encoded by these genes are localized near the basal body, the transition zone or within the primary cilium. The transition zone includes the region where the basal body is docked onto the cellular membrane, and extends distally to link microtubule doublets to the ciliary membrane by Y-shaped molecular links (Gilula and Satir, 1972). The transition zone may form a molecular filter between the ciliary compartment and the cytoplasm similar to the role of the nuclear pore complex (reviewed by Hu and Nelson, 2011; Ishikawa and Marshall, 2011). Septins form a ring-shaped structure at the base of cilia (Hu et al., 2010; Kim et al., 2010b; Chih et al., 2012). This localization is in agreement with a putative septin-based diffusion barrier at the transition zone. In addition, retention at the plasma membrane has been proposed to explain exclusion of membrane proteins from the cilium (Francis et al., 2011). SEPT2 is also required for ciliogenesis (Hu et al., 2010; Kim et al., 2010b; Chih et al., 2012), thereby linking septins to ciliary function and morphogenesis.

To further characterize these new functions of septins in the primary cilium, we investigated the distribution of septins in human telomerase-immortalized retinal pigment epithelial [hTERT-RPE-1 (RPE1)] cells, one of the most widely used models to study ciliogenesis. We found that in RPE1 cells SEPT2 forms a 1:1:1 complex with SEPT7 and SEPT9, that this complex localizes along the entire length of the axoneme, and that it positively controls ciliogenesis and the length of cilia. MAP4 is also localized to the axoneme, and negatively regulates ciliary length and therefore appears to antagonize the function of septins in the cilium.

Results

SEPT2, SEPT7, SEPT9 form a complex and localize to the primary cilium

SEPT2 forms a diffusion barrier at the base of the primary cilium in murine kidney (IMCD3) cells and fibroblasts (Hu et al., 2010; Chih et al., 2012; Garcia-Gonzalo et al., 2011). In IMCD3 cells,

SEPT2 is also distributed along the axoneme in a minor proportion of the cells (Hu et al., 2010). To further characterize septins at the primary cilium, we analyzed the distribution and function of septins in RPE1 cells, a widely used *in vitro* cell model for ciliogenesis.

RPE1 cells were grown to confluency and then transferred to low serum medium for 24 hours to induce ciliogenesis. Under these conditions, 80% of the cells formed a cilium (Molla-Herman et al., 2010), which was identified as a 3–4 μm rod that stained for acetylated tubulin (AcTub). To identify septin complexes in these cells, lysates from ciliated cells expressing SEPT2–S-tag–GFP were sequentially precipitated with GFP antibodies followed by S-beads, and analyzed by SDS-PAGE using silver staining (Fig. 1A) and western blotting (Fig. 1B). The results show that SEPT2 is present in an apparently equimolar complex of SEPT2/SEPT7/SEPT9 in ciliated RPE1 cells.

The localization of the SEPT2/SEPT7/SEPT9 complex was then investigated in ciliated RPE1 cells. In ciliated (and in non-ciliated RPE1 cells) septins were organized as cytoplasmic fibers (Fig. 1C) that colocalized with actin filaments throughout the cell (see below). In addition, in the great majority of ciliated cells (see below), SEPT2, SEPT7 and SEPT9 colocalized with AcTub (Fig. 1C), indicating their presence in the primary cilium. Similar results were obtained in ARPE19 cells, another human RPE cell lines (supplementary material Fig. S1). SEPT9_v1 fused with Tomato (SEPT9–tomato) and transiently expressed in RPE1 cells also colocalized with AcTub in the primary cilium in fixed cells (data not shown). In live cells, SEPT9–tomato also colocalized with the somatostatin receptor type 3 (SSTR3–GFP; see below), a ciliary membrane marker (Händel et al., 1999; Berbari et al., 2008; Hu et al., 2010), showing that its localization to the primary cilium was not a fixation artifact. Altogether, these results indicate that a specific complex of septins (SEPT2/SEPT7/SEPT9) localized to the primary cilium in RPE cells.

Septins are present at the axoneme of cilia *in situ*

The presence of septins at the axoneme of cilia *in situ* was then further analyzed by immunohistochemistry of various human tissues. As shown in Fig. 2A, SEPT2 was abundant in the photoreceptor layer of the human retina in both the outer nuclear layer and the outer plexiform layer, which contains the presynaptic terminals of photoreceptor cells. SEPT2 colocalized with centrin3 a marker of the connecting cilium, the basal body and the adjacent daughter centriole of photoreceptor cells (Fig. 2A, bottom part). SEPT2 was also present in spots surrounding the daughter centriole but the significance of this staining remains to be determined. Moreover, we found staining of SEPT2 in the photoreceptor outer segments (Fig. 2A), which represent ciliary modifications. In addition, to SEPT2 in the retina, SEPT9 colocalized with AcTub at primary cilia of kidney tubule epithelial cells (Fig. 2B) and cilia of bronchus multiciliated epithelial cells (Fig. 2C); similar results were obtained for SEPT7 (data not shown). Thus, septins are components of the axoneme of primary cilia in RPE cell lines *in vitro* and in cilia of different tissues *in vivo*.

Septins accumulate in the axoneme of long mature primary cilia in RPE1 cells

Because localization of septins within axonemes was not detected in all ciliated RPE1 cells (see below) and only in a minor

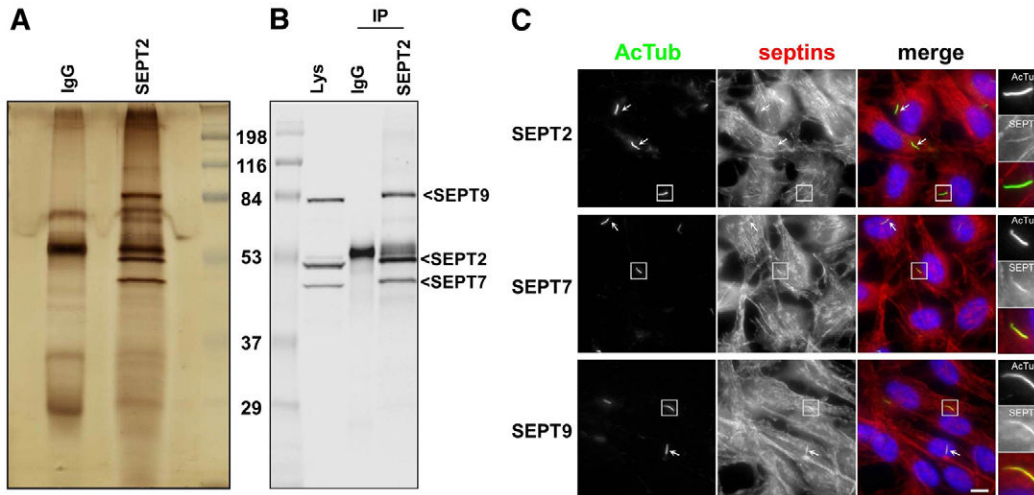


Fig. 1. A SEPT2/SEPT7/SEPT9 complex at the primary cilium of RPE1 cells. (A,B) RPE1 cells expressing SEPT2-S-tag-GFP were extracted and proteins immunoprecipitated either with control antibody (IgG) or GFP followed by S-beads (IP), and proteins separated by SDS-PAGE and processed for silver staining (A), or western blotting with a mixture of antibodies to SEPT9_v1, SEPT7 and SEPT2 (B). (C) RPE1 cells, grown on coverslips and serum-starved for 24 hours, were processed for immunofluorescence using anti-acetylated tubulin antibody to stain cilia (AcTub, green), antibodies against SEPT2, SEPT7 or SEPT9 (red), and DAPI (blue) to stain the nuclei. Panels on the right are enlarged views of representative cilia (boxed in the main images). White arrows indicate other cilia in the same field. Scale bar: 5 μ m.

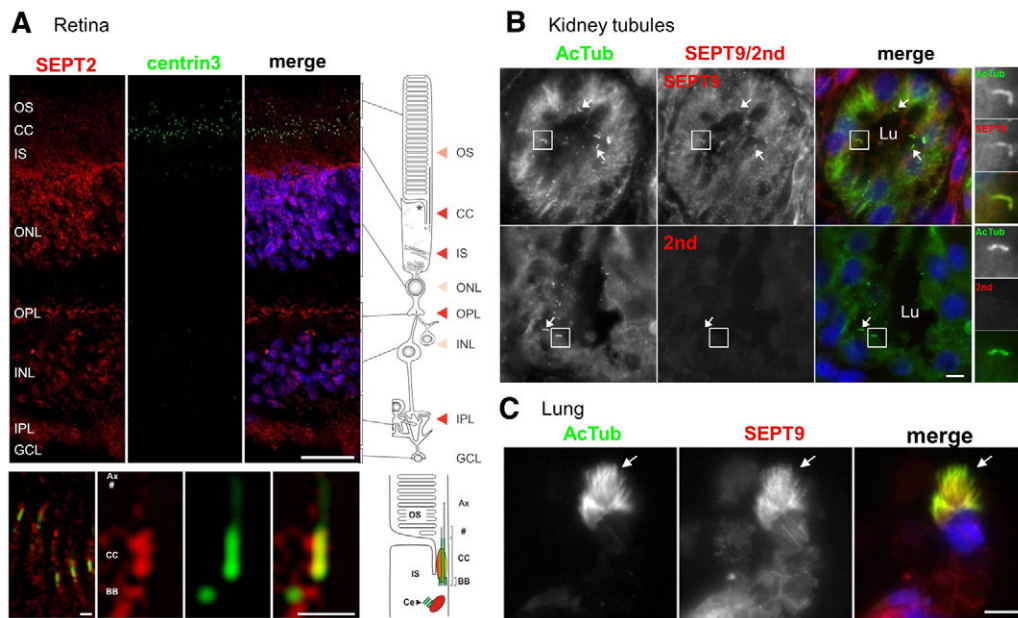


Fig. 2. Septins localize to the axoneme of cilia *in vivo*. (A) Indirect immunofluorescence triple staining of SEPT2 (red), centrin isoform 3 (green), which was used as marker for the connecting cilium (CC), basal body and the adjacent centriole (Ce), and nuclei were stained with DAPI (blue). In the human retina, SEPT2 is localized in the outer segment (OS), the inner segment (IS) and the synaptic compartments of the outer (OPL) and inner (IPL) plexiform layer. Additional weak staining was detected in the nuclei of the outer (ONL) and inner nuclear layer (INL). The bottom panel shows high magnification indirect immunofluorescence of SEPT2 (red) and centrin3 (green) in longitudinal cryosections through human photoreceptor cells. The high magnification reveals SEPT2 localization as a fibrous pattern in the inner and outer segment. Merged images reveals partial colocalization of SEPT2 with centrin3 at the centriole, the basal body (BB) and along the connecting cilium. Scale bars: top, 25 μ m; bottom, 1 μ m. (B) Tissue sections from adult human kidney were stained with antibodies against AcTub (red) and either SEPT9 (green) or with secondary anti-rabbit antibodies only (2nd; green). Nuclei were stained with DAPI (blue). Representative tubule lumens are indicated (Lu). Higher magnifications of representative cilia are shown on the right, and other cilia are identified with white arrows. Scale bar: 5 μ m. (C) Tissue sections from the lung of a 33-week fetus were stained with antibodies against AcTub (red) and SEPT9 (green). White arrows point to a representative ciliary tuft. Scale bar: 5 μ m.

proportion of the primary cilia in IMCD3 epithelial cells (Hu et al., 2010), we investigated whether the incorporation of septins into the primary cilium was dependent on state of cilium maturation.

The expression of some ciliary proteins is upregulated during ciliogenesis owing to a specific transcription program controlled by the RFX transcription factors family (reviewed by Thomas et al., 2010). Therefore, we examined the expression level of SEPT2/7/9 during ciliogenesis in RPE1 cells grown in the presence of serum, or in low serum for 24 or 48 hours. As shown in Fig. 3A, expression of SEPT2/SEPT7/SEPT9 was not significantly modified upon ciliogenesis, a result in agreement with the observations that the overall cytoplasmic network of septins appears similar in ciliated and non-ciliated cells and that septins at the cilium probably represents a very minor pool of the total cellular septins.

Next, we examined septin localization in the primary cilium at different times after withdrawal of serum and, thereby, different lengths of cilia. RPE1 cells were grown in a low serum concentration for 6 hours (~1 μm primary cilium; Fig. 3B) and

48 hours (~4 μm primary cilium; Fig. 3C), fixed and stained for AcTub and SEPT9 (Fig. 3). Although SEPT9 was absent from the axoneme of short 'young' cilia (6 hours, Fig. 3B), long 'mature' primary cilia (48 hours) had strong septin staining (Fig. 2C; >80% of septin-positive cilia, see below). Similar results were obtained for SEPT7 (supplementary material Fig. S2A). Therefore, septins accumulate in long, mature primary cilia. This observation was confirmed in live RPE1 cells that transiently co-expressed SEPT9–tomato and SSTR3–GFP. Forty-eight hours after serum starvation, a mixture of short and long primary cilia were detected in the cell population (Fig. 2D,E). Similar to endogenous SEPT9, SEPT9–tomato was absent or only stained the base of short primary cilia (Fig. 3D), whereas it decorated the length of long primary cilia (Fig. 3E). Note, however, that SEPT9–tomato (Fig. 3E, arrowheads) did not appear to localize at the tip of primary cilia. Similar observations were made using a SEPT2–GFP fusion (data not shown). These results indicate that septins accumulate in mature primary cilia by a process that probably depends on their gradual accumulation during ciliogenesis.

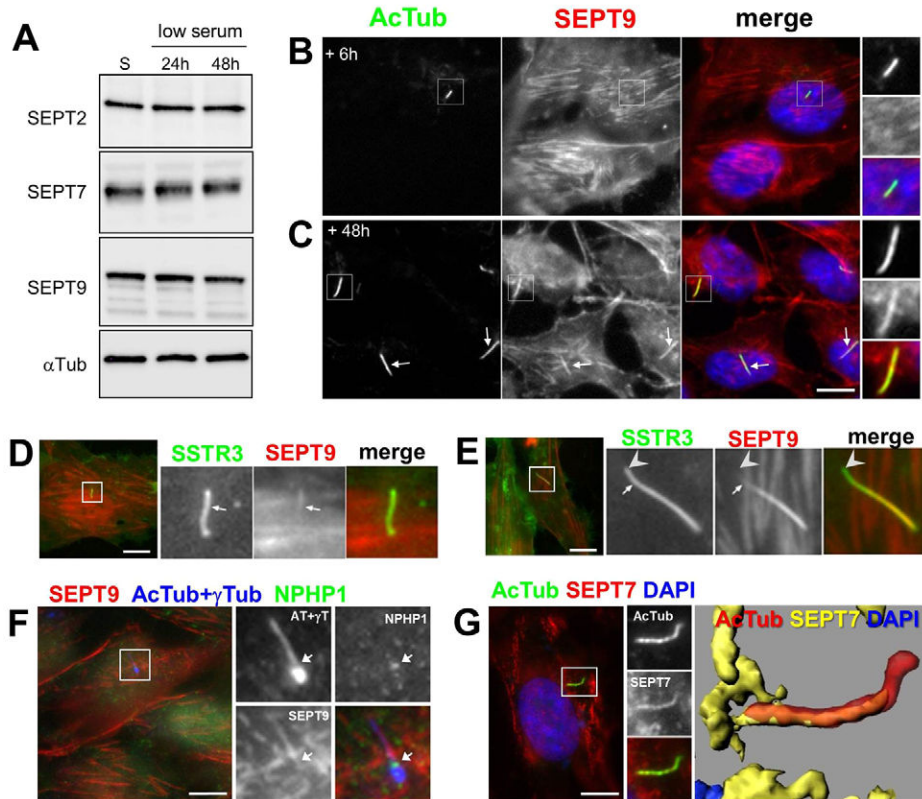


Fig. 3. Septins localize to the axoneme of long mature cilia in RPE1 cells. (A) RPE1 cells maintained in the presence of serum (S) or grown in low serum for 24 (24 h) or 48 (48 h) hours were lysed and expression of SEPT2, SEPT7 and SEPT9 was analyzed by western blotting with the indicated antibodies, expression of γ -tubulin was also analyzed in the same conditions as a control. (B,C) RPE1 cells, serum-starved for 6 (B) or 48 hours (C), were processed for immunofluorescence using antibodies against acetylated tubulin (AcTub; green) and anti-SEPT9 (red). Similar results were obtained using an anti-SEPT7 antibody (supplementary material Fig. S2). Panels on the right are enlarged views of representative cilia (boxed in the main images). (D,E) RPE1 cells were transiently transfected with plasmids encoding SSTR3–GFP (green) and SEPT9–tomato (red) fusions, serum-starved for 48 hours and directly analyzed by epifluorescence microscopy. Representative short (D) and long (E) cilia are shown. Panels on the right are enlarged views of each cilium (white boxes). Arrows and arrowheads indicate the distal end of SEPT9 and SSTR3 stainings, respectively. (F) RPE1 cells, serum-starved for 24 hours were processed for immunofluorescence using a mix of mouse monoclonal antibodies against acetylated-tubulin and γ -tubulin (AcTub+ γ Tub; blue), a goat polyclonal against NPHP1 (green) and a rabbit polyclonal against SEPT7 (red). Panels on the right are enlarged views of a representative cilium (boxed in the main images) where the white arrows indicate NPHP1 staining. (G) RPE1 cells starved for 48 hours were stained for acetylated-tubulin (AcTub, green) and SEPT7 (red). Stacks of images were deconvoluted (left panels) and 3D reconstruction images (right) showed that SEPT7 staining overlaps with AcTub. Scale bars: 5 μm .

Septins colocalized with AcTub within the axoneme of long mature cilia (Figs 1, 3). To examine whether septins were present at other regions of the primary cilium, we compared the distribution of SEPT9 to that of markers of the axoneme (AcTub), basal body (γ -tubulin) and transition zone (NPHP1). Whereas SEPT9 colocalized with AcTub, we detected little or no colocalization with any of the other markers (Fig. 3F). Three-dimensional reconstruction of deconvoluted images clearly showed an almost complete overlap between AcTub and SEPT7 (Fig. 3G) indicating that septins accumulate all along the axoneme of long, mature cilia in RPE1 cells.

Localization of septins to the primary cilium of RPE-1 cells is independent of actin polymerization

Septins colocalize with actin cables throughout the cytoplasm in almost all non-dividing cell types, and with stable cytoplasmic microtubules in Madin–Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells and other cell types (reviewed by Spiliotis, 2010). We compared the distribution of septins, the actin cytoskeleton and microtubules in RPE1 cells; SEPT2, SEPT7 and SEPT9 had identical distributions (see Fig. 1), so we show a detailed analysis of SEPT7 (Fig. 4), although similar observations were made with SEPT9 (supplementary material Fig. S3, and data not shown). In non-ciliated interphase RPE1 cells, SEPT7 colocalized with actin filaments (stress fibers) but not with cytoplasmic AcTub-positive microtubules (supplementary material Fig. S2B). During mitosis, SEPT7 colocalized with filamentous actin at the cell cortex and at the cleavage furrow, but not with microtubules at the mitotic spindle or midbody (supplementary material Fig. S2C, arrows). In ciliated RPE1 cells, SEPT7 mainly localized with actin filaments in the cytoplasm (Fig. 4A,a), but not with the general microtubule population (Fig. 4A,b) except within the cilium (Fig. 4A,c). Therefore, it appears that in RPE1 cells, septins mainly colocalize with actin filaments in the cytoplasm, and with microtubules in the cilium.

The polymerization state or contractility of the actin-based cytoskeleton were shown recently to be involved in ciliogenesis (Kim et al., 2010a; Bershteyn et al., 2010; Pitaval et al., 2010). Because the distribution of septins on cytoplasmic filaments depends on actin polymerization (Kinoshita et al., 2002), we

tested the role of actin polymerization on the localization of septins to the primary cilium. Disruption of actin filaments using cytochalasin D resulted in a dramatic change in the distribution of cytoplasmic septin filaments into ring-like structures that colocalized with actin aggregates (Fig. 4B), as previously described (Kinoshita et al., 2002). However, addition of cytochalasin D did not affect SEPT7 localization in the primary cilium (Fig. 4B). When non-muscle myosin II was inhibited by blebbistatin, cytoplasmic septins filaments were shorter and their staining at the cortex increased, whereas staining of septins in the primary cilium was again unaffected (supplementary material Fig. S3). Thus, the actin-based cytoskeleton does not appear to be involved directly in the steady state localization of septins at the cilium.

Primary cilium-associated septins are stable, and non-dynamic

Since the axoneme forms the rails for the IFT trains, we examined whether or not axonemal septins are involved in IFT-like movements. RPE1 cells co-expressing SSTR3–GFP and SEPT9–tomato were imaged by live-cell fluorescence microscopy (Fig. 5A). SEPT9–tomato colocalized with SSTR3–GFP in cilia in live cells and was uniformly distributed along the length of cilia (Fig. 5A, arrows) as observed in fixed cells (Figs 1, 2). SEPT2–GFP also localized along the length of the cilium (Fig. 5B–D, and data not shown). These distributions are different from the more punctate organization of IFT particles that move within the cilium and accumulate at the basal body and/or the distal tip (review by Pedersen and Rosenbaum, 2008; Ishikawa et Marshall, 2011).

To further explore the organization of septins in the primary cilium, we investigated their dynamics using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). We first tested whether septins within the axoneme exchanged with the cytoplasmic pool. RPE1 cells co-expressing pericentrin–RFP to identify the basal body, and SEPT2–GFP were imaged by live-cell fluorescence microscopy (Fig. 5B–D). Following photobleaching (Fig. 5B; white boxes), the recovery rate of primary-cilium-associated SEPT2–GFP fluorescence (arrows) was compared to that of cytoplasmic septin filaments (arrowheads). Whereas fluorescence

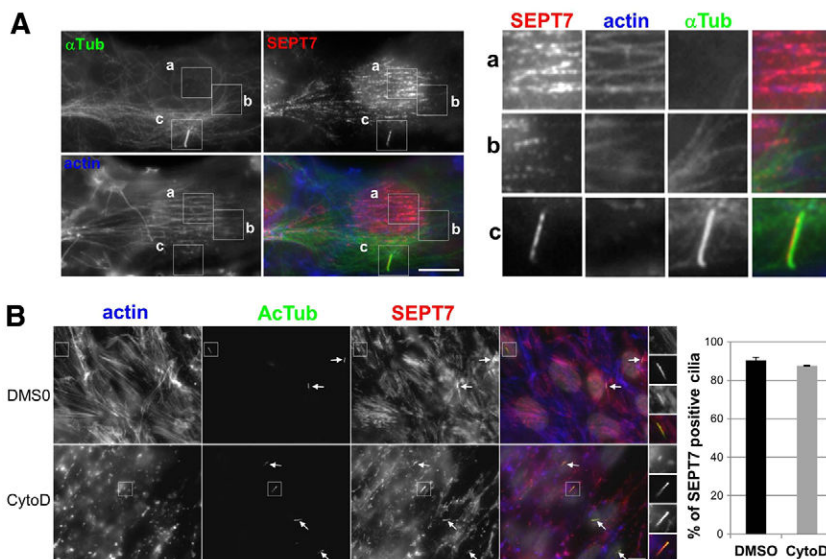


Fig. 4. Localization of septins to the primary cilium does not depend on actin polymerization. (A) RPE1 cells were serum starved for 24 hours and then fixed and stained for immunofluorescence using antibodies against SEPT7 (red), α -tubulin (α -Tub; green), and fluorescent phalloidin to stain actin filaments (blue). Panels on the right are enlarged views of representative regions of the same cell (boxed in the main images) including stress fibers (a) microtubules (b) and the cilium (c). (B) RPE1 cells were serum-starved for 24 hours and then treated with 5 μ M cytochalasin D (CytoD) or, as a control, with the same final concentration of DMSO, for 30 minutes at 37°C, then fixed and analyzed by immunofluorescence using antibodies against SEPT7 (red), acetylated tubulin (AcTub; green) and fluorescent phalloidin (actin; blue). Panels on the right are enlarged views of representative cilia (boxed in the main images). White arrows point to cilia in the same field. Scale bars: 5 μ m. (Far right) Results were quantified (i.e. proportion of SEPT7-positive cilia) from three independent experiments ($n=40$ cilia per experiments).

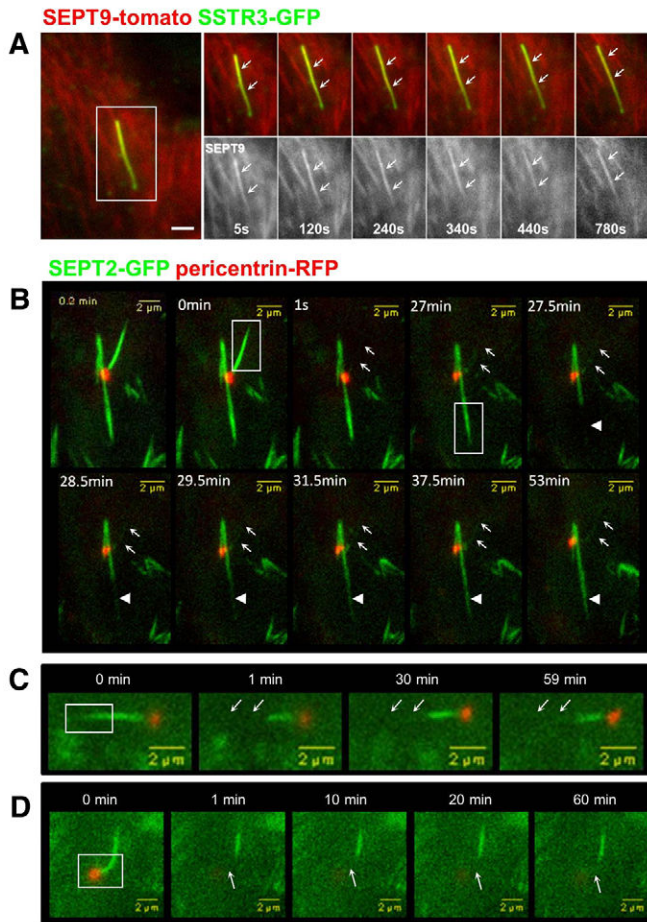


Fig. 5. Septins form a stable-non dynamic pool at the primary cilium. (A) RPE1 cells were transiently transfected with plasmids coding for SSTR3–GFP (green) and SEPT9–tomato (red) fusions, then serum-starved for 48 hours and analyzed by live-cell epifluorescence microscopy. An example of the behavior of SEPT9 in a long cilium is shown (one image every 5 seconds; from left to right). White arrows indicate the position of the cilium. (B–D) RPE1 cells were transiently transfected with plasmids coding for SEPT2–GFP (green) and pericentrin–RFP (red) fusions, then serum-starved for 48 hours and analyzed by live-cell confocal microscopy. The dynamic of SEPT2 at the cilium (B–D) or in cytoplasmic filaments (B) was analyzed by FRAP. Regions (boxed in the main images) including the whole cilium (0 min) or a cytoplasmic SEPT2 filament (27 min; B), the distal part (C) or the proximal part (D) of the cilium were photobleached and recovery of the GFP fluorescence was analyzed for the indicated period. White arrows point to the position of the cilia before photobleaching. Scale bars: 2 μm.

of the cytoplasmic pool of septins recovered slowly over 4 minutes, SEPT2–GFP fluorescence in the primary cilium did not, even when the recovery time was extended to more than 50 minutes. Similar results were obtained using the SEPT9–tomato fusion (supplementary material Fig. S5). These data indicate that in addition to being associated with distinct structures, cytoplasmic and cilium-associated septins represent different dynamic pools that do not appear to exchange with each other.

To test whether septins are dynamic within primary cilium, SEPT2–GFP was photobleached in the distal (Fig. 5C) or proximal (Fig. 5D) domain of the primary cilium. The photobleached regions of SEPT2–GFP did not appear to

recover fluorescence. Since the fluorescence of SEPT2–GFP in short, immature primary cilia was very weak, we were unable to analyze septin dynamics in those cilia. Nevertheless, the results in mature primary cilia indicate that septins are not dynamic and may be a structural component of the axoneme.

Septins are required for ciliogenesis and control cilium length in RPE1 cells

To test the functions of septins during ciliogenesis in RPE1 cells, we use the septin targeting drug Forchlorfenuron which induces the assembly of large septins structures and perturbs septin dynamics without affecting either actin or tubulin polymerization (Hu et al., 2008). While treatment of RPE1 cells with 50 μM Pestanal during ciliogenesis significantly reduced the percentage of ciliated cells (supplementary material Fig. S4A–C), a short treatment, of 4 hours, of ciliated cells only moderately affected ciliogenesis without perturbing the localization of septins to the axoneme (supplementary material Fig. S4D,E). Thus these results indicate that a dynamic septin network is necessary for ciliogenesis.

To more specifically investigate the role of each septin isoform in ciliogenesis we then used previously characterized siRNA sequences to knockdown expression of *SEPT7* (Kremer et al., 2005) or *SEPT9* (Mostowy et al., 2010), and a luciferase targeting sequence as a negative control. The efficiency and specificity of the knockdown was assessed by western blotting of septins, using the ubiquitously expressed clathrin-adaptor complex AP-1 as a control (Fig. 6A). Two different SEPT7 siRNAs efficiently knocked down expression of *SEPT7*, and resulted in efficient downregulation of both SEPT2 and SEPT9. SEPT9 targeting siRNA also efficiently knocked down *SEPT9* expression, but had little effect on either *SEPT2* or *SEPT7* expression, as recently observed (see Discussion). These results were confirmed by immunofluorescence (Fig. 6B), and identify the key function of SEPT7 in the overall stability of septin complexes (see Discussion).

The effect of septin depletion on ciliogenesis was investigated in RPE1 cells by immunofluorescence, and the proportion of ciliated cells and length of primary cilium were quantified based on AcTub staining, as described previously (Molla-Herman et al., 2010; Hu et al., 2010). The percentage of cells with cilia was normalized to controls (normalized ciliogenesis). Depletion of SEPT7 significantly inhibited ciliogenesis ($49.9 \pm 14.2\%$ of control; Fig. 6B,C) and the primary cilia that formed were shorter than those in control-siRNA-treated cells ($1.81 \pm 0.61 \mu\text{m}$ versus $2.71 \pm 0.83 \mu\text{m}$ for control; Fig. 6D). Depletion of SEPT9 resulted in limited effects on the formation of cilia ($92.9 \pm 10.7\%$ of control; Fig. 6C). However, primary cilia in SEPT9-depleted cells were shorter than in control cells ($1.69 \pm 0.52 \mu\text{m}$ versus $3.0 \pm 0.78 \mu\text{m}$ in controls; Fig. 6D), similar to SEPT7-siRNA-treated cells (Fig. 6D). These results indicate that the SEPT2/SEPT7/SEPT9 complex plays a role in ciliogenesis, and that SEPT9 is required to form long cilia.

The septin binding partner MAP4 localizes to the primary cilium and controls cilium length

To investigate the role of septins in controlling ciliogenesis and the length of the cilia, we focused on the possible role of MAP4 because it has been shown to regulate microtubule–septin interactions and function (Kremer et al., 2005; Spiliotis et al., 2008). MAP4 is a ubiquitously expressed MAP of the

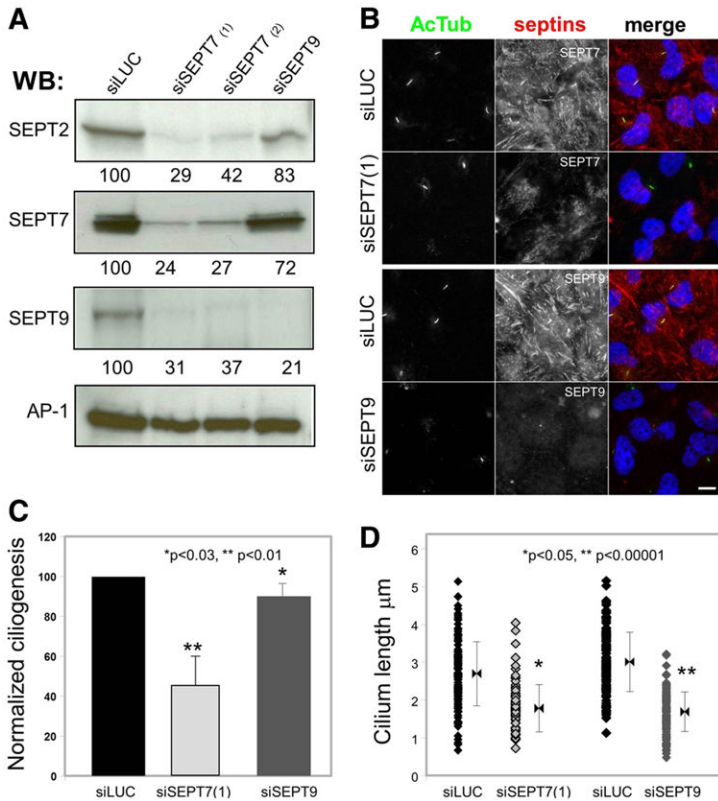


Fig. 6. Septins are required for ciliogenesis, and control cilium length. (A) RPE1 cells were treated with a control luciferase-targeting siRNA (siLUC), two different SEPT7-specific siRNA [siSEPT7(1) and siSEPT7(2)] or a SEPT9-specific siRNA (siSEPT9) were analyzed by western blotting using antibodies against the indicated septins and the γ -adaptn subunit of the AP-1 complex as a control. A quantification of the signal is shown below each panel. (B) RPE1 cells treated with siSEPT7(1), SEPT9 or luciferase targeting siRNA were analyzed by immunofluorescence using antibodies against SEPT7 or SEPT9 (red) and acetylated-tubulin (AcTub; green). (C) The ability of siRNA-treated cells to form primary cilia was analyzed by immunofluorescence from images obtained as in B. Results were quantified (i.e. cells with a single rod-like AcTub-positive structure), normalized to control cells in each experiment and expressed as normalized ciliogenesis. Statistical analysis was performed with the Student's *t*-test. (D) The length of cilia in siRNA-treated cells was measured ($n=50$) and the length distribution is shown. Results are from three independent experiments. Statistical analysis was performed with the Fischer test. Scale bar: 5 μ m.

MAP2/TAU family that increases the assembly and stability of cytoplasmic microtubules (reviewed by Holmfeldt et al., 2009). However, neither the localization of MAP4 in primary cilia nor its functions in ciliogenesis have been examined.

Endogenous MAP4 colocalized with AcTub in the primary cilia of RPE1 cells fixed in either methanol (Fig. 7A), which allowed co-staining of MAP4 and cytoplasmic microtubules, or paraformaldehyde (Fig. 7B). Similar results were obtained in human primary foreskin fibroblasts (supplementary material Fig. S6). We also examined the localization of a GFP fusion of a truncation mutant of MAP4, which encodes amino acid (aa) 800–1152 (GFP–MAP4m) and includes most of the proline-rich domain and the affinity domain (termed PRD and AD, respectively). This mutant has been used in functional studies where it was shown to bind and stabilize microtubules (Nguyen et al., 1997; Perez et al., 1999). GFP–MAP4m colocalized with AcTub in the primary cilia of all ciliated GFP–MAP4m-expressing cells (Fig. 7C). This result confirms observations made with the MAP4 antibody, and indicates that the C-terminal microtubule-binding domain of MAP4 (PRD and AD) contains a primary cilium-targeting domain. Additional localization analysis using myc-tagged deletion mutants of MAP4 confirmed that the PRD (aa 654–895) contains the primary cilium-targeting domain, therefore, indicating that this motif is present between aa 800 and 895 of MAP4 (supplementary material Fig. S7).

Localization of MAP4 at cilia *in vivo* was also investigated in the human retina, in a similar manner to that for SEPT2 (Fig. 2). Analyses of parallel sections by immunofluorescence double labeling of anti-MAP4 and centrin3 in human retinal sections also revealed colocalization of MAP4 and centrin3 (Fig. 7D) at the connecting cilium and the basal body. MAP4 was also present in the outer segment with a linear distribution, indicating its

localization along the axoneme (arrows). Together with results presented in Fig. 2A, these results show the expression of SEPT2 and MAP4 in the same subciliary compartments of retinal photoreceptor cells.

The role of MAP4 in ciliogenesis was investigated using an siRNA-based approach in RPE1 cells. Two previously characterized MAP4-targeting siRNA (Holmfeldt et al., 2007) were used in RPE1 cells, and their effects on MAP4 expression, ciliogenesis and cilium length were analyzed by immunofluorescence as described above for septins. The two siRNAs efficiently knocked down MAP4 expression with similar efficiencies (Fig. 8A). In general, ciliogenesis was only moderately affected in MAP4-depleted cells compared to control siRNA-treated cells {83.1 \pm 7.9% [siMAP4(1)] and 92.9 \pm 11.3% [siMAP4(2)] of control; Fig. 8B and C} although the primary cilia that formed in MAP4-depleted cells were \sim 1.1 μ m longer than in control cells {4.27 [siMAP4(1)] and 4.29 [MAP4(2)] versus 3.15 μ m for control, Fig. 8D}. Importantly, depletion of MAP4 did not affect the expression of septins (supplementary material Fig. S8) (see also Kremer et al., 2005). These results show that MAP4 is a component of the primary cilium, and that its presence may be required to limit the growth of the axoneme.

MAP4 competes with septins at the axoneme

It was described previously that MAP4 negatively regulates interaction of septins with microtubules (Kremer et al., 2005; Spiliotis et al., 2008). In addition, MAP4 is present at the axoneme of human primary fibroblasts (supplementary material Fig. S6) where SEPT2/7/9 could not be detected (data not shown), indicating that localization of MAP4 at cilia does not depend on septins. We next investigated the role of MAP4 in the localization of septins at the axoneme.

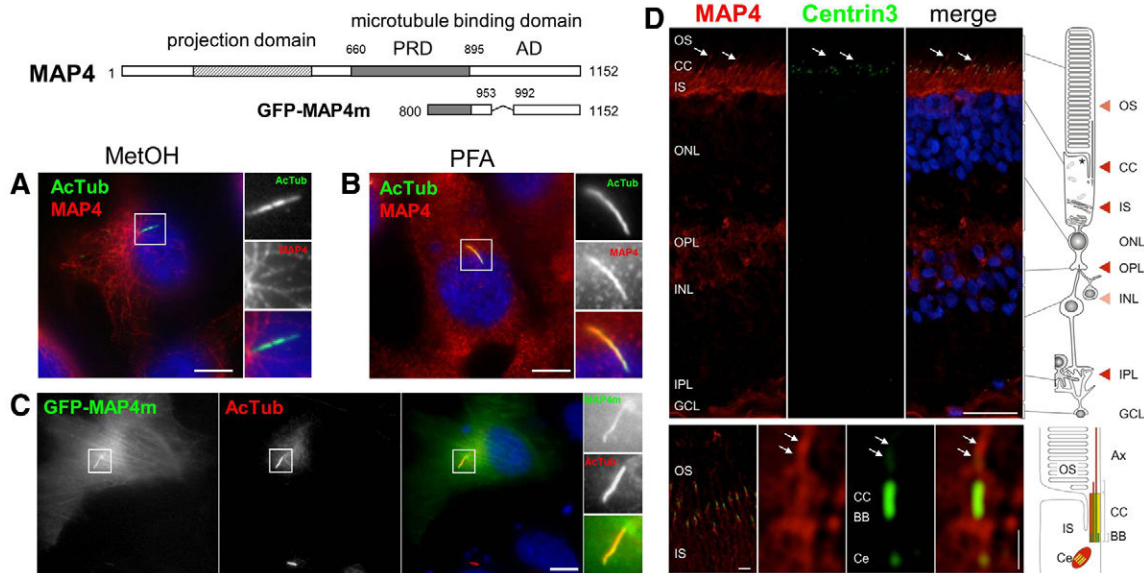


Fig. 7. MAP4 localizes to the primary cilium in RPE1 cells. Schematic representation of MAP4 showing its functional domains and the region encoded by the GFP-MAP4m fusion. PRD, proline-rich domain; AD, affinity domain. (A,B) RPE1 cells were grown on coverslips, serum-starved for 48 hours and then fixed with methanol (MetOH; A) or paraformaldehyde (PFA; B) then processed for immunofluorescence using anti-acetylated tubulin (AcTub, green) and anti-MAP4 (red) antibodies, and DAPI (blue) to stain nuclei. (C) RPE1 cells were transiently transfected with the GFP-MAP4m encoding plasmid, fixed and processed for immunofluorescence using an antibody against acetylated-tubulin (red) and DAPI (blue) to stain nuclei. Panels on the right are enlarged views of representative cilia (boxed in the main images). Scale bars: 5 μ m (A–C). (D) Indirect immunofluorescence staining of MAP4 (red), centrin3 (green), used as marker for the connecting cilium (CC), basal body and the adjacent centriole (Ce), and the nuclei were stained with DAPI (blue). In the human retina MAP4 is localized in the outer segment (OS) and in the inner segment (IS) of the outer plexiform layer (OPL). Bottom panel shows high magnification indirect immunofluorescence of MAP4 (red) and centrin3 (green) in longitudinal cryosections through human photoreceptor cells. Merged images reveal partial colocalization of MAP4 with centrin3 at the centriole, the basal body (BB) and along the connecting cilium and axoneme (white arrows). Scale bars: top, 25 μ m; bottom, 1 μ m.

The localization of septins at cilia was analyzed in RPE1 cells treated with siMAP4(1), in conditions in which most of the cells (>90%) showed effective knockdown of *MAP4* expression (i.e.

similarly to conditions shown in Fig. 8). The proportion of cilia (AcTub) that stained for SEPT7 was quantified and compared to control siLUC-treated cells. As shown in Fig. 9A, SEPT7

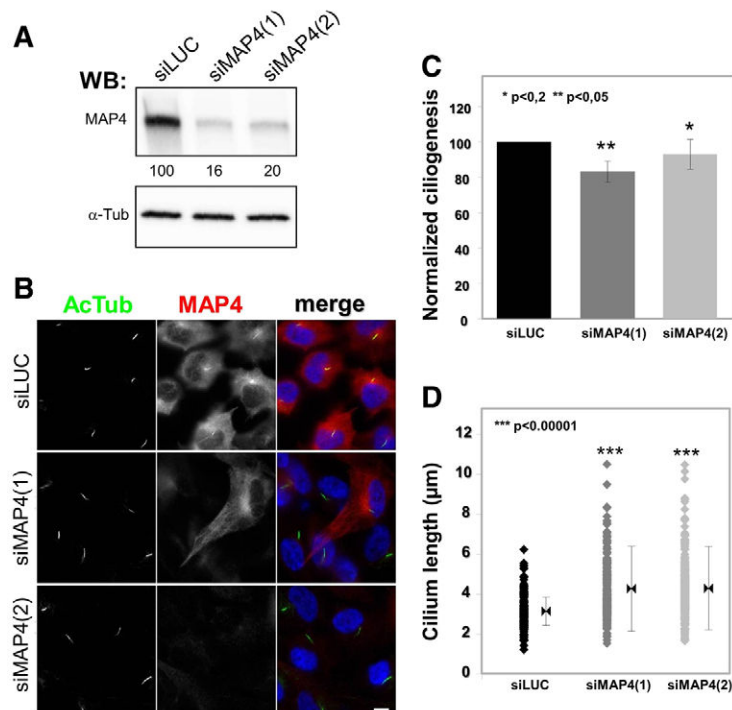


Fig. 8. MAP4 negatively regulates cilium length. (A–D) RPE1 cells were treated with two different MAP4-specific siRNAs [siMAP4(1) and siMAP4(2)] or luciferase targeting siRNA (siLUC) as a control. Expression of MAP4 was analyzed by western blotting (A), using antibodies against MAP4 and α -tubulin (α -tub) as a control, and by immunofluorescence (B), using antibodies against acetylated tubulin (AcTub; green) and MAP4 (red). (C) The ability of siRNA-treated cells to form cilia was analyzed by immunofluorescence from images obtained as in B. (D) The effects of MAP4 siRNA on ciliogenesis were quantified as in Fig. 6 and expressed as normalized ciliogenesis. Statistical analysis was performed with the Student's *t*-test. (E) The length of the cilia of siRNA-treated cells was measured as in Fig. 6 ($n=50$). Statistical analysis was performed with the Fischer test. Scale bar: 5 μ m.

colocalized with AcTub in long cilia present in MAP4-depleted cells in a proportion similar to that for control cells (84.0 versus 71.6%, respectively). These data indicate that MAP4 is not required for the recruitment of septins to the axoneme of cilia.

Overexpression of MAP4 results in the mislocalization of septins from stable cytoplasmic microtubules (Kremer et al., 2005; Spiliotis et al., 2008). To test whether a similar competition could occur at the axoneme, which is also composed of stabilized microtubules, the distribution of septins at cilia was analyzed in ciliated cells expressing GFP–MAP4m (see Fig. 7) or SSTR3–GFP as a control. As expected, SEPT7 (Fig. 9B), as well as SEPT2 and SEPT9 (data not shown), did not colocalize with AcTub in most GFP–MAP4m-positive cilia (Fig. 9B, arrows). In contrast, septins were present in all SSTR3–GFP-positive control long cilia. These results support a general role of MAP4 as a negative regulator of septin functions at stabilized microtubules.

Discussion

The above results show that a SEPT2/SEPT7/SEPT9 complex is present along the axoneme of the primary cilium of RPE cells where it appears to function as a positive regulator of ciliogenesis. We identified MAP4 along the axoneme of the primary cilium where it appears to function as a negative regulator of ciliary length. Therefore, MAP4 and septins appear to function antagonistically to control ciliogenesis and the length of the primary cilium.

Our proteomic analysis revealed a complex of SEPT2/SEPT7/SEPT9 in a ~1:1:1 stoichiometry in RPE1 cells, and all three of these septin isoforms had overlapping distributions in the cytoplasm of RPE1 cells, and prominently at the axoneme of the primary cilium of quiescent RPE1 cells (Figs 1, 3, 4). Similar overlapping distributions of SEPT2/SEPT7/SEPT9 were observed in ARPE19 cells, another RPE cell line (supplementary material Fig. S1). A previous study showed that SEPT2 localized to the base of the primary cilium of quiescent IMCD3 kidney cells (Hu et al., 2010), but that it also formed puncta along the axoneme in a

minority of these cells (Hu et al., 2010). Interestingly, a recent proteomic study revealed that SEPT2, SEPT7 and SEPT9 are present in IMCD3 cilia (Ishikawa et al., 2012).

Several other proteomic studies showed the presence of septins in the multiple primary cilia of choroid plexus epithelial cells (swine), in mouse photoreceptor connecting cilia and cilia of olfactory neurons from rat (Narita et al., 2012; Liu et al., 2007; Mayer et al., 2009). Finally our results show that septins are present within the axoneme of cilia in human tissues including connecting cilia of photoreceptors, primary cilia of kidney epithelial cells and motile cilia of the lung (Fig. 2). Taken together, these results demonstrate that septins are general components of cilia in vertebrates, but have distinct distributions, and possibly functions, in different tissues and cell types.

SEPT2, SEPT7 and SEPT9 were found at the axoneme of human RPE cells but not in human primary fibroblasts (data not shown). The molecular basis for different distributions of the same septins in the primary cilium of different cell types is unclear. However, it is interesting to note that SEPT7 and SEPT9 colocalized with AcTub in the primary cilium of the two RPE cell lines but were absent from cytoplasmic microtubules in RPE1 cells (Fig. 4; supplementary material Fig. S1); in contrast, SEPT7 and SEPT9 colocalized with AcTub microtubules in the cytoplasm, mitotic spindle and mid-body of ARPE19 cells (supplementary material Fig. S1B,C,E). These results indicate that the mechanisms controlling localization of septin to cytoplasmic microtubules and the axoneme are probably different, and that further studies are required to understand the underlying mechanisms.

We used FRAP and live-cell imaging to investigate whether SEPT2 and SEPT9 moved dynamically in the primary cilium. Our results showed that there was no exchange between the axonemal and cytoplasmic pools of septins nor movement of septins along the axoneme, indicating that septins are not a component of IFT (Fig. 5; supplementary material Fig. S5).

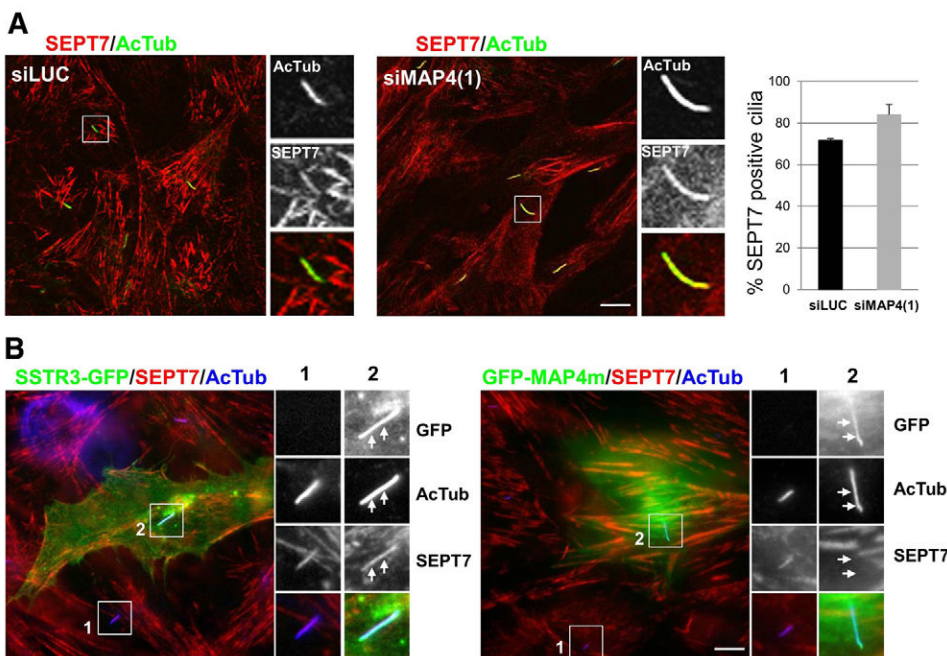


Fig. 9. MAP4 competes with septins at the axoneme. (A) RPE1 cells treated with siMAP4(1) or luciferase targeting siRNA (siLUC) as a control (as in Fig. 8) were stained with antibodies against acetylated tubulin (AcTub, green) and SEPT7 (red). Panels on the right are enlarged views of representative cilia (boxed in the main images). The proportion of SEPT7-positive cilia was quantified in both conditions from three independent experiments ($n=30$ in each experiment, $P>0.1$). (B) RPE1 cells were transiently transfected with SSTR3-GFP or GFP-MAP4m plasmids, fixed and processed for immunofluorescence with antibodies for SEPT7 (red) and acetylated tubulin (AcTub; blue), and the nuclei were stained with DAPI (blue). Panels on the right are enlarged views of representative cilia (boxed in the main images). White arrows indicate the position of cilia. Scale bars: 5 μ m.

These data indicate differences in the dynamic properties of cytoplasmic and ciliary septins. They also support previous observations indicating that, with the exception of IFT components and signaling molecules, the ciliary membrane and axonemal compartments have low or very limited exchange with the rest of the cell. Finally, FRAP was also used to investigate the dynamics of the SSTR3–GFP, a well-characterized ciliary membrane protein, in cilia of RPE1 cells. Our results indicate that SSTR3–GFP dynamics are similar in the cilia of RPE-1 and IMCD3 cells (Hu et al., 2010; Chih et al., 2012), with low if any recovery after photobleaching of the whole cilium (supplementary material Fig. S9A,A'). In addition, SSTR3–GFP can also diffuse within the ciliary membrane (supplementary material Fig. S9B,B'). Thus the presence of septins along the axoneme does not appear to prevent the movement of membrane proteins in the ciliary membrane.

To investigate the functions of septins in RPE1 cilia, we depleted septins using a siRNA-based approach. As previously described (Kremer et al., 2005; Tooley et al., 2009; Sellin et al., 2011), efficient knockdown of *SEPT7* resulted in the concomitant loss of the other two members of the complex, *SEPT2* and *SEPT9*. Under these conditions, ciliogenesis was inhibited in ~50% of cells, and the primary cilia in the remaining ~50% of cells were significantly shorter than in the control. siRNA-targeted depletion of *SEPT9* affected *SEPT9* levels but not those of *SEPT2* or *SEPT7* (see also Tooley et al., 2009; Estey et al., 2010; Sellin et al., 2011), and resulted in little or no effect on ciliogenesis, although the primary cilia were shorter. These results indicate that the *SEPT2/SEPT7/SEPT9* complex is required for ciliogenesis in RPE1 cells, as shown previously for *SEPT2* in IMCD3 cells (Hu et al., 2010; Chih et al., 2012), and that *SEPT9* is specifically required for the proper elongation of cilia. The importance of *SEPT9* is in agreement with recent data showing that *SEPT9* plays a crucial role in the elongation of septin filaments because of its terminal position within septins oligomers (Kim et al., 2011). In conclusion, the assembly of septin filaments plays a crucial role in the elongation of the primary cilium in RPE1 cells.

To further investigate the role of septins in the primary cilium, we examined MAP4, which regulates the functions of septins with cytoplasmic microtubules (Kremer et al., 2005; Spiliotis et al., 2008). MAP4 colocalized with AcTub along the axoneme of the primary cilium in RPE1 cells (Fig. 7), and in human primary fibroblasts (supplementary material Fig. S6). MAP4 is a well-established positive regulator of microtubule polymerization, and MAP4 depletion results in an increase in the pool of free tubulin, whereas overexpression of wild-type or mutant forms of MAP4 containing the microtubule-binding domain (including MAP4m) stabilizes microtubules and increases the proportion of polymerized tubulin (Nguyen et al., 1997; Nguyen et al., 1999; Holmfeldt et al., 2002; Holmfeldt et al., 2007). Interestingly, moderate treatment with nocodazole, which depolymerizes microtubules and increases the amount of free tubulin, results in longer cilia (Sharma et al., 2011), similar to what we observed when we depleted MAP4 in RPE1 cells (Fig. 8). As expected, treatment of MAP4-depleted RPE1 cells with moderate concentration of taxol, which stabilizes microtubules and decrease ciliary length (Sharma et al., 2011), reversed the effect of MAP4 depletion and resulted in shorter MAP4-depleted cilia (supplementary material Fig. S10). Part of the effect of MAP4 depletion on ciliary length could be

interpreted as an indirect effect on the assembly of cytoplasmic microtubules and regulation of free tubulin pool. However, the presence of MAP4 within cilia (Fig. 7; supplementary material Fig. S6) indicates that MAP4 may also directly regulate the polymerization dynamics of axonemal microtubules.

Our results show that MAP4 is not required for the localization of septins to the cilium of RPE1 cells (Fig. 9A). Significantly, MAP4 was present in primary cilia in which the levels of *SEPT2/7/9* were very low, such as human primary fibroblasts (supplementary material Fig. S6, and data not shown), indicating that MAP4 might compete with and/or displace septins from axonemal microtubules. Indeed, studies *in vitro* and *in vivo* have shown that MAP4 and septins compete for microtubule binding (Kremer et al., 2005; Spiliotis et al., 2008). Therefore, we speculate that in the primary cilium, MAP4 controls the accessibility of septins to the axoneme thereby negatively regulating ciliary elongation, an effect counteracted by septins in cell types such as RPE cells. In agreement with this hypothesis, septins were absent from cilia in cells expressing the MAP4m mutant (Fig. 9B).

The molecular basis for a cell-type-specific effect of MAP4 on the accessibility of septins to the axoneme remains to be determined. Regulation of MAP4 functions through alternative splicing (Chapin et al., 1995) and/or phosphorylation by MARK [MAP/microtubule affinity-regulating kinase (Drewes et al., 1997)] are two possibilities that should be investigated in the future. Interestingly, recent data obtained by G. Pereira's group (Kuhns et al., 2013) indicate that MARK4, a kinase known to phosphorylate MAP4 (Trinczek et al., 2004), is present at the basal body where it positively regulates ciliogenesis in a kinase-activity-dependent process.

In conclusion, our study reveals that septins and MAP4 probably play antagonistic roles in controlling axonemal microtubule organization and growth, similar to their functions with cytoplasmic microtubules. In addition, septins have different distributions within the primary cilium of different cell types indicating different functions and mechanisms of regulation.

Materials and Methods

Plasmids, antibodies and reagents

The Septin9_v1–tomato-encoding plasmid was described previously (Mostowy et al., 2010). The SSTR3–GFP-encoding plasmid was a generous gift from K. Mykytyn [Ohio State University (Berbari et al., 2008)]. The MAP4m–GFP-encoding plasmid was provided by F. Perez [Curie Institute (Perez et al., 1999)]. Mouse *SEPT2* was subcloned from *SEPT2*–YFP to generate *SEPT2*–S-tag–GFP containing a TEV site between the S-tag and GFP, using Gateway subcloning (Invitrogen); RFP-pericentrin PACT domain (PeriCTRFP) was a gift from Sean Munro (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK) (for details, see Hu et al., 2010). Mouse monoclonal antibodies against acetylated tubulin (clone 6-11B-1) and γ -tubulin (GTU-88) were from Sigma. Rabbit polyclonal antibody against MAP4 (sc-67152) and goat polyclonal against NPHP1 (sc-20204) were from Santa Cruz Biotechnologies. Rabbit polyclonal antibodies against *SEPT2*, *SEPT7* and *SEPT9* were described previously (Mostowy et al., 2009; Mostowy et al., 2010; Hu et al., 2010), or obtained from Sigma (*SEPT7*; HPA 029524). Monoclonal antibodies against mouse centrin3 were previously characterized and are frequently used as molecular markers of ciliary sub-compartments (Trojan et al., 2008). Alexa-Fluor-conjugated secondary antibodies (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546 and Alexa Fluor 647) and Alexa-Fluor-546-conjugated phalloidin were purchased from Life Technologies (Molecular Probes). Cytochalasin D, blebbistatin, Forchlorfenuron, taxol and nocodazole were purchased from Sigma.

Cells

RPE1 cells, a human retinal pigment epithelial cell line that stably expresses human telomerase reverse transcriptase (hTERT-RPE1; Clontech Laboratories, Inc.), and ARPE19 cells, a spontaneously arising human retinal pigment epithelial cell line, were kind gifts from M. Bornens (Institut Curie, Paris, France) and Y. Courtois (Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France). Human inner foreskin fibroblasts (hFF) were a kind gift from Y. Ganor (Institut Cochin, Paris). RPE cells

were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-F12 (1:1) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Life Technologies) for RPE1 cells, and in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Life technologies) for hFF. To induce ciliogenesis, cells were grown to confluency on glass coverslips in basic cell culture conditions and then transferred into low serum (0.5% FBS) medium for an additional 24 or 48 hours, as described previously (Molla-Herman et al., 2010).

Transfections

Transfections of plasmids were performed following the recommended procedure for the FuGENE HD (Roche) transfection reagent. Subconfluent RPE1 cells grown on glass coverslips or on μ -slides (Ibidi) were transfected and immediately transferred to low serum conditions for 24 or 48 hours.

For knockdown experiments, RPE1 cells were treated with control siRNA [luciferase (*Luc*): 5'-GCCATTCTATCCTCTAGAGGATG-3'] or with siRNA targeting *SEPT7* [SEPT7(1): 5'-GTCGACATTAATCAACTCA-3'; SEPT7(2): 5'-GGCAGTATCCTTGGGGTGT-3' (Kremer et al., 2005)], *SEPT9* [SEPT9: ID no. 18228 from Ambion (Mostowy et al., 2009; Mostowy et al., 2010)] or *MAP4* [MAP4(1): 5'-CTGGCCAGAAGATACCAAC-3'; MAP4(2): 5'-GATAGTCCC-AGCCAAGGAT-3' (Holmfeldt et al., 2007)]. The siRNA duplexes, with the exception of SEPT9, were obtained from Eurogentec. Briefly, siRNA duplexes were transfected using Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (Life technologies) according to the manufacturer's instructions as described previously (Molla-Herman et al., 2010). RPE1 cells plated at 30% confluency (cells per well) were transfected on the first day with siRNA (50 nM) and then grown in basic conditions. Transfected cells were transferred to low serum media (0 or 0.5% serum) to induce ciliogenesis on the third or fourth day, as indicated, and then processed for immunofluorescence or biochemistry.

Immunofluorescence

Cells grown on glass coverslips were washed twice in PBS and fixed in methanol at -20°C for 4 minutes, or in 4% paraformaldehyde for 20 minutes at 4°C . Fixed cells were incubated with primary antibodies in PBS containing 0.1% Triton X-100 (Sigma) and 1 mg/ml BSA (Sigma) for 45 minutes at room temperature. After two washes with PBS-BSA, cells were incubated for 30 minutes at room temperature in PBS-BSA containing secondary antibodies. After one wash with PBS-BSA and two washes in PBS, coverslips were mounted on microscope slides in a PBS-glycerol mix (50/50) using the SlowFade Light Antifade Kit containing DAPI from Molecular Probes (S36938, Life Technologies). Samples were examined with an epi-illumination microscope (DMI 6000, Leica) with a cooled charge-coupled device (CCD) camera (MicroMax, Princeton Instruments). Images were acquired with MetaMorph (Molecular Devices) and processed with MetaMorph and Photoshop CS2 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA).

Immunohistochemistry

Mature human kidney and 33-week-old fetal lung were embedded in OCT compound. Frozen sections, 8 μm -thick, were fixed in acetone for 10 minutes, treated with PBS containing 0.1% Tween 20, 3% BSA and 10% donkey serum for 1 hour and incubated in the same buffer overnight at 4°C with appropriate antibodies. Hoechst (no. 33342, Sigma) was used to label the nuclei and slides were mounted with FLUOPREP (BioMerieux sa, Marcy L'Etoile, France). Light microscopy analyses of immunofluorescence samples were performed with an Epi-illumination microscope (DMI 6000, Leica Microsystems).

Eyes of a human adult donor [69-year-old female donor (hum252), 11.5 hours post-mortem] were cryofixed in melting isopentane and cryosectioned as described elsewhere (Wolfrum, 1992). Cryosections were placed on coverslips precoated with poly-L-lysine, and incubated with in PBS containing 0.01% Tween 20 for 20 minutes. After a PBS washing step, sections were covered with blocking solution (PBS containing 0.5% cold-water fish gelatin, 0.1% ovalbumin) and incubated for a minimum of 30 minutes followed by an overnight incubation with primary antibodies diluted in blocking solution at 4°C . Washed cryosections were incubated with secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 568 (Invitrogen) in PBS with DAPI (Sigma-Aldrich) for 1.5 hours at room temperature in the dark. After repeated washing with PBS, sections were mounted in Mowiol 4.88 (Hoechst). Light microscopy analyses of immunofluorescence samples were performed with a Leica DM6000 microscope (Leica microsystems).

Human eyes were obtained from the Dept. of Ophthalmology (Mainz, Germany) and kidney and lung samples from the Necker-Enfants Malades Hospital (Paris, France). Guidelines of the Declaration of Helsinki were followed.

Live-cell imaging and FRAP

Dynamics of SSTR3, SEPT2 and SEPT9 in the primary cilium were analyzed by live-cell fluorescence microscopy. RPE1 cells grown on μ -slides (Ibidi) were transfected with SSTR3-GFP- and/or SEPT9-tomato- or SEPT2-GFP and pericentrin-RFP-encoding plasmids in low serum media and analyzed 24 or 48 hours later. Live-cell fluorescence microscopy was performed using an Apo 100 \times NA 1.43 microscope objective and an inverted epi-illumination microscope (Axiovert 100 M, Zeiss) placed within a temperature-controlled enclosure set at 37°C . Images corresponding to GFP

and tomato fluorescence were acquired successively every 3 seconds for 3–20 minutes. Shutters, filters, camera and acquisition were controlled by MetaMorph. The final movies and images were generated using ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) and Photoshop. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) studies were performed with a laser scanning confocal microscope (TCS SP2 AOBs, Leica) after excitation with a 488-nm laser line from an argon laser, as described previously (Molla-Herman et al., 2010). Briefly, regions containing the primary cilium or another area of the same cells were exposed to two consecutive laser pulses of 1 second with 100% of the laser intensity, and recovery of fluorescence was analyzed for the indicated periods. Images were then analyzed using ImageJ to quantify normalized fluorescence in the selected zones. The fluorescence intensity at the photo-bleached regions was measured using ImageJ and the percentage of recovery was calculated as follows. In the first case, the whole cilium was photobleached and in the second case, only one half of the cilium was photobleached. The final images were generated using ImageJ and Photoshop (Adobe Systems Inc.).

Immunoprecipitation and immunoblotting

RPE cells were grown in the presence or absence of serum, extracted in buffer containing 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 140 mM KCl, 5 mM EGTA, 1 mM DTT, 2 mM Pefabloc, and 0.5% Triton X-100, and centrifuged at 20,000 *g*. SEPT2-S-tag-GFP was immunoprecipitated from the resulting supernatant with a GFP antibody and protein-A-Sepharose 4B beads. The resulting immunoprecipitated proteins were treated with TEV protease, and processed for a second round of isolation with S-beads (Millipore). Following elution from the S-beads, proteins co-isolated with SEPT2 were separated by 10% SDS-PAGE and silver staining. Proteins were transferred onto Immobilon P membranes (Millipore), and incubated overnight at 4°C in blocking buffer (10 mM Tris-HCl, pH 6.8, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1% Tween 20, 2% BSA). SEPT9_v1, SEPT7 and SEPT2 antibodies were diluted in blocking buffer and incubated with the membrane for 2 hours. Blots were subsequently incubated with secondary Alexa-Fluor-680- and IRDye800-conjugated antibodies and scanned in a Li-COR infrared imager.

For immunoblotting, cells were lysed in lysis buffer [0.02 M Tris-HCl pH 7.5, 1% NP40, 0.1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10% glycerol, 10 mM protease inhibitor cocktail (Sigma)] for 30 minutes at 4°C . After centrifugation, cleared lysates were separated by SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene fluoride transfer membranes (PVDF, GE Healthcare) using the NuPage electrophoresis system (Life technologies). Immunoblotting was performed using the indicated primary antibodies and revealed using the ECL⁺ Detection Kit (GE Healthcare).

Statistical analysis

The percentage of ciliated cells and the length of primary cilium were quantified and measured using fluorescence microscope images and ImageJ. To determine the percentage of ciliated cells, we counted the number of nuclei (DAPI staining) in each image and the number of primary cilia detected by the AcTub staining. The percentage of ciliated cells was equal to (number of cilia/number of nuclei) \times 100. Cilia were measured with the analyze-measure option of ImageJ. All the results were then transferred to Excel. Student's *t*-tests and Fischer's tests were used for the percentage of ciliated cells and cilium length, respectively.

Acknowledgements

The authors thank all their generous collaborators for providing important reagents; Anthony Henneveu for his help with immunofluorescence and transfections; Flora Legendre for her help with immunohistochemistry; people from the 'Imagerie Cellulaire' facility of the Cochin Institute for their help; G. Pereira for sharing important new results; and A. Touré and N. Spassky for stimulating discussions.

Author contributions

R.G., Q.H., M.F., M.C.R. and B.S. performed and analyzed the experiments; S.M., U.W., S.S. and P.C. provided reagents, tissues samples, expertise and designed and analyzed some of the experiments; R.G., Q.H., W.J.N. and A.B. designed most of the experiments; W.J.N. and A.B. analyzed all the experiments; R.G., W.J.N. and A.B. wrote the manuscript; all the coauthors corrected the manuscript.

Funding

This work was supported by the National Institutes of Health [grant number GM35527 to W.J.N.]; a Department of Defense Breast Cancer Research Program Predoctoral Fellowship [grant number BC083077 to Q.H.]; Agence National de la Recherche [grant number R09087KS to A.B. and S.S.]; the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur [R.G.]; Région ile de France,

Cardiovasculaire Obésité-Rein-Diabète les domaines d'intérêt majeur (CORDDIM) [M.F.]; a Wellcome Trust Research Career Development Fellowship [grant number WT097411MA to S.M.]; a European Research Council Advanced Grant Award [grant number 233348 to S.M.]; and 'SYSCILIA' European Community's Seventh Framework Programme FP7/2009 [grant agreement number 241955 to U.W.]. Deposited in PMC for release after 6 months.

Supplementary material available online at

<http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.111377/-DC1>

References

- Berbari, N. F., Johnson, A. D., Lewis, J. S., Askwith, C. C. and Mykityn, K. (2008). Identification of ciliary localization sequences within the third intracellular loop of G protein-coupled receptors. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1540-1547.
- Bershteyn, M., Atwood, S. X., Woo, W.-M., Li, M. and Oro, A. E. (2010). MIM and cortactin antagonism regulates ciliogenesis and hedgehog signaling. *Dev. Cell* **19**, 270-283.
- Chapin, S. J., Lue, C. M., Yu, M. T. and Bulinski, J. C. (1995). Differential expression of alternatively spliced forms of MAP4: a repertoire of structurally different microtubule-binding domains. *Biochemistry* **34**, 2289-2301.
- 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.
- Drewes, G., Ebnet, A., Preuss, U., Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* **89**, 297-308.
- Estey, M. P., Di Ciano-Oliveira, C., Froese, C. D., Bejide, M. T. and Trimble, W. S. (2010). Distinct roles of septins in cytokinesis: SEPT9 mediates midbody abscission. *J. Cell Biol.* **191**, 741-749.
- 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**, 219-233.
- García-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**, 776-784.
- Gilula, N. B. and Satir, P. (1972). The ciliary necklace. A ciliary membrane specialization. *J. Cell Biol.* **53**, 494-509.
- Händel, M., Schulz, S., Stanarius, A., Schreff, M., Erdtmann-Vourliotis, M., Schmidt, H., Wolf, G. and Höllt, V. (1999). Selective targeting of somatostatin receptor 3 to neuronal cilia. *Neuroscience* **89**, 909-926.
- Hildebrandt, F., Benzing, T. and Katsanis, N. (2011). Ciliopathies. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1533-1543.
- Holmfeldt, P., Brattsand, G. and Gullberg, M. (2002). MAP4 counteracts microtubule catastrophe promotion but not tubulin-sequestering activity in intact cells. *Curr. Biol.* **12**, 1034-1039.
- Holmfeldt, P., Stenmark, S. and Gullberg, M. (2007). Interphase-specific phosphorylation-mediated regulation of tubulin dimer partitioning in human cells. *Mol. Biol. Cell* **18**, 1909-1917.
- Holmfeldt, P., Sellin, M. E. and Gullberg, M. (2009). Predominant regulators of tubulin monomer-polymer partitioning and their implication for cell polarization. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 3263-3276.
- Hsu, S. C., Hazuka, C. D., Roth, R., Foletti, D. L., Heuser, J. and Scheller, R. H. (1998). Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron* **20**, 1111-1122.
- Hu, Q. and Nelson, W. J. (2011). Ciliary diffusion barrier: the gatekeeper for the primary cilium compartment. *Cytoskeleton (Hoboken)* **68**, 313-324.
- Hu, Q., Nelson, W. J. and Spiliotis, E. T. (2008). Forchlorfenuron alters mammalian septin assembly, organization, and dynamics. *J. Biol. Chem.* **283**, 29563-29571.
- 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**, 436-439.
- Ihara, M., Kinoshita, A., Yamada, S., Tanaka, H., Tanigaki, A., Kitano, A., Goto, M., Okubo, K., Nishiyama, H., Ogawa, O. et al. (2005). Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. *Dev. Cell* **8**, 343-352.
- Ishikawa, H. and Marshall, W. F. (2011). Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 222-234.
- Ishikawa, H., Thompson, J., Yates, J. R., 3rd and Marshall, W. F. (2012). Proteomic analysis of mammalian primary cilia. *Curr. Biol.* **22**, 414-419.
- Joo, E., Surka, M. C. and Trimble, W. S. (2007). Mammalian SEPT2 is required for scaffolding nonmuscle myosin II and its kinases. *Dev. Cell* **13**, 677-690.
- Kim, J., Lee, J. E., Heynen-Genel, S., Suyama, E., Ono, K., Lee, K., Icker, T., Aza-Blanc, P. and Gleeson, J. G. (2010a). Functional genomic screen for modulators of ciliogenesis and cilium length. *Nature* **464**, 1048-1051.
- Kim, S. K., Shindo, A., Park, T. J., Oh, E. C., Ghosh, S., Gray, R. S., Lewis, R. A., Johnson, C. A., Attie-Bittach, T., Katsanis, N. et al. (2010b). Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. *Science* **329**, 1337-1340.
- Kim, M. S., Froese, C. D., Estey, M. P. and Trimble, W. S. (2011). SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. *J. Cell Biol.* **195**, 815-826.
- Kinoshita, M., Field, C. M., Coughlin, M. L., Straight, A. F. and Mitchison, T. J. (2002). Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Dev. Cell* **3**, 791-802.
- Kissel, H., Georgescu, M.-M., Larisch, S., Manova, K., Hunnicutt, G. R. and Steller, H. (2005). The Sept4 septin locus is required for sperm terminal differentiation in mice. *Dev. Cell* **8**, 353-364.
- Kremer, B. E., Haystead, T. and Macara, I. G. (2005). Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAP4. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4648-4659.
- Kuhns, S., Schmidt, K. N., Reymann, J., Gilbert, D. F., Neuner, A., Hub, B., Carvalho, R., Wiedemann, P., Zentgraf, H., Erfle, H. et al. (2013). The microtubule affinity regulating kinase MARK4 promotes axoneme extension during early ciliogenesis. *J. Cell Biol.* **200**, 505-522.
- Liu, Q., Tan, G., Levenkova, N., Li, T., Pugh, E. N., Jr, Rux, J. J., Speicher, D. W. and Pierce, E. A. (2007). The proteome of the mouse photoreceptor sensory cilium complex. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1299-1317.
- Mayer, U., Küller, A., Daiber, P. C., Neudorf, I., Warnken, U., Schnölzer, M., Frings, S. and Möhrlein, F. (2009). The proteome of rat olfactory sensory cilia. *Proteomics* **9**, 322-334.
- Molla-Herman, A., Ghossoub, R., Blisnick, T., Meunier, A., Serres, C., Silbermann, F., Emmerson, C., Romeo, K., Bourdoncle, P., Schmitt, A. et al. (2010). The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *J. Cell Sci.* **123**, 1785-1795.
- Mostowy, S. and Cossart, P. (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 183-194.
- Mostowy, S., Nam, T., Danckaert, A., Guadagnini, S., Boisson-Dupuis, S., Pizarro-Cerdá, J. and Cossart, P. (2009). Septins regulate bacterial entry into host cells. *PLoS ONE* **4**, e4196.
- Mostowy, S., Bonazzi, M., Hamon, M. A., Nam, T. N., Mallet, A., Lelek, M., Gouin, E., Demangel, C., Brosch, R., Zimmer, C. et al. (2010). Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures. *Cell Host Microbe* **8**, 433-444.
- Narita, K., Kozuka-Hata, H., Nonami, Y., Ao-Kondo, H., Suzuki, T., Nakamura, H., Yamakawa, K., Oyama, M., Inoue, T. and Takeda, S. (2012). Proteomic analysis of multiple primary cilia reveals a novel mode of ciliary development in mammals. *Biol. Open* **1**, 815-825.
- Nguyen, H. L., Chari, S., Gruber, D., Lue, C. M., Chapin, S. J. and Bulinski, J. C. (1997). Overexpression of full- or partial-length MAP4 stabilizes microtubules and alters cell growth. *J. Cell Sci.* **110**, 281-294.
- Nguyen, H. L., Gruber, D. and Bulinski, J. C. (1999). Microtubule-associated protein 4 (MAP4) regulates assembly, protomer-polymer partitioning and synthesis of tubulin in cultured cells. *J. Cell Sci.* **112**, 1813-1824.
- Oegema, K., Savoian, M. S., Mitchison, T. J. and Field, C. M. (2000). Functional analysis of a human homologue of the Drosophila actin binding protein anillin suggests a role in cytokinesis. *J. Cell Biol.* **150**, 539-552.
- 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.
- Perez, F., Diamantopoulos, G. S., Stalder, R. and Kreis, T. E. (1999). CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell* **96**, 517-527.
- Pitaval, A., Tseng, Q., Bornens, M. and Théry, M. (2010). Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle-arrested cells. *J. Cell Biol.* **191**, 303-312.
- Saarikangas, J. and Barral, Y. (2011). The emerging functions of septins in metazoans. *EMBO Rep.* **12**, 1118-1126.
- Sellin, M. E., Sandblad, L., Stenmark, S. and Gullberg, M. (2011). Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. *Mol. Biol. Cell* **22**, 3152-3164.
- Sharma, N., Kosan, Z. A., Stallworth, J. E., Berbari, N. F. and Yoder, B. K. (2011). Soluble levels of cytosolic tubulin regulate ciliary length control. *Mol. Biol. Cell* **22**, 806-816.
- Spiliotis, E. T. (2010). Regulation of microtubule organization and functions by septin GTPases. *Cytoskeleton (Hoboken)* **67**, 339-345.
- Spiliotis, E. T., Hunt, S. J., Hu, Q., Kinoshita, M. and Nelson, W. J. (2008). Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules. *J. Cell Biol.* **180**, 295-303.
- 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.
- Tooley, A. J., Gilden, J., Jacobelli, J., Beemiller, P., Trimble, W. S., Kinoshita, M. and Krummel, M. F. (2009). Amoeboid T lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility. *Nat. Cell Biol.* **11**, 17-26.
- Trinczek, B., Brajenovic, M., Ebnet, A. and Drewes, G. (2004). MARK4 is a novel microtubule-associated proteins/microtubule affinity-regulating kinase that binds to the cellular microtubule network and to centrosomes. *J. Biol. Chem.* **279**, 5915-5923.
- Trojan, P., Krauss, N., Choe, H.-W., Giessl, A., Pulvermüller, A. and Wolfrum, U. (2008). Centriins in retinal photoreceptor cells: regulators in the connecting cilium. *Prog. Retin. Eye Res.* **27**, 237-259.
- Wolfrum, U. (1992). Cytoskeletal elements in arthropod sensilla and mammalian photoreceptors. *Biol. Cell* **76**, 373-381.

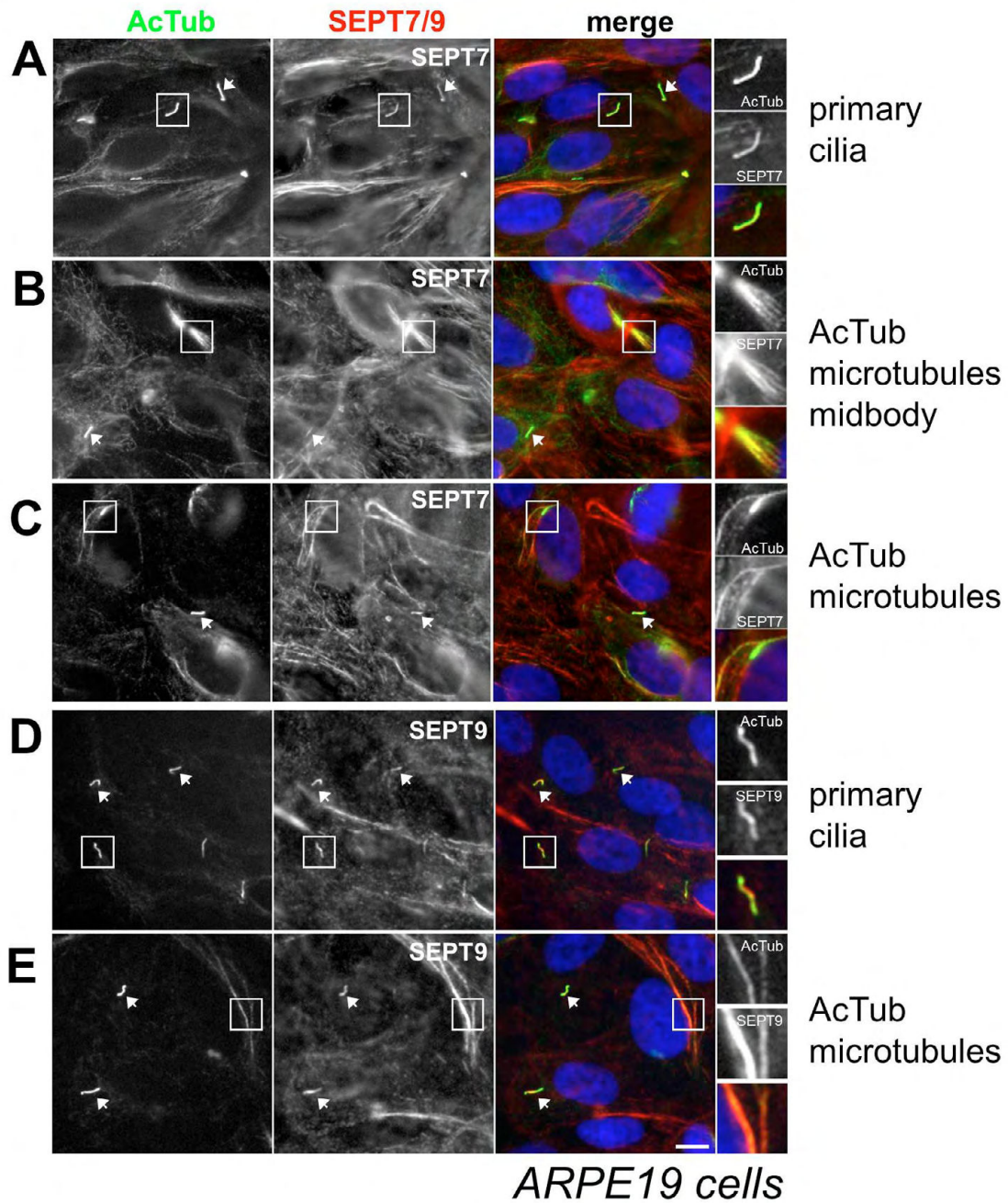


Fig. S1. Septins localize to the axoneme of the primary cilium in ARPE19 cells. ARPE19 cells were grown on coverslips to confluence were then transferred in low serum (1%) for 48 hours. After fixation in paraformaldehyde, cells were processed for immunofluorescence using anti-acetylated-tubulin (AcTub, green) and anti-SEPT7 or anti-SEPT9 antibodies (red), and DAPI (blue) to stain nuclei. Panels on the right represent enlarged views (white boxes) of representative cilia (**A,D**) or cytoplasmic AcTub positive microtubules (**B,C,E**). White arrows pointed to cilia in the same fields. Scale bar: 5 μ m.

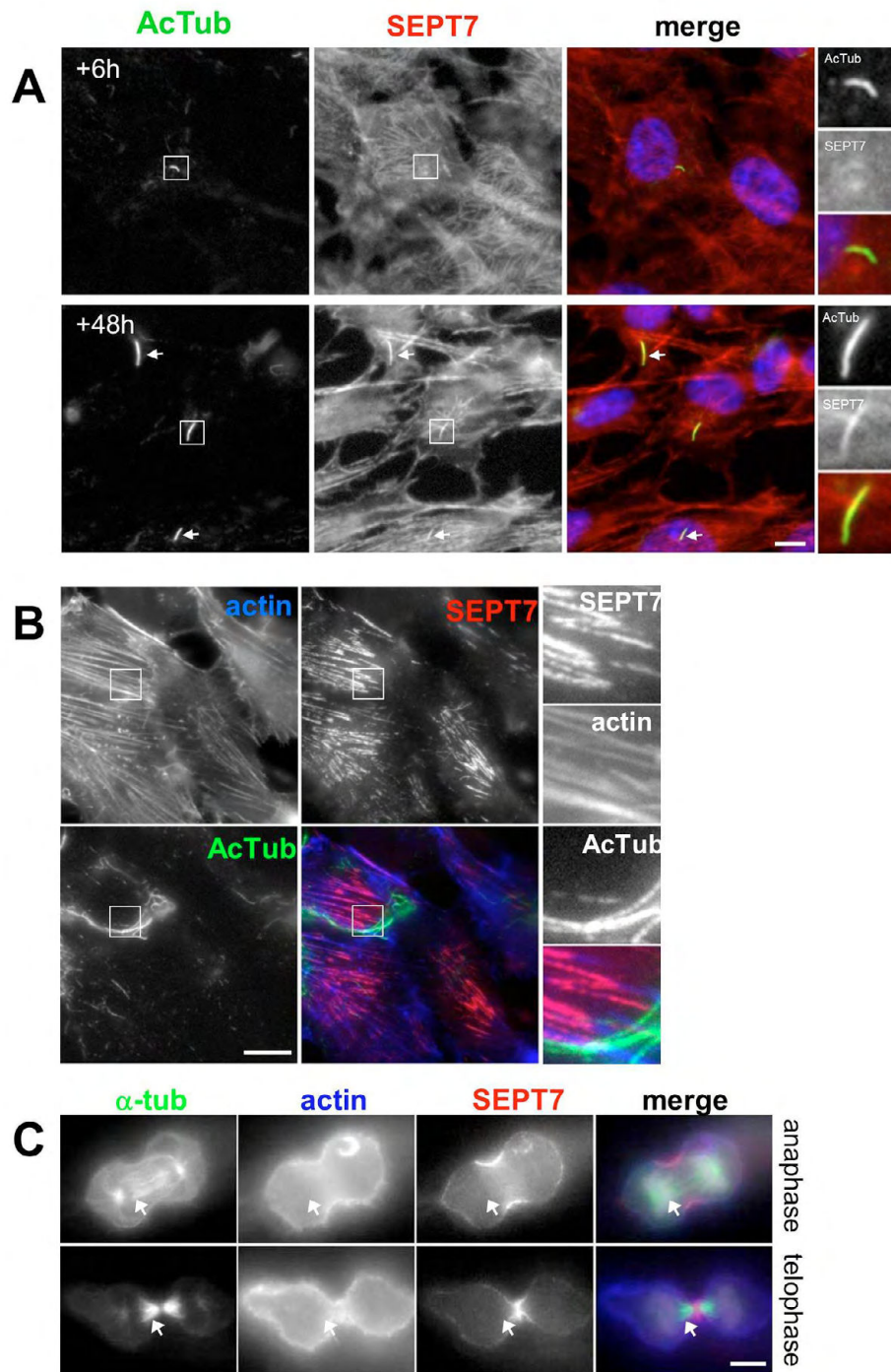


Fig. S2. SEPT7 localizes to the axoneme of long mature cilia and actin cytoskeleton in RPE1 cells. **(A)** RPE1 cells, serum-starved for 6 or 48 hours, were processed for immunofluorescence using antibodies against acetylated-tubulin (AcTub, green) and SEPT7 (red). Panels on the right represent enlarged views of representative cilia (white boxes), white arrows stress other cilia in the same field. **(B)** RPE1 cells grown on coverslips in the presence of serum, were fixed and processed for immunofluorescence using antibodies against acetylated-tubulin (AcTub, green; **B**) or α -tubulin to stain microtubules (α -Tub, green; **C**), and SEPT7 (red, **B** and **C**), as well as fluorescent phalloidin to observe F-actin (blue, **B** and **C**) and DAPI to stain the chromosomes (gray, **C**). **(B)** An interphasic cell is shown. **(C)** Different mitotic phases are shown; anaphase (top panel) and telophase (bottom panel). Scale bars: 5 μ m.

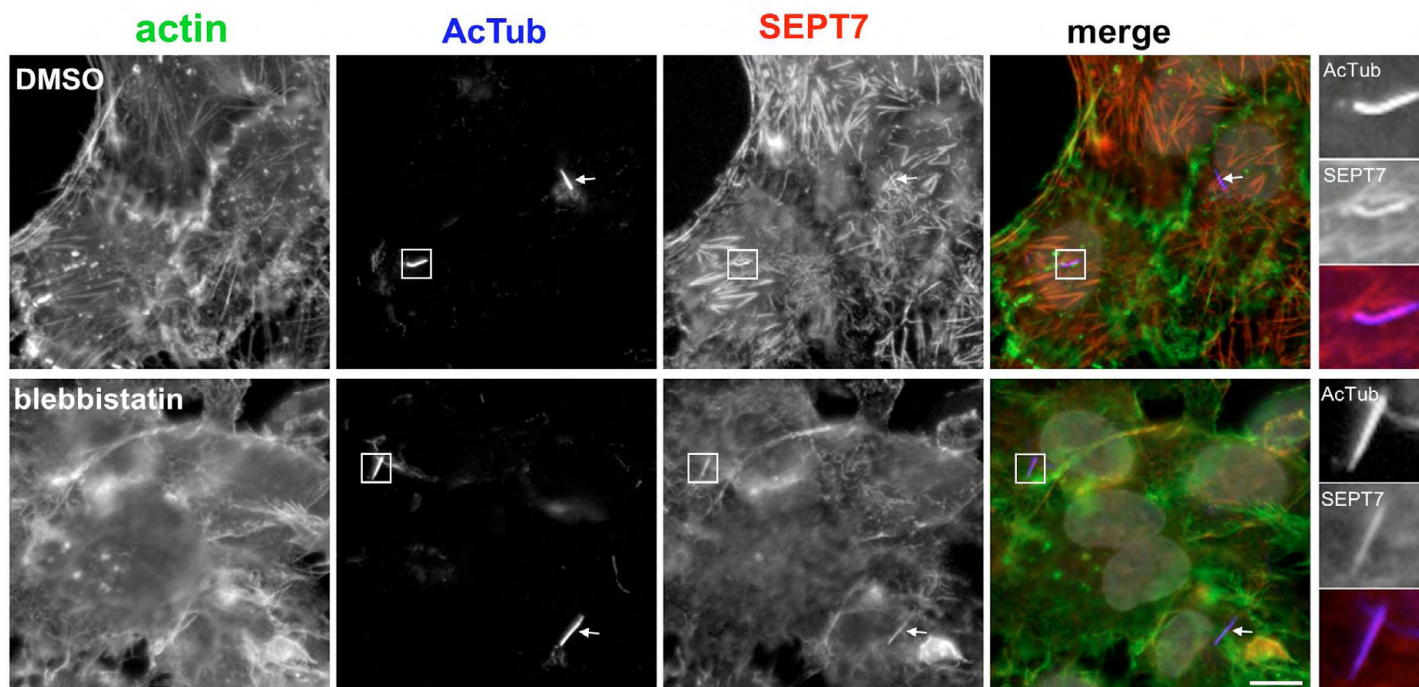


Fig. S3. Blebbistatin does not affect localization of SEPT7 to cilia. RPE1 cells were serum starved for 24h and then treated with 1 μ M of Blebbistatin or, as a control, with the same final concentration of DMSO for 60 minutes, then fixed and analyzed by immunofluorescence using antibodies against SEPT7 (red) and acetylated-tubulin (AcTub, blue), as well as with fluorescent phalloidin (green) to stain F-actin. Panels on the right represent enlarged views of representative cilia (white boxes). White arrows pointed to cilia in the same fields. Scale bar: 5 μ m.

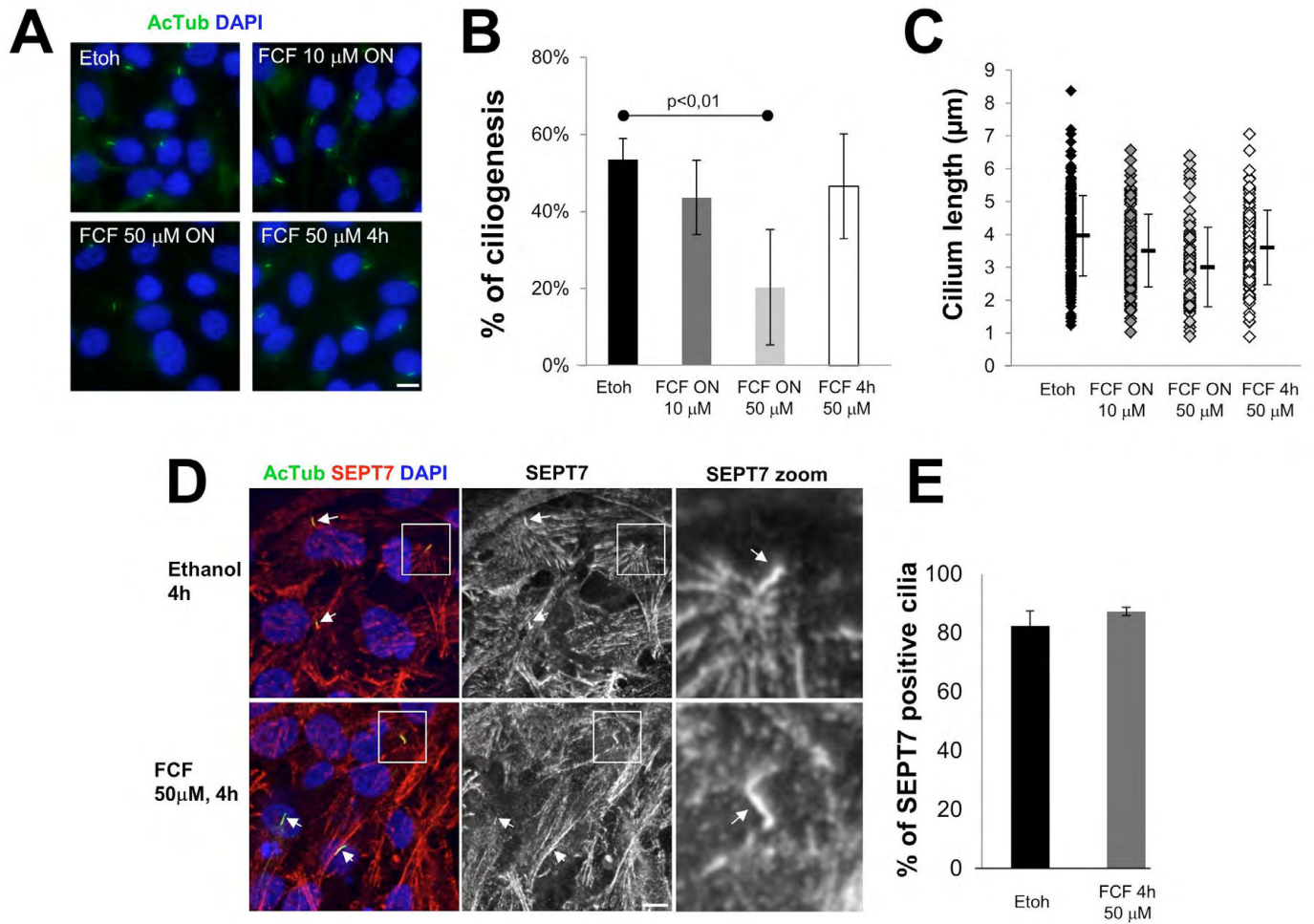


Fig. S4. Effect of Forchlorfenuron (FCF) on ciliogenesis in RPE1 cells. **(A-C)** RPE1 cells were treated with or without FCF at different concentrations (10 or 50 μ M overnight (ON), or 50 μ M for 4 hours) as indicated, then fixed and stained for cilia (AcTub, green) and nuclei (DAPI). The proportion of ciliated cells **(B)** and the length of cilia **(C)** were quantified from three independent experiments. **(D,E)** RPE1 cells treated with or without 50 μ M FCF for 4 hours were stained for cilia (AcTub, green), SEPT7 (red) and nuclei (DAPI). The proportion of cilia positive for SEPT7 was quantified from 3 independent experiments. Scale bar: 5 μ m.

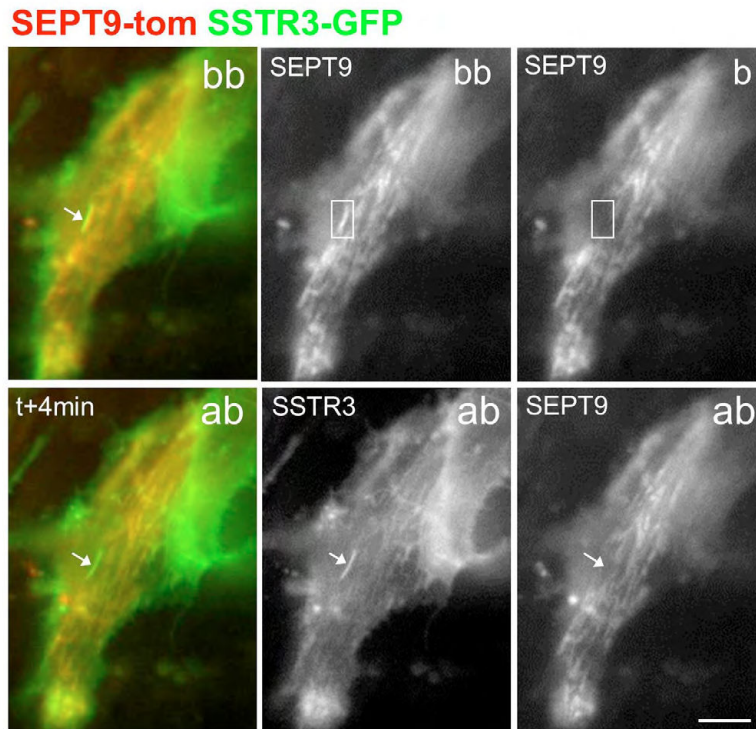


Fig. S5. SEPT9 forms a stable pool at the cilium of RPE1 cell. RPE1 cells were transiently co-transfected with plasmids coding for SSTR3-GFP (green) and SEPT9-tomato (red) fusions then serum-starved for 48 hours and the dynamics of SEPT9 at the cilium was analyzed by FRAP. SEPT9 fluorescence in the cilium and surrounding cytoplasmic area was bleached (white box) and recovery of the fluorescence was followed for 4 min. Fluorescence of the indicated markers were followed before bleach (bb) just after the bleach (b) and 4 minutes after bleach (ab). Scale bar: 5 μ m.

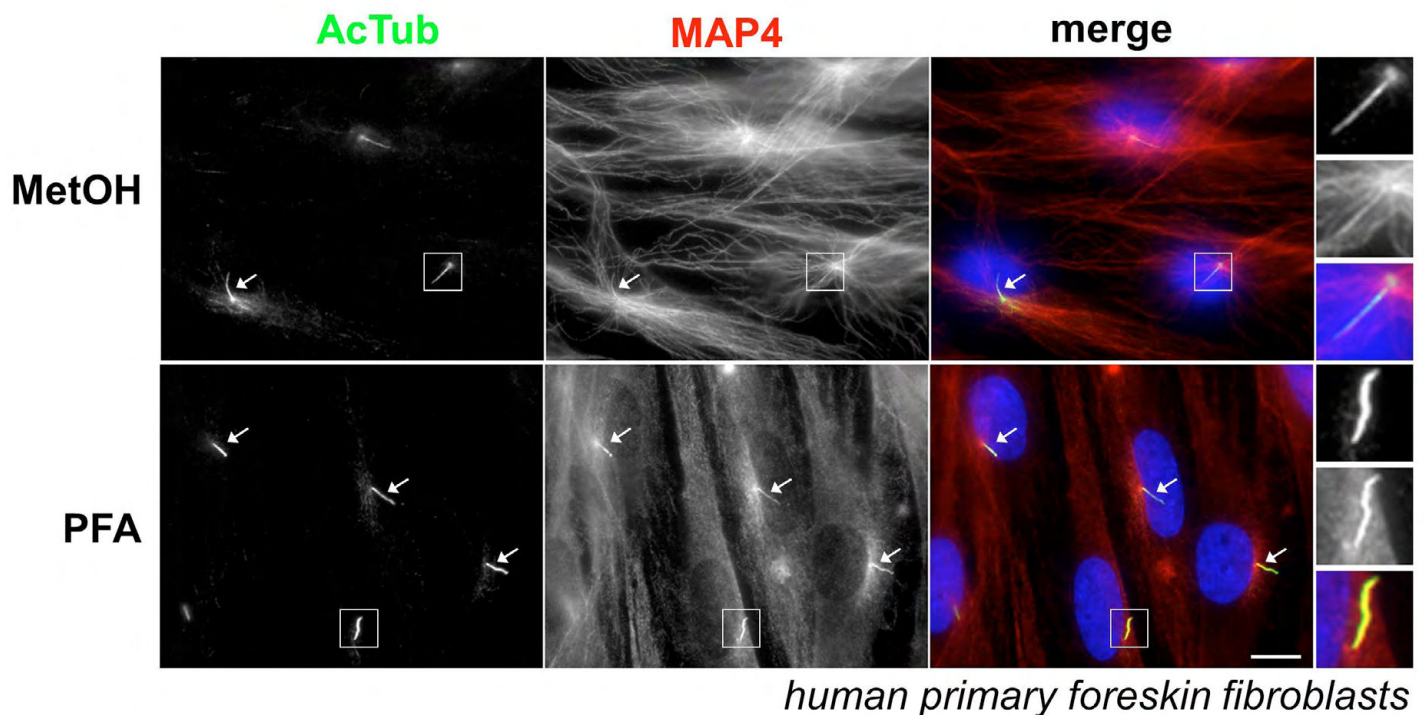


Fig. S6. MAP4 localizes to the primary cilium in human primary fibroblasts. Human primary foreskin fibroblasts were grown on coverslips, serum starved for 48 hours and then fixed with methanol (MetOH) or paraformaldehyde (PFA) and processed for immunofluorescence using antibodies against acetylated-tubulin (AcTub, green) and MAP4 (red), and DAPI to stain nuclei (blue). Panels on the right represent enlarged views of representative cilia (white boxes), white arrows pointed to cilia in the same fields. Scale bar: 5 μ m.

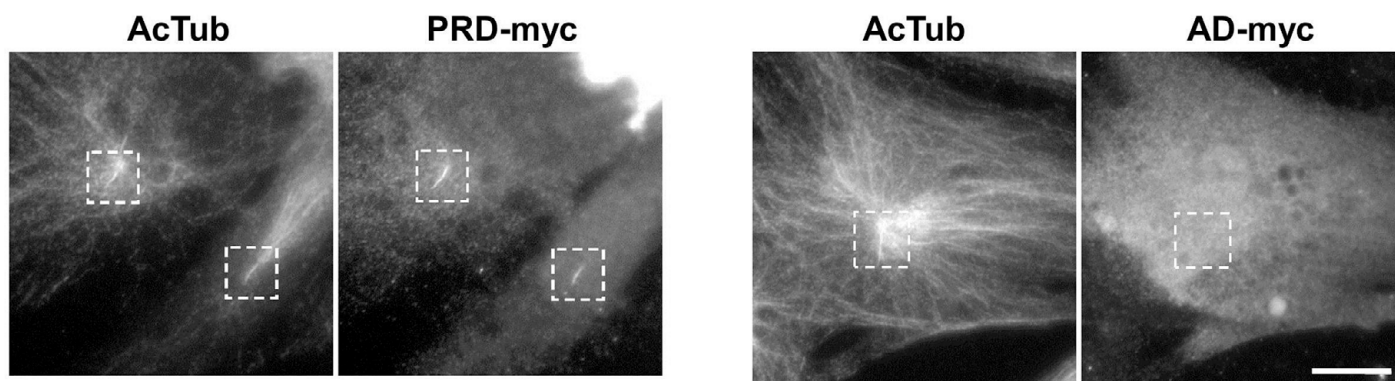
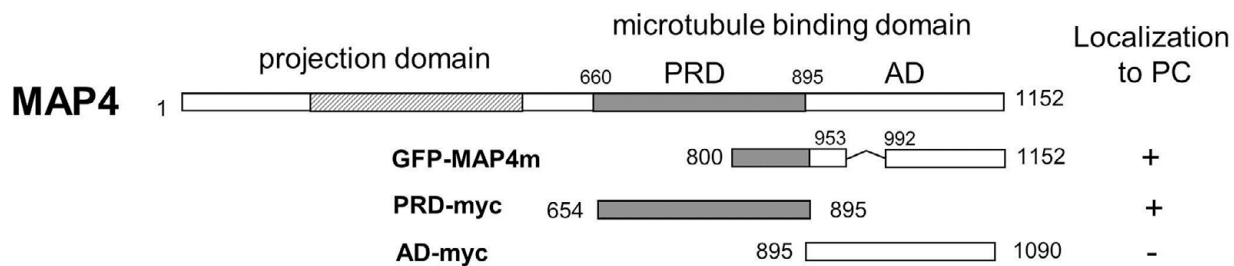


Fig. S7. The proline-rich domain of MAP4 contains a cilium targeting domain. Schematic representation of MAP4 showing its functional domains and the region encoded by the GFP-MAP4m fusion and the myc-tagged PRD and AD constructs. PRD: proline-rich domain; AD: affinity domain. RPE1 cells were transiently transfected with either PRD or AD myc-tagged-MAP4 constructs as indicated, fixed and processed for immunofluorescence using anti-acetylated-tubulin (AcTub, left panels) and anti-Myc (right panels). Cilia are boxed in white. Scale bar: 5 μ m.

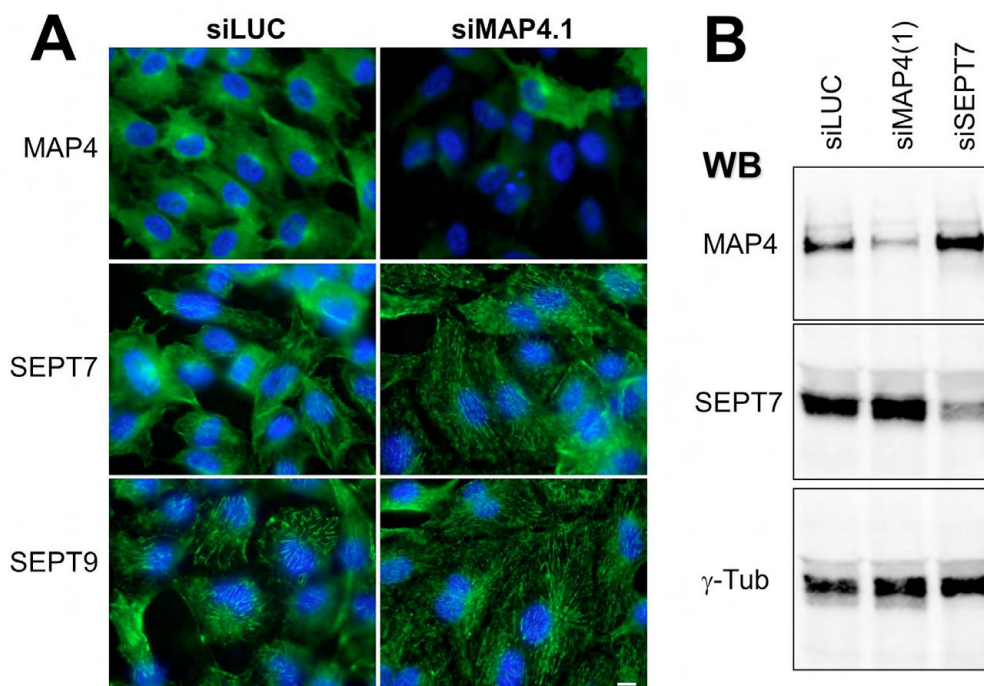


Fig. S8. Depletion of MAP4 does not affect expression of septins and vice versa. **(A)** RPE1 cells were treated with MAP4-specific siRNA (siMAP4.1) or luciferase targeting siRNA (siLUC) as in Figure 8. Expression of MAP4, SEPT7 and SEPT9 was analyzed by immunofluorescence. Scale bar: 5 μ m. **(B)** RPE1 cells were treated with siLUC, siMAP4(1) or siSEPT7(1). Expression of MAP4 and SEPT7, and α -tubulin (α -tub) as a control, was analyzed by western blotting.

SSTR3-GFP

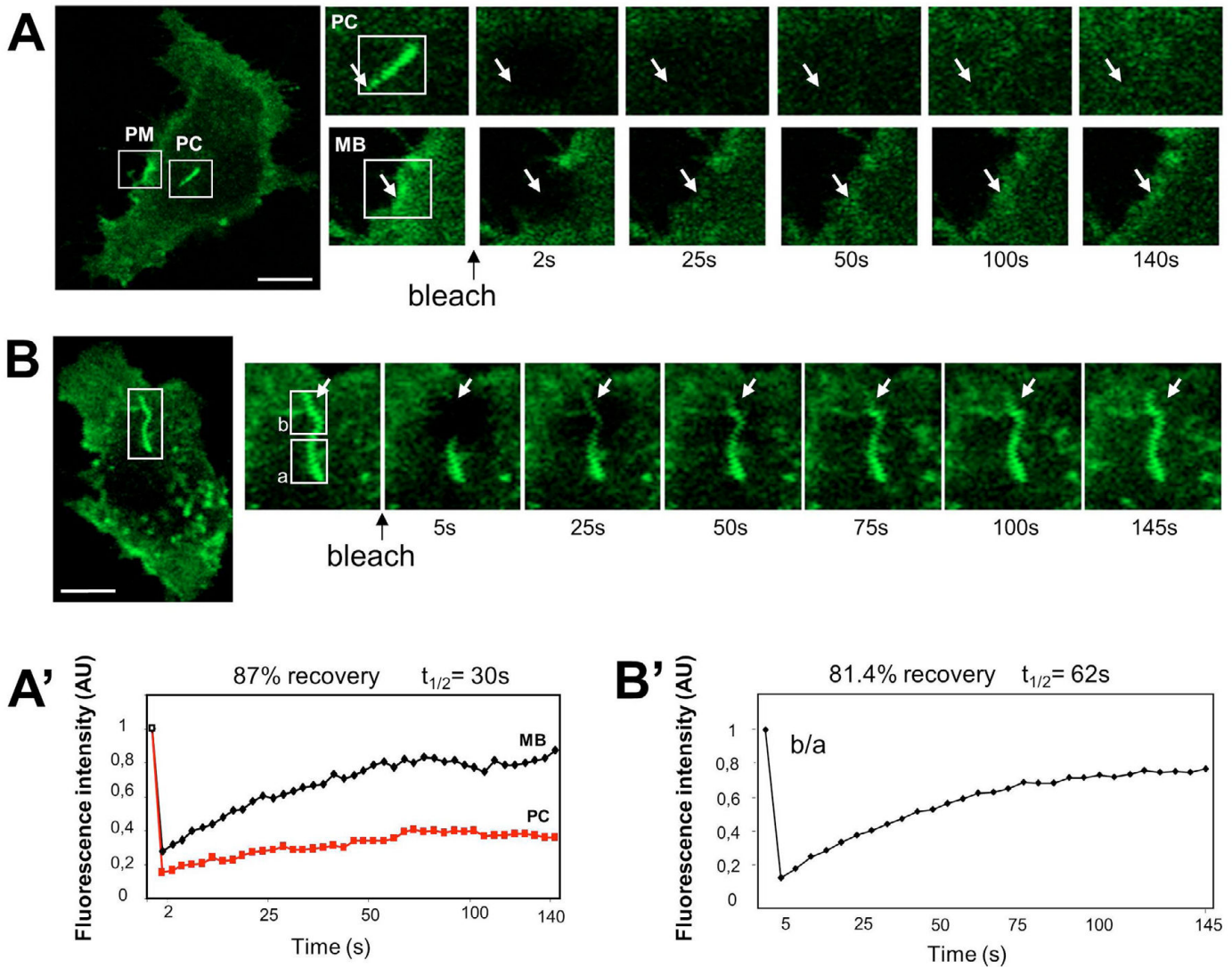


Fig. S9. Dynamics of the ciliary membrane marker SSTR3 in RPE1 cilia. (**A,B**) RPE1 cells transiently expressing SSTR3-GFP were used for FRAP studies. (**A**) The whole cilium (PC) and a representative region of the plasma membrane (MB) of the same cell were photobleached and fluorescence recovery was followed for 140 sec. (**B**) A region corresponding to half of the cilium was photobleached and fluorescence recovery was followed for 145 sec. (**A'**) Quantification of fluorescence recovery of SSTR3-GFP when the whole cilium was photobleached ($n=20$). (**B'**) Quantification of fluorescence recovery of SSTR3-GFP within the photobleached region (b), normalized to the signal present in the region of the cilium which was not photobleached (a) ($n=20$). Scale bars: 5 μ m.

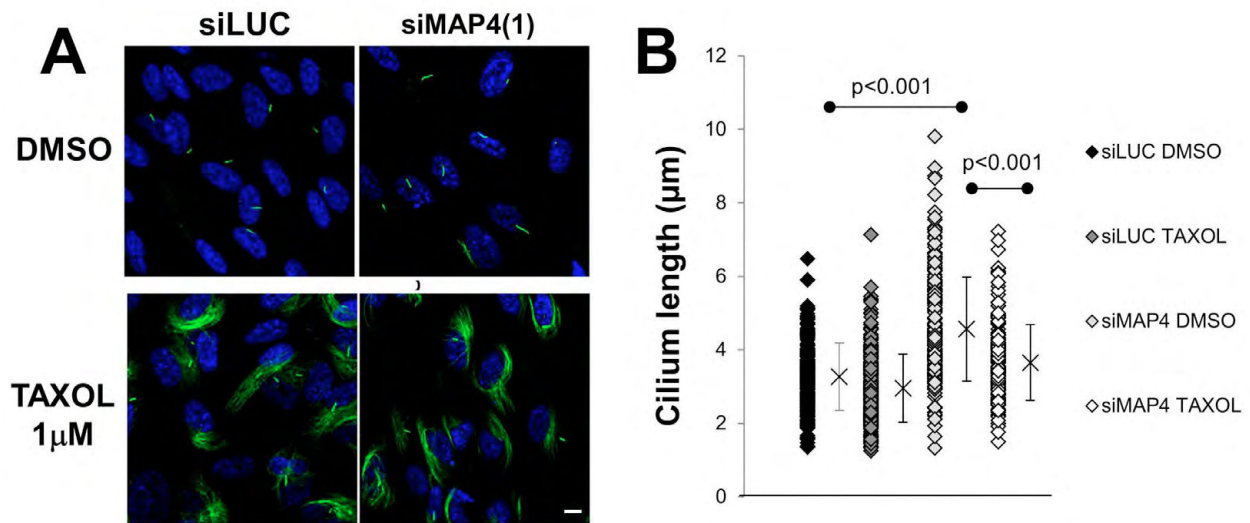


Fig. S10. Effects of MAP4 on the length of cilia is inhibited by taxol. RPE1 cells treated with MAP4-specific siRNA (siMAP4(1)) or luciferase targeting siRNA (siLUC) as in Fig. 8, were incubated with taxol (1 μ M, 2 hours) or with DMSO as a control. Cells were fixed and analyzed by immunofluorescence (**A**), using an antibody against acetylated-tubulin (AcTub, green). The length of cilia was measured as in Fig. 8 (**B**). Statistical analysis was performed with the Fischer's test. Scale bar: 5 μ m.

Annexe 2 : Mutations in KIAA0586 Cause Lethal Ciliopathies Ranging from a Hydrolethalus Phenotype to Short-Rib Polydactyly Syndrome

Caroline Alby,^{1,2} Kevin Piquand,¹ Céline Huber,³ André Megarbané,⁴ Amale Ichkou,^{1,2} Marine Legendre,⁵ Fanny Pelluard,⁶ Ferechté Encha-Ravazi,^{1,2} Georges Abi Tayeh,⁷ Bettina Bessières,² Salima El Chehadeh-Djebbar,⁸ Nicole Laurent,⁸ Laurence Faivre,⁸ Laszlo Sztriha,⁹ Melinda Zombor,⁹ Hajnalka Szabo,⁹ Marion Failler,¹⁰ Meriem Garfa-Traore,¹¹ Christine Bole,¹² Patrick Nitschké,¹³ Mathilde Nizon,^{2,3} Nadia Elkhartoufi,^{1,2} Françoise Clerget-Darpoux,¹ Arnold Munnich,^{1,2} Stanislas Lyonnet,^{1,2} Michel Vekemans,^{1,2} Valérie Cormier-Daire,^{2,3} Tania Attié-Bitach,^{1,2} and Sophie Thomas¹

¹INSERM U1163, Laboratory of Embryology and Genetics of Congenital Malformations, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité and Imagine Institute, 75015 Paris, France; ²Département de Génétique, Hôpital Necker – Enfants Malades, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, 75015 Paris, France;

³INSERM U1163, Laboratory of Molecular and Physiopathological Bases of Osteochondrodysplasia, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité and Imagine Institute, 75015 Paris, France;

⁴Medical Genetics Unit, Saint Joseph University, Rue de Damas, BP 175208, Mar Mikhaël, Beyrouth 1104, Lebanon;

⁵Department of Genetics, Poitiers University Hospital, 2 Rue de la Milétrie, 86021 Poitiers, France;

⁶Unité de Pathologie Foetoplacentaire, Groupe Hospitalier Pellegrin, Centre Hospitalier Universitaire, Place Amélie Raba-Léon, 33076 Bordeaux Cedex, France; ⁷Service de Gynécologie Obstétrique, Hôtel-Dieu de France, BP 166830, Achrafieh, Beyrouth 1100, Lebanon;

⁸Génétique et Anomalies du Développement EA4271, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France;

⁹Department of Paediatrics, Faculty of Medicine, University of Szeged, Dugonics tér 13, Szeged 6720, Hungary;

¹⁰INSERM U1163, Laboratory of Inherited Kidney Diseases, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité and Imagine Institute, 75015 Paris, France;

¹¹Cell Imaging Platform, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité and Imagine Institute, 75015 Paris, France;

¹²Genomic Core Facility, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité and Imagine Institute, 75015 Paris, France;

¹³Bioinformatics Core Facility, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, 75015 Paris, France

Mutations in *KIAA0586* Cause Lethal Ciliopathies Ranging from a Hydrolethalus Phenotype to Short-Rib Polydactyly Syndrome

Caroline Alby,^{1,2} Kevin Piquand,¹ Céline Huber,³ André Megarbané,⁴ Amale Ichkou,^{1,2} Marine Legendre,⁵ Fanny Pelluard,⁶ Ferechté Encha-Ravazi,^{1,2} Georges Abi-Tayeh,⁷ Bettina Bessières,² Salima El Chehadeh-Djebbar,⁸ Nicole Laurent,⁸ Laurence Faivre,⁸ László Sztriha,⁹ Melinda Zombor,⁹ Hajnalka Szabó,⁹ Marion Failler,¹⁰ Meriem Garfa-Traore,¹¹ Christine Bole,¹² Patrick Nitschké,¹³ Mathilde Nizon,^{2,3} Nadia Elkhartoufi,^{1,2} Françoise Clerget-Darpoux,¹ Arnold Munnich,^{1,2} Stanislas Lyonnet,^{1,2} Michel Vekemans,^{1,2} Sophie Saunier,¹⁰ Valérie Cormier-Daire,^{2,3} Tania Attié-Bitach,^{1,2} and Sophie Thomas^{1,*}

KIAA0586, the human ortholog of chicken *TALPID3*, is a centrosomal protein that is essential for primary ciliogenesis. Its disruption in animal models causes defects attributed to abnormal hedgehog signaling; these defects include polydactyly and abnormal dorsoventral patterning of the neural tube. Here, we report homozygous mutations of *KIAA0586* in four families affected by lethal ciliopathies ranging from a hydrolethalus phenotype to short-rib polydactyly. We show defective ciliogenesis, as well as abnormal response to SHH-signaling activation in cells derived from affected individuals, consistent with a role of *KIAA0586* in primary cilia biogenesis. Whereas centriolar maturation seemed unaffected in mutant cells, we observed an abnormal extended pattern of CEP290, a centriolar satellite protein previously associated with ciliopathies. Our data show the crucial role of *KIAA0586* in human primary ciliogenesis and subsequent abnormal hedgehog signaling through abnormal GLI3 processing. Our results thus establish that *KIAA0586* mutations cause lethal ciliopathies.

Ciliopathies are a continuum of genetically highly heterogeneous disorders with varying severity and organ involvement and are all caused by genes involved in ciliary function or biogenesis. Among the most severe ciliopathies are the short-rib polydactyly (SRP) group of lethal skeletal dysplasia (SRPI [MIM: 613091], SRPII [MIM: 263520], SRPIII [MIM: 613091], and SRPIV [MIM: 269860]), hydrolethalus syndrome (HLS [MIM: 236680]), and Meckel syndrome (MKS [MIM: 249000]). All three represent the extreme phenotype of viable ciliopathies, namely Jeune asphyxiating thoracic dystrophy (MIM: 208500) and Ellis-van Creveld syndrome (MIM: 225500),¹ acrocallosal syndrome (MIM: 200990),² and Joubert syndrome (MIM: 213300),^{3–5} respectively.

Here, we examined a consanguineous Lebanese family (family 1; Figure 1A) with two 15 gestational week (gw)-old fetuses presenting with severe hydrocephaly, polydactyly of the hands and feet, a cleft palate, and skeletal abnormalities (Figure 1B, Table 1, and supplemental case reports). We considered this phenotype to be similar to that of HLS and therefore sequenced *HYLS1* (MIM:

610693) and *KIF7* (MIM: 611254) but found no mutation. Because HLS is now known as a ciliopathy, we then combined a targeted capture strategy for candidate ciliary genes with next-generation sequencing, as described previously, by using DNA from fetus II:3.^{6,7} In brief, ciliary exome-targeted sequencing and bioinformatics filtering were conducted with a Custom SureSelect Capture Kit (Agilent Technologies) targeting 4.5 Mb of 20,168 exons (1,221 ciliary candidate genes). Agilent SureSelect libraries were prepared from 3 µg of genomic DNA sheared with a Covaris S2 Ultrasonicator according to manufacturer's instructions. The Ovation Ultralow System (NuGEN Technologies) was used to prepare HiSeq 2500 pre-capture barcoded libraries. The ciliome capture by hybridization was performed on a pool of 10–16 barcoded pre-capture libraries. Sequencing performed on a HiSeq 2500 (Illumina) was done on pools of barcoded ciliome libraries (16 ciliome libraries per lane of HiSeq FlowCell). Paired-end reads (100 100-bp reads) were generated and mapped on a human genome reference (NCBI Genome browser build 37) with the Burrows-Wheeler Aligner (Illumina).

¹INSERM U1163, Laboratory of Embryology and Genetics of Congenital Malformations, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité and Imagine Institute, 75015 Paris, France; ²Département de Génétique, Hôpital Necker – Enfants Malades, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, 75015 Paris, France; ³INSERM U1163, Laboratory of Molecular and Physiopathological Bases of Osteochondrodysplasia, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité and Imagine Institute, 75015 Paris, France; ⁴Medical Genetics Unit, Saint Joseph University, Rue de Damas, BP 175208, Mar Mikhaél, Beyrouth 1104, Lebanon; ⁵Department of Genetics, Poitiers University Hospital, 2 Rue de la Milétrie, 86021 Poitiers, France; ⁶Unité de Pathologie Fœtoplacentaire, Groupe Hospitalier Pellegrin, Centre Hospitalier Universitaire, Place Amélie Raba-Léon, 33076 Bordeaux Cedex, France; ⁷Service de Gynécologie Obstétrique, Hôtel-Dieu de France, BP 166830, Achrafieh, Beyrouth 1100, Lebanon; ⁸Génétique et Anomalies du Développement EA4271, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France; ⁹Department of Paediatrics, Faculty of Medicine, University of Szeged, Korányi fasor 14-15, 6725 Szeged, Hungary; ¹⁰INSERM U1163, Laboratory of Inherited Kidney Diseases, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité and Imagine Institute, 75015 Paris, France; ¹¹Cell Imaging Platform, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité and Imagine Institute, 75015 Paris, France; ¹²Genomic Core Facility, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité and Imagine Institute, 75015 Paris, France; ¹³Bioinformatics Core Facility, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, 75015 Paris, France

*Correspondence: sophie.thomas@inserm.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.06.003>. ©2015 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.

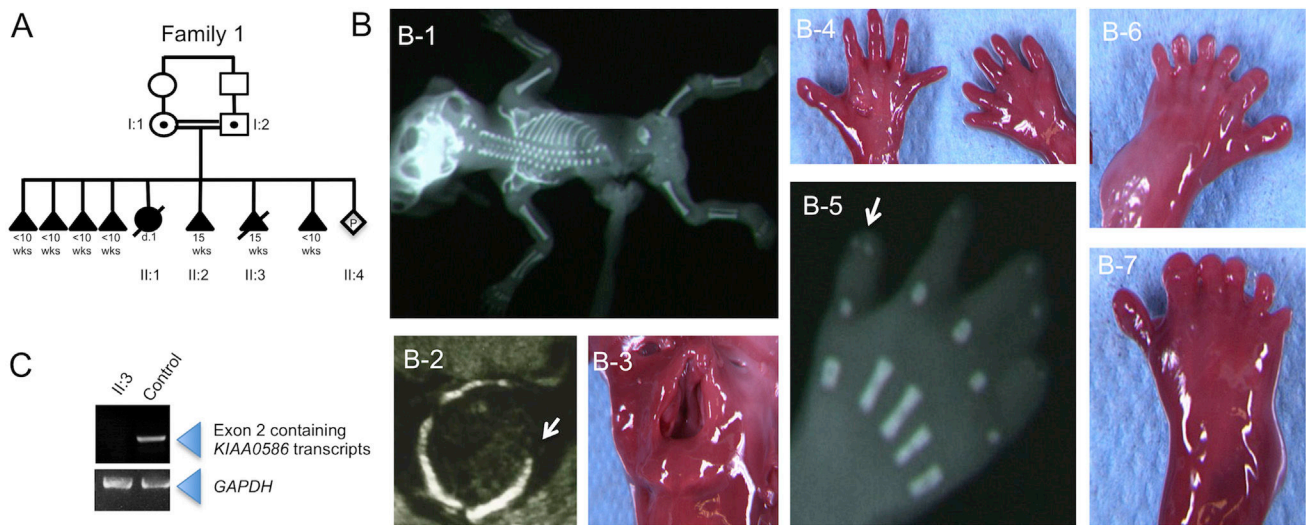


Figure 1. Pedigree and Phenotype of Family 1, Subject II:3 with a KIAA0586 Nonsense Variation

(A) Family 1 pedigree. The c.230C>G (p.Ser77*) variant segregated with the expected patterns of autosomal-recessive inheritance in all available family members.

(B) Phenotype of affected subject II:3. A fetal X-ray shows a frontal view (B-1). Ultrasound imaging shows exencephaly (axial view) with an occipital defect (arrow; B-2). Photographs show cleft lip and palate (B-3), polysyndactyly (B-4) with duplication of the second phalanx of thumbs on X-ray of the right hand (arrow; B-5), and preaxial polydactyly of the feet (B-6 and B-7).

(C) RT-PCR amplification on mRNA extracted from affected and age-matched-control tissue; amplification shows complete degradation of transcripts containing *KIAA0586* exon 2 in mutant tissue. *GAPDH* was used as cDNA quality and quantity control.

Downstream processing was carried out with the Genome Analysis Toolkit, SAMtools, and Picard Tools according to documented best practices from the Broad Institute. All variants were annotated with a software system developed by the Paris Descartes University bioinformatics platform. Informed consent was obtained for all participating families, and the study was approved by the ethical committee of Paris Ile de France II. Genomic DNA was extracted from frozen tissue or amniocyte cultured cells for fetal subjects and from peripheral-blood samples for parents. Finally, a total of 6,263 variants were identified, and after we filtered data by removing known SNPs and synonymous coding sequence variations and by using a recessive model of inheritance, a unique nonsense homozygous mutation remained (Table S1) in *KIAA0586* (MIM: 610178). *KIAA0586*, the ortholog of chicken *KIAA0586*, was considered an excellent candidate gene given that its disruption in animal models causes defects, including polydactyly and abnormal dorsoventral patterning of the neural tube, attributed to abnormal hedgehog signaling.^{8–11} The c.230C>G (p.Ser77*) variant (GenBank: NM_001244189.1) segregated with the expected patterns of autosomal-recessive inheritance in all available family members and is absent from dbSNP, the NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server (EVS), the Exome Aggregation Consortium (ExAC) Browser, and 300 Lebanese control chromosomes. This homozygous nonsense variation is located in *KIAA0586* exon 2, and mRNAs produced are predicted to be targeted for nonsense-mediated decay (NMD). To test this, we extracted mRNA from the tissue of an affected individual

(subject II:3, family 1) and age-matched control individuals and subsequently performed reverse transcription. Compared to control mRNA, mRNA extracted from the affected subject, showed a total absence of transcript containing *KIAA0586* exon 2. Importantly, *GAPDH* amplification was similar in both samples (Figure 1C). We next tested *KIAA0586* expression in different tissues at different human developmental stages and found those specific transcripts containing *KIAA0586* exon 2 were expressed as early as 6 gw (Carnegie stage 16) in humans. They appeared ubiquitously expressed during fetal development and persisted postnatally in all human adult tissues tested (Figure S1).

We performed additional next-generation sequencing of ciliary genes for 150 subjects presenting with lethal ciliopathies with various combinations of brain and skeletal abnormalities. This screen led us to identify a c.1815G>A (p.=) homozygous silent variant (GenBank: NM_001244189.1) in three subjects from three unrelated families (II:2 in family 2, II:2 in family 3, and II:5 in family 4) originating from Romania (family 2), Hungary (family 3), and Kosovo (family 4). The variant segregates with the expected patterns of autosomal-recessive inheritance in all available family members. All three subjects had a SRP syndrome with similar cerebral anomalies, preaxial polydactyly of the feet and postaxial polydactyly of the hands, and long-bone shortening, including short ribs. Upon neuropathological examination, all three affected subjects displayed vermian agenesis and brainstem anomalies evocative of a molar tooth sign (Figure 2A, Table 1, and supplemental case reports). The variation involves

Table 1. Clinical Data of Affected Individuals in the Four Families Studied

Family (ID)	Subject	Age	Sex	Origin	PD	CK	BDP	CP	MTS	Brain Anomalies	Skeletal Anomalies	Other Anomalies	Variation	Exon	Inheritance
1 (HE)	II:2	15 gw	ND	Lebanon	+	ND	ND	+	+	major hydrocephaly	no clavicle	diaphragmatic hernia	no DNA	ND	ND
	II:3	15 gw	female	Lebanon	+	-	ND	+	+	major hydrocephaly, occipital defect	flat and wide iliac wings	fetal hydrops	c.230C>G (p.Ser77*)	2	homozygous
2 (CI)	II:2	29 gw	male	Romania	+	-	-	+	+	VH, polymicrogyria, absent olfactory bulb, ventriculomegaly	short ribs	tongue hamartomas, multiple frenulae	c.1815G>A (splice)	14	homozygous
	II:3	39 gw (died 1 hr after birth)	ND	Romania	+	-	ND	ND	+	VH, abnormal gyration, mega cisterna magna	short ribs, short limbs	ND	c.1815G>A (splice)	14	homozygous
3 (FA)	II:1	spontaneous fetal death (<10 weeks)	ND	Hungary	ND	ND	ND	ND	ND	anencephaly	ND	ND	no DNA	ND	ND
	II:2	died at 13 months	female	Hungary	+	-	-	-	+	occipital meningocele, VH, hypoplasia of the hemispheres and corpus callosum, abnormal basal ganglia, pontocerebellar hypoplasia	short ribs, short limbs, PD of hands and feet	dysplastic and low set ears, depressed nasal bridge, short neck, multiple frenulae	c.1815G>A (splice)	14	homozygous
4 (ME)	II:4	died at 1 day of life	ND	Kosovo	+	-	-	+	+	described as identical to his sibling	described as identical to his sibling	described as identical to his sibling	no DNA	ND	ND
	II:5	26 gw	male	Kosovo	+	-	-	+	+	Occipital meningocele (key hole), hypoplastic brain stem, VH, CC and septal agenesis, temporal polymicrogyria	Short ribs, short limbs (-6 to -8 SD), superior limb incurvation, bilateral postaxial PD of hands and feet	Retinal dysplasia with retinal coloboma, brachyphalangism, facial dysmorphism, micropenis, frenulae nodules	c.1815G>A (splice)	14	homozygous

The KIAA0586 reference sequence used was GenBank: NM_001244189.1. Chromosome analysis and clinicopathological examination were performed for all affected subjects. Abbreviations are as follows: BDP, bile duct proliferation of liver; CC, corpus callosum; CK, cystic kidneys; CP, cleft palate; MTS, molar tooth sign; PD, polydactyly; VH, vermis hypoplasia, ND, no data.

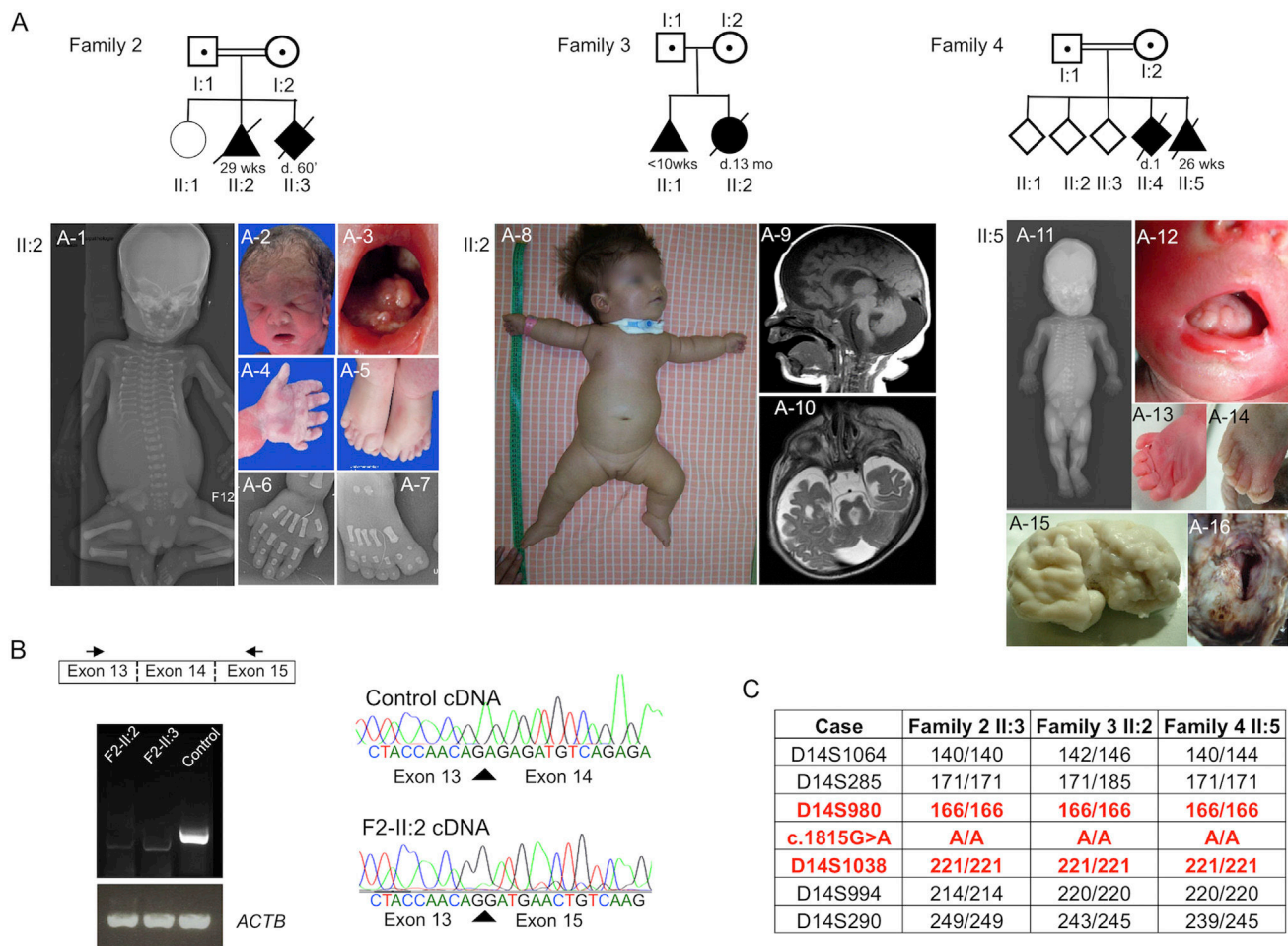


Figure 2. Pedigree, Phenotype, and Haplotype Analyses in Families 2–4 Lead to the Identification of a *KIAA0586* Homozygous Splice-Site Mutation with a Founder Effect

(A) Pedigrees. In subject II:2 of family 2, an X-ray (frontal view) shows shortening of ribs and micromelia with round metaphysal ends (A-1), and pictures and X-rays show dysmorphism (A-2), lingual hamartomas (A-3), postaxial polydactyly of the hand (A-4 and A-6), and preaxial polysyndactyly of the feet (A-5 and A-7). For subject II:2 in family 3, a picture shows short thorax and micromelia (A-8), and sagittal (A-9) and axial (A-10) views of brain MRI show a micro-brain with large ventricles and large subarachnoid spaces, corpus callosum and ponto-cerebellar hypoplasia with a large fourth ventricle and cisterna magna, and a molar tooth aspect. In subject II:5 from family 4, an X-ray (frontal view) shows shortening of ribs and micromelia with round metaphysal ends (A-11), and pictures show lingual hamartomas (A-12), postaxial polydactyly of the right hand (A-13), preaxial polydactyly of the right foot (A-14), temporal polymicrogyria (A-15), and an occipital keyhole defect (A-16).

(B) The c.1815G>A *KIAA0586* variant affects the last base of exon 14 and is responsible for aberrant transcript lacking exon 14, as shown by RT-PCR and sequencing of *KIAA0586* mRNA from control and affected subjects (family 2, subjects II:2 and II:3). Total RNAs were extracted from frozen blood with the Nucleospin RNA Blood Kit and on-column DNase digestion (Macherey Nagel). *ACTB* was used as cDNA quality and quantity control.

(C) Haplotype at *KIAA0586* of affected subjects from families 2–4.

the last base of *KIAA0586* exon 14, is absent from dbSNP, the EVS, and the ExAC Browser, and is predicted in silico to abolish the intron 14 donor splice site (MaxEntScan, splice site prediction by Neural Network [NNSPLICE], and Human Splicing Finder). To confirm this hypothesis, we performed RT-PCR and subsequent cDNA sequencing on total mRNA extracted from blood samples from subjects II:2 and II:3 from family 2 and from control individuals. A unique transcript lacking *KIAA0586* exon 14 was observed in both affected subjects (Figure 2B) and is predicted to cause a shift in the reading frame with a premature stop codon.

Given the Eastern European origin of the three families, a founder effect was highly suspected. The distance to the common ancestor was estimated by a likelihood-based method.¹² We selected the polymorphic markers encompassing *KIAA0586* and found a similar haplotype in those three families (Figure 2C). The allele frequencies of the microsatellites used were found on the CEPH genotype database, and the mutation rate was chosen as 10^{-3} . Because the genetic distances available for closely linked markers are generally not very accurate, we computed the rates of recombination between markers by using both the overall genetic length of the haplotype and the

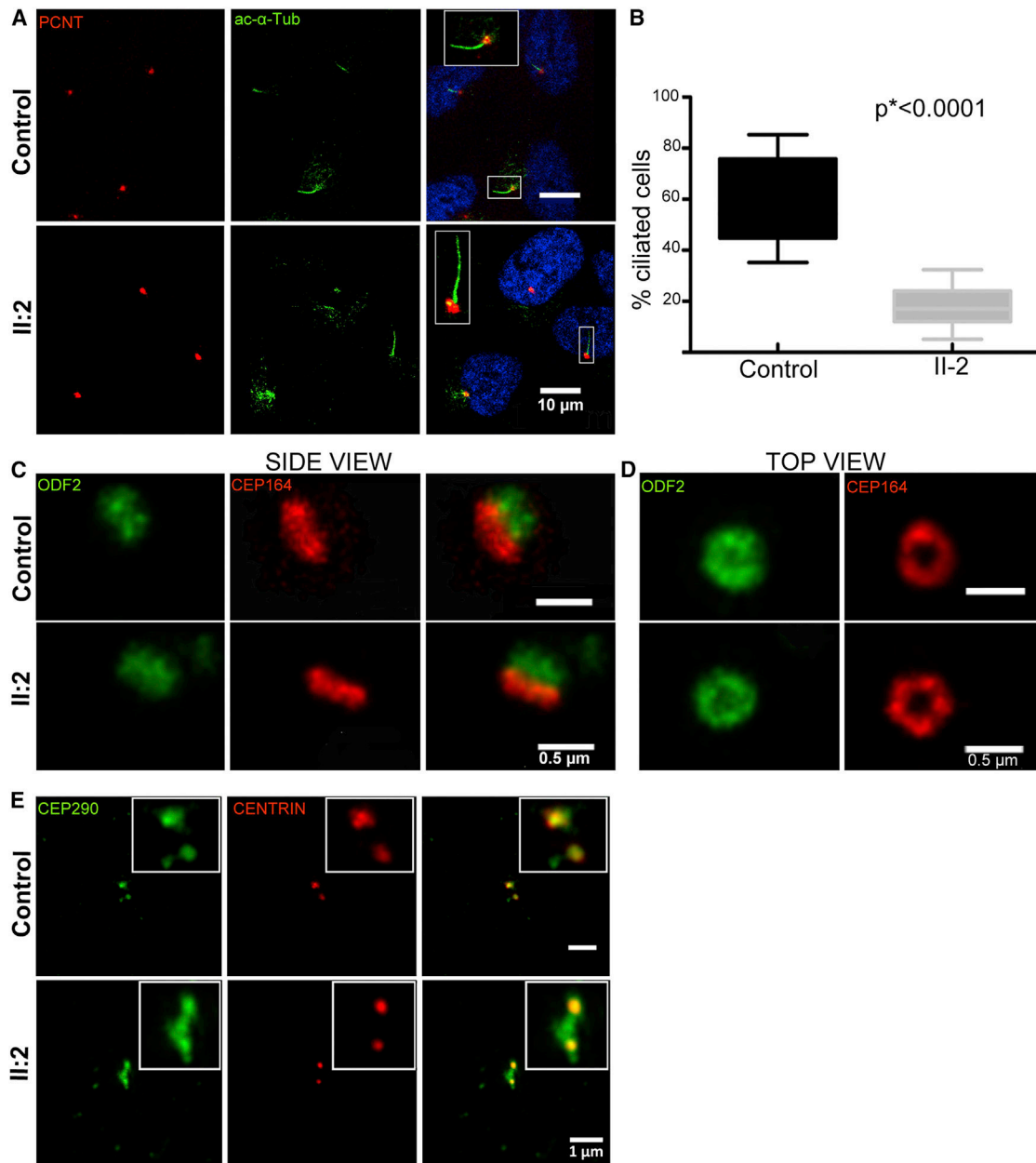


Figure 3. Analysis of Ciliogenesis in *KIAA0586* Mutant Cells

Cells from affected individuals were obtained from subject II:2 in family 2.

(A and B) In control cells, primary cilia co-stained with acetylated alpha tubulin (ac- α -Tub, clone 6-11B-1, Sigma) and pericentrin (PCNT, Abcam Ab4448) protrude from 60% of cells ($n = 500$, three independent experiments), whereas only 20% of mutant cells ($n = 500$) bear a primary cilia. The graph in (B) is a boxplot representing the distribution of the data. The boxes contain 50% of the values and the whiskers indicate the minimum and the maximum of the distribution. The p values were calculated with the Mann-Whitney two-tailed test. Confocal images were taken with a Leica SP5 confocal microscope.

(C and D) High-resolution imaging of control and mutant cell centrioles co-stained with ODF2 (centriolar subdistal appendage protein; Abnova, H00004957-M01) and CEP164 (a centriolar distal appendage protein; Sigma, HPA037606) showed no defect in mutant cells, neither on side view (C) nor on top view (D). Super-resolution microscopy was performed with a Leica TCS SP8 STED (Stimulated Emission Depletion).

(E) Immunostaining with CEP290 (Novus Biologicals, NB100-86991) and centrin (Clone 20H5, Millipore) antibodies, showing abnormal extended pattern of CEP290.

physical distances between markers.¹³ The closest markers at which affected individuals do not share any alleles were determined on both sides of *KIAA0586*. The distance to the common ancestor was estimated to be approximately 480 years $n = 16$ generations ago (n_{inf} [the lower bound of the

95% confidence interval (CI)] = 5; n_{sup} [the upper bound of the 95% CI] = 63; n_{end} [the total number of iterations performed] = 232; likelihood = -3.776324).

In animal and cell models, TALPID3 has been involved in very early stages of ciliogenesis, before the formation and

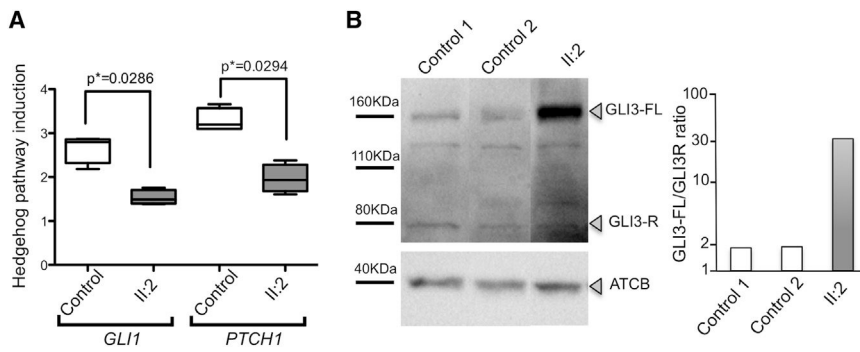


Figure 4. SHH Signaling in *KIAA0586* Mutant Cells

(A) *KIAA0586* mutant fibroblasts from subject II:2 in family 2 showed an altered response to smoothed agonist (SAG; sc-202814, Santa Cruz; 5 μ M for 18 hr), given that they induced less *GLI1* and *PTCH1* expression than did control cells. Primers used for real-time qRT-PCR are listed in Table S2. Values from five independent experiments were normalized to *GAPDH* and are presented as relative expression levels. The boxes contain 50% of the values and the whiskers indicate the minimum and the maximum of the distribution. The p values were calculated with the Mann-Whitney two-tailed test.

(B) Western blot analysis with a GLI3 antibody (AF3690, R&D Systems) showed that the amount of processing of GLI3-FL into its repressor form, GLI3-R, was much lower in *KIAA0586* mutant fibroblasts than in control cells. The samples were not run in contiguous lanes, and in the figure presented here, lanes were spliced together (the entire photograph of the immunoblot is presented in Figure S3). A graphical evaluation of the GLI3-FL/GLI3-R ratio, with actin as a loading control and ImageJ software for densitometry, is presented.

docking of a primary ciliary vesicle at the distal appendage.¹⁴ TALPID3 interacts with CP110 and co-localizes to the distal ends of centrioles. CP110 and its protein-interaction network (including CEP97, CEP290, and KIF24) have been found to modulate cilium assembly (reviewed in Tsang et al.¹⁵). In addition, TALPID3 localizes near the distal appendages,¹⁴ which localize to the site of centriole-to-membrane docking and are required for the centriole to be converted to a basal body and thus for ciliogenesis.¹⁶

In order to examine the effect of *KIAA0586* loss on cilia assembly in humans, we induced ciliogenesis by using serum-starvation-mediated cell-cycle arrest in confluent fibroblasts from both affected (family 2, subject II:2) and control subjects and visualized cilia by co-immunostaining with antibodies to ARL13B (a cilia marker), glutamylated tubulin (GT335) or acetylated α -tubulin, and pericentrin (Figure 3A and data not shown). In control fibroblasts with wild-type *KIAA0586*, cilia were evident in 60% of the total stained cells by 48 hr of serum starvation, and nearly all were co-stained with all markers. In mutant fibroblasts, only 20% of cells presented with cilia (Figures 3A and 3B). This result indicates that *KIAA0586* is necessary for cilia biogenesis in humans, in accordance with its function in animal and cell models.

We then checked centriolar morphogenesis and targeting of crucial proteins and found no differences in the staining patterns of CEP164 (distal appendages of mother centrioles) and ODF2 (subdistal appendages), indicating that assembly of these proteins to centrioles is not affected by *KIAA0586* loss (Figures 3C and 3D). Finally, as suggested by TALPID3 siRNA depletion studies in which TALPID3 is required for centriolar satellite dispersal preceding the formation of mature ciliary vesicles,¹⁴ we compared the distribution of the CP110-interacting protein CEP290 in affected cells to the distribution in control cells and found an abnormal extended pattern of this satellite protein in asynchronously growing conditions (Figure 3E).

We next tested the transduction of the SHH pathway in mutant fibroblasts by assaying the expression of *PTCH1*

and *GLI1*, two transcriptional targets of SHH signaling, after pathway activation by the addition of smoothed agonist. We found that both *PTCH1* and *GLI1* were less induced in mutant fibroblasts than in controls (Figure 4A). We also analyzed GLI3 processing by western blot and found that *KIAA0586* mutant fibroblasts exhibited increased amounts of full-length, unprocessed GLI3 (GLI3-FL) and an abnormal GLI3-FL/GLI3-R ratio (Figure 4B and Figure S3). Thus, *KIAA0586* mutant cells exhibit abnormal SHH responsiveness, suggesting that at least some of the defects in affected individuals with *KIAA0586* variations might be secondary to abnormal SHH signaling, as observed in animal models.^{8–11,17}

In this study, using a targeted high-throughput sequencing strategy for candidate ciliary genes, we identified homozygous nonsense and splicing *KIAA0586* mutations as responsible for lethal ciliopathies. This candidate-gene strategy previously succeeded in identifying ciliopathy genes, including *TCTN3* (MIM: 613847), which is associated with Mohr-Majewski syndrome (OFD4 [MIM: 258860]).⁶

The phenotype of *KIAA0586*-affected subjects ranges from a hydroletharus phenotype to SRP syndrome in four unrelated families. In particular, cerebral phenotypes range from anencephaly or large occipital meningocele to vermian agenesis associated with brainstem anomalies; such anomalies are classically suggestive of ciliopathies. Importantly, the only living SRP-affected individual reported in this study also presented with a molar tooth sign on brain MRI, consistent with the conclusions of neuropathological examination on fetal subjects. All affected subjects display skeletal anomalies, including a consistent polydactyly, short ribs, and micromelia with round femoral ends in families 2–4. In addition, most of the affected subjects have a large median cleft palate. These features are reminiscent of the spectrum of SRPII and SRPIV.^{1,18,19}

Thus, fetuses and individuals reported in this study all display lethal phenotypes consistent with a hedgehog-signaling defect and similar to the phenotype described

in *KIAA0586* animal models.^{8–11,17} In particular, the *KIAA0586* chicken with a frameshift mutation in exon 7 (corresponding to human exon 9) closely models the human SRP ciliopathy phenotype, including a small rib cage and polydactyly, as well as lung anomalies.¹⁷ Interestingly, the c.1815G>A variation identified in families 2–4 leads to the deletion of human exon 14, corresponding to mouse exon 12 (Figure S2), which has been shown to be essential for the function of the protein.^{9,10} Indeed, *Talpid3*^{−/−} mice in which exons 11 and 12 are constitutively deleted show abnormal Shh signaling and embryonic lethality as early as embryonic day 10.5. The c.230C>G (p.Ser77*) nonsense variation of family 1 leads to NMD of exon-2-containing transcripts shown to be expressed early in human embryos and throughout fetal development.

Finally, ciliogenesis was severely impaired in *KIAA0586* mutant cells, and the SHH signaling pathway was abnormal, characteristic of other severe human ciliopathies, such as Morh-Majewski or hydroletharus syndromes, associated with *TCTN3* and *KIF7* variations,^{2,6} respectively, or Meckel syndrome.

Overall, these results highlight the conserved function of *KIAA0586* among species and its involvement in human ciliopathies. In view of the wide phenotypic spectrum of ciliopathy genes, the lethal phenotype reported here might represent the severe end of the phenotypic spectrum associated with *KIAA0586* variations.

Supplemental Data

Supplemental Data include case reports, three figures, and two tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.06.003>.

Acknowledgments

We thank the families for their participation. We also thank Leila Hakkakian, Judite De Oliveira, and Nadège Gigot for technical assistance and Prof. Andrew Green for referral of affected subjects, and we are grateful to the French Society of Fetal Pathology for participating in the study. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR; 2010 fetal ciliopathies grant BLAN-1122-01 and 2013 cilia, axonal guidance, and corpus callosum grant ANR-13-BSV1-0027 to T.A.B.). C.A. is funded by the Fondation pour la Recherche Médicale and K.P. by grants from ANR. The Institut Imagine is supported by an ANR grant (ANR-A0-IAHU-01).

Received: March 13, 2015

Accepted: June 8, 2015

Published: July 9, 2015

Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

Broad Institute GATK Best Practices, <https://www.broadinstitute.org/gatk/guide/best-practices>

ClustalW2, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

Human Splicing Finder, <http://www.umd.be/HSF/>

MaxEntScan, http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq_acc.html

MultAlin, <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

OMIM, <http://www.omim.org/>

PolyPhen-2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

Primer3Plus, <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>

SIFT, <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>

Splice Site Prediction by Neural Network (NNSPLICE), http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu>

References

- Huber, C., and Cormier-Daire, V. (2012). Ciliary disorder of the skeleton. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* *160C*, 165–174.
- Putoux, A., Thomas, S., Coene, K.L.M., Davis, E.E., Alanay, Y., Ogur, G., Uz, E., Buzas, D., Gomes, C., Patrier, S., et al. (2011). *KIF7* mutations cause fetal hydroletharus and acrocallosal syndromes. *Nat. Genet.* *43*, 601–606.
- Baala, L., Romano, S., Khaddour, R., Saunier, S., Smith, U.M., Audollent, S., Ozilou, C., Faivre, L., Laurent, N., Foliguet, B., et al. (2007). The Meckel-Gruber syndrome gene, *MKS3*, is mutated in Joubert syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *80*, 186–194.
- Delous, M., Baala, L., Salomon, R., Laclef, C., Vierkotten, J., Tory, K., Golzio, C., Lacoste, T., Besse, L., Ozilou, C., et al. (2007). The ciliary gene *RPGRIP1L* is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. *Nat. Genet.* *39*, 875–881.
- Valente, E.M., Logan, C.V., Mougou-Zerelli, S., Lee, J.H., Silhavy, J.L., Brancati, F., Iannicelli, M., Travaglini, L., Romani, S., Illi, B., et al. (2010). Mutations in *TMEM216* perturb ciliogenesis and cause Joubert, Meckel and related syndromes. *Nat. Genet.* *42*, 619–625.
- Thomas, S., Legendre, M., Saunier, S., Bessières, B., Alby, C., Bonnière, M., Toutain, A., Loeuillet, L., Szymanska, K., Jossic, F., et al. (2012). *TCTN3* mutations cause Mohr-Majewski syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *91*, 372–378.
- Failler, M., Gee, H.Y., Krug, P., Joo, K., Halbritter, J., Belkacem, L., Filhol, E., Porath, J.D., Braun, D.A., Schueler, M., et al. (2014). Mutations of *CEP83* cause infantile nephronophthisis and intellectual disability. *Am. J. Hum. Genet.* *94*, 905–914.
- Davey, M.G., Paton, I.R., Yin, Y., Schmidt, M., Bangs, F.K., Morrice, D.R., Smith, T.G., Buxton, P., Stamatakis, D., Tanaka, M., et al. (2006). The chicken *talpid3* gene encodes a novel protein essential for Hedgehog signaling. *Genes Dev.* *20*, 1365–1377.
- Yin, Y., Bangs, F., Paton, I.R., Prescott, A., James, J., Davey, M.G., Whitley, P., Genikhovich, G., Technau, U., Burt, D.W., and Tickle, C. (2009). The *Talpid3* gene (*KIAA0586*) encodes a centrosomal protein that is essential for primary cilia formation. *Development* *136*, 655–664.
- Bangs, F., Antonio, N., Thongnuek, P., Welten, M., Davey, M.G., Briscoe, J., and Tickle, C. (2011). Generation of mice with functional inactivation of *talpid3*, a gene first identified in chicken. *Development* *138*, 3261–3272.
- Ben, J., Elworthy, S., Ng, A.S.M., van Eeden, F., and Ingham, P.W. (2011). Targeted mutation of the *talpid3* gene in zebrafish reveals its conserved requirement for ciliogenesis and Hedgehog signalling across the vertebrates. *Development* *138*, 4969–4978.

12. Genin, E., Tullio-Pelet, A., Begeot, F., Lyonnet, S., and Abel, L. (2004). Estimating the age of rare disease mutations: the example of Triple-A syndrome. *J. Med. Genet.* *41*, 445–449.
13. Picard, C., Fieschi, C., Altare, F., Al-Jumaah, S., Al-Hajjar, S., Feinberg, J., Dupuis, S., Soudais, C., Al-Mohsen, I.Z., Génin, E., et al. (2002). Inherited interleukin-12 deficiency: IL12B genotype and clinical phenotype of 13 patients from six kindreds. *Am. J. Hum. Genet.* *70*, 336–348.
14. Kobayashi, T., Kim, S., Lin, Y.-C., Inoue, T., and Dynlacht, B.D. (2014). The CP110-interacting proteins Talpid3 and Cep290 play overlapping and distinct roles in cilia assembly. *J. Cell Biol.* *204*, 215–229.
15. Tsang, W.Y., and Dynlacht, B.D. (2013). CP110 and its network of partners coordinately regulate cilia assembly. *Cilia* *2*, 9.
16. Tanos, B.E., Yang, H.-J., Soni, R., Wang, W.-J., Macaluso, F.P., Asara, J.M., and Tsou, M.-F.B. (2013). Centriole distal appendages promote membrane docking, leading to cilia initiation. *Genes Dev.* *27*, 163–168.
17. Davey, M.G., McTeir, L., Barrie, A.M., Freem, L.J., and Stephen, L.A. (2014). Loss of cilia causes embryonic lung hypoplasia, liver fibrosis, and cholestasis in the talpid3 ciliopathy mutant. *Organogenesis* *10*, 177–185.
18. El Hokayem, J., Huber, C., Couvé, A., Aziza, J., Baujat, G., Bouvier, R., Cavalcanti, D.P., Collins, F.A., Cordier, M.-P., Delezoide, A.-L., et al. (2012). NEK1 and DYNC2H1 are both involved in short rib polydactyly Majewski type but not in Beemer Langer cases. *J. Med. Genet.* *49*, 227–233.
19. Schmidts, M. (2014). Clinical genetics and pathobiology of ciliary chondrodysplasias. *J. Pediatr. Genet.* *3*, 46–94.

Le cil primaire est une antenne sensorielle présente à la surface de la plupart des cellules qui contrôle des voies de signalisation clés au cours du développement et de l'homéostasie tissulaire. Des défauts de formation ou de fonctionnement des cils sont responsables de maladies génétiques complexes appelées ciliopathies. La néphronophtise (NPH) est une ciliopathie caractérisée par une néphropathie tubulo-interstitielle chronique évoluant généralement vers l'insuffisance rénale terminale (IRT) avant l'âge adulte. La NPH peut être isolée ou associée à des signes extra-rénaux tels que la rétinite pigmentaire et des défauts du squelette permettant de définir des syndromes comme celui de Saldino-Mainzer (MZSDS). La NPH est une maladie à transmission autosomique récessive très hétérogène sur le plan génétique et les protéines codées par les gènes identifiés ont quasiment toutes été impliquées dans des fonctions ciliaires. Le séquençage d'exome de patients, ciblant plus de 1300 gènes ciliaires (ciliome), a permis de mettre en évidence des mutations dans deux nouveaux gènes candidats pour la NPH : *CEP83* et *TEKT1*. Mon travail de thèse a consisté à caractériser l'effet des mutations et à valider leur implication dans les phénotypes des patients.

- *CEP83* a été retrouvé muté chez plusieurs patients non-apparentés présentant une NPH avec IRT précoce (< 5 ans). *CEP83* est un composant des appendices distaux du centriole père qui joue un rôle clé dans les étapes précoces de la formation du cil. J'ai montré que les mutations identifiées entraînaient une désorganisation des appendices distaux qui pourrait expliquer les défauts de ciliogénèse observés dans les fibroblastes et les biopsies rénales de patients. Ces résultats ont permis de démontrer l'implication d'une nouvelle protéine centriolaire dans la physiopathologie des formes sévères de NPH.

- *TEKT1* présente des mutations hétérozygotes composites chez un patient ayant un tableau clinique complexe associant un MZSDS et une dyskinésie ciliaire primitive (PCD) due à des défauts de cils motiles. Une analyse génétique détaillée a mis en évidence des mutations sévères dans un second gène, *WDR19*, déjà caractérisé dans les formes de NPH associées à des défauts osseux. *TEKT1* code la protéine Tektine-1, un membre encore non caractérisé de la famille des tektines impliquées dans les cils motiles. L'analyse de cellules nasales multiciliées a montré que Tektine-1 était localisée le long de l'axonème des cils motiles contrôles et absent des cils des cellules du patient qui présentaient aussi des anomalies sévères de battement. En parallèle, des défauts de ciliogénèse, typiques de mutations de *WDR19*, ont été observés dans les fibroblastes du patient. Ces résultats suggèrent que ce phénotype complexe est dû aux effets complémentaires des mutations des deux gènes *TEKT1* et *WDR19*, responsables des défauts dans les cils motiles et primaires, respectivement.

Mots-clés : ciliopathies, cils primaires, cils motiles, *CEP83*, *TEKT1*