



**HAL**  
open science

# Etude des protéines VFL3 et OFD1 dans le mécanisme d'ancrage des corps basaux chez la paramécie

Hakim Bengueddach

► **To cite this version:**

Hakim Bengueddach. Etude des protéines VFL3 et OFD1 dans le mécanisme d'ancrage des corps basaux chez la paramécie. Biologie cellulaire. Université Paris-Saclay, 2016. Français. NNT : 2016SACLS556 . tel-01443930

**HAL Id: tel-01443930**

**<https://theses.hal.science/tel-01443930>**

Submitted on 23 Jan 2017

**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.

NNT : 2016SACLS556

THESE DE DOCTORAT  
DE  
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY  
PREPAREE A  
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N°577  
Structure et dynamique des systèmes vivants

Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Par

**M. Bengueddach Hakim**

Etude des protéines VFL3 et OFD1 dans le mécanisme d'ancrage des corps basaux  
chez la paramécie

**Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 14 décembre 2016**

**Composition du Jury :**

M. Théodore Laurent, Professeur, Université Paris-Sud, Président  
Mme Azimzadeh Juliette, Chargée de recherche, Institut Jacques Monod, Rapporteur  
M. Rosnet Olivier, Chargé de recherche, IBDM, Rapporteur  
Mme Saunier Sophie, Directrice de Recherche, Université Paris Descartes, Examinatrice  
M. Bastin Philippe, Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Examineur  
Mme Koll France, Chargée de Recherche, Université Paris-Sud, Directrice de thèse



## TABLE DES MATIERES

|  |    |
|--|----|
| <b><u>Avant- propos</u></b> .....  | 1  |
| <b><u>Introduction générale</u></b> .....  | 5  |
| <b>I) <u>Structure générale du cil</u></b> .....                                       | 7  |
| <b>1) <u>Le compartiment ciliaire</u></b> .....  | 7  |
| A) <u>Cil non motile</u> .....   | 7  |
| a) <i>Structure</i> .....  | 7  |
| b) <i>Fonction</i> .....   | 9  |
| B) <u>Cil motile</u> .....   | 9  |
| a) <i>Structure</i> .....  | 9  |
| b) <i>Fonction</i> .....   | 11 |
| <b>2) <u>Le corps basal</u></b> .....  | 13 |
| A) <u>Maturation et conversion du centriole en corps basal</u> .....                   | 15 |
| a) <i>Cellules monociliées</i> .....   | 15 |
| b) <i>Cellules multiciliées</i> .....  | 15 |
| B) <u>Assemblage</u> .....   | 17 |
| <b>3) <u>La zone de transition</u></b> .....   | 19 |
| A) <u>Composition moléculaire</u> .....  | 19 |
| B) <u>Assemblage</u> .....   | 21 |
| <b>II) <u>Structures associées au corps basal</u></b> .....                            | 23 |
| <b>1) <u>Les fibres de transition</u></b> .....  | 23 |
| A) <u>Composition moléculaire</u> .....  | 25 |
| B) <u>Assemblage</u> .....   | 25 |
| C) <u>Fonction</u> .....   | 27 |
| <b>2) <u>Le pied basal</u></b> .....   | 29 |
| A) <u>Composition moléculaire</u> .....  | 29 |
| B) <u>Assemblage</u> .....   | 31 |
| C) <u>Fonction</u> .....   | 31 |
| <b>3) <u>La racine striée</u></b> .....  | 33 |
| A) <u>Composition moléculaire</u> .....  | 35 |
| B) <u>Assemblage</u> .....   | 37 |
| C) <u>Fonction</u> .....   | 37 |
| <b>III) <u>La ciliogenèse</u></b> .....  | 39 |
| <b>1) <u>association corps basal / membrane, étape clé de la ciliogenèse</u></b> ..... | 39 |
| <b>2) <u>Initiation de la ciliogenèse</u></b> .....                                    | 41 |



|  |     |
|--|-----|
| A) <u>Fusion vésicule/centriole</u> .....  | 41  |
| B) <u>Initiation de l'extension de l'axonème</u> .....   | 43  |
| a) <i>Levée de l'inhibition CP110/CEP97</i> .....  | 43  |
| b) <i>Levée de l'inhibition Trichoplein</i> .....  | 45  |
| 3) <u>L'assemblage du cil</u> .....  | 47  |
| 4) <u>Cils et maladies génétiques humaines : les ciliopathies</u> .....  | 49  |
| <br>   |     |
| <b>IV) <u>La paramécie : organisme modèle pour l'étude de l'ancrage des corps basaux à la membrane plasmique</u></b> ..... | 53  |
| 1) <u>Présentation générale</u> .....  | 53  |
| A) <u>Un modèle</u> .....  | 53  |
| B) <u>Des outils</u> .....   | 55  |
| 2) <u>Organisation et structure des corps basaux</u> .....   | 57  |
| 3) <u>Organisation des structures associées aux corps basaux</u> .....   | 57  |
| A) <u>En interphase</u> .....  | 57  |
| B) <u>En division</u> .....  | 59  |
| <br>   |     |
| <b>V) <u>Contexte scientifique</u></b> .....   | 65  |
| 1) <u>Les protéines de la famille FOP</u> .....  | 67  |
| A) FOP.....  | 67  |
| B) OFD1.....   | 69  |
| C) FOR20.....  | 69  |
| D) Tonneau 1.....  | 69  |
| 2) <u>Les Centrines</u> .....  | 71  |
| 3) <u>FOR20, Centrine 2 et Centrine 3 dans l'ancrage</u> .....   | 71  |
| 4) <u>Deux protéines d'intérêt : OFD1 et VFL3</u> .....  | 73  |
| A) OFD1.....   | 75  |
| B) VFL3.....   | 75  |
| <br>   |     |
| <b>VI) <u>Résultats</u></b> .....  | 79  |
| 1) <u>Résumé</u> .....   | 81  |
| 2) <u>Article</u> .....  | 89  |
| <br>   |     |
| <b>VII) <u>Discussions</u></b> .....   | 143 |
| <br>   |     |
| <b>VIII) <u>Références bibliographiques</u></b> .....  | 169 |



## TABLE DES FIGURES

**Figure 1** : Structure des cils

**Figure 2** : Structure des corps basaux

**Figure 3** : Cycle cellulaire et duplication des centrioles dans les cellules monociliées de mammifères

**Figure 4** : Amplification des centrioles au cours de la différenciation des cellules multiciliées

**Figure 5** : La duplication des corps basaux chez la paramécie

**Figure 6** : Conservation et diversité structurales de la zone de transition

**Figure 7** : Structures associées au centriole et au corps basal

**Figure 8** : Les fibres de transition

**Figure 9** : Variabilité du nombre de pieds basaux selon les différents types cellulaires

**Figure 10** : La diversité d'organisation de la racine striée chez les métazoaires

**Figure 11** : Les racines striées chez *Chlamydomonas* et la paramécie

**Figure 12** : L'initiation de la croissance ciliaire peut se faire par deux voies distinctes

**Figure 13** : L'assemblage du cil

**Figure 14** : L'ubiquité ciliaire explique l'effet pléiotrope des ciliopathies

**Figure 15** : La paramécie, protozoaire cilié : organisation générale

**Figure 16** : Organisation stéréotypée des corps basaux chez la paramécie

**Figure 17** : La zone de transition chez la paramécie

**Figure 18** : Structures associées aux corps basaux chez la paramécie

**Figure 19** : Schéma de duplication des corps basaux chez la paramécie

**Figure 20** : Conséquence de la déplétion d'une protéine impliquée dans l'ancrage chez la paramécie : exemple de FOR20

**Figure 21** : Différence ultrastructurale des corps basaux observés après déplétion de FOR20, de la Centrine 2 ou de la Centrine 3

**Figure 22** : Inter-relation des protéines FOR20, Centrine 2 et Centrine 3

**Figure 23**: Localisation et cinétique de recrutement de Myc-VFL3-1



## Avant-propos

Les cils sont des organites dont la structure et la composition en protéines ont été très conservées au cours de l'évolution. On les retrouve à la surface de cellules de la plupart des espèces eucaryotes qu'elles soient uni ou pluricellulaires, à l'exception des plantes terrestres et de la plupart des champignons supérieurs. Si leurs rôles moteurs et sensoriels sont connus depuis longtemps, les travaux réalisés ces dernières années ont mis en évidence leur implication primordiale dans le développement et le fonctionnement des cellules des vertébrés, en particulier chez l'homme. Ceci a conduit de nombreux laboratoires de recherche à s'investir dans la compréhension des mécanismes impliqués dans leur assemblage et leur fonctionnement.

La ciliogenèse est conditionnée par l'accrochage et le positionnement correct au niveau de la membrane cellulaire du corps basal, une structure qui sert de socle pour l'échafaudage de la structure ciliaire. C'est à ces mécanismes d'ancrage et de positionnement des corps basaux que je me suis intéressé au cours de ma thèse en utilisant la paramécie comme modèle. Chez cet organisme, 3 protéines conservées au cours de l'évolution : la Centrine 2, la Centrine 3 et FOR20, intervenant de façon séquentielle dans l'assemblage des corps basaux, sont nécessaires à cet ancrage (Aubusson-Fleury et al., 2012).

J'ai entrepris l'analyse fonctionnelle de deux autres protéines potentiellement impliquées dans ce mécanisme chez la paramécie, OFD1 et VFL3/CCDC61. Étudiée abondamment, OFD1 joue un rôle essentiel dans l'assemblage des appendices distaux indispensables à l'ancrage des corps basaux des cils primaires mais sa fonction dans l'assemblage des cils motiles reste encore peu connue. En ce qui concerne VFL3, il existe à ce jour dans la littérature peu d'études qui lui soient essentiellement dédiées. Celle réalisée chez *Chlamydomonas* dans les années 1980 suggérait néanmoins qu'elle pouvait jouer un rôle dans ce processus d'ancrage (Wright et al., 1983).

Dans une introduction générale, je ferai une brève revue concernant la structure générale du cil, du corps basal et de la zone de transition. Je décrirai par la suite les structures et les fonctions des appendices associés à ces corps basaux avant de faire un point sur les différentes étapes de la ciliogenèse. Je présenterai enfin les caractéristiques générales de la

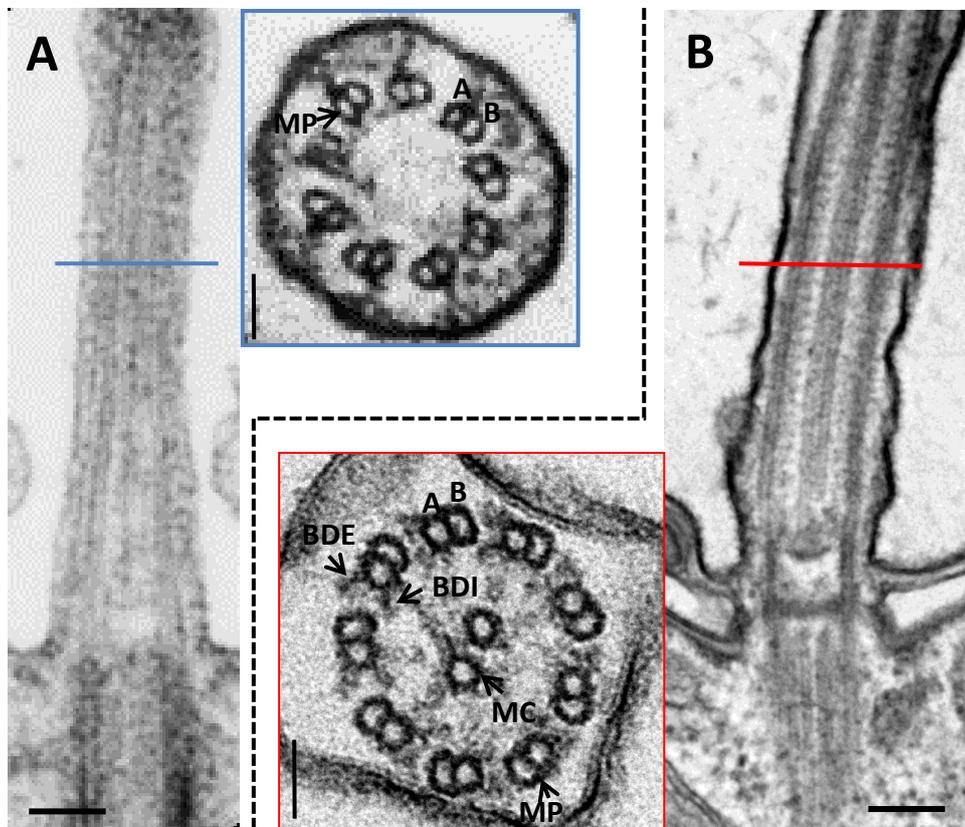


paramécie, l'organisation et la structure de ses corps basaux et des appendices qui leur sont associés.

Dans un second temps, je présenterai l'état de nos connaissances sur les protéines impliquées dans l'ancrage chez la paramécie ainsi que sur mes deux protéines d'intérêts, OFD1 et VFL3/CCDC61, puis les résultats obtenus au cours de ma thèse seront décrits sous forme d'un article. Enfin une discussion viendra clore ce manuscrit.



# **Introduction générale**



### **Figure 1: Structure des cils**

**Coupes longitudinales et transversales d'un cil primaire du tube neural de souris (A) (d'après Liem et al., 2012) et d'un cil motile de paramécie (B).** Les cils sont constitués de 9 doublets de microtubules dits périphériques (MP), les microtubules A complets et les microtubules B incomplets imbriqués dans ces derniers. A l'inverse des cils primaires (A), les cils motiles (B) contiennent des bras de dynéines internes (BDI) et externes (BDE), associés aux microtubules A (encadré rouge), qui permettent leur motilité. Ces derniers possèdent généralement une paire centrale de microtubules (MC). Barre d'échelle horizontale: 200 nm, barre d'échelle verticale: 50 nm.

## **I) Structure générale du cil**

Les cils et les flagelles sont des extensions cellulaires assemblées à partir d'un corps basal et composées d'un corps cylindrique microtubulaire, l'axonème, entouré par une membrane ciliaire prolongeant la membrane plasmique. Bien qu'en continuité, ces deux membranes sont de compositions protéiques et lipidiques différentes faisant du cil un véritable compartiment distinct du corps cellulaire. Le filtrage des protéines destinées au compartiment ciliaire est assuré par une structure appelée zone de transition, localisée entre le cil et le corps basal.

### **1) Le compartiment ciliaire**

L'axonème est composé de 9 doublets de microtubules disposés en cylindre. Les microtubules sont formés de dimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ . Ces hétérodimères s'assemblent en « tête à queue » pour former 1 protofilament. Les paires de microtubules sont constituées d'un microtubule A dit complet car composé de 13 protofilaments dans lequel s'imbrique le microtubule B dit incomplet du fait qu'il est composé de 10 protofilaments. Il existe deux grandes catégories de cils : les cils motiles et les cils non motiles qui peuvent être présents en grand nombre ou en unique exemplaire à la surface cellulaire.

#### **A) Cils non motiles**

##### *a) Structure*

Souvent présent en unique exemplaire à la surface cellulaire, ce type de cils, appelé cil primaire ne possède généralement pas de paire centrale de microtubules (structure 9+0) (figure 1A). On compte parmi cette catégorie, les cils associés à la surface de cellules différenciées, tels que les cils connecteurs des cellules des cônes et bâtonnets de la rétine ou les cils des neurones olfactifs, et les cils qui se développent transitoirement en phase quiescente à la surface des cellules de presque tous les tissus des mammifères. Ces derniers se désassemblent lorsque les cellules reprennent leur phase proliférative, leur corps basal étant alors reconverti en centriole pour jouer son rôle au sein du centrosome dans l'assemblage du fuseau mitotique au cours de la division. A la fin de la phase proliférative, lorsque les cellules



rentrent de nouveau en quiescence, un centriole de chaque cellule migre à la membrane pour assembler un nouveau cil.

Il existe des exceptions à la règle  $9+0$  = cil non motile et unique. Par exemple, les kinocils non motiles de la cochlée présentent une structure  $9+2$  tout comme les nombreux cils non motiles présents à la surface des neurones olfactifs.

#### *b) Fonction*

On connaît depuis de nombreuses années le rôle sensoriel de ce type de cils des cellules différenciées. Par exemple les photorécepteurs présents au niveau des membranes des cônes et bâtonnets de la rétine reçoivent et transmettent les signaux visuels tandis que des chimiorécepteurs localisés au niveau des cils des neurones olfactifs transmettent les signaux permettant de percevoir les odeurs. On peut aussi citer les mécanorécepteurs au niveau des cils de l'épithélium rénal qui perçoivent le flux urinaire et vont ainsi moduler l'activité cellulaire.

Plus récemment on a démontré que le cil primaire transitoire fonctionne également comme une véritable antenne cellulaire. Il capte, grâce à ses récepteurs, les signaux de son environnement qu'il transmet à la cellule via différentes voies de signalisation. Il joue un rôle crucial dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux tels que la différenciation, la prolifération (Irigoin and Badano, 2011) ou la morphogénèse. Par exemple ces cils sont impliqués dans les voies de signalisation Hedgehog, Wnt, polycystine ou mTOR impliquées dans la progression du cycle cellulaire et les processus de cancérisation.

### B) Les cils motiles

#### *a) Structure*

Cette catégorie de cils possède neuf doublets de microtubules qui entourent généralement une paire de microtubules centraux (structure  $9+2$ ) reliés entre eux par des ponts radiaux. De plus sur chaque microtubule complet sont accrochés deux bras de dynéines (un bras interne et un bras externe) qui permettent la motilité (figure 1B). Grâce à leurs



activités ATPasique, elles font glisser les doublets de microtubules périphériques les uns par rapport aux autres engendrant ainsi le battement ciliaire.

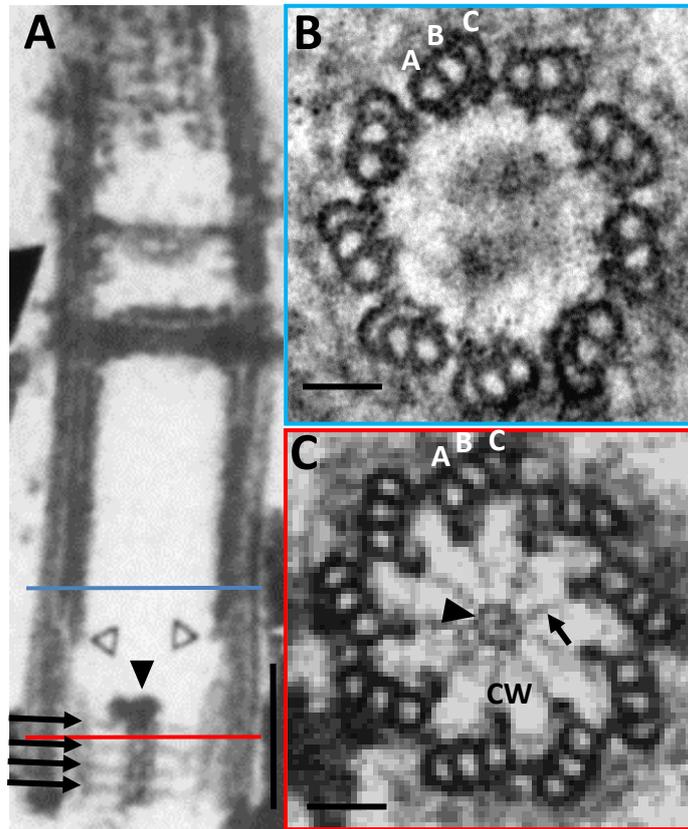
Il existe également des exceptions à la règle, cils motiles = structure 9+2. C'est le cas par exemple du monocil nodal de structure 9+0, qui coexiste avec des cils de structure 9+2 (Casparly et al., 2007), présent à la surface des cellules du nœud embryonnaire, responsable du flux permettant l'établissement de l'asymétrie droite gauche chez les vertébrés (Nonaka et al., 1998).

### *b) Fonction*

Chez les vertébrés, plusieurs centaines de cils motiles tapissent la surface de cellules des épithéliums de la trachée, de l'oviducte et des ventricules cérébraux, on parle alors de cellules multiciliées. Leur battement crée des mouvements de fluide qui permettent respectivement de faire remonter du mucus de manière à débarrasser la trachée des impuretés, le mouvement de l'ovule vers l'utérus ou la circulation du liquide céphalorachidien. Le cil unique du spermatozoïde (aussi appelé flagelle) est utilisé par la cellule comme système de propulsion. C'est également le cas des cils présents à la surface d'un grand nombre d'unicellulaires comme la paramécie et chez certains pluricellulaires comme la planaire.

Les cils motiles, comme les cils primaires, contiennent à leur surface de nombreux récepteurs absents de la surface de la membrane plasmique et qui leur confèrent également des propriétés de senseurs de l'environnement (Bloodgood, 2010). Ainsi la présence de canaux cationiques de type TRP dans les cils des épithéliums respiratoires (Lorenzo et al., 2008) ou ceux de l'oviducte (Teilmann and Christensen, 2005) permettent de réguler le battement ciliaire en fonction de la viscosité du milieu.

Ce rôle de senseur des cils motiles, souvent négligé, n'est pas restreint aux métazoaires et se manifeste également chez les protistes. Chez la paramécie, la réversion du battement ciliaire qui lui permet d'éviter les obstacles met en jeu une voie de signalisation qui implique des canaux ciliaires (Machemer and Ogura, 1979). Le processus sexuel (conjugaison) chez l'algue verte *Chlamydomonas* est initiée par réaction de contact entre les



**Figure 2: Structure des corps basaux**

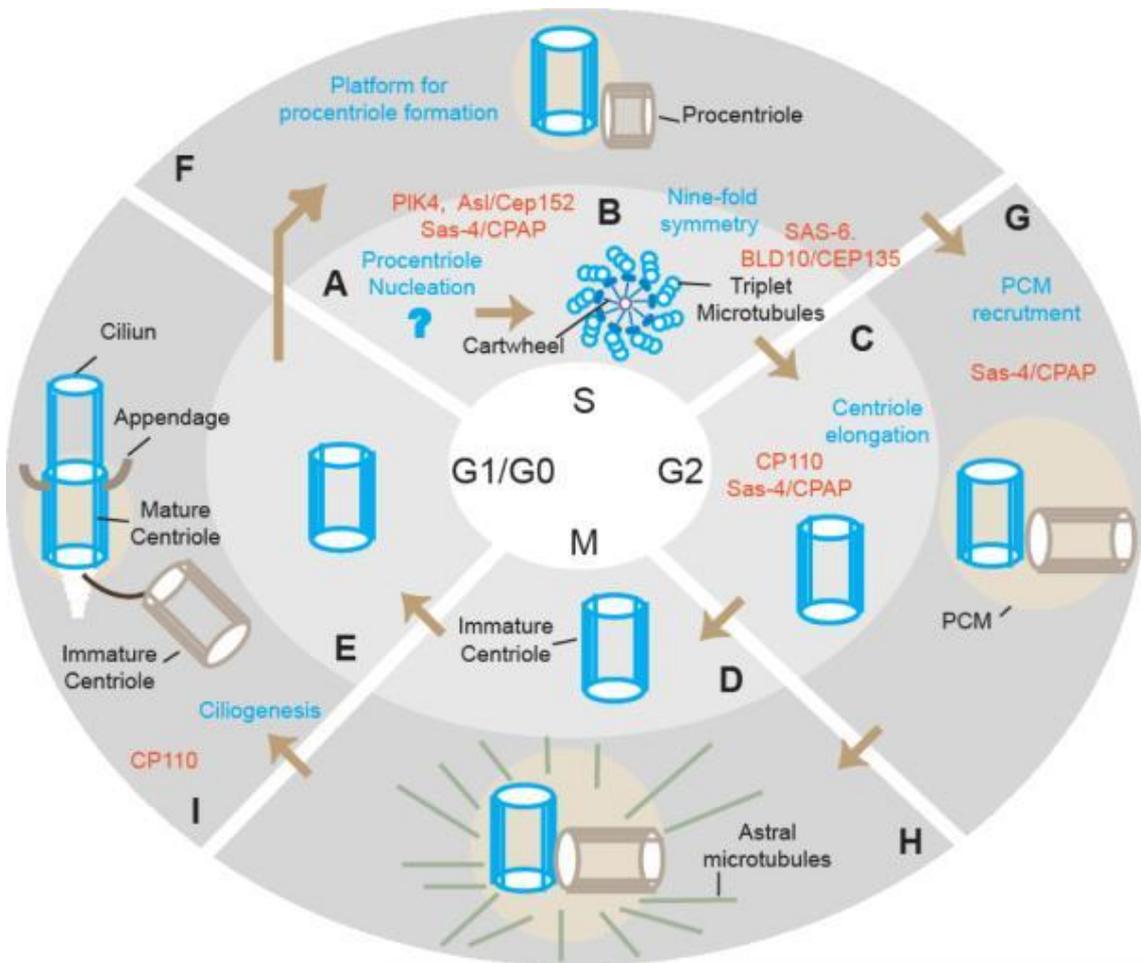
Coupes longitudinale (A) (d'après Iftode et al., 1996) et transversales (B, C) d'un corps basal de paramécie. Le corps basal est constitué de neuf triplets de microtubules A, B et C. Dans sa partie proximale (C) (encadré rouge) on retrouve une structure rappelant une roue de charrette (Cartwheel, CW) constitués de plusieurs structures chacune composée d'un anneau central (tête de flèche pleine) et de neuf rayons (flèches) (A,C) reliés aux microtubules A. En partie distale du corps basal (B) (encadré bleu) le CW est absent. Barre d'échelle verticale: 200 nm, barre d'échelle horizontale: 50 nm.

flagelles des gamètes déclenchant une voie de signalisation complexe qui induit une augmentation de l'AMPc intracellulaire et implique de nombreuses protéines kinases et adenylyclase ciliaires (Snell and Goodenough, 1992).

## 2) Le corps basal

C'est à la base du cil, ancré à la membrane plasmique que se situe le corps basal. Chez les métazoaires, c'est un centriole modifié. Il sert d'échafaudage à la construction du cil. Il est constitué de neuf triplets de microtubules A, B et C. Les microtubules B et C sont composés de 10 protofilaments et s'imbriquent respectivement dans le microtubule A complet et dans le microtubule B (figure 2). Chez la plupart des organismes le corps basal mesure en moyenne 400 à 500 nm de long et 200 nm de diamètre.

On retrouve à l'extrémité proximale du corps basal une structure en roue de charrette appelé cartwheel (CW) en anglais. Le CW est composé d'un empilement de structures constituées chacune d'un anneau central d'où émanent neuf rayons. Une structure en tête d'épingle lie la pointe de chaque rayon aux microtubules A (figure 2). Le nombre de structures empilées varie selon les organismes. On retrouve généralement un empilement de deux à une quinzaine de structures à l'exception de *Trychonympha*, un protozoaire zooflagellé. Cet organisme possède en effet un corps basal dont la longueur est près de dix fois supérieur à la moyenne et où un empilement d'une centaine de structures recouvre 90% de sa longueur (Gibbons and Grimstone, 1960; Guichard et al., 2012). D'autre part, le nombre de structures empilées peut varier au sein d'un même organisme durant son cycle cellulaire. C'est le cas chez *Spermatozopsis* (Lechtreck and Grunow, 1999) et *Chlamydomonas* (O'Toole and Dutcher, 2014), deux espèces d'algues vertes. Dans les cellules de mammifères, le CW est présent uniquement à la base du procentriole et disparaît dans les centrioles matures (Anderson, 1972; Alvey, 1986). Cependant certains rares organismes ne semblent pas posséder de CW. Chez *Caenorhabditis elegans*, Pelletier et collaborateurs montrent que les singlets de microtubules qui constituent le centriole sont organisés autour d'un tube central dans lequel aucune structure n'avait été observée (Pelletier et al., 2006). Néanmoins de rares images de microscopie électronique laissent supposer qu'une structure évoquant un CW puisse être présente à l'intérieur de ce tube central (Malone et al., 2003).



**Figure 3: Cycle cellulaire et duplication des centrioles dans les cellules monociliées de mammifères**  
**Schéma présentant la maturation du centriole, de son assemblage (A-E) à l'acquisition de ses structures associées (F-I).** Durant un premier cycle cellulaire, le centriole fils (en bleu) s'assemble (A-B) puis s'allonge (C), il est dit immature. Lors d'un deuxième cycle cellulaire il donne naissance à un nouveau centriole fils (en marron) (F) et va acquérir ses structures associées qui vont lui permettre de s'ancrer à la surface cellulaire. On le nomme alors corps basal. Certaines protéines clés impliquées dans l'assemblage et la maturation du centriole sont indiquées en orange (d'après Avidor-Reiss et al., 2013).

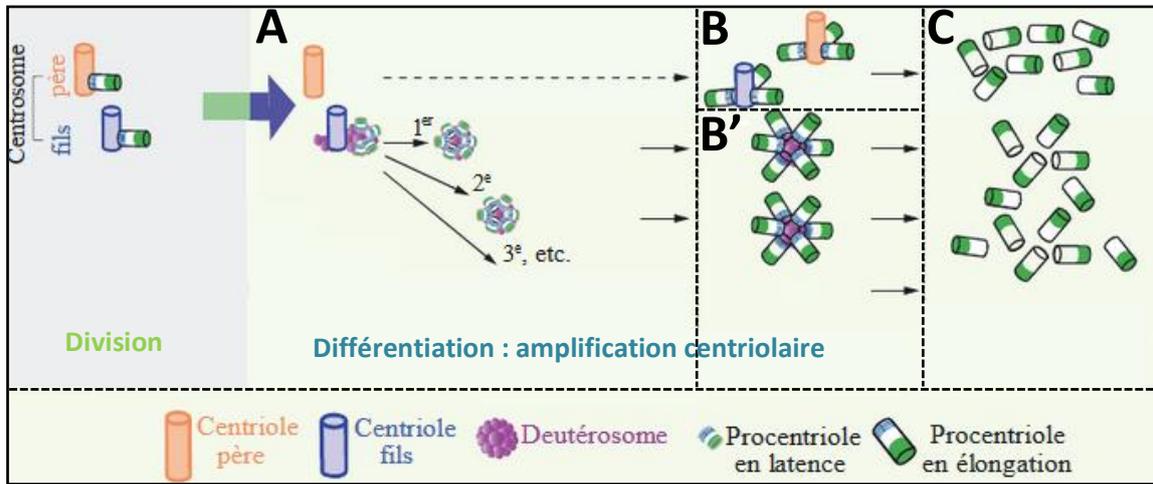
## A) Maturation et conversion du centriole en corps basal

### a) *Cellules monociliées*

Chez les métazoaires, le corps basal des cils primaires est élaboré à partir d'un des deux centrioles qui organisent le centrosome des cellules. Ces deux centrioles sont entourés par un nuage de granules fibreux denses appelé la matrice péricentriolaire. Générés au cours du cycle cellulaire précédent, les deux centrioles présentent des différences structurales liées à leur mode de duplication. Le plus ancien, qualifié de centriole père et dit mature, se distingue de son fils par la présence dans sa partie distale de structures associées caractéristiques : les appendices distaux et subdistaux. Durant la phase S du cycle cellulaire un nouveau centriole se développe à la base de chacun des deux centrioles préexistants (père comme fils). En fin de mitose chaque cellule fille reçoit donc un centriole néoformé associé dans l'une d'elle à l'ancien centriole père et dans l'autre à l'ancien centriole fils. Au cours de ce cycle, les appendices distaux et subdistaux commencent à s'assembler sur l'ancien centriole fils devenu mature. Il se passe donc deux cycles cellulaires avant que les centrioles deviennent matures (figure 3). Lorsque les cellules destinées à devenir ciliées entrent en phase quiescente, des changements structurels des centrioles s'opèrent et de nouvelles structures annexes caractéristiques du corps basal apparaissent. Il s'agit des fibres de transition, des pieds basaux et des racines striées.

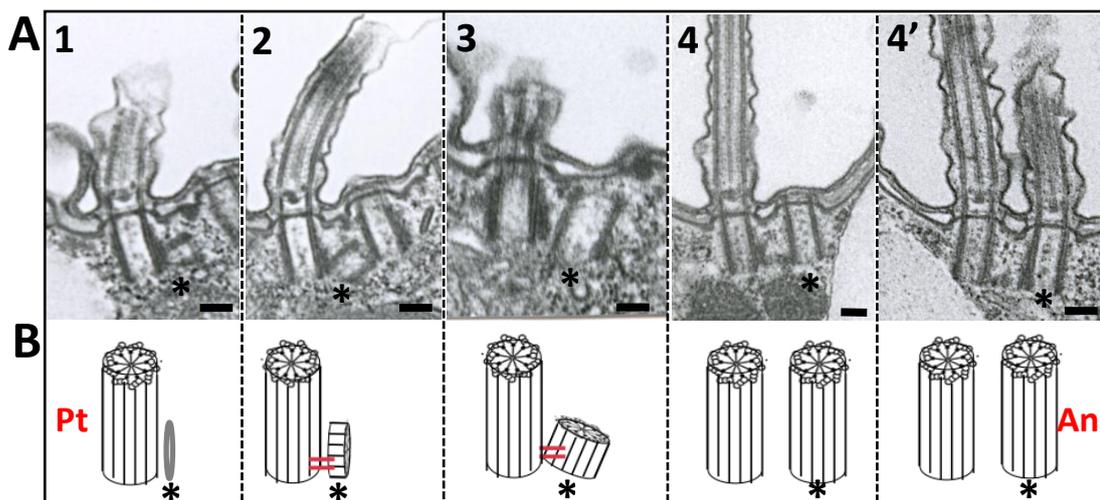
### b) *Cellules multiciliées*

Dans les cellules multiciliées de métazoaires, deux modes d'assemblage des corps basaux ont été décrits dans les années 1960. Si la biogenèse de quelques procentrioles initiée au voisinage des centrioles préexistants avait été décrite, la plupart d'entre eux semblaient engendrés « de novo » à partir de structures denses aux électrons appelées deutérosomes (Sorokin, 1962). L'existence de cet assemblage *de novo* a été remise en question par des résultats récents qui démontrent que les deux types d'assemblage sont dépendants de structures centriolaires. Des études réalisées *in vitro* sur des cellules multiciliées épandymaires en cours de différenciation montrent en effet que la formation du deutérosome s'établit toujours au niveau proximal du centriole fils. C'est à partir de cette structure de composition moléculaire encore peu connue que s'assemblent des dizaines de procentrioles.



**Figure 4: Amplification des centrioles au cours de la différenciation des cellules multiciliées**

Schéma présentant l'amplification des centrioles conduisant à la formation des centaines de cils qui tapissent la surface des cellules multiciliées. Lors de la différenciation (A), plusieurs dizaines de procentrioles s'assemblent à partir de deutérosomes (en rose) qui apparaissent dans la partie proximale du centriole fils (en bleu). Ceci met en exergue une asymétrie des centrioles au sein du centrosome. A ce stade nommé « halos » il y a une accumulation de deutérosomes dans le cytoplasme, les procentrioles qui en émanent ayant tous une taille identique. Au cours d'une seconde étape (B'), nommée « fleur » les procentrioles s'allongent et maturent simultanément. En parallèle (B), des procentrioles s'assemblent dans la partie proximale des centrioles pères et fils en suivant un schéma de duplication centriolaire. Les centrioles matures (C) migreront et s'ancreront à la surface cellulaire afin de nucléer un cil (d'après d'Al Jord et al., 2015).



**Figure 5: La duplication des corps basaux chez la Paramecie**

Observation en microscopie électronique (A) (d'après Iftode and Fleury-Aubusson, 2003) et schématisation (B) (d'après Ruiz et al, 2005) des différentes étapes de la duplication. Le nouveau corps basal (astérisque) se duplique toujours à l'avant du corps basal préexistant. La duplication s'initie par l'apparition d'une ébauche du nouveau corps basal (1), suivi de l'élongation des microtubules (2), du relèvement du corps basal (3), de l'ancrage de ce dernier à la membrane plasmique (4) parfois suivi de l'assemblage du cil selon les régions de la paramecie (4'). An: antérieur, Pt: postérieur, barre d'échelle: 200 nm.

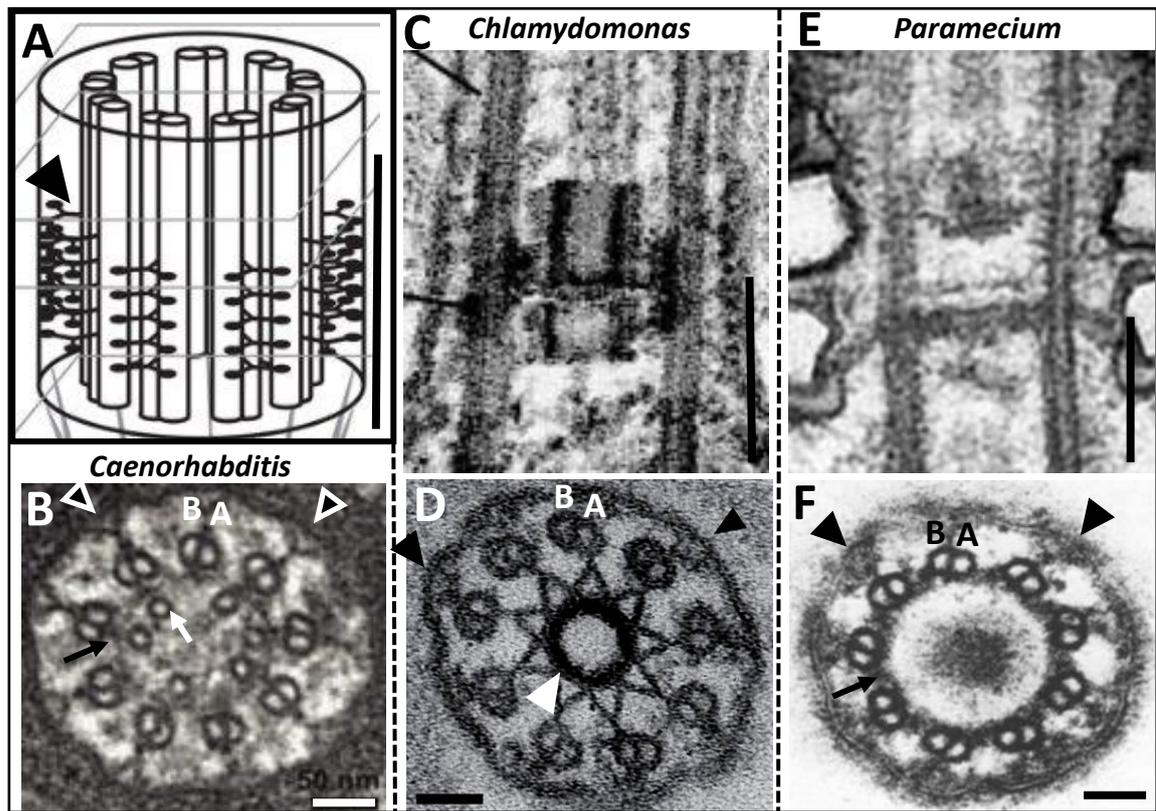
Plusieurs deutérosomes vont ainsi se former successivement et s'accumuler dans le cytoplasme jusqu'à produire les centaines de procentrioles. A ce stade tous les procentrioles ont la même taille. Ils vont ensuite s'allonger de manière synchrone afin de devenir des centrioles matures capables de migrer et de s'ancrer à la surface cellulaire. Cette étude montre donc que l'amplification centriolaire au sein des cellules multiciliées est orchestrée par une seule et unique voie dépendante du centrosome (Al Jord et al., 2014) (figure 4).

Chez la paramécie comme chez de nombreux ciliés, on ne retrouve pas d'intermédiaire centriolaire. En effet la duplication du corps basal s'établit à partir d'un corps basal préalablement ancré à la membrane cellulaire (Dippell, 1968) (figure 5). De plus, l'ancrage du corps basal n'est pas systématiquement couplé à l'assemblage du cil.

## B) Assemblage

Dans les cellules monociliées, l'assemblage de nouveau centriole se fait perpendiculairement au centriole père. Le site de nucléation est défini par la présence d'une kinase clé, Plk4 (Polo like kinase 4) chez les mammifères, (ZYG1 chez *Caenorhabditis*, Sak chez la *Drosophile*) dont le recrutement dépend de CEP152 (Asterless chez la *Drosophile*), CEP192 (SPD2 chez *caenorhabditis*) et de CEP63 (Sir et al., 2011; Conduit et al., 2015). Cette kinase permet le recrutement de SAS6 (Leidel et al., 2005), une protéine constitutive du CW (Nakazawa et al., 2007) dont la structure intrinsèque et l'auto assemblage jouent un rôle important dans l'établissement de la symétrie 9 du centriole (van Breugel et al., 2011; Kitagawa et al., 2011). L'assemblage du CW requiert également la protéine SAS5 (Ana2 chez la *Drosophile* et STIL chez l'homme).

Dans les cellules multiciliées, Plk4 et CEP152 sont nécessaires à la fonction du deutérosome alors que Deup1 (un paralogue de CEP63) est le constituant essentiel à sa formation (Klos Dehring et al., 2013; Zhao et al., 2013). CCDC78 permet le recrutement de CEP152 et semblerait ainsi indispensable à l'amplification centriolaire (Klos Dehring et al., 2013).



**Figure 6: Conservation et diversité structurales de la zone de transition**

Schématisation de la zone de transition (A) (d'après Czarnecki 2012), coupes longitudinales et/ou transversales de *Caenorhabditis elegans* (B) (d'après Czarnecki 2012), de *Chlamydomonas reinhardtii* (C, D) (d'après Piasecki and Silflow, 2009) et de *Paramecium tetraurelia* (E, F) (d'après Dute and Kung, 1978). Une partie des structures de la zone de transition est conservée. Elle est composée de neuf doublets de microtubules périphériques A et B reliés via des structure nommées Y-links (têtes de flèche noires) au collier ciliaire (non visible) situé au niveau de la membrane ciliaire (A, B, D, F). Un anneau central reliant les neufs doublets de microtubules (flèche noire) est présent chez certains organismes, tels que la Paramécie (F) et *Caenorhabditis* (B). On observe cependant une diversité structurale inter-espèces. Chez ces derniers, plusieurs microtubules se localisent à l'intérieur de l'axonème (flèche blanche) (B). On trouve chez *Chlamydomonas* (D) une structure en anneau (tête de flèche blanche), plus petite et plus dense aux électrons que l'anneau central retrouvé chez la paramécie ou *Caenorhabditis* précédemment décrit, d'où émanent des liens le reliant aux microtubules périphériques A. Barre d'échelle horizontale: 50 nm, barre d'échelle verticale: 200 nm.

L'assemblage et l'allongement des triplets de microtubules requièrent l'Alpha, la Beta et la Gamma tubuline mais dépendent également de tubulines divergentes telles que la Delta ou l'Epsilon tubuline. Leur stabilisation et leur élongation sont contrôlées par différentes protéines parmi lesquelles on compte SAS4 (Kohlmaier et al., 2009), POC1 (Pearson and Winey, 2009), POC5 (Azimzadeh et al., 2009) la Centrine 2 et CP110 (Schmidt et al., 2009) . Cette dernière est recrutée précocement au cours de l'assemblage et agit également comme un régulateur de la ciliogenèse (Spektor et al., 2007).

### **3) La zone de transition**

La sélection des protéines destinées à entrer ou à sortir du compartiment ciliaire se fait au niveau d'une structure appelée zone de transition (ZT). Localisée dans la partie proximale du compartiment ciliaire, elle est délimitée d'une part par les fibres de transition où s'établit le passage de 9 triplets en 9 doublets de microtubules et d'autre part par la paire centrale de microtubules et des liens en Y (Y-links) pour les cils motiles ou uniquement par les Y-links pour les cils primaires. Bien que l'architecture de cette zone diffère d'un organisme à l'autre et d'un type cellulaire à l'autre, certaines structures de cette zone sont conservées. C'est le cas notamment du collier ciliaire qui est composé de plusieurs rangées de particules intra-membranaires qui apparaissent comme des perles sur la surface externe de la membrane ciliaire et des Y-links qui les connectent aux doublets de microtubules externes. Récemment un anneau central reliant les doublets périphériques de microtubules a été décrit dans le cil non motile de *Caenorhabditis* (Schouteden et al., 2015). Il semble que celui-ci soit également présent au niveau de la ZT chez la paramécie (Dute and Kung, 1978) (figure 6).

#### **A) Composition moléculaire**

Deux grands complexes constitués de protéines conservées au cours de l'évolution, le complexe MKS (qui compte MKS1, MKS2, MKS3, MKS6, B9D1, B9D2, TMEM 231, TMEM237, TMEM17, TMEM107, TCTN1-2 et 3...) et le complexe NPHP (NPHP1 et NPHP4,) (Huang et al., 2011; Williams et al., 2011; Lambacher et al., 2016) agissent en coopération avec la protéine CEP290 pour assurer d'une part l'assemblage de cette ZT en particulier celle des Y-links et d'autre part la fonction de filtre. Des BLASTs réciproques

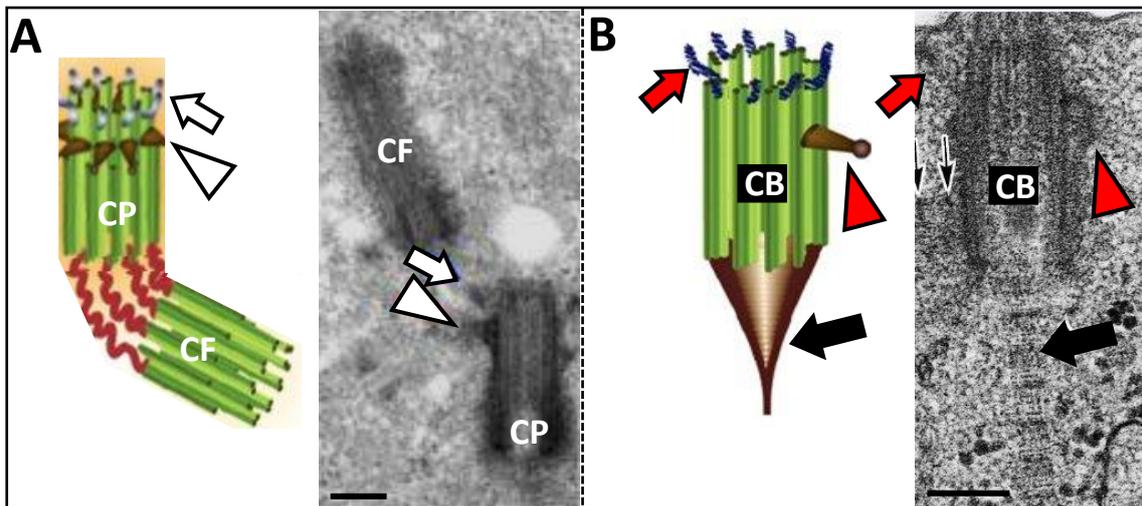


réalisés au laboratoire ont permis de déterminer que la grande majorité de ces protéines sont conservées chez la paramécie à l'exception de NPHP1 et TMEM237. Ceci semble confirmer par une analyse en bio-informatique (Barker et al., 2014).

Il existe des incertitudes quant à la fonction et la localisation de CEP290. Alors que la protéine semble localisée entre les microtubules et la membrane ciliaire et que sa mutation induit des défauts d'assemblage des Y-links chez *Chlamydomonas* (Craigie et al., 2010), sa fonction structurale chez *Caenorhabditis* semble être encore discutée. En effet alors que Schouteden et ses collaborateurs montrent que des mutants de CEP290 ont perdu l'anneau central mais conservé les Y-links, Li et ses collaborateurs montrent que cette perte est également associée à celle des Y-links chez ces mutants (Schouteden et al., 2015; Li et al., 2016).

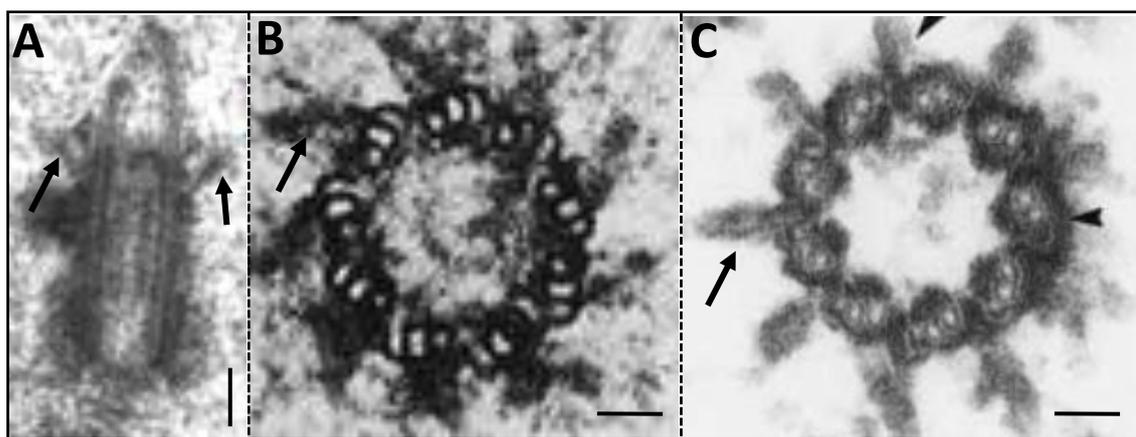
## B) Assemblage

Les données obtenues sur les cellules de mammifères et chez *Caenorhabditis* semblent indiquer que l'assemblage de la ZT se fait en même temps que la construction de l'axonème. En effet les protéines impliquées dans la construction de la ZT telles que CEP290 sont recrutées dans la partie distale du corps basal avant la formation de la vésicule ciliaire, étape précoce de la ciliogenèse (Lu et al., 2015). Une cascade moléculaire a pu être décrite permettant d'établir une hiérarchisation de recrutement des protéines du complexe MKS chez *Caenorhabditis*. Il a en effet été montré que MKS5 est nécessaire au recrutement de toutes les protéines du complexe MKS et en particulier des protéines MKS2, B9D1, B9D2 et TMEM 231 constituant la deuxième série de recrutement. Ces dernières permettent le recrutement de TMEM 107 qui, à leur tour, permettent le recrutement de MKS3, MKS6, TMEM 17 et TMEM 237 (Lambacher et al., 2016). En plus d'être un facteur central de l'assemblage du complexe MKS, MKS5 est nécessaire à la localisation des protéines du complexe NPHP (Williams et al., 2011) et de CEP290 (Li et al., 2016) au niveau de la zone de transition. CEP290 semble jouer également un rôle majeur dans le recrutement des protéines du complexe MKS et permettrait de stabiliser MKS5 (Li et al., 2016). Le lien existant entre ces 2 complexes serait donc MKS5. Il existe par ailleurs des chevauchements de fonction entre protéines des 2 complexes (Yee et al., 2015) ce qui pourrait suggérer qu'ils interagissent physiquement.



**Figure 7: Structures associées au centriole (A) et au corps basal (B)**

Coupes longitudinales et schématisations (adapté de Carvalho-Santos et al., 2011) d'un centriole d'une cellule embryonnaire de carcinome (A) (d'après Tateishi et al., 2013) et d'un corps basal observé au niveau d'une cellule épithéliale de l'oviducte (B) (d'après Hagiwara et al., 2002). (A) Le centriole mature dit centriole père (CP) possède dans sa partie distale des appendices distaux (flèche blanche) et subdistaux (tête de flèche blanche) associés tous deux à chaque triplet de microtubules. Le centriole immature dit centriole fils (CF) est dépourvu de toute structure associée. (B) Le corps basal possède dans sa partie distale les fibres de transition (flèche rouge) qui émanent de chaque triplet de microtubules, un pied basal (tête de flèche rouge) et une racine striée (flèche noire). Barre d'échelle: 200 nm.



**Figure 8: Les fibres de transition**

Coupe longitudinale d'un corps basal d'une cellule embryonnaire de carcinome (A) (d'après Tateishi et al., 2013) et coupes transversales de corps basaux d'un cil primaire de souris (B) (d'après Garcia and Reiter, 2016) et d'un cil motile de *Chlamydomonas* (C) (d'après Geimer and Melkonian, 2004). Les fibres de transition (flèches noires) émanent de chaque triplet de microtubule. Barre d'échelle horizontale: 50 nm, barre d'échelle verticale: 200 nm.

## **II) Structures associées au corps basal**

Quels que soient les organismes, on retrouve toujours des structures associées aux corps basaux. Chez les mammifères, il s'agit des fibres de transition, des racines striées et des pieds basaux.

Chez les métazoaires, ces structures se développent lors de la différenciation des centrioles en corps basaux. Les analogies structurales observées entre les fibres de transition et appendices distaux d'une part et les similitudes fonctionnelles des pieds basaux et appendices subdistaux d'autre part laissent penser que les appendices distaux et subdistaux sont respectivement à l'origine de la formation des fibres de transition et des pieds basaux (Sorokin, 1962; Anderson, 1972) (figure 7). Cependant ce n'est que récemment que des données moléculaires supportent cette hypothèse. En effet des dysfonctionnements de protéines impliquées dans la formation de ces appendices distaux et subdistaux des centrioles entraînent généralement des défauts d'assemblage des cils, corrélés à des défauts d'assemblage des structures associées (Kunimoto et al., 2012; Tateishi et al., 2013; Azimzadeh, 2014).

### **1) Les fibres de transition**

Ces structures, dont la forme et l'organisation évoquent les pales d'un moulin à vent, délimitent le corps basal et la zone de transition. Au nombre de 9, elles lient les microtubules les plus externes (microtubules C) à la membrane plasmique apicale du corps cellulaire (figure 8).

#### **A) Composition moléculaire**

On connaît à ce jour cinq composants majeurs des appendices distaux qui sont indispensables à la ciliogenèse. Il s'agit de CEP83 (Joo et al., 2013), CEP164 (Graser et al., 2007), CEP 89 (Sillibourne et al., 2013), SCLT1 (sodium channel and clathrin linker 1) et FBF1 (fas binding factor 1) (Wei et al., 2013). La déplétion de chacune de ces protéines a été réalisée en visualisant l'effet sur la localisation des quatre autres protéines (Tanos et al., 2013). Ainsi une cascade moléculaire a pu être établie dont CEP83 est le constituant central.



En effet sa déplétion a pour effet l'absence totale des quatre autres composants au niveau des appendices distaux. La déplétion de SCLT1 abolit la localisation de CEP164 et FBF1 aux appendices distaux et non celle de CEP89. CEP89 et SCLT1 sont donc recrutés indépendamment. La déplétion d'une de ces cinq protéines abolit complètement la ciliogenèse dans les cellules RPE1 (Tanos et al., 2013). De façon surprenante, plus de la moitié des fibroblastes de peau de patients mutés pour CEP83 sont ciliées (Failler et al., 2014). Ces cellules semblent d'ailleurs être capables de recruter CEP89 (mais pas CEP164) au centrosome. Chez ces patients, la mutation de CEP83 pourrait entraîner une déficience partielle de l'assemblage des appendices distaux aboutissant à une ciliogenèse occasionnelle. Des pathologies ciliaires sont aussi associées à des mutations dans les gènes *CEP164* (Chaki et al., 2012) et *SCLT1* (Adly et al., 2014).

## B) Assemblage

Au moins quatre protéines qui ne sont pas des constituants des appendices distaux conditionnent leur formation: ODF2 (Outer dense fiber 2), OFD1 (Oro facial digital syndrome 1), C2CD3 (C2 calcium dependent domain containing 3) et DZIP1 (DAZ-interacting zinc finger protein 1). Mis à part OFD1, les trois autres protéines sont aussi impliquées dans l'assemblage des appendices subdistaux.

Toutes deux localisées au niveau des satellites centriolaires ainsi qu'à l'extrémité distale des centrioles, OFD1 et C2CD3 interagissent physiquement et contrôlent l'élongation de ces derniers (Thauvin-Robinet et al., 2014). Elles sont toutes deux nécessaires au recrutement de CEP164 (Singla et al., 2010; Ye et al., 2014), il a de plus été démontré que C2CD3 est également indispensable au recrutement des quatre autres constituants des appendices distaux (SCLT1, CEP83, CEP89 et FBF1) (Ye et al., 2014).

ODF2, initialement décrit comme un constituant majoritaire des fibres denses qui entourent l'axonème du spermatozoïde (Brohmann et al., 1997), est enrichie à l'extrémité distale du centriole père (Nakagawa et al., 2001) et se localise également aux corps basaux (Schweizer and Hoyer-Fender, 2009). L'incapacité des centrioles pères à recruter les différents composants des appendices distaux et subdistaux dans des cellules souches de carcinomes (cellules F9) *ODF2* *-/-* a permis de démontrer l'implication de ce dernier dans la



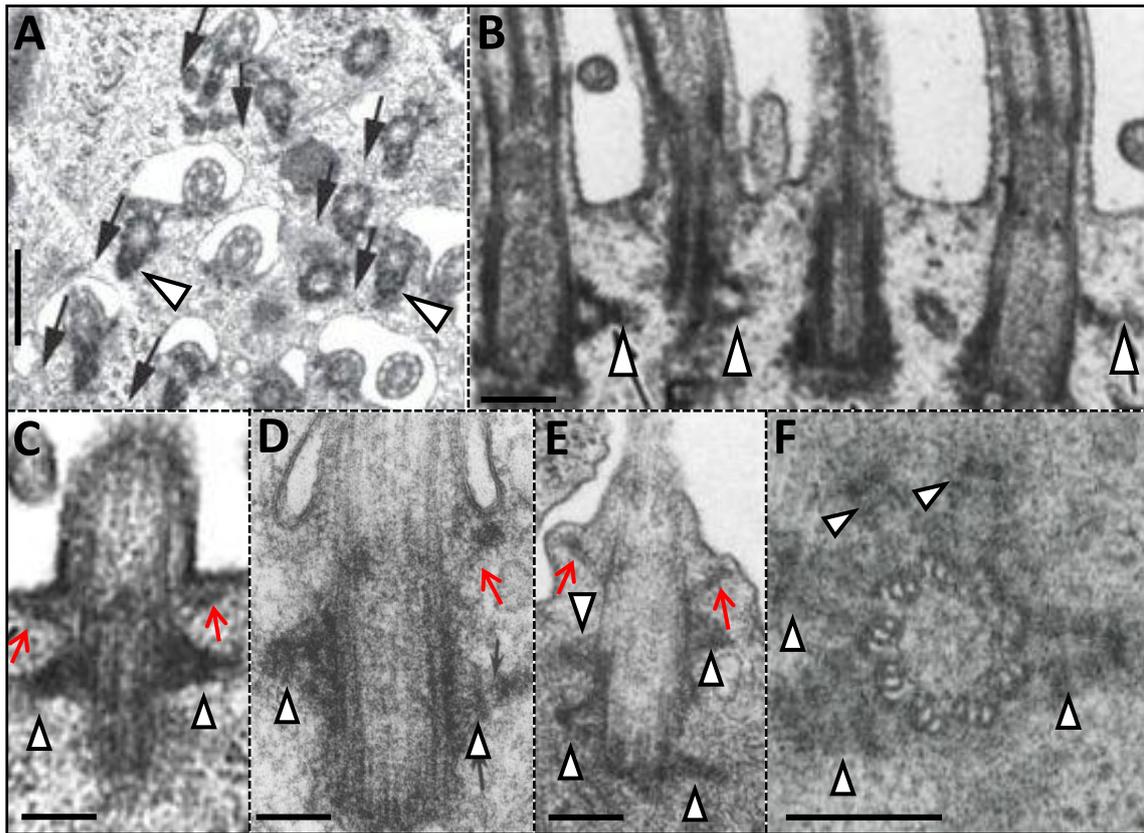
genèse de ces structures (Ishikawa et al., 2005). Dans la souris *ODF2*  $\Delta 6,7/\Delta 6,7$  un ARNm tronqué contenant uniquement la partie 3' est faiblement exprimée dans les cellules multiciliées de la trachée et du cerveau. On observe dans ces deux types cellulaires la perte exclusive des pieds basaux au niveau des corps basaux possédant les fibres de transition permettant l'ancrage et la formation des cils. La transfection de la partie C-terminale d'*ODF2* dans les cellules F9 *ODF2*  $-/-$  rétablit la formation du cil (Kunimoto et al., 2012). Ces résultats suggèrent que la région C-terminale d'*ODF2* est impliquée dans la formation des fibres de transition et la région N-terminale dans la formation des pieds basaux. Par la suite, des expériences de transfection par des constructions permettant l'expression de différentes protéines tronquées ont permis de confirmer ces résultats (Tateishi et al., 2013).

DZIP1 est une protéine retrouvée au niveau du corps basal et qui colocalise avec CEP164 au niveau des appendices distaux et avec la Ninéine au niveau des appendices subdistaux. Des fibroblastes embryonnaires de souris mutantes pour DZIP1 ont perdu la localisation de CEP164 et de la Ninéine respectivement au niveau des appendices distaux et subdistaux. Ces cellules mutées sont dépourvues de cils primaires (Wang et al., 2013).

### C) Fonction

Les appendices distaux/ fibres de transition jouent un rôle primordial dans l'interaction corps basal - structure membranaire qui constitue une des premières étapes de la ciliogenèse (Singla et al., 2010; Tanos et al., 2013). La localisation de particules IFTs à l'extrémité distale des centrioles pères dans les cellules de mammifères et au niveau des fibres de transition chez *Chlamydomonas* (Deane et al., 2001) indiquent qu'elle constitue également un site de stockage et d'ancrage des composants ciliaires. FBF1 semble d'ailleurs nécessaire au recrutement des particules IFTs à la base du cil (Wei et al., 2013).

Une structure similaire aux fibres de transition est observée dans la zone de transition des cils chez la paramécie (Dute and Kung, 1978). Néanmoins parmi tous les composants nécessaires à la formation et à la constitution de ces fibres de transition, seules CEP164 et OFD1 semblent conservées.



**Figure 9: Variabilité du nombre de pieds basaux selon les différents types cellulaires**

Coupes longitudinales ou transversales de corps basaux de différents types cellulaires: cellules épendymaires de souris (A) (d'après Tissir et al., 2010), cellules multiciliées (B) et monociliées (C) de l'épithélium de l'oviducte de lapin (d'après Odor Louise and Blandau Richard j. ), lignées cellulaires dérivées de cellules épithéliales de rein du rat kangourou (Ptk2) (D) (d'après Baron et al., 1991), cellules du myocarde humain (E) (d'après Myklebust and Kryvi, 1983) et cellules sécrétrices de l'oviducte humain (F) (d'après Hagiwara et al., 2008). Les pieds basaux (têtes de flèches blanches) se localisent généralement dans la partie médiane du corps basal. Ils sont retrouvés en unique exemplaire au niveau des cils motiles (A, B) et sont orientés dans la même direction (indiquée par les flèches noires) (A). Les pieds basaux retrouvés au niveau des corps basaux de cils primaires (C, D, E, F) peuvent être présents en multiples exemplaires. On observe sur ces différents corps basaux entre deux et cinq pieds basaux. Les fibres de transition sont indiquées par des flèches rouges (C, D, E). Barre d'échelle horizontale: 200 nm, barre d'échelle verticale: 500 nm.

## 2) Les pieds basaux

Le pied basal est une structure située généralement dans la région centrale du corps basal contrairement aux appendices subdistaux présents majoritairement dans la région distale du corps basal. On ne retrouve souvent qu'un seul pied basal sur les corps basaux des cellules multiciliées de métazoaires (figure 9). Ils sont associés à des triplets spécifiques du corps basal révélant l'asymétrie rotationnelle de ce dernier. Deux à neuf pieds basaux peuvent être associés aux cils primaires. De façon surprenante on observe sur des cellules de myocarde humain des pieds basaux situés à différents niveaux du corps basal (Myklebust and Kryvi, 1983) (figure 9). Les mécanismes par lesquels les appendices subdistaux se convertissent en pieds basaux au sein du corps basal semblent donc complexes. Cette structure n'est pas conservée chez la paramécie.

### A) Composition moléculaire

La Ninéine (Mogensen et al., 2000); la Centrioline (Hehnlly et al., 2012) la Gamma (Hagiwara et al., 2000), l'Epsilon (Chang et al., 2003) et la Zeta tubuline (Turk et al., 2015), CEP170 (Guarguaglini et al., 2005) ainsi que la Galectine 3 (Clare et al., 2014) sont associées aux appendices subdistaux/pieds basaux. La fonction exacte de ces protéines reste encore floue. Cependant on sait qu'elles jouent un rôle essentiel dans l'organisation et l'ancrage des microtubules au centriole/corps basal via les appendices subdistaux/pieds basaux.

### B) Assemblage

La plupart des données concernant la formation des pieds basaux sont dérivées des connaissances sur l'assemblage des appendices subdistaux. Si ODF2 est indispensable pour la localisation de la Ninéine et de la Centrioline aux appendices subdistaux (Tateishi et al., 2013), son recrutement dépend de CC2D2A qui est impliquée dans des ciliopathies (Veleri et al., 2014) et de C2CD3 (Thauvin-Robinet et al., 2014). Nécessaire pour la formation du pied basal des corps basaux et des appendices distaux des centrioles, la kinésine Kif3a est essentielle au recrutement de la Ninéine et de CEP170. Ce recrutement passe par l'intermédiaire d'une sous unité de la Dynactine p150glued (Kodani et al., 2013). La Ninéine joue un rôle essentiel dans l'ancrage des microtubules au niveau du pied basal en recrutant les

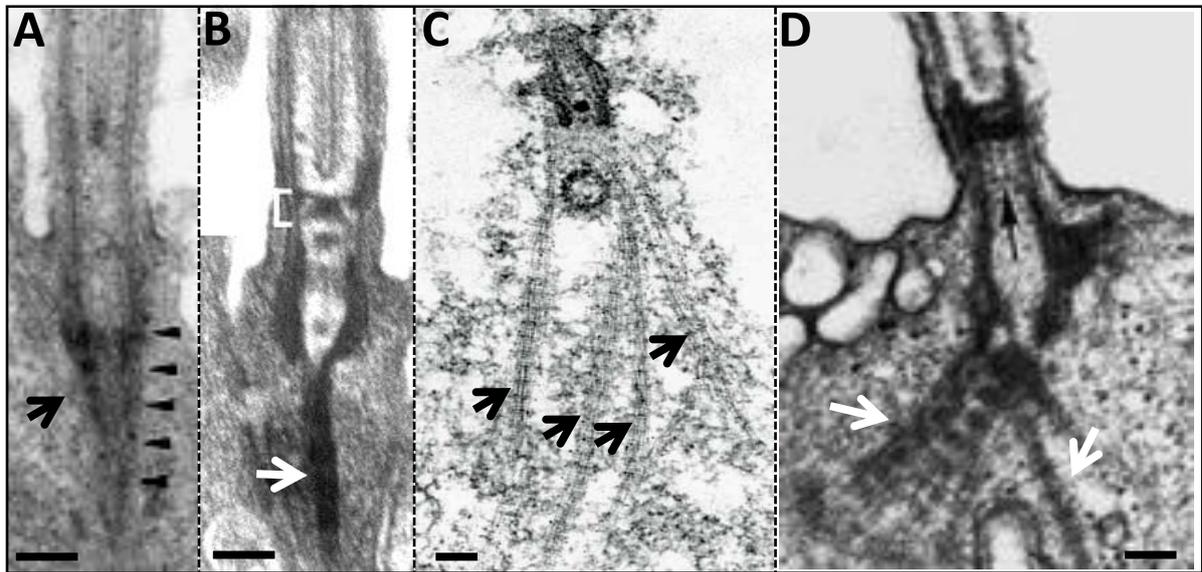


complexes Gamma-Turc (gamma-Tubulin Ring Complexes) qui permettent la nucléation des microtubules (Delgehr et al., 2005). Enfin la Galectine 3 est nécessaire au recrutement de la Gamma tubuline au pied basal (Clare et al., 2014).

### C) Fonction

Dans les cellules multiciliées, le battement ciliaire doit être coordonné pour permettre le déplacement efficace des fluides qui l'entourent ou celui de la cellule elle-même. Ceci nécessite que les cils d'une même cellule ou des différentes cellules composant un tissu soient correctement orientés les uns par rapport aux autres pour permettre un mouvement homogène (même sens et même direction). Dans ces cellules, les pieds basaux sont orientés parallèlement et pointent dans la direction du battement actif du cil. (Sorokin, 1968; Kunimoto et al., 2012; Clare et al., 2014). Dans les cellules multiciliées de métazoaire, cette orientation s'établit après l'ancrage des corps basaux à la membrane plasmique par l'intermédiaire de la signalisation PCP et par l'établissement d'un flux généré par le cil en cours de développement (Boisvieux-Ulrich et al., 1985; Mitchell et al., 2007). L'orientation anormale des corps basaux et la non coordination du battement ciliaire généralement observées dans les cellules multiciliées en l'absence des pieds basaux indiquent que ces structures jouent un rôle essentiel dans le positionnement correct à la membrane.

Le pied basal, tout comme les appendices subdistaux des centrioles, constitue un point d'ancrage des microtubules et est donc considéré depuis de nombreuses années comme un centre organisateur de microtubules (Sandoz et al., 1988). Cette hypothèse est étayée par le fait que son absence ou le dysfonctionnement des protéines qui lui sont associées telles qu'ODF2, la Galectine 3, la Ninéine, CC2D2A ou la Zeta tubuline conduisent généralement à des défauts de l'organisation des microtubules sous corticaux aussi bien dans les cellules multiciliées que monociliées (Delgehr et al., 2005; Kunimoto et al., 2012; Tateishi et al., 2013; Clare et al., 2014; Veleri et al., 2014; Turk et al., 2015). Une des fonctions du pied basal serait donc d'organiser un réseau de microtubules apicaux permettant d'enraciner le corps basal au cortex cellulaire.



**Figure 10: La diversité d'organisation de la racine striée chez les métazoaires**

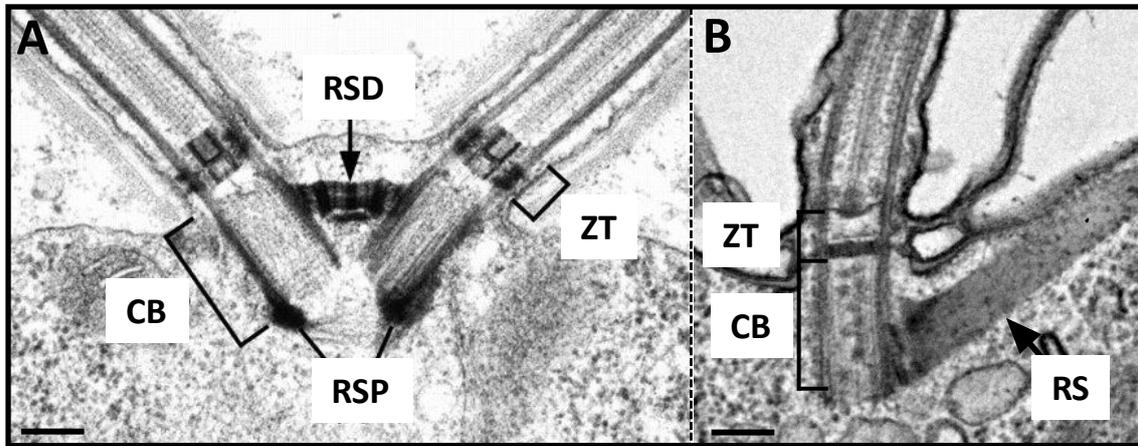
Coupes longitudinales montrant les racines striées associées aux corps basaux du cloaque chez le poisson zèbre (A) (d'après Bubenshchikova et al., 2012), d'une cellule des neurones sensoriels chez la planaire (B) (d'après Azimzadeh and Basquin, 2016), d'une cellule sécrétrice de l'oviducte humain (C) (d'après Hagiwara et al., 2008) et d'une cellule multiciliée de Xénope (D) (d'après Chien et al., 2013). Les racines striées (flèches) émanent de la partie proximale des corps basaux et plongent en profondeur dans le cytoplasme. On retrouve une unique racine striée sur les cellules du cloaque du poisson zèbre ainsi que sur les cellules des neurones sensoriels chez la planaire (A, B) . De multiples racines striées émanent des corps basaux des cellules sécrétrices de l'oviducte humain et des cellules multiciliées de Xénope (C, D). Barre d'échelle: 200 nm.

Les liens observés entre l'extrémité du pied basal et les microtubules suggèrent par ailleurs qu'il pourrait constituer une voie d'accès pour les vésicules provenant de l'appareil de Golgi essentielles à la construction du cil. Cette hypothèse est étayée par le fait que l'absence de Galectine 3 (Clare et al., 2014) ou de CC2D2A (Veleri et al., 2014) induit des défauts structuraux des axonèmes. En absence de CC2D2A, les fibroblastes embryonnaires de souris présentent en effet une accumulation de vésicules qui semblent incapables de se lier au réseau de microtubules (Veleri et al., 2014).

### **3) Les racines striées**

Chez les métazoaires, les racines striées sont généralement associées à la partie proximale des corps basaux qu'elles relient à la membrane de différents organites tels que l'appareil de Golgi ou le noyau (Anderson, 1972; Hagiwara et al., 2008). Elles ne sont pas universelles et leur position et leur nombre varient selon les organismes et les types cellulaires (figure 10). Ainsi les corps basaux des cellules ciliées de l'oviducte humain (Hagiwara et al., 2008) possèdent une seule racine striée contrairement aux corps basaux des cils primaires des cellules sécrétrices qui en possèdent plusieurs. On n'observe pas de racine striée sur les corps basaux des cellules épithéliales de l'oviducte de lapin (Odor and Blandau, 1985). Les cils des cellules multiciliées de larve de Xénope présentent deux racines striées : une fine (la racine secondaire), qui plonge profondément dans le cytoplasme et une plus large (la racine principale) positionnée à 180 degrés par rapport au pied basal (Chien et al., 2013). Chez la planaire, si deux racines striées sont associées aux corps basaux des cellules multiciliées de l'épiderme, une seule est présente au niveau des corps basaux des neurones sensoriels (figure 10) (Azimzadeh and Basquin, 2016).

Chez les protistes, les racines striées sont associées à des triplets spécifiques des corps basaux qui permettent de définir l'asymétrie rotationnelle de ces derniers. Chez *Tetrahymena* et la paramécie une seule racine striée est présente tandis que trois racines striées émanent des corps basaux chez *Chlamydomonas*. Deux de ces racines organisées parallèlement relient entre eux les deux corps basaux des flagelles au niveau de leur partie proximale. La troisième racine est associée au niveau distal du corps basal (figure 11). Deux autres racines, dites microtubulaires connectent ces corps basaux dans leur partie proximale.



**Figure 11: Les racines striées chez *Chlamydomonas* et la Paramécie**

**Coupes longitudinales de corps basaux associés à leurs racines striées chez *Chlamydomonas* (A) (d'après Silflow et al., 2001) et chez la paramécie (B).** Trois racines dites striées émanent du corps basal de *Chlamydomonas* (A), deux localisées dans la partie proximale (RSP) et une dans la partie distale (RSD). Cette dernière contient de la Centrine. Chez la paramécie (B), une unique racine striée émane de la partie proximale du corps basal et s'associe au cortex. CB: corps basal, ZT: zone de transition, RS: racine striée, RSD: racine striée distale, RSP: racine striée proximale. Barre d'échelle 200 nm.

## A) Composition moléculaire

Tout comme celle des pieds basaux, leur composition est peu connue. Chez les métazoaires elle est majoritairement composée de Rootletine (Yang et al., 2002), dont les mutations ou la déplétion empêchent sa formation (Yang et al., 2005; Chen et al., 2015). Dans les cellules cyclantes, la Rootletine interagit avec C-nap1, une protéine à laquelle elle est apparentée, pour former un lien impliqué dans la cohésion des centrioles (Yang et al., 2006). Étonnamment, l'étude de cette protéine chez *Caenorhabditis* montre un rôle jusqu'alors inconnu de la Rootletine dans la stabilisation et le maintien de l'ensemble de la structure ciliaire. En effet chez les mutants de *Che-10*, l'orthologue de la Rootletine chez *Caenorhabditis*, la structure ciliaire dégénère au cours de la maturation des vers. Les larves au stade L2 possèdent un compartiment ciliaire complet puis au fur et à mesure de leur maturation elles vont perdre le cil et la zone de transition au stade L4 pour aboutir à une absence de structure ciliaire au stade adulte (Mohan et al., 2013). Un des marqueurs utilisés pour visualiser la racine striée est CLAMP/Spf1 (Park et al., 2008; Werner et al., 2011; Yasunaga et al., 2015) qui pourrait donc être un composant de cette structure.

La SF assemblin et DisAp sont respectivement des constituants de la racine striée qui recouvre les faisceaux de microtubules associés aux corps basaux chez *Chlamydomonas* et chez *Tetrahymena* (Lehtreck and Melkonian, 1998; Galati et al., 2014). On retrouve aussi de la Centrine au niveau de la racine striée distale chez *Chlamydomonas*.

## B) Assemblage

Sans en être un constituant, la protéine Bbof1 pourrait intervenir dans la construction des racines striées ou leur association avec le corps basal. En effet cette protéine se localise de façon transitoire au niveau de la racine striée principale des corps basaux au cours de la ciliogenèse dans les cellules multiciliées de Xénope et son inactivation induit la disparition de la racine striée secondaire (Chien et al., 2013). Chez la Drosophile le recrutement de la Rootletine au niveau des racines requiert SAS4 (Chen et al., 2015).



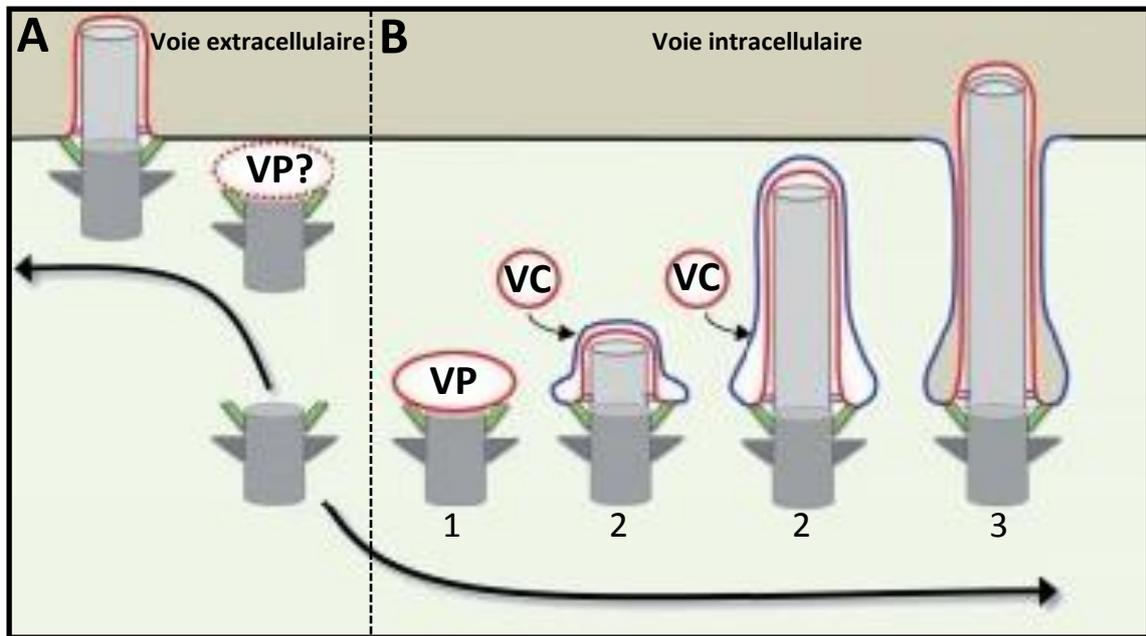
### C) Fonction

Dans les cellules multiciliées de *Xénope*, les racines striées sont associées à un réseau d'actine subapical (Werner et al., 2011) qui connecte l'extrémité de la racine striée d'un corps basal, au corps basal suivant et dont l'intégrité est nécessaire pour leur ancrage, leur orientation et leur espacement. A l'instar des pieds basaux qui organisent les réseaux de microtubules, un des rôles de la racine striée serait d'organiser ce réseau d'actine indispensable pour l'enracinement et l'orientation des corps basaux à la surface apicale.

Elle pourrait par ailleurs avoir une fonction importante dans la stabilisation et le maintien à long terme de l'ensemble de la structure ciliaire chez la souris (Yang et al., 2005) et *Caenorhabditis* (Mohan et al., 2013), ce qui semble ne pas être le cas chez la *Drosophile* (Chen et al., 2015).

Enfin la Rootletine interagit avec une kinésine ce qui laisse supposer que les racines striées pourraient servir de rails pour le transport des vésicules contenant des composants ciliaires (Yang et al., 2006).

Chez la paramécie et *Tetrahymena*, la racine striée interagit avec le cytosquelette sous cortical et est supposée participer au positionnement correct et à l'orientation finale des corps basaux à la surface cellulaire. Le raccourcissement de la racine induit par la mutation du gène *DisAp* chez *Tetrahymena* est corrélé à des défauts d'espacements et d'orientation des corps basaux (Galati et al., 2014). De plus dans un contexte sauvage, lorsque la fréquence du battement ciliaire s'intensifie générant une augmentation de la force mécanique exercée sur le corps basal, la racine striée s'épaissit et s'allonge. Chez le mutant *DisAp*, l'augmentation de cette force induit des défauts d'orientation des corps basaux suggérant qu'un des rôles de la racine striée serait de maintenir une orientation correcte des corps basaux à la surface lorsqu'ils sont soumis à des changements de fréquence des battements ciliaires. Chez ces organismes il semble par ailleurs qu'elle joue également un rôle dans le positionnement et l'orientation du nouveau corps basal par rapport au corps basal père (Allen, 1969; Iftode et al., 1989).



**Figure 12: L'initiation de la croissance ciliaire peut se faire par deux voies distinctes**

Schéma présentant la voie extracellulaire (A) et la voie intracellulaire (B) (d'après Benmerah, 2014). Dans la voie extracellulaire (A), la croissance ciliaire débute une fois le corps basal ancré à la surface cellulaire. Une association entre l'extrémité distale du corps basal et une vésicule pourrait précéder l'ancrage du corps basal dans certains tissus (vésicule en pointillé). La deuxième voie dite intracellulaire (B) débute par l'ancrage du corps basal avec une vésicule primaire (1), puis s'ensuit la ciliogenèse intracellulaire. L'apport de membrane se fait grâce à la fusion de vésicules cytoplasmiques à la vésicule ciliaire (2), enfin cette dernière fusionne avec la membrane plasmique. VP: vésicule primaire, VC: vésicule cytoplasmique.

En conclusion de ce chapitre nous pouvons dire que chez les mammifères les pieds basaux et les racines striées semblent être indispensables à l'acquisition de l'orientation finale du corps basal à la membrane plasmique permettant un battement ciliaire coordonné. Cependant toutes ces données indiquent que ces structures ne jouent aucun rôle dans l'étape d'ancrage et que seules les fibres de transition remplissent cette fonction. Chez la paramécie, les structures associées dans la partie proximale des corps basaux sont au contraire impliquées dans de multiples processus tel que le positionnement, la migration et l'ancrage des corps basaux à la surface cellulaire.

### **III) La ciliogenèse**

#### **1) Association corps basal/ membrane, étape clé de la ciliogenèse**

En 1962 et 1968, S. Sorokin décrit pour la première fois différentes étapes de la ciliogenèse des cils primaires et motiles par une étude en microscopie électronique sur des fibroblastes et des cellules de l'épithélium respiratoire chez le rat. Il décrit deux voies distinctes aboutissant à la formation du cil primaire selon le type cellulaire. La première voie appelée la voie intracellulaire débute par l'association de la partie distale du centriole père avec une vésicule cytoplasmique (vésicule primaire) probablement dérivée de l'appareil de Golgi. Cette association est suivie de la formation de l'axonème au sein de la vésicule, son élongation étant corrélée avec un apport membranaire généré par la fusion entre la vésicule primaire et des vésicules cytoplasmiques. La ciliogenèse se déroule à l'intérieur de la cellule, le cil primaire étant libéré à la surface cellulaire après fusion de la vésicule avec la membrane plasmique (figure 12B).

Dans la seconde voie, dite extracellulaire, l'élongation de l'axonème se fait comme son nom l'indique, dans l'environnement extracellulaire (figure 12A). C'est cette voie qui semble majoritaire au cours de l'assemblage des cils motiles dans les cellules multiciliées. On a longtemps considéré que dans cette voie l'élongation de l'axonème se faisait après l'accrochage direct des corps basaux à la surface cellulaire. Ceci est maintenant remis en question. Des images de microscopie électronique de cellules de trachée de souris (Burke et al., 2014), d'oviducte de caille (Chailley et al., 1982) ou d'épiderme de l'embryon de Xénope (Park et al., 2008) montrent en effet une association entre les extrémités distales des corps



basaux et des vésicules qui indique qu'une association corps basal - vésicules puisse précéder l'ancrage à la membrane plasmique, ce qui avait d'ailleurs été suggéré par Sorokin en 1968.

## **2) Initiation de la ciliogenèse**

Quel que soit le type de mécanisme mis en jeu, l'élongation de l'axonème nécessite une étape préalable d'ancrage de l'extrémité distale du corps basal avec une structure membranaire.

### **A) Fusion vésicule/centriole**

Il semble que la première étape de la ciliogenèse soit la jonction entre le corps basal et de petites vésicules appelées vésicules des appendices distaux. L'intervention de trois protéines EHD1, EHD3 et SNAP 29 localisées au niveau de ces vésicules permettrait par la suite leurs fusions et la formation d'une vésicule plus grande appelée vésicule ciliaire (VC) (Lu et al., 2015). Au cours de la formation de cette VC, la protéine TTBK2 (Tau Tubuline kinase 2) serait recrutée au niveau des fibres de transition via CEP164 en coopération avec CEP83 ce qui aurait pour conséquence d'une part l'élimination de la protéine CP110 (Čajánek and Nigg, 2014; Oda et al., 2014), étape qui semble cruciale pour l'initiation de l'élongation de l'axonème, et d'autre part le recrutement de plusieurs protéines de la zone de transition telles que MKS5, TMEM67 ou B9D2 et de la protéine IFT20 (Lu et al., 2015).

L'extension de la VC sur toute l'extrémité distale du centriole serait par la suite contrôlée par le recrutement du complexe Rabin8/Rab8. Rab8 est une GTPase impliquée dans la voie de sécrétion et de transport de vésicule post-golgienne qui favorise l'extension membranaire (Nachury et al., 2007). Son recrutement nécessite l'intervention de CC2D2A et CEP290 (Tsang et al., 2008; Veleri et al., 2014). Dans les cellules multiciliées, cette étape implique également la formation d'un complexe entre CEP164 et Chibby (Cby) (Burke et al., 2014), une protéine impliquée dans l'ancrage des corps basaux à la membrane plasmique (Voronina et al., 2009). Spécifiquement localisée à l'extrémité distale des centrioles pères dans les cellules en culture (Steere et al., 2012), Cby facilite d'une part le recrutement de Ahi1, une protéine de la zone de transition, et d'autre part la biogénèse des cils primaires. Son



incorporation au centriole dépend par ailleurs d'OFD1 au voisinage de laquelle elle est localisée (Lee et al., 2014) .

## B) Initiation de l'extension de l'axonème

Une seconde étape primordiale dans la biogenèse des cils est l'initiation de l'extension de l'axonème qui est inhibée par l'existence, à l'extrémité distale des centrioles, de régulateurs négatifs de la ciliogenèse : le complexe CP110/CEP97 et la Trichopleine.

### *a) Levée de l'inhibition CP110/CEP97*

Les centrioles des centrosomes possèdent dans leur partie distale la protéine CP110 qui, en complexe avec CEP97, joue un rôle de verrou et inhibe la ciliogenèse (Spektor et al., 2007). La levée de ce verrou au sein du centriole père met en jeu des mécanismes complexes qui impliquent plusieurs protéines capables d'interagir avec ce complexe en le déstabilisant ou en le maintenant dans la partie distale du centriole père.

La kinésine Kif24 agit comme un répresseur de la ciliogenèse d'une part en stabilisant CP110 au niveau de centriole père et d'autre part en contrôlant, grâce à son activité dépolymérisante, l'allongement des microtubules centriolaires en remodelant leur extrémités distales (Kobayashi et al., 2011).

En plus des protéines CEP164, CEP83 et TTBK2, précédemment évoquées, on retrouve plusieurs autres régulateurs positifs de la ciliogenèse.

Avant de jouer un rôle primordial dans la construction de la ZT, CEP290 contrôle positivement les premières étapes de la ciliogenèse. Présent à l'extrémité distale des deux centrioles, son action est abolie durant le cycle cellulaire par une interaction physique avec CP110 au sein d'un complexe indépendant du complexe CP110/CEP97 (Tsang et al., 2008). Lorsque les cellules entrent en quiescence, la concentration de CP110 diminue libérant CEP290 qui devient alors capable de recruter la protéine Rab8 (Tsang et al., 2008; Kobayashi et al., 2014) favorisant ainsi l'interaction du centriole père avec la VC. Paradoxalement, bien que ces deux protéines jouent des rôles antagonistes, c'est l'interaction avec CEP290 qui



permet à CP110 de jouer son rôle de régulateur négatif de la ciliogenèse. En effet lorsque l'interaction est abolie, l'activité inhibitrice de CP110 est réduite de trois fois (Tsang et al., 2008).

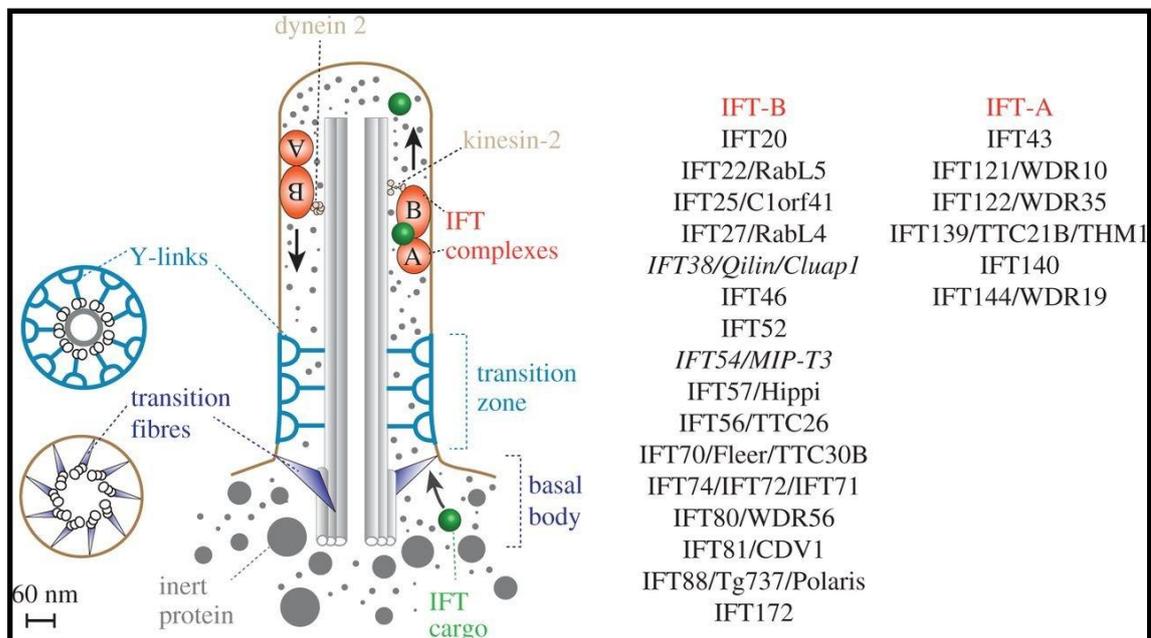
Il a également été envisagé que la protéine CEP104, qui est associée à l'extrémité distale des deux centrioles dans les cellules cyclantes et qui interagit avec CP110 et CEP97 (Jiang et al., 2012), pouvait contrecarrer l'effet inhibiteur de CP110. En effet, à une étape très précoce de la ciliogenèse la protéine se relocalise à l'extrémité distale des microtubules de l'axonème en croissance. Il a donc été supposé que la dissolution du complexe CEP104/CP110/CEP97 pourrait induire le relargage de CP110 et CEP97 du centriole (Tammana et al., 2013).

Une seconde kinase MARK4 capable d'interagir avec ODF2 semble également nécessaire pour l'élimination du complexe CP110/CEP97 et l'extension de l'axonème sans que le mécanisme impliqué soit élucidé. En effet la déplétion de MARK4 ou d'ODF2 dans des cellules RPE1 dépourvu de sérum a pour conséquence la persistance de la localisation au centriole père de CP110, mettant en lumière une autre fonction d'ODF2 (Kuhns et al., 2013).

Toutefois le rôle de CP110 dans la ciliogenèse est loin d'être clair. En effet une étude récente (Yadav et al., 2016) montre qu'en son absence la formation des cils est compromise chez la souris et donc qu'elle agirait également comme un régulateur positif de la ciliogenèse. Son invalidation conduit par ailleurs à des défauts d'assemblage des appendices distaux et subdistaux, corrélés à la délocalisation de protéines impliquées dans leur formation telles qu'ODF2, la Ninéine et CC2D2A.

#### *b) Levée de l'inhibition Trichopleine*

Localisée au niveau des deux centrioles, la Trichopleine doit également être éliminée du centriole père pour permettre l'assemblage de l'axonème (Inoko et al., 2012). Cette protéine qui active la kinase Aurora A dans les cellules cyclantes, est dégradée du centriole père au cours de la ciliogenèse via le système ubiquitine-protéasome (UPS) et l'activité d'un complexe ubiquitine ligases E3 de la famille Culline-3 et de son adaptateur KCTD17 (Kasahara et al., 2014)



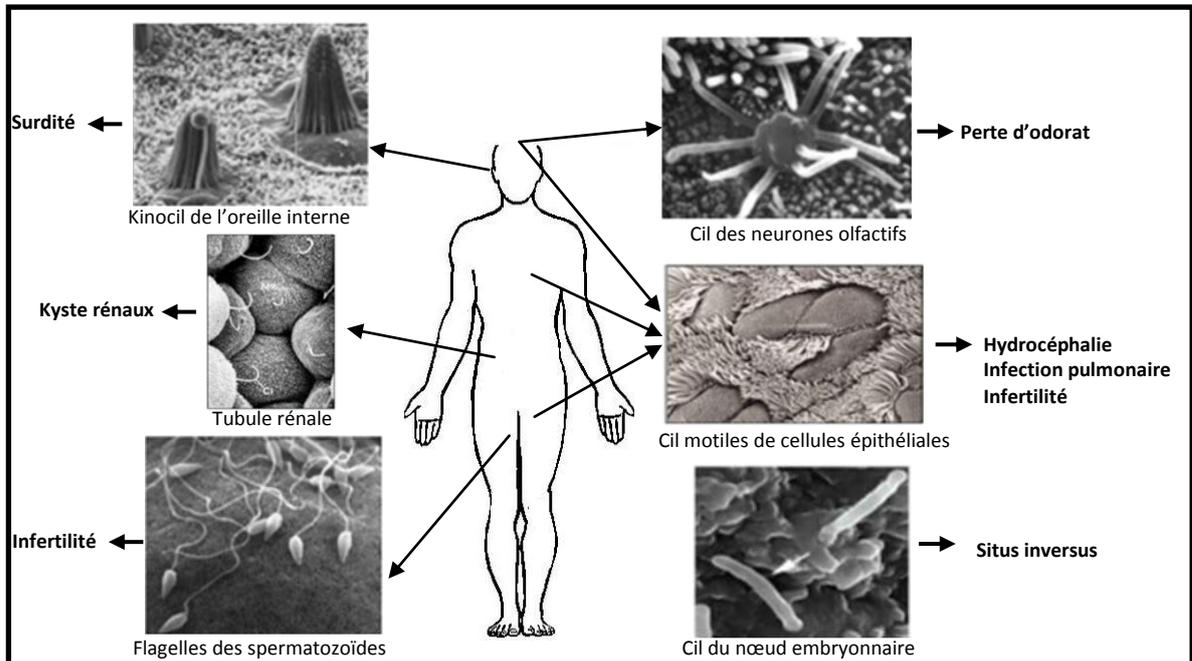
**Figure 13: L'assemblage du cil**

Schéma simplifié représentant le mécanisme du transport intraflagellaire (d'après Nachury, 2014). Les protéines cargos (en vert) sont prises en charge par le système intraflagellaire (IFT) au niveau de la région proximale du corps basal. Des kinésines permettent le transport antérograde de ces protéines cargos et de dyneïne inactive, via leur interaction avec les complexes A et B de l'IFT, jusqu'à la pointe ciliaire. Un changement de conformation des complexes IFTs permet l'activation de la dyneïne et le transport retrograde des IFTs vers le corps cellulaire. Les protéines constituant ces deux complexes sont indiquées à droite de la figure.

### **3) L'assemblage du cil**

Une fois amorcée, l'extension de l'axonème doit se poursuivre au sein d'un compartiment indépendant du corps cellulaire. Les protéines ciliaires sont donc synthétisées dans le cytoplasme et sont acheminées à la base du cil via un complexe protéique: le BBSome. Ce complexe protéique découvert en 2007 (Nachury et al., 2007) comporte huit sous unités conservées au cours de l'évolution: BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8, BBS9 et BBS18 (Scheidecker et al., 2014). Le BBSome interagit transitoirement avec PCM1, le constituant central des satellites centriolaires. La fonction de ce complexe au niveau des satellites centriolaires reste floue, en revanche son interaction avec Rabin8 via BBS1 permettrait au complexe de se relocaliser au niveau du corps basal et activerait Rab8, nécessaire à la fusion de vésicules post-golgiennes à la membrane ciliaire (Nachury et al., 2007). Le BBSome permettrait également aux protéines cargos de passer la barrière ciliaire (Liew et al., 2014) afin d'être prises en charge par un transport de particules appelé le transport intraflagellaire (IFT).

Ce système de transport a été découvert pour la première fois sur les flagelles de *Chlamydomonas reinhardtii* (Kozminski et al., 1995). Ce transport permet le déplacement de complexes multiprotéiques entre les doublets périphériques du cil et la membrane ciliaire via des moteurs moléculaires. Les molécules cargos sont prises en charge à la base du cil par le complexe IFT qui est divisé en 2 sous complexes: IFT-A composé d'au moins 6 protéines et IFT-B composé d'au moins 16 protéines (Lechtreck, 2015; Nachury, 2014). Ces protéines IFTs se concentrent à la base du cil au niveau des fibres de transition et passent dans le compartiment ciliaire par l'intermédiaire des composants de ces fibres de transition tels que FBF1, CEP83 ou CEP164 (Joo et al., 2013; Wei et al., 2013). L'ensemble IFT-cargo associé au BBSome et à une dynéine inactive est véhiculé vers la pointe ciliaire grâce à un moteur antérograde de type kinésine lié au sous-complexe IFT-B. A la pointe du cil, le complexe est remodelé, les protéines cargos sont libérées, la kinésine inactivée et la dynéine activée. Les IFTs sont alors repris en charge par la dynéine liée au sous complexe IFT-A qui les transporte jusqu'à la base du cil où elles se dissocient et sont relarguées vers le compartiment cellulaire (figure 13).



**Figure 14: L'ubiquité ciliaire explique l'effet pléiotrope des ciliopathies**

Schéma montrant la présence des cils dans différents types cellulaires chez l'homme (adapté d'un séminaire d'A. Benmerah, 2010). Les dysfonctionnements de ces différents cils entrainent une atteinte multiviscérale.

Après avoir passé cette barrière physique, les protéines IFTs permettent la construction du cil grâce à un apport de membrane, régulent sa longueur qui est indispensable à la fonction sensorielle et/ou motrice du cil et jouent un rôle dans la transduction des signaux en transmettant différents signaux captés par les récepteurs de la membrane ciliaire.

#### **4) Cils et maladies génétiques humaines: les ciliopathies**

Des mutations dans certains gènes codant pour des protéines ciliaires peuvent induire des défauts dans la biogenèse ou le fonctionnement du cil entraînant des pathologies humaines graves: les ciliopathies. Ce sont des maladies rares et généralement très invalidantes. Les cils motiles tapissent la surface de nombreuses cellules, tissus et organes tels que les poumons, l'oreille moyenne, les sinus, les cellules épendymaires, les spermatozoïdes ou les trompes utérines. Les cils primaires quant à eux sont présents à la surface de pratiquement toutes les cellules. Les ciliopathies conduisent donc à une atteinte multiviscérale (figure 14) (Lucas et al., 2014).

##### La dyskinésie ciliaire primitive

La dyskinésie ciliaire primaire (DCP) est une maladie respiratoire rare caractérisée par des infections récurrentes et chroniques des voies respiratoires. Une trentaine de gènes sont impliqués dans cette ciliopathie. Ils codent pour la majorité, des dynéines, qui permettent la motilité du cil ou des constituants essentiels de celui-ci. Les anomalies du battement ciliaire associées à cette ciliopathie entraînent des infections pulmonaires, des otites chroniques, des sinusites, des hydrocéphalies, l'infertilité aussi bien masculine que féminine ou des situs inversus, présents chez la moitié des patients (Boon et al., 2012; Lucas et al., 2014).

##### Le syndrome de Bardet-Biedl

Ce syndrome est caractérisé par une atteinte oculaire souvent associée à une rétinite pigmentaire, une atteinte rénale, une anomalie des membres, dans 70% des cas à une polydactylie, un déficit intellectuel, de l'obésité, de l'hypogonadisme, un situs inversus et des troubles neurologiques. L'origine génétique de cette maladie est très hétérogène puisqu'au moins 19 gènes responsables de cette maladie ont été identifiés (Khan et al., 2016). Comme



précédemment évoqué, certaines de ces protéines qui composent le BBSome sont impliquées dans le transport vésiculaire.

### Les néphronophyses

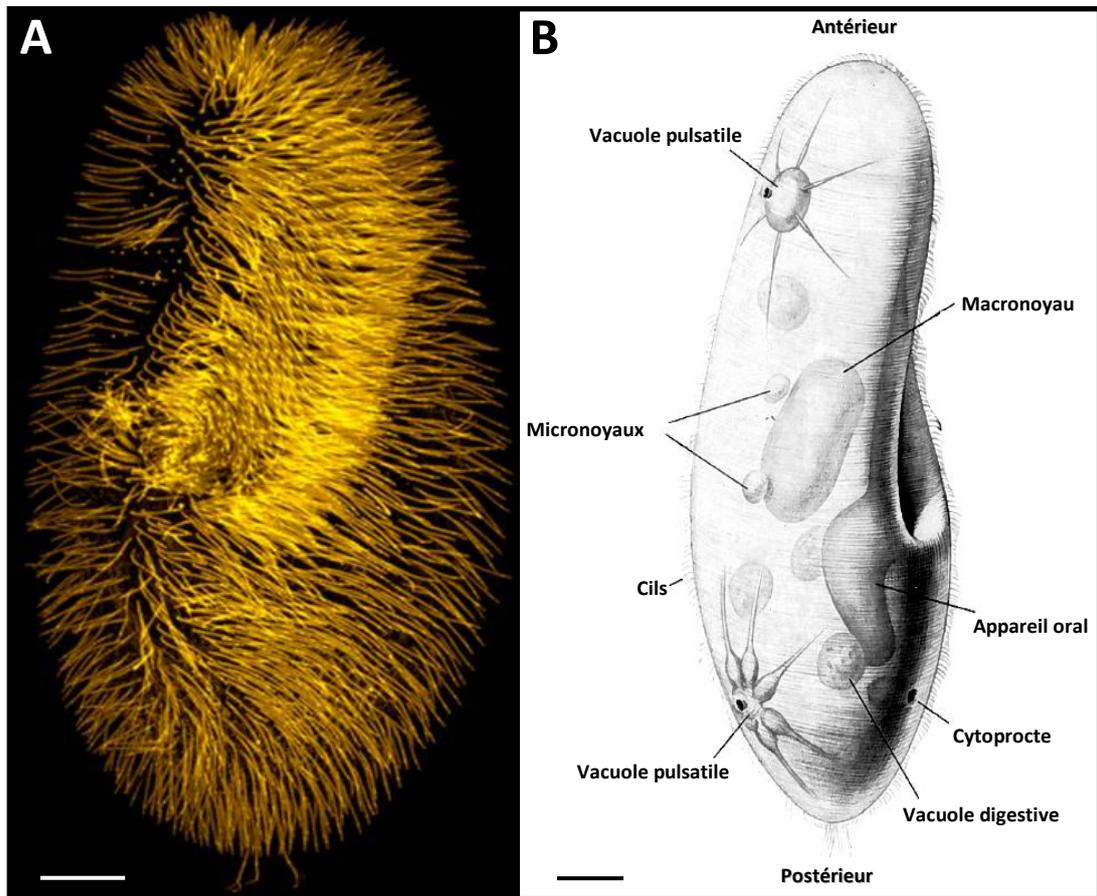
La néphronophyse est une néphropathie chronique évoluant vers l'insuffisance rénale terminale. Elle peut s'accompagner de nombreux symptômes tels qu'une dégénérescence rétinienne, un déficit intellectuel, une ataxie, des anomalies osseuses ou des atteintes hépatiques. Au moins 18 gènes sont impliqués dans cette ciliopathie dont *NPHP1*, *NPHP4* ou *Ahi1* (Simms et al., 2009; Failler et al., 2014).

### Le syndrome de Meckel Gruber

Ce syndrome est caractérisé par la présence de kystes rénaux, des anomalies de développement du système nerveux central, une dysplasie des voies biliaires, une polydactylie et un situs inversus. Aujourd'hui, au moins 15 gènes sont associés à ce syndrome (Bergmann et al., 2016). Plusieurs dizaines de mutations peuvent être retrouvées dans chacun de ces gènes (Salonen et al., 2011). Des mutations sur d'autres gènes peuvent causer ce syndrome. En effet des mutations dans le gène *NPHP3* peuvent conduire à des phénotypes caractéristiques d'un syndrome de Meckel Gruber.

### Le syndrome de Joubert

Le syndrome de Joubert est caractérisé par une malformation congénitale du tronc cérébral, une agénésie ou une hypoplasie du cervelet entraînant des troubles respiratoires et est parfois associé à une déficience intellectuelle, une ataxie, une anomalie des mouvements oculaires. 25% des patients atteints de ce syndrome présentent des anomalies rénales et une minorité des défauts hépatiques (Brancati et al., 2010). Aujourd'hui plus de 20 gènes ont été identifiés comme impliqués dans cette ciliopathie (Kroes et al., 2016).



**Figure 15: La paramécie, protozoaire cilié: organisation générale**

Observation de la région ventrale d'une paramécie (A), marquée avec un anticorps reconnaissant les cils. Représentation schématique de ses principaux organites (B). Barre d'échelle 10  $\mu\text{m}$ .

Comme on vient de le voir, les différentes ciliopathies présentent plusieurs phénotypes communs tels que des atteintes rénales, des dégénérescences rétiniennes, des retards mentaux, des hydrocéphalies ou encore des situs inversus. Effectivement différentes mutations dans un même gène entraînent différentes ciliopathies. Par exemple les gènes JBS5, MKS4 et NPHP6 sont en réalité un même gène, il s'agit de CEP290 qui est impliqué dans le syndrome de Joubert, le syndrome de Meckel-Gruber et la néphronoptose. On retrouve au moins cinq gènes qui sont impliqués à la fois dans le syndrome de Joubert et dans le syndrome de Meckel. Il existe donc un chevauchement phénotypique et génétique important entre les différents syndromes.

#### **IV) La paramécie : organisme modèle pour l'étude de l'ancrage des corps basaux à la membrane plasmique**

##### **1) Présentation générale**

###### **A) Un modèle**

La paramécie est un protozoaire cilié mesurant en moyenne 130  $\mu\text{m}$  de long sur 50  $\mu\text{m}$  de large et comportant au niveau cortical plus de 4000 cils (figure 15A). Comme tous les ciliés, la paramécie possède deux types de noyaux. Le macronoyau dit noyau somatique est transcriptionnellement actif et est responsable de l'expression des gènes durant le cycle végétatif. Deux micronoyaux, dits noyaux germinaux, sont transcriptionnellement inactifs et subissent la méiose lors des processus sexuels.

La paramécie présente des fonctions cellulaires diverses au même titre que les métazoaires. En effet, elle possède par exemple un système de transport vésiculaire jouant un rôle analogue au système digestif. Une partie des cils assure la prise de nourriture via son appareil oral, en forme d'entonnoir, dans lequel les bactéries vont entrer par endocytose. Après formation de vésicules digestives et dégradation des éléments ingérés par les enzymes qu'elles contiennent, ces vésicules vont être exocytées via le cytoprocte. Deux vacuoles pulsatiles lui permettent d'éliminer les déchets liquides et de maintenir la pression osmotique (figure 15B).



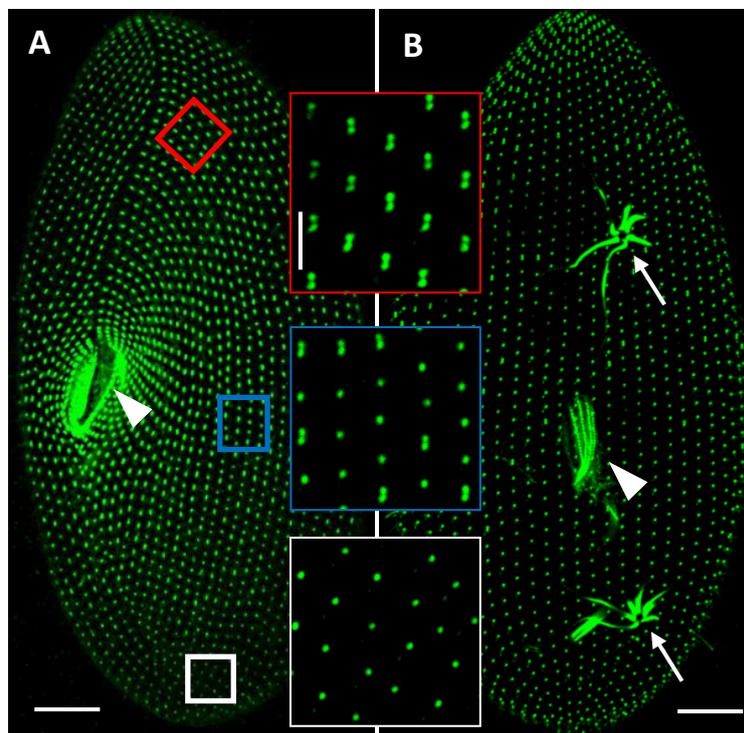
## B) Des outils

Le génome de l'espèce *Paramecium tetraurelia* a été entièrement séquencé (Aury et al., 2006) ce qui a d'ailleurs révélé qu'il avait subi au moins trois duplications globales au cours de son évolution, chacune des duplications étant suivie de délétions aléatoires de gènes. En conséquence, de nombreux isoformes protéiques sont codées par deux ou plusieurs gènes paralogues appelés « ohnologues », en référence au généticien japonais S. Ohno.

Une méthode d'inactivation génique par ARN interférence appelée « feeding » qui consiste à nourrir les paramécies avec des bactéries produisant les ARNs double brin complémentaires des gènes à inactiver a été mise au point (Galvani and Sperling, 2002). Cette technique permet d'observer les défauts précoces induits par l'inactivation des gènes d'intérêts dès la première division. Ceci est un avantage par rapport à d'autres systèmes dans lesquels ces effets ne peuvent souvent être examinés qu'après plusieurs divisions et donc résulter de l'accumulation de défauts liés au mauvais fonctionnement d'autres protéines.

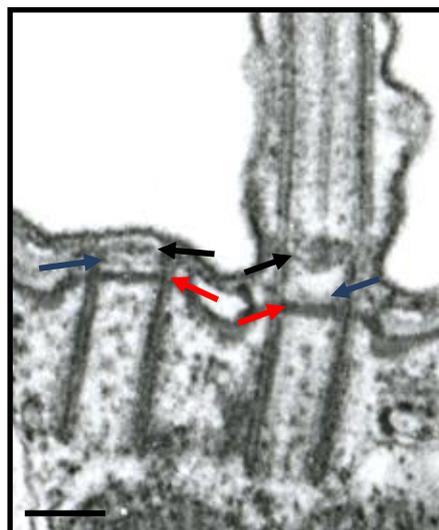
Il est par ailleurs possible de transformer la paramécie par injection d'ADN dans le macronoyau. Elle possède un système de défense bien particulier. Il s'agit de l'exocytose de vésicules de sécrétion, les trichocystes. La co-transformation avec un des gènes impliqués dans ce mécanisme nous sert de crible afin de sélectionner des clones d'intérêt.

Enfin deux bases de données, Paramecium DB (Arnaiz et al., 2007) et Cildb (Arnaiz et al., 2009) regroupent les résultats obtenus chez cet organisme en particulier ceux concernant la protéomique ciliaire ou la régulation du transcriptome au cours de la re-ciliation. La base de donnée Cildb, mise à jour en juin 2014 (Arnaiz et al., 2014) permet par ailleurs d'établir la correspondance entre gènes identifiés dans des études ciliaires chez différentes espèces.



**Figure 16: Organisation stéréotypée des corps basaux chez la paramécie**

**Observation des corps basaux après un marquage avec un anticorps spécifique dans la région ventrale (A) et dorsale (B) de la paramécie en interphase.** Les corps basaux sont organisés en rangées parallèles. Ces rangées sont constituées de corps basaux uniques (singlet) ou organisés par paire (doublet). Le ratio singlet/doublet varie selon la région de la Paramécie. Dans la région postérieure on observe une zone composée exclusivement de singlets (zoom encadré blanc); dans la région médiane, une zone d'alternance entre singlets et doublets (zoom encadré bleu); dans la région antérieure de la face ventrale, une région composée exclusivement de doublets (zoom encadré rouge). La face ventrale comporte plus de doublets que la face dorsale. Les deux vacuoles pulsatiles (flèches) (B) et l'appareil oral (tête de flèche) sont visibles (A, B). Barre d'échelle horizontale: 10  $\mu\text{m}$ , barre d'échelle verticale: 2  $\mu\text{m}$ .



**Figure 17: La zone de transition chez la paramécie**

**Ultrastructure de la zone de la transition selon le statut de ciliation du corps basal.** La zone de transition d'un corps basal cilié est constituée de trois plaques, la plaque terminale (flèche rouge), la plaque intermédiaire (flèche bleue) et la plaque axosomale (flèche noire). Le corps basal non cilié possède une zone de transition moins épaisse que le corps basal cilié. Barre d'échelle 200 nm

## **2) Organisation et structure des corps basaux**

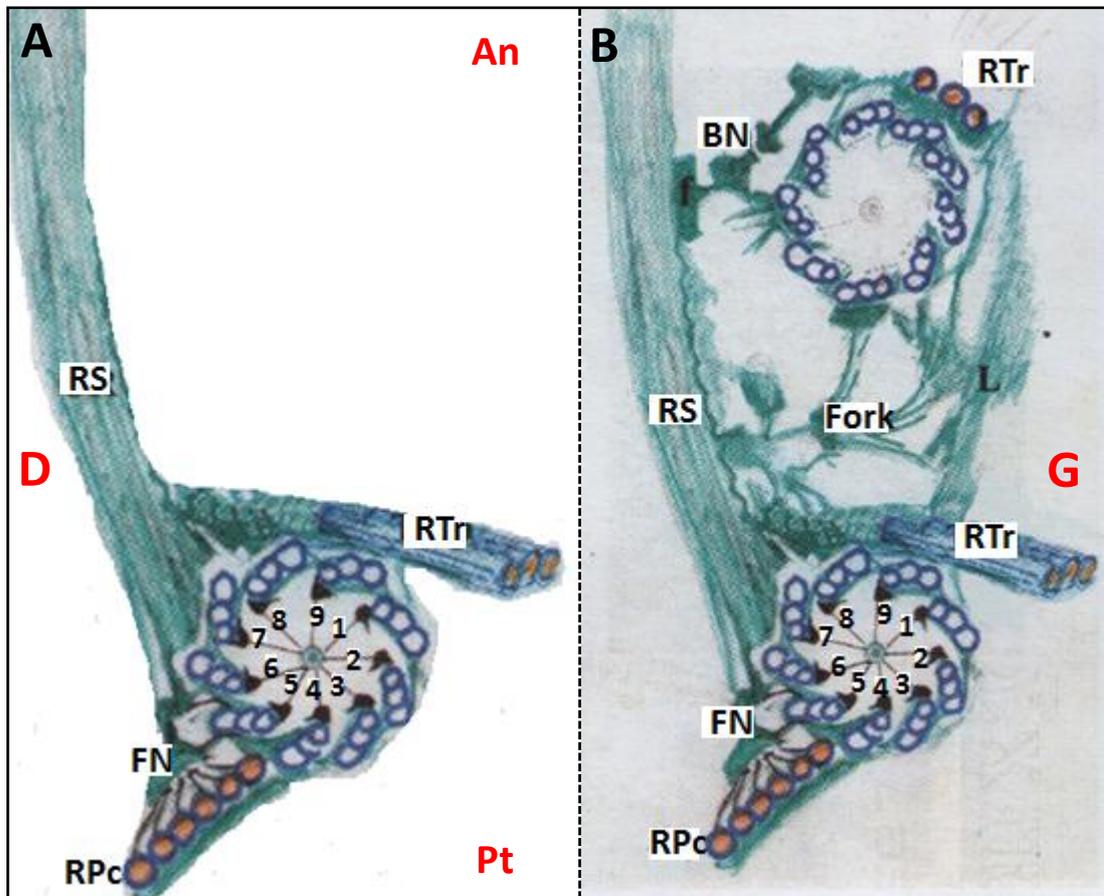
Le cortex de la paramécie est soutenu par un cytosquelette superficiel, l'épiplasme, qui est segmenté en unités corticales. Selon le territoire de la cellule sur laquelle elle est localisée, chaque unité porte un ou deux corps basaux appelés respectivement « singlet » et « doublet » qui apparaissent organisés en rangées parallèles appelées cinéties (figure 16). Ces corps basaux mesurent en moyenne 450 nm de long sur 200 nm de diamètre.

Corps basaux ciliés et non ciliés coexistent à la surface d'une même cellule, la structure de leur partie distale variant selon leur statut de ciliation (figure 17). A l'exception d'un territoire particulier appelé champ invariant, lorsque les corps basaux sont associés en doublets, l'un est cilié et l'autre ne l'est pas (Aubusson-Fleury et al., 2012). Trois plaques reconnaissables organisent la zone de transition qui sépare le corps basal du cil. La plaque terminale, épaisse et localisée au niveau proximale de cette zone de transition, est en contact avec l'épiplasme. La plaque axosomale sépare la zone de transition du cil. La paire centrale de microtubules s'établit à ce niveau. Entre ces 2 plaques se situe la plaque intermédiaire (Dute and Kung, 1978). Ces trois plaques sont aussi retrouvées à l'extrémité distale des corps basaux non ciliés mais apparaissent plus serrées (figure 17). Au laboratoire, à cette structure appelée prozone de transition, pourrait correspondre un équivalent fonctionnel d'un centriole père associé à la vésicule ciliaire.

## **3) Organisation des structures associées aux corps basaux**

### **A) En interphase**

Dans sa région proximale, le corps basal est associé à trois racines qui permettent de définir son asymétrie rotationnelle. Chacune d'elle le relie au cortex cellulaire. Associée aux triplets de microtubules dits 5, 6 et 7, la racine striée est située à droite du corps basal et dirigée vers le pôle antérieur de la cellule. Egalement associée à sa droite au niveau du triplet 4 mais dirigée vers le pôle postérieur de la cellule se trouve une première racine microtubulaire, la racine post-ciliaire. Une deuxième racine microtubulaire, la racine transverse, est associée au triplet 9 et se dirige sur le côté gauche de la cellule (figure 18A). Ces trois racines se lient au niveau de l'épiplasme dans leur partie distale. Lorsqu'ils sont



**Figure 18: Structures associées aux corps basaux chez la paramécie**

Schéma montrant l'organisation d'un singlet (A) et d'un doublet (B) avec leurs structures associées (d'après Iftode and Fleury-Aubusson, 2003). (A) La racine striée (RS) émane des triplets 5, 6 et 7, la racine postciliaire (RPc) émane du triplet 4 et la racine transverse (RTr) émane du triplet 9. Le « Fingered Node (FN) » est une structure qui lie la racine post-ciliaire à la racine striée. Dans un doublet (B), le corps basal antérieur ne possède ni racine striée ni racine post-ciliaire mais possède la racine transverse. Ce dernier est relié à la racine striée émanant du corps basal postérieur via le « Bone Node (BN) » et au corps basal postérieur via un réseau de liens nommé « Fork ». Ces structures révèlent la polarité rotationnelle des corps basaux. D: Droite, G: Gauche, An: antérieur, Pt: postérieur.

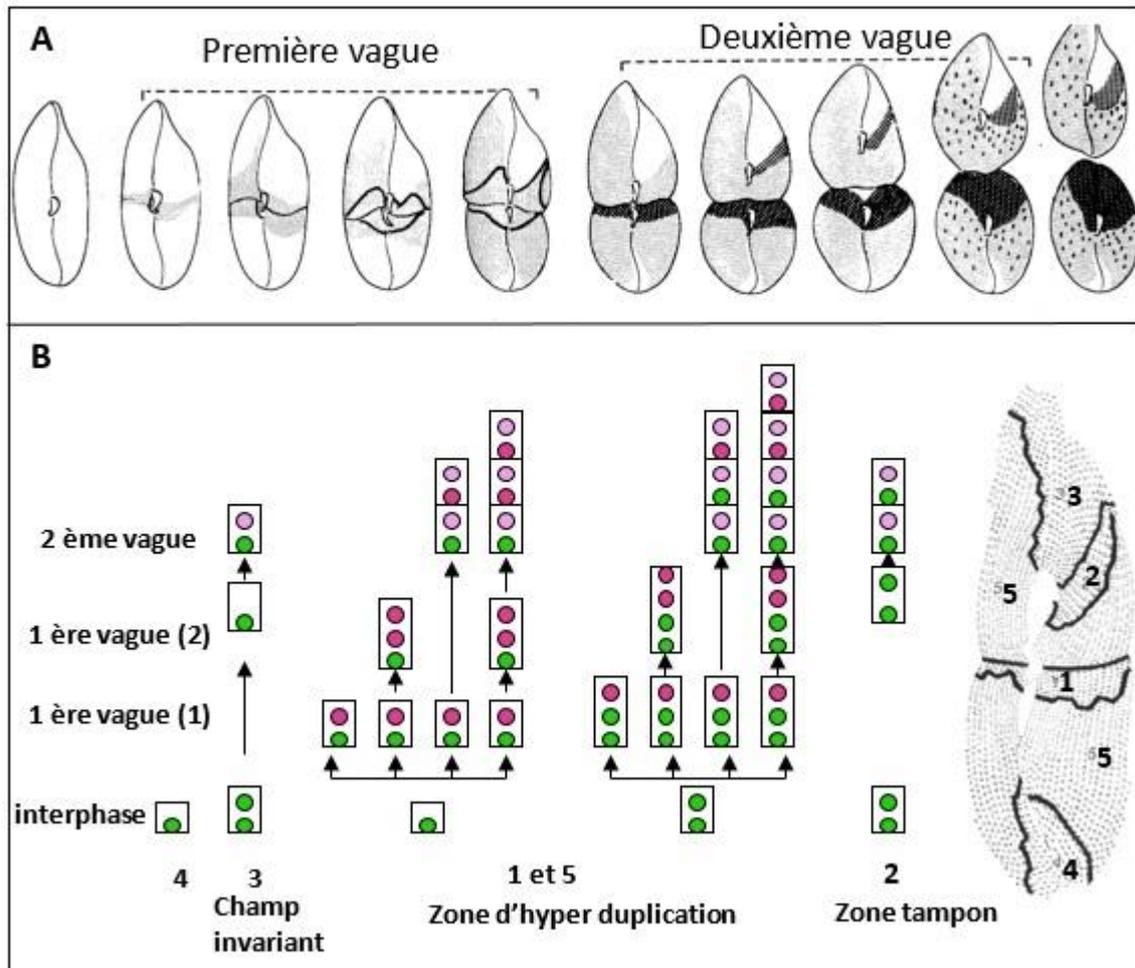
distribués en doublet, les corps basaux antérieurs sont dépourvus de racines striées et de microtubules post-ciliaires mais possèdent les racines transverses (figure 18B). Il est généralement admis que ces structures associées aux corps basaux agissent comme des guides pour définir la position d'assemblage du nouveau corps basal.

L'étude de F. Iftode portant sur l'observation en microscopie électronique des corps basaux après un traitement à l'acide tannique montre que plusieurs autres structures unissent les corps basaux et racines principales. Un premier lien est visualisé entre le corps basal antérieur et la racine striée, le « bone node »; un second entre chaque microtubule de la racine post ciliaire du corps basal postérieur et sa racine striée, le « fingered node » et enfin un dernier entre le matériel dense localisé entre la paire de corps basaux et la racine striée, le «fork» (figure 18B) (Iftode et al., 1996).

#### B) Au cours de la division

Le patron spatiotemporel de duplication des corps basaux durant le cycle cellulaire a été décrit (Iftode et al., 1989; Iftode and Fleury-Aubusson, 2003). Nous sommes donc capables d'identifier les nouveaux corps basaux des anciens. Cela nous permet d'identifier, grâce à nos outils développés pour l'imagerie, l'étape de la ciliogenèse durant laquelle est impliquée la protéine étudiée.

Après la division cellulaire, l'organisation stéréotypée des corps basaux observée dans la cellule parentale est reproduite à l'identique dans les deux cellules filles. Le schéma de la duplication des corps basaux est donc complexe et diffère selon le territoire de la cellule observé (figure 19). Ce processus s'initie au niveau équatorial et progresse vers les deux pôles de la cellule suivant deux vagues successives au cours desquelles les nouveaux corps basaux apparaissent toujours devant les corps basaux préexistants. La première vague permet la génération de nouvelles unités corticales et selon les territoires peut comporter plusieurs cycles de duplication. Seuls les corps basaux destinés à constituer des unités corticales à doublets subissent la seconde vague de duplication.



**Figure 19: Schéma de duplication des corps basaux chez la paramécie**

Schéma représentant le patron spatiotemporel de duplication des corps basaux chez la paramécie (d'après Iftode et al., 1989). (A) Les cellules sont schématisées à différentes étapes de la division. Les zones grisées représentent les régions où se déroule la première vague de duplication au cours du temps, les zones noires représentent la seconde vague de duplication. (B) A droite est schématisée une paramécie en cours de division sur laquelle sont indiqués ses différents territoires (1 à 5). Selon ces territoires les corps basaux subissent des schémas de duplication différents qui sont détaillés à gauche. Les anciens corps basaux sont représentés en vert; les corps basaux issus de la première vague de duplication, en rouge et les corps basaux issus de la seconde vague de duplication, en rose.

Une région particulière, appelée le champ invariant, est située au niveau antérieur gauche de la cellule (figure 19, zone 3). Cette zone intégralement composée de doublets est destinée à reconstituer le champ avant gauche de la cellule fille antérieure. Le schéma de la duplication y est spécifique. Le corps basal antérieur de chaque paire disparaît pendant la première vague de duplication. Il est remplacé par un corps basal néoformé à partir du corps basal postérieur toujours en place lors de la seconde vague de duplication. Les corps basaux des doublets du champ invariant de la cellule fille postérieure sont tous quant à eux néoformés aux cours des deux vagues de duplication (figure 19, zone 1).

Juste en dessous du champ invariant, se situe une autre zone particulière appelée la zone tampon, qui subit uniquement une seconde vague sur les doublets de corps basaux qui la composent (figure 19, zone 2).

Enfin au niveau postérieur de la cellule, on retrouve une zone où aucune duplication n'a lieu (Iftode et al., 1989) et qui est transmise telle quelle à la cellule postérieure (figure 19, zone 4).

La duplication se déroule en trois grandes étapes : 1) modification structurale du corps basal antérieur de chaque paire lorsqu'il s'agit de doublets, 2) assemblage du nouveau corps basal et 3) maturation de celui-ci.

1) Sur le corps basal antérieur de chaque doublet qui en est dépourvue vont s'assembler une racine post ciliaire accompagnée du « fingered node » ainsi qu'une nouvelle racine striée lui conférant la même organisation que celle du corps basal postérieur. Puis une partie des liens identifiés entre les deux corps basaux vont se désassembler (Iftode and Fleury-Aubusson, 2003).

2) Le nouveau corps basal se développe antérieurement et perpendiculairement au corps basal père (Dippell, 1968). A ce stade précoce de la duplication des liens se sont déjà établis entre les deux corps basaux père et fils au niveau proximal et entre le nouveau corps basal et la racine striée du corps basal père. Après l'élongation des microtubules A, le nouveau corps basal se relève en même temps que polymérisent les microtubules B et C.



L'apparition transitoire d'une structure filamenteuse appelée ALF (Anterior Left Filament) reliée à la racine striée via du matériel fibreux et qui se développe sous les microtubules transverses précède l'apparition de l'ébauche du nouveau corps basal. C'est sous les microtubules transverses et entre la racine striée et l'ALF que se produit la nucléation du nouveau corps basal (Jerka-Dziadosz et al., 2013).

3) A la fin de la duplication, le corps basal fils est parallèle au corps basal père et s'ancre à la membrane plasmique. L'assemblage des trois plaques caractéristiques de la zone de transition précède l'étape d'ancrage (Dippell, 1968). Selon son devenir, au corps basal fils s'associera une racine microtubulaire transverse afin de former une paire de corps basaux ou les trois racines pour former une nouvelle unité corticale comme décrit précédemment (Iftode and Fleury-Aubusson, 2003).

La construction des corps basaux chez la paramécie met en jeu des orthologues de protéines impliquées dans la duplication des centrioles chez les mammifères. En effet les études réalisées sur la paramécie indique que la Gamma tubuline (Ruiz et al., 1999), SAS6, Bld10/CEP135 (Jerka-Dziadosz et al., 2010), SAS4 (Gogendeau et al., 2011), l'Epsilon tubuline (Dupuis-Williams et al., 2002) et la Delta tubuline (Garreau de Loubresse et al., 2001) sont essentiels à leur formation.

Une fois assemblé le corps basal s'ancre directement au cortex cellulaire sans qu'aucun intermédiaire vésiculaire n'ait été décrit à ce jour. C'est aux mécanismes qui sont nécessaires à cet ancrage que je me suis intéressé au cours de ma thèse.



# **Contexte scientifique**



## **V) Contexte scientifique**

Chez la paramécie trois protéines conservées au cours de l'évolution ont été identifiées comme impliquées dans le mécanisme d'ancrage des corps basaux à la membrane plasmique. Il s'agit de FOR20, la Centrine 2 et la Centrine 3 (Aubusson-Fleury et al., 2012). FOR20 fait partie d'une famille de protéines conservées, la famille FOP que je commencerai par décrire avant de m'intéresser aux Centrines.

### **1) Les protéines de la famille FOP**

FOR20 fait partie d'une famille de protéines appelée la famille FOP définie par la présence de 3 domaines conservés dans leur partie N terminale (Azimzadeh et al., 2008). Le domaine LisH est un motif de dimérisation dont les mutations entraînent une altération de la demi-vie et affectent la localisation des protéines au niveau subcellulaire (Gerlitz et al., 2005). Le domaine TOF (Tonneau1, OFD1, FOP) permet, avec le domaine LisH, à la protéine de se localiser au niveau du centrosome. Le domaine PLL (Proline-Leucine-Leucine) localisé en aval des deux autres domaines permettrait, avec le domaine, LisH l'auto-association des différentes protéines nécessaires à leur localisation (Sedjaï et al., 2010).

#### **A) FOP**

Le membre fondateur de cette famille, la protéine FOP elle-même (FGFR1 Oncogene Partner), est une protéine centrosomale découverte à l'origine en tant que partenaire de fusion avec la protéine FGFR1 chez des patients atteints d'un syndrome myéloprolifératif rare (Popovici et al., 1999). Localisée à l'extrémité distale des centrioles, elle s'accumule de façon préférentielle au centriole père (Acquaviva et al., 2009) et joue en complexe avec CAP350 un rôle dans l'ancrage des microtubules centrosomaux (Yan et al., 2006). Par ailleurs, sa déplétion induit des défauts de ciliogenèse (Lee and Stearns, 2013).



## B) OFD1

Parmi les protéines de cette famille, on compte également la protéine OFD1 dont nous avons déjà vu qu'elle était indispensable à la ciliogenèse, qu'elle se localise dans la partie distale des centrioles et qu'elle est impliquée dans le contrôle de leur élongation ainsi que dans le recrutement des protéines des appendices distaux. Chez les mammifères, comme FOP, elle est présente au niveau des satellites centriolaires, structures dont le rôle serait d'inhiber la ciliogenèse en séquestrant les protéines ciliaires (Chavali and Gergely, 2013). De façon surprenante si la présence d'OFD1 à l'extrémité distale des centrioles est indispensable à la ciliogenèse elle nécessite également sa dégradation au niveau des satellites par autophagie (Tang et al., 2013).

## C) FOR20

Tout comme FOP et OFD1, FOR20 se localise dans les cellules de métazoaires au centrosome et aux satellites péricentriolaires. Sa déplétion entraîne des défauts de ciliogenèse (Sedjai et al., 2010). Récemment il a été démontré que OFD1 et FOR20 en association avec KIAA0753/OFIP forment un complexe localisé à la fois au centrosome/centriole et aux satellites, le recrutement de ces trois protéines au niveau de ces structures étant interdépendant (Chevrier et al., 2016).

## D) Tonneau 1

Enfin la protéine Tonneau1 des végétaux joue un rôle essentiel dans le recrutement des microtubules au cortex cellulaire (Azimzadeh et al., 2008). Elle interagit avec la Centrine mais également avec un motif TRM qui de façon surprenante est également conservé dans la protéine CAP350 des mammifères (Drevensek et al., 2012).



## **2) Les Centrines**

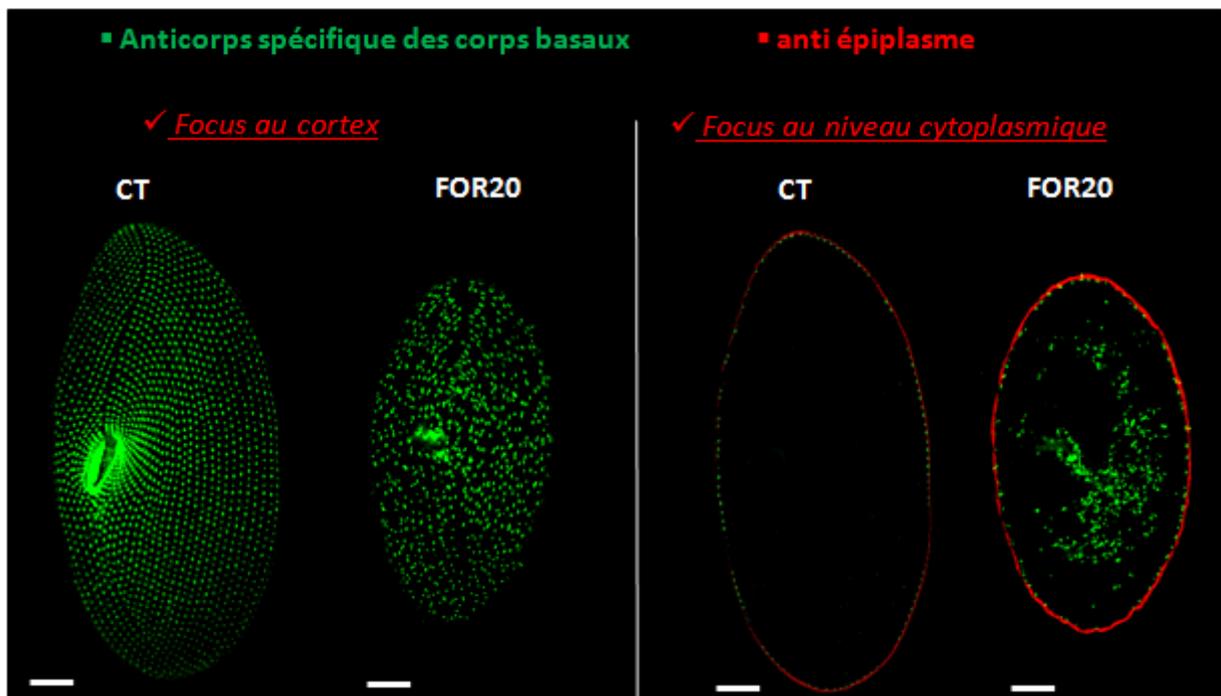
Les Centrines sont de petites protéines, très conservées chez les eucaryotes, capables de fixer le calcium. Parmi les différentes sous-familles de Centrines existant, deux sont principalement associées aux cils et centrioles. La Centrine 2 apparentée à la protéine VFL2 de *Chlamydomonas* et la famille Centrine 3 apparentée à la protéine CDC31 de levure.

Initialement décrite comme impliquée dans la duplication des centrioles (Salisbury et al., 2002) les études récentes sur la Centrine 2 sont plutôt en faveur d'un rôle de la protéine dans la biogénèse des cils. Des anomalies de ciliogénèse ont en effet été observées après son invalidation aussi bien chez le poisson zèbre (Delaval et al., 2011) que dans des cellules RPE1 humaines (Prosser and Morrison, 2015). Des défauts de positionnement et de structures des corps basaux ont également été observés dans des cellules olfactives et épendymaires des souris KO (Ying et al., 2014). Il semble par ailleurs que sa présence soit requise pour la levée de CP110 à l'extrémité distale des centrioles et qu'en son absence certains de ses constituants tels que CEP164, CEP170 et la Ninéine soient délocalisés (Prosser and Morrison, 2015).

Fonctionnellement distincte de la Centrine 2, la Centrine 3 est localisée dans la lumière des centrioles des cellules de mammifères (Middendorp et al., 2000). Des études récentes montrent qu'elle contrôlerait la duplication des centrioles en inhibant la kinase Msp1 et l'incorporation de la Centrine 2 (Sawant et al., 2015).

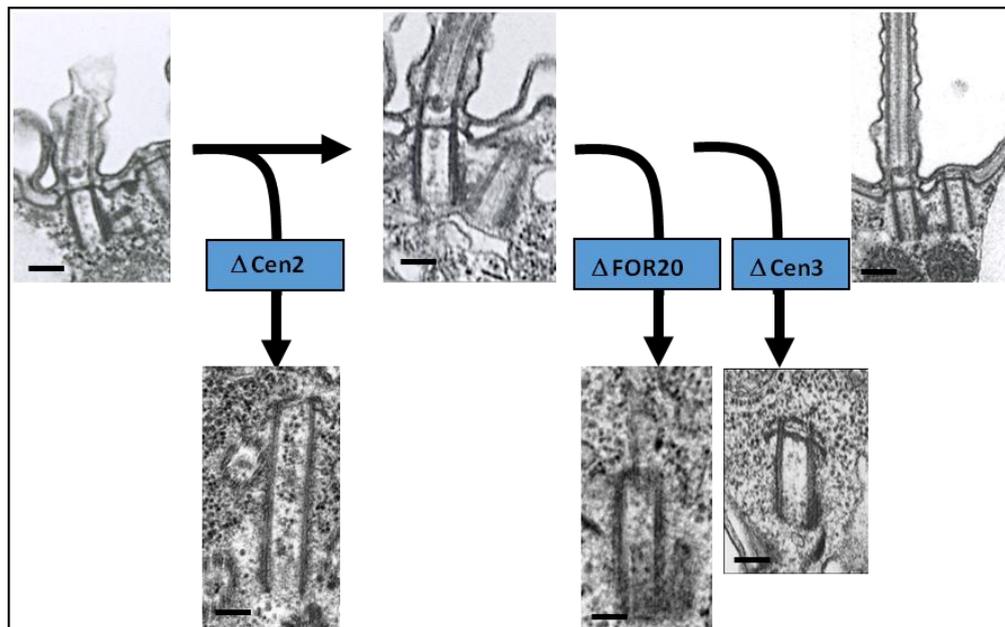
### **3) FOR20, Centrine 2 et Centrine 3 dans l'ancrage**

Chez la paramécie la Centrine 2 et FOR20, recrutées précocement aux cours de l'assemblage des corps basaux sont localisées la première dans la lumière du corps basal (Ruiz et al., 2005) et la seconde entre les microtubules périphériques et la membrane à l'extrémité distale du corps basal (Aubusson-Fleury et al., 2012). La Centrine 3 quant à elle se localise majoritairement à l'extérieur du cylindre centriolaire au niveau de sa partie proximale. Une fraction minoritaire semble néanmoins présente au niveau de la ZT.



**Figure 20: Conséquence de la déplétion d'une protéine impliquée dans l'ancrage chez la *Paramecie*: exemple de FOR20**

Effet de la déplétion de FOR20 sur l'organisation des corps basaux observé après marquage avec des anticorps spécifiques des corps basaux et de l'épiphase (cortex). Lors de la déplétion de FOR20 on observe un défaut de positionnement des corps basaux (vert) au niveau du cortex (rouge) et la présence de corps basaux intra-cytoplasmiques caractéristiques d'un défaut d'ancrage. Barre d'échelle: 10  $\mu$ m. (D'après Aubusson et al., 2012)



**Figure 21: Différence ultrastructurale des corps basaux observés après déplétion de FOR20, de la Centrine 2 ou de la Centrine 3**

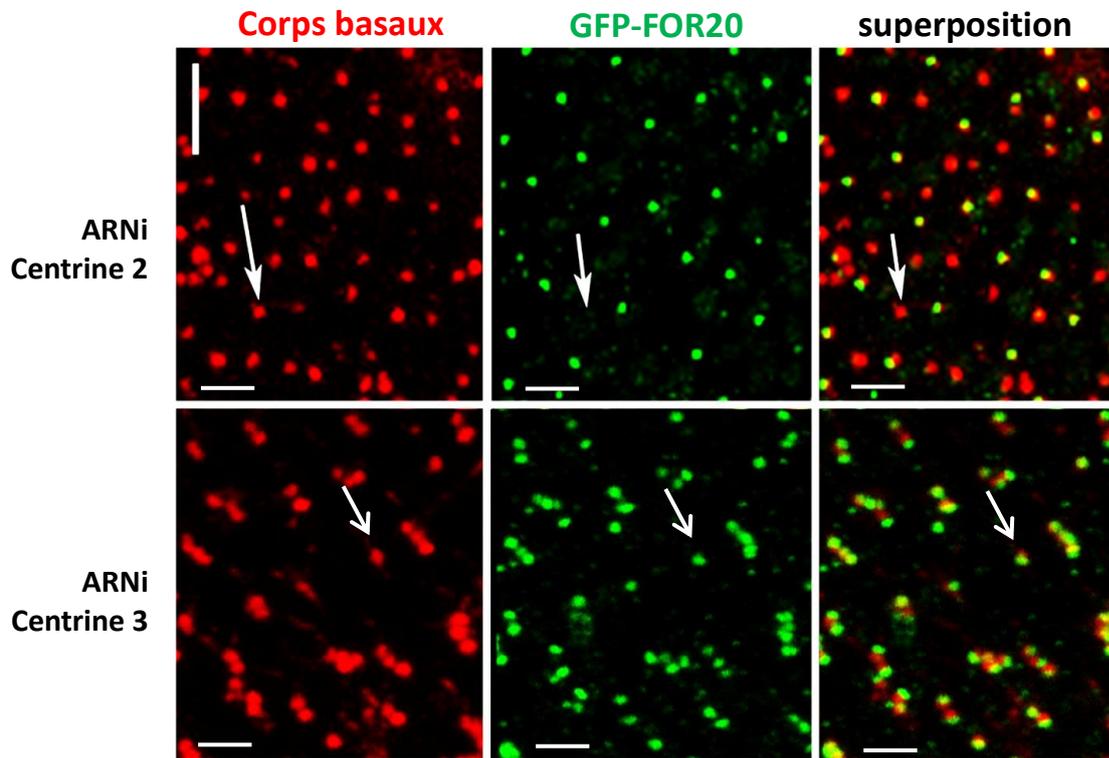
On observe après déplétion de chacune de ces trois protéines, la présence de corps basaux intra-cytoplasmiques caractéristiques d'un défaut d'ancrage. Les corps basaux intra-cytoplasmiques retrouvés après déplétion de la Centrine 2 sont plus longs et présentent une zone de transition quasi absente. Après déplétion de FOR20, les corps basaux intra-cytoplasmiques sont de taille normale mais la zone de transition n'est que partiellement formée. Enfin la déplétion de la Centrine 3 engendre la présence de corps basaux intra-cytoplasmiques ne présentant pas de défauts structurels. Barre d'échelle: 200 nm.

La déplétion de chacune de ces protéines induit des défauts de positionnement et d'ancrage des corps basaux à la surface (figure 20) (Aubusson-Fleury et al., 2012). Pourtant les corps basaux mal attachés au cortex ne présentent pas les mêmes anomalies montrant que ces 3 molécules interviennent dans des étapes distinctes de leur formation. Ainsi les corps basaux assemblés en absence de Centrine 2 et de FOR20 ont des défauts dans leur partie distale, les trois plaques de la zone de transition étant absentes ou incomplètes (figure 21) ce qui explique les défauts d'ancrage à la surface. On observe des corps basaux plus longs que la normale dans les cellules déplétées pour la Centrine 2 montrant qu'elle contrôle également l'étape d'allongement des microtubules centriolaires. Les corps basaux formés en absence de Centrine 3 apparaissent au contraire parfaitement assemblés et leur extrémité distale normale. L'absence de la fraction de Centrine 3 présente à l'extrémité distale des corps basaux pourrait être à l'origine des défauts d'ancrage. Toutefois l'observation de corps basaux entièrement assemblés mais toujours orientés perpendiculairement à leurs pères et non relevés dans les cellules déplétées pour Centrine 3 suggère une origine plus précoce du défaut. Cette hypothèse est étayée par le fait que l'inactivation de la Centrine 3 inhibe la formation de l'ALF qui pourrait servir au redressement des corps basaux vers la surface cellulaire (Jerka-Dziadosz et al., 2013).

La déplétion de chacune de ces protéines sur des lignées exprimant l'un des autres gènes étiquetés à la GFP ont permis d'établir un ordre d'intervention de ces protéines dans l'étape d'ancrage (figure 22). La Centrine 2 est nécessaire au recrutement de FOR20 au niveau des corps basaux ce qui est compatible avec les différences structurales observées à leur extrémité distale lors de leur déplétion.

#### **4) Deux protéines d'intérêt: OFD1 et VFL3**

Pour essayer de progresser dans la compréhension des mécanismes impliqués dans l'ancrage des corps basaux à la surface chez la paramécie, j'ai entrepris l'analyse fonctionnelle de deux protéines OFD1 et VFL3.



**Figure 22: Inter-relation des protéines FOR20, Centrine 2 et Centrine 3**

En l'absence de Centrine 2, GFP-FOR20 n'est plus recrutée au niveau des nouveaux corps basaux alors qu'en absence de la Centrine 3, GFP-FOR20 est bien recrutée. Des expériences complémentaires réalisées avec des cellules exprimant GFP-Centrine 2 et GFP-Centrine 3 ont permis d'établir les relations d'épistasie entre ces trois protéines. Barre d'échelle: 2  $\mu\text{m}$ . (D'après Aubusson-Fleury et al.,2012).

## A) OFD1

Différentes considérations ont conduit à étudier OFD1. D'une part, valider notre modèle pour l'étude de l'ancrage des corps basaux en introduisant dans notre cascade une protéine bien connue pour être impliquée dans ce mécanisme. D'autre part, les données concernant sa fonction dans l'assemblage des cils motiles étaient rares. Ainsi si chez des malades atteints du syndrome Oro facial digital de type 1 des défauts d'accrochage des corps basaux à la surface des cellules multiciliées ont été observés (Thauvin-Robinet et al., 2013), chez le poisson zèbre l'invalidation de la protéine n'abolit pas la ciliogenèse des cils motiles de la vésicule de Kupffer (Ferrante et al., 2009). Dans ce cas, des anomalies de structure de l'axonème ont néanmoins été constatées ce qui paraissait compatible avec l'observation occasionnelle d'OFD1 dans le cil primaire (Romio et al., 2004; Jerman et al., 2014) ou l'existence de dérèglements de ciliogenèse observés dans des cellules du cerveau de souris mutantes porteuses d'une délétion des exons 4 et 5 du gène *OFD1* (D'Angelo et al., 2012).

## B) VFL3

Contrairement à OFD1, VFL3 a été peu étudiée. Les mutations de la protéine VFL3 obtenue chez *Chlamydomonas* montraient néanmoins que la protéine pouvait jouer un rôle dans l'ancrage (Wright et al., 1983). Chez cet organisme, les corps basaux flagellés sont reliés dans leur partie proximale et distale par des racines striées qui sont associés à des triplets spécifiques du corps basal. Chez les mutants *VFL3*, Wright et ses collaborateurs montrent que les défauts dans le positionnement sont associés à des défauts de ségrégation des corps basaux ainsi qu'à la présence de racines striées incomplètes. Pour expliquer les différents défauts observés et en particulier les défauts de positionnement, ils ont privilégié un modèle dans lequel l'effet primaire serait un défaut d'assemblage des racines striées.

Le mutant *VFL3* a été utilisé dans une autre étude portant sur les voies de duplication. Marshall et ses collaborateurs suggèrent que cette protéine est impliquée dans la voie de duplication dépendant du centriole. La duplication via la voie *de novo* semble toutefois maintenue dans ces mutants (Marshall et al., 2001).



Par ailleurs, l'homologue humain de cette protéine (CCDC61) a été retrouvée au sein du centrosome (Jakobsen et al., 2011) et des analyses globales de RNAi menée chez la planaire a démontré que son inactivation modifiait la locomotion (Azimzadeh et al., 2012).



# Résultats



## **VI) Résultats**

### **A) Résumé**

Je résumerai ici les résultats qui sont présentés dans l'article que nous avons soumis à Cilia et qui concernent l'analyse fonctionnelle d'OFD1 et de VFL3 chez *Paramecium tetraurelia*.

Chez cet organisme, il existe un gène unique codant pour la protéine OFD1. Nous avons identifié 4 gènes codant pour des homologues de *VFL3/CCDC61* appelés *VFL3-1*, *VFL3-2*, *VFL3-3* et *VFL3-4* qui peuvent être regroupés en deux familles. Les deux premiers gènes codent pour la famille VFL3-A et les deux derniers gènes codent pour la famille VFL3-B. Ces familles proviennent des différentes duplications globales de génome qui ont eu lieu dans cette espèce au cours de l'évolution. Une analyse phylogénétique indique que les protéines codées par les gènes de la famille *VFL3-A* sont plus proches de celles codées par le génome de *Chlamydomonas*, l'organisme dans lequel sa fonction a été initialement décrite.

Pour aborder les fonctions de ces différentes protéines chez la paramécie, nous avons testé, dans un premier temps, grâce à des marquages immunocytochimiques, si leur inactivation conduisait à des défauts d'ancrage des corps basaux à la membrane plasmique. Les gènes des familles *VFL3-A* et *VFL3-B* ont été inactivés individuellement. Nous avons ensuite caractérisé les défauts des corps basaux induits par ces déplétions par des analyses ultrastructurales. Puis nous avons cherché à localiser OFD1 et une isoforme de chaque famille VFL3-A et VFL3-B après leur étiquetage par la GFP ou l'épitope Myc.

### **OFD1**

La déplétion d'OFD1 s'accompagne d'un défaut de croissance cellulaire, de l'altération de la nage et de la forme des cellules qui meurent après trois/quatre divisions suivant l'inactivation. Des doubles marquages avec l'anticorps ID5, qui révèle les corps basaux et un anticorps anti-epiplasme qui permet de visualiser le cortex cellulaire, ont été réalisés sur des cellules après une division suivant la déplétion d'OFD1. De nombreux corps



basaux profondément enfoncés dans le cytoplasme ainsi que des corps basaux mal positionnés au cortex ont ainsi été mis en évidence. Les analyses en microscopie électronique montrent que la plupart des corps basaux intra-cytoplasmiques ou partiellement accrochés au cortex présentent des extrémités distales mal assemblées.

L'expression d'une protéine OFD1 étiquetée par la GFP a permis de localiser la protéine. Des immunomarquages avec l'anticorps ID5 sur des cellules en interphase exprimant GFP-OFD1 montrent que la protéine est présente à l'extrémité distale des corps basaux accrochés au cortex. Les observations sur des cellules en division indiquent que la protéine est recrutée précocement au cours de l'assemblage du nouveau corps basal. Dans un contexte spécifique à la paramécie, où un corps basal ancré à la surface peut se désassembler, OFD1 reste associée à la surface cellulaire. Enfin grâce à la microscopie électronique, OFD1 a pu être localisée au niveau de la plaque intermédiaire de la zone de transition à l'extérieur du cylindre du corps basal entre les doublets de microtubules et la membrane ciliaire.

L'implication d'OFD1 dans la formation de l'extrémité distale des corps basaux a conduit à étudier ses relations avec deux protéines également impliquées dans la formation de cette extrémité distale chez la paramécie, FOR20 et Centrine 2. Des expériences d'inactivation de FOR20 et de Centrine 2 ont donc été effectuées sur des transformants exprimant GFP-OFD1. Les expériences réciproques ont également été réalisées. Si les recrutements d'OFD1 et de la Centrine 2 sont indépendants, il existe une interdépendance pour le recrutement d'OFD1 et de FOR20.

### **VFL3**

Comme observé dans le cas d'OFD1, la déplétion des protéines de la famille VFL3-A s'accompagne d'un ralentissement de la division cellulaire, de l'altération de la nage des cellules et entraîne la mort à compter de la quatrième division. Au contraire, bien que l'expression des gènes de la famille *VFL3-B* ait été réduite de soixante pour cent, aucun défaut de croissance cellulaire, de nage, de forme ou de ralentissement de la division n'a été observé au cours de leur inactivation. Ceci laisse penser que les deux familles de gènes *VFL3* ont des fonctions distinctes. Cette hypothèse est étayée par le fait que l'expression des gènes de la famille *VFL3-B* ne complètent pas l'inactivation des gènes de la famille *VFL3-A*.



Contrairement à ce qui a été remarqué pour OFD1, la plupart des corps basaux mal positionnés dans les cellules déplétées pour VFL3-A restent à proximité de la surface cellulaire. On observe également un excès de doublets et la présence de triplets de corps basaux à la surface des cellules inactivées pour VFL3-A, qui ne peuvent s'expliquer par une sur-duplication de corps basaux. Nous avons donc interprété cette observation comme un défaut de ségrégation des nouveaux corps basaux par rapport à leur père au cours de leur assemblage.

Les appendices associés aux extrémités proximales des corps basaux jouant un rôle essentiel dans les différents mouvements qui accompagnent leur duplication, nous avons recherché si la déplétion de VFL3-A affectait également leur formation. Trois structures principales associées à l'extrémité proximale des corps basaux ont été décrites chez la paramécie : une racine striée et deux racines microtubulaires, la racine post-ciliaire et la racine transverse. Des immunomarquages réalisés avec des marqueurs spécifiques de ces racines indiquent que la déplétion de VFL3-A affecte la position et la formation de ces trois types de structures. Ainsi jusqu'à trois racines striées peuvent être associées à un seul corps basal tandis que certains sont totalement dépourvus de toute structure.

Les analyses en microscopie électronique confirment les défauts d'assemblages des racines striées observés par immunomarquage. Ils révèlent par ailleurs que les corps basaux retrouvés au niveau sous cortical sont pour la plupart parfaitement assemblés et possèdent une extrémité distale normalement constituée mais sont anormalement orientés par rapport à la surface cellulaire. Les observations de ces cellules au cours de la première division suivant l'inactivation montrent des nouveaux corps basaux anormalement orientés et espacés par rapport à leur père et non redressés. Des structures anormales liant anciens et nouveaux corps basaux sont également retrouvées. Ces anomalies peuvent expliquer la présence inaccoutumée de triplets et l'excès de doublets observés en immunocytochimie après la division.

L'une des isoformes de la famille VFL3-A a pu être localisée après étiquetage avec l'épitope Myc. Qu'elle soit exprimée sous le contrôle de ses propres régulateurs ou celui d'un régulateur constitutif, on ne l'observe que dans les cellules en division au niveau antérieur des corps basaux en cours de duplication. L'observation en STED a permis de préciser la localisation dans la partie proximale du corps basal père entre les microtubules et la racine



striée. Par ailleurs les protéines de la famille VFL3-A sont indispensables au recrutement de la Centrine 3 qui joue un rôle essentiel dans les mouvements des corps basaux vers la surface cellulaire. Enfin j'ai montré qu'une des isoformes de la famille VFL3-B se localise tout au long du cycle cellulaire au niveau des corps basaux.



**Basal Body Positioning and Anchoring in the multiciliated cell  
*Paramecium tetraurelia*: roles of OFD1 and VFL3**

**Hakim Bengueddach, Michel Lemullois, Anne Aubusson-Fleury and France Koll.**

Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC),  
CEA, CNRS, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay  
1 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette, France.

Hakim.bengueddach@i2bc.paris-saclay.fr  
Michel.lemullois@i2bc.paris-saclay.fr  
aaff@orange.fr  
France.koll@i2bc.paris-saclay.fr



## **Abstract**

### **Background**

The development of a ciliary axoneme requires the correct docking of the basal body at cytoplasmic vesicles or plasma membrane. In the multiciliated cell *Paramecium*, three conserved proteins, FOR20, Centrin 2 and Centrin 3 participate in this process, FOR20 and Centrin 2 being involved in the assembly of the transition zone. We investigated the function of two other evolutionary conserved proteins, OFD1 and VFL3, likely involved in this process.

### **Results**

In *P. tetraurelia* a single gene encodes OFD1, while 4 genes encode 4 isoforms of VFL3, grouped into two families, VFL3-A and VFL3-B. Depletion of OFD1 and the sole VFL3-A family impairs basal body docking. Loss of OFD1 yields a defective assembly of the basal body distal part. Like FOR20, OFD1 is recruited early during basal body assembly and localizes at the transition zone between axoneme and membrane at the level of the microtubule doublets. While the recruitment of OFD1 and Centrin 2 proceed independently, the localizations of OFD1 and FOR20 at the basal body are interdependent.

In contrast, in VFL3-A depleted cells, the unanchored basal bodies harbor a fully organized distal part but display an abnormal distribution of their associated rootlets which mark their rotational asymmetry. VFL3-A, which is required for the recruitment of Centrin 3, is transiently present near the basal bodies at an early step of their duplication. VFL3-A localizes at the junction between the striated rootlet and the basal body.

### **Conclusion**

Our results demonstrate the conserved role of OFD1 in the anchoring mechanisms of motile cilia and establish its relations with FOR20 and Centrin 2. They support the hypothesis of its association with microtubule doublets. They suggest that the primary defect of VFL3 depletion is a loss of the rotational asymmetry of the basal body which specifies the sites of



assembly of the appendages which guide the movement of basal bodies toward the cell surface. The localization of VFL3 outside of the basal body suggests that extrinsic factors could control this asymmetry.

### **Keywords**

Basal body- OFD1-VFL3/CCDC61- Anchoring - Rotational asymmetry



## Background

Generally absent in land plants or higher fungi, one or several cilia involved in motility, feeding, sensation and sexual process, localize at the cell surface of numerous protists. This diversity is also observed in metazoa in which the number of cilia protruding from the surface depends on the cellular type: either a solitary cilium, also called primary cilium or several, often hundred cilia, can develop at the surface of specialized differentiated cells. Cilia are anchored at the cell surface by the basal body. In the case of the primary cilium, it is a derivative of the mother centriole, one of the two centrioles which organize the centrosome and contains two specific structures, the distal and sub-distal appendages.

Depending on the cellular type, the development of the primary cilium is initiated in the cytoplasm after docking of the mother centriole, via its distal appendages to Golgi derived vesicles or, directly in the external cellular space, after docking at the plasma membrane [1,2]. This second pathway is also observed during the formation of motile cilia in multiciliated cells which occurs after multiplication of the centrioles/basal bodies deep in the cytoplasm and their migration towards the apical membrane. In multiciliated cells including epithelial cells of the human oviduct [3], of the epidermal *Xenopus* embryo [4] and of the mouse trachea [5], observations of basal bodies whose distal parts were surrounded by large or small vesicles suggest that in some cases, a basal body/vesicle interaction could also precede the docking of the basal body at the cell surface. The key role of the distal appendages in the anchoring process is supported by several results demonstrating that the depletion of proteins involved in their assembly impairs the docking [6].

In the multiciliated organism *Paramecium*, basal body anchoring at the cell surface does not involve vesicular intermediate [7]. The ciliogenesis is initiated by the development, from an already anchored basal body, of a new basal body which directly docks at the surface. Ciliated and non ciliated basal bodies are observed indicating that axoneme extension is not necessarily associated with the basal body docking event [8]. Three typical plates organize the transition zone of the ciliated basal body, which also displays transition fibers, a ciliary necklace and Y links [9]. These three plates appear more closely apposed at the distal end of non ciliated basal body and form the protransition zone [10]. These structures cap the tip of the basal body before its docking at the cell surface [7].



Three appendages protrude asymmetrically from the *Paramecium* basal bodies, one striated rootlet and two microtubular ribbons. They are thought to act as a scaffold for defining the site of new basal body assembly and to maintain the organization of the basal body row at the cell surface [11,12]. A transient appendage of the mother basal body, the ALF (Anterior Left Filament) also guides the movement of the daughter basal body toward the cell surface [13].

We have previously shown that Centrin 2, Centrin 3 and FOR20 are involved in the positioning and anchoring of basal bodies at the surface [8,14]. Centrin 2 and FOR20 localize respectively in the basal body lumen and at the distal part of anchored basal body. The assembly of the structural elements of the pro-transition zone is impaired upon Centrin 2 and FOR20 depletion. Thus, in *Paramecium* as in metazoan cells, there is a correlation between defects in the structure of the basal body tip and in the anchoring process. In contrast, the depletion of Centrin 3 which is mainly located anteriorly to the proximal part of the centriolar cylinder [14] does not lead to defects in this assembly. The fully assembled new basal bodies are disoriented with respect to the mother, suggesting that the initial defect resides in the movement of the new basal body towards its docking site. This is supported by the fact that inactivation of Centrin 3 inhibits the formation of the ALF which may contribute to tilt up the basal body toward the cell surface [13].

In order to go further in the anchoring process in *Paramecium*, we undertook a functional analysis of homologs of conserved protein likely involved in this mechanism such as OFD1 and VFL3. OFD1, a protein whose mutations induce ciliopathies such as oro-facial digital type 1 [15] is well known to be involved in the basal body anchoring process during the formation of the primary cilium. Located at the distal end of the mother centriole in mammalian cells [16], it is essential for the formation of the distal appendages which anchor the ciliary membrane vesicles before axoneme extension. Like FOR20, OFD1 possesses a conserved TOF/LisH motif [17] required for centrosomal localization [18]. OFD1 was recently shown to form a ternary complex with FOR20 and OFIP at the centriolar satellites of mammalian cells [19]. However the function of OFD1 in the assembly of the motile cilium remains relatively unstudied. *VFL3* was essentially studied in *Chlamydomonas*. Its mutation which affects basal body positioning at the cell surface is correlated with the lack of appendages [20]. Its ortholog in metazoa, CCDC61, is associated with the centrosome in human cells [21,22]. We present here the analysis of OFD1 and VFL3 in *Paramecium*.



## Methods

### Strains and culture conditions.

Stock d4-2 of *Paramecium tetraurelia*, the wild-type reference strain, was used in RNAi experiments. The mutant nd7-1 [23] which carries a recessive monogenic mutation preventing trichocyst discharge, a dispensable function under laboratory conditions, was used for transformations. Cells were grown at 27°C in a wheat grass infusion, BHB (L'arbre de vie, Luçay Le Male, France) bacterized with *Klebsiella pneumoniae* and supplemented with 0.8 µg/ml β-sitosterol according to standard procedures [24].

### Gene cloning.

Constitutive expression of the Myc-tagged *VFL3-1* and *-VFL3-3* genes: the tag was added at the 5' end of each gene by PCR amplification, using 5'-end specific primers in which the Myc coding sequence was added. After restriction digests, the fragments were cloned into the *SpeI* restriction site of the pPXV vector, the recombinant genes being under the control of the *Paramecium* calmodulin constitutive regulators.

Expression of the *GFP-VFL3-3* and *GFP-OFD1* under the control of their own regulators: the putative promoter of each gene was first amplified by PCR and cloned upstream the GFP-coding fragment inserted into the pZZ-GFP vector (a derivative of the pPXV-GFP vector kindly provided by Jean Cohen) using the *BamHI* and *SpeI* restriction sites. Then, each gene, followed by its putative 3'UTR, was amplified by PCR and cloned downstream the GFP sequence, between the *XhoI* and *XmaI* sites.

Constitutive expression of *GFP-OFD1*: the *OFD1* gene was amplified by PCR from genomic DNA and cloned downstream the GFP sequence into the *KpnI* site of the pPXV-GFP plasmid which contains the constitutive regulators of the calmodulin gene. Three glycine codons were added between the *GFP* and the *OFD1* sequences.



Gene silencing: all RNAi plasmids are derivatives of the vector L4440 [25] and carry fragments of the target genes inserted between two convergent T7 promoters. Silencing of the *VFL3-A* subfamily gene was performed using a vector containing a fragment of the *VFL3-1* gene (from base 20 to 637) linked to a fragment of the *VFL3-2* gene (from base 861 to 1375). The two fragments were amplified by PCR and cloned successively into the vector. The RNAi of the *VFL3-B* subfamily was performed by using a vector containing a *VFL3-3* fragment extending from base 328 to 701 and linked to a part of the *VFL3-4* gene extending from base 1124 to 1725. Finally, for *OFD1* silencing, a fragment extending from base 254 to 1310 was used. Amplifications were performed with high fidelity Phusion DNA polymerase using standard procedures. After cloning, the genes were entirely sequenced to ensure that no error was introduced during the amplification.

### **RNA extraction and Northern blot analysis.**

Total RNA was extracted using TRIzol as previously described [26]. For Northern blots, 20 µg of total RNA were denatured and loaded on 1% agarose gels. Electrophoresis in 1× Tris-borate-EDTA transferred to Hybond N+ membranes (GE Healthcare), and hybridization with 32P-labeled DNA probes were performed as previously described [27]. *VFL3-1* probe: sequence of the *VFL3-1* gene from base 861 to 1375. *VFL3-2* probe: sequence of *VFL3-2* from base 20 to 637. *VFL3-3* probe: sequence of *VFL3-3* from base 1354 to 1725. *VFL3-4* probe: sequence of *VFL3-4* from base 330 to 831. The sequences of these probes are specific for each gene and do not cross-react with the double strand RNA produced by the RNAi vector. Radioactive signals were quantified using ImageQuant.

### **Paramecium transformation**

nd7-1 mutant cells unable to discharge their trichocysts were transformed by micro-injection into their macronucleus of filtered and concentrated plasmid DNA containing a mixture of the plasmids of interest (5 µg/µl) digested by *Sfi*1 and of plasmid DNA directing the expression of the ND7 wild type gene [23]. Transformants were first screened for their ability to discharge their trichocysts and if so, further analyzed. Microinjection was made under an inverted Nikon phase-contrast microscope, using a Narishige micromanipulation device and an Eppendorf air pressure microinjector.



### **Gene silencing.**

Gene silencing was performed by the feeding method as previously described [28]. Stationary wild-type cells were fed with the appropriate double-stranded-RNA-expressing HT115 bacteria and transferred daily into fresh feeding medium as needed. Control cells were fed with bacteria transformed by the L4440 plasmid.

### **Immunolabeling.**

Immunolabeling was carried out as previously described [29]. Briefly, paramecia were permeabilized 5 min in 1% TritonX100 in PHEM buffer (PIPES 60 mM, HEPES 25 mM, EGTA 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM pH6.9) fixed in 2% Paraformaldehyde in PHEM buffer for 10 min, and rinsed 2x15 min in TBST/BSA (Tris 10mM, NaCl 0.15M, Tween20, 3% BSA, EGTA 10 mM MgCl<sub>2</sub> 2 mM). All subsequent steps were performed in this same buffer. Cells were incubated in the primary antibody for 20 min, rinsed twice and incubated in the secondary antibody for 25 min, rinsed in TBST/BSA supplemented with Hoechst 2mg/ml and then in TBST/BSA without Hoechst.

Antibodies: The monoclonal anti-tubulin antibody 1D5 [30] at a dilution 1:100; a polyclonal affinity purified PolyE anti-tubulin [31] at 1 :7000 dilution; the monoclonal CTS32 directed against epiplasmins diluted 1:20 to decorate the epiplasm [32], the monoclonal anti-Myc antibody 9E10 (Sigma) at a dilution 1:1000, the polyclonal anti-ciliary rootlet serum at a dilution 1:800 [33], the monoclonal anti-tubulin acetylated TEU318 [34] culture supernatant at a dilution 1:10, and secondary antibodies labelled with Alexa Fluor 488 or 568 from Invitrogen-Molecular Probes (Eugene, OR), or Cy5 (Life Technologies) at a dilution 1 :250-1:500

### **Fluorescence microscopy.**

Cells were observed with a Zeiss Axioskop 2 plus equipped with epifluorescence. Images were acquired with a CoolSnap camera coupled with Metavue. Confocal acquisitions were made with a Leica SP8 equipped a UV diode (line 405), and three laser diodes (lines 488, 552 and 635) for excitation and two PMT detectors. Images stacks were processed with imageJ



and Photoshop. STED imaging was performed using a Leica TCS SP8 STED 3X (Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Germany). The system was equipped with a WLL ranging from 470 to 670 nm for excitation and with 3D STED lasers at 592nm, 660nm and 775nm. A 100x 1,4 Oil STED white objective was used to acquire the images. GFP, AF568 and Cy5 were excited at 488 nm, 561 nm and XXX nm respectively. Detection ranges were 500-550, 575-625 nm and xxx-xxx nm respectively. Signals were recorded on Hybrid Detectors using time gated detection of 1.5-6.0 ns, 0.5-6.0 ns and xx\_xx ns for GFP, AF 568 and Cy5 respectively. A pixel size of 25 nm was used. For deconvolution, SVI Huygens was used.

### **Countings of basal bodies.**

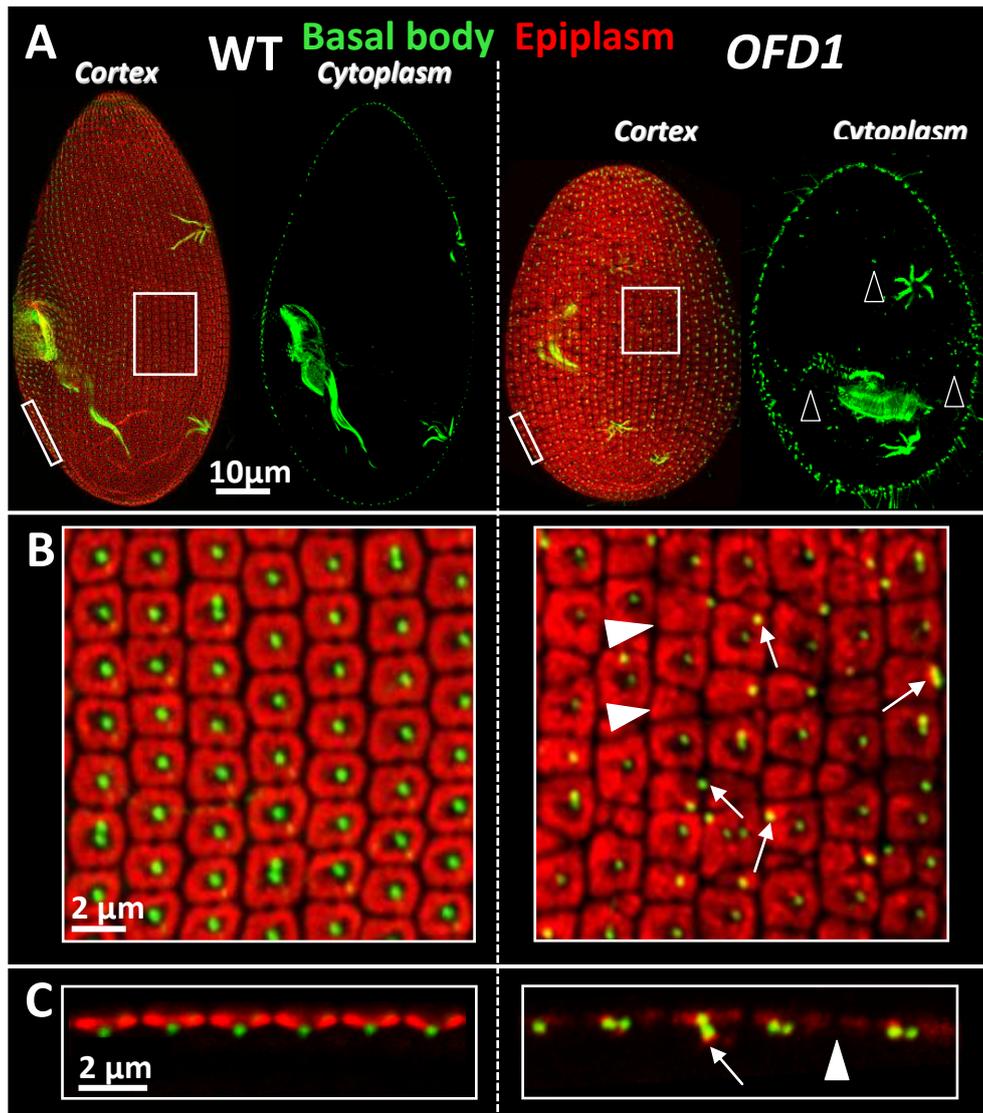
Countings of basal body doublets were performed from projections of images acquired at the dorsal side of paramecium cells labelled by the ID5 antibody. Automatic countings were performed by using the ImageJ software and were refined manually. Seven wild type cells and eleven *VFL3-A* inactivated cells obtained from three independent RNAi knock down experiments were used. The percentage of basal body containing abnormal striated rootlets was calculated from manual counting on ten cells obtained from three independent RNAi knock down experiments.

### **Electron microscopy.**

For ultrastructural observations, the depleted and control cells were fixed in 1% (v/v) glutaraldehyde and 1% OsO<sub>4</sub> (v/v) in 0.05 M cacodylate buffer, pH 7.4 for 30 min. After rinsing and dehydration in ethanol and propylene oxide series, they were embedded in Epon resin. For pre-embedding immunolocalization, the immunostaining process was carried out as described for immunofluorescence using a gold-coupled instead of fluorochrome-coupled secondary antibody. Then the cells were rinsed, fixed and embedded as previously described [8]. For post-embedding immunolocalization, cells were fixed in 3% paraformaldehyde, 0.15% glutaraldehyde, in 0.05 M cacodylate buffer, pH 7.4 at 4 °C for 1 h. After washes and dehydration in ethanol, they were embedded in LR White (London Resin). Thin sections were collected on nickel grids and treated with 0.1 M NH<sub>4</sub>Cl in 0.1 M PBS and then saturated with 3% BSA and 0.1M glycine in PBS. Sections were incubated with anti-GFP polyclonal



antibody at room temperature for 45 mn. After several washes in PBS a gold labelled anti-rabbit IgG (GAR G10, Aurion) diluted 1/50 was applied for 30 mn. The grids were rinsed in PBS and distilled water, and finally stained with uranyl acetate. All ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The sections were examined with Jeol 1400 (120kV) or Philips CM10 transmission electron microscopes.



**Figure 1**

**OFD1 depletion alters basal body positioning.** (A) Projections of optical sections through the dorsal surface (cortex) and the cytoplasm of cells labelled with ID5 (green), a marker of basal bodies and the anti-epiplasm antibody (red). *OFD1*: cell observed after one division upon *OFD1* depletion. The depleted cell is smaller than the control. Numerous internal basal bodies are observed (empty arrowheads). (B) Magnification of A. The basal bodies (green) appear in the center of the units (red) in the wild type cell. Basal bodies lying between units (arrows) and units devoid of basal bodies (filled arrowheads) are observed in the *OFD1* depleted cell. (C) Optical transverse sections (top: outside; bottom: inside the cell) performed across the cell surface. In the control cell, the basal bodies are located at the center of the epiplasmic units (red). In the *OFD1* depleted cell, basal bodies lying under the cell surface are observed (white arrows). Small epiplasmic units and epiplasmic units devoid of basal bodies are also observed (filled arrowhead).

## Results

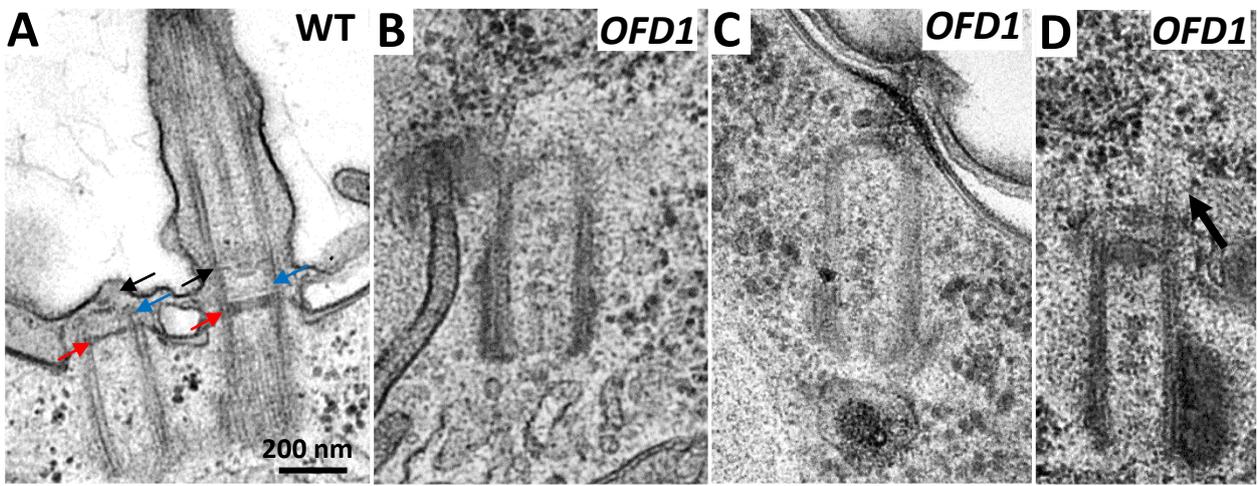
### Identification of the VFL3 and OFD1 genes in *Paramecium tetraurelia*.

While a single *VFL3* gene is present in *Chlamydomonas*, four *VFL3* genes (*VFL3-1*, *VFL3-2*, *VFL3-3*, and *VFL3-4*) are encoded in the *Paramecium tetraurelia* genome which has undergone at least three successive whole genome duplications (WGD) during the evolution [26]. Phylogenetic analysis indicates that the four *P. tetraurelia* genes can be grouped into two families (*VFL3-A* and *VFL3-B*), the *VFL3-A* proteins being more closely related to the *Chlamydomonas* one (Figure S1). Only one gene of each family is encoded in the *P. caudatum* genome, a closely related species which shares only the most ancient of the three WGDs with *P. tetraurelia* [35]. Only one *OFD1* ortholog is encoded in the genome. The alignment of the conserved N-terminal part of this protein with its orthologs is presented in Figure S2.

### Role of OFD1 in the basal body anchoring process and distal part assembly

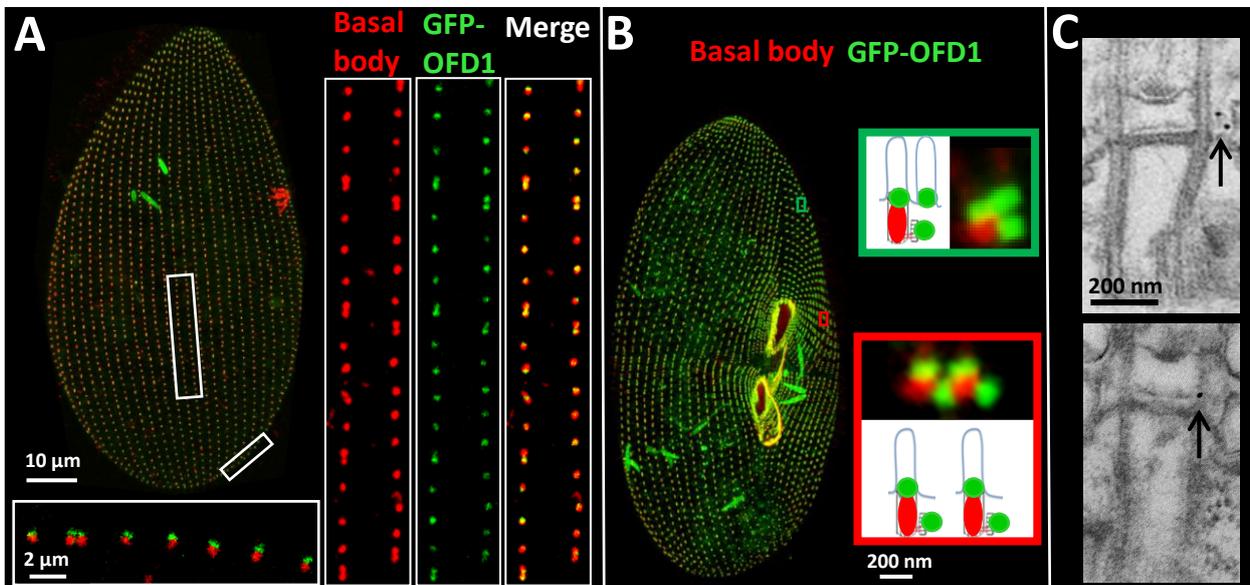
We tested the involvement of *OFD1* in basal body anchoring by RNAi knockdown experiments using the feeding method [28]. To silence the unique *OFD1* gene, we performed inactivation by bacteria producing dsRNA covering 56% of the gene (1055nt/1887nt). The efficiency of the vector to inactivate its target was tested by controlling the effective depletion of the GFP-tagged protein (see Figure S3).

In interphase cells, the basal bodies are embedded in cortical units which contain either one or two basal bodies, the distribution of these units being specific of the cell areas. During cell division, neoformed basal bodies are inserted in these units anterior to their parental basal bodies. Depending on the cell territories, several rounds of duplication can occur, generating several new basal bodies from a preexisting one. This is associated with the elongation of the cortical units which then split to form the individualized units in the daughter cells. An additional wave of duplication occurs in a subset of cortical units to generate units with basal body pairs. After division, the daughter cells inherit a global pattern of cortical units identical to that of their mother [11].



**Figure 2**

**Anomalies of basal body ultrastructure induced by OFD1 depletion.** Longitudinal sections of non ciliated and ciliated basal bodies in WT cell (A) and OFD1 depleted cell (B, C, D). The three plates present in the protransition zone and the transition zone (A) are indicated by arrows. Red arrows: terminal plate; blue arrows: intermediate plate; black arrows: axosomal plate. Undocked (B) or partially docked (C) basal bodies in OFD1 depleted showing defective distal structures. (D) An internal basal body prolonged by an abnormal transition zone and microtubule (black arrow).



**Figure 3**

**Localization of GFP-OFD1.** (A) and (B) Immunofluorescence. Transformants expressing GFP-OFD1 were stained by ID5. (A) An interphase cell. Right insets: the GFP-OFD1 signal (green) overlaps the ID5 labeling (red) on all basal bodies. Bottom inset: an optical transverse section (top, outside; bottom, inside the cell) performed across the cell surface shows the GFP signal at the distal part of the basal bodies. (B) A dividing cell. Red inset: an optical section through the cell surface at the level of duplicating basal bodies. In addition to the distal GFP labelling (green) at the distal part of the parental basal bodies (red), a GFP signals, not labelled by ID5 localize at the site where new basal bodies are expected to assemble. Green inset: an optical section at the level of the “invariant field”. A dual GFP labelling is detected near the posterior basal body of the doublet when the new basal body assemble: one corresponding to the nascent basal body and the other one corresponding to the anchoring site of the disassemble one. (C) Immunoelectron microscopy. Localization of the GFP tag after pre-embedding (upper panel) and post-embedding (lower panel) immunolabeling. On longitudinal sections, the labeling is located just above the terminal plate near the intermediate plate (arrows). The gold particles are always localized to the outer side of the axoneme at the level of the microtubular doublets.

OFD1 knockdown induced a cellular growth defect and cell size reduction after 1 division and cellular death after 4/5 divisions. To analyze the effects of the depletion on the basal bodies, inactivated cells were labeled by the ID5 antibody which decorates the basal bodies and an anti-epiplasm antibody specific of the subcortical units. Figure 1 shows the defects induced by OFD1 depletion after one division upon silencing. Many basal bodies are detected in the cytoplasm of OFD1 depleted cells (Figure 1A right panel). Whereas in the control cells, the basal bodies are located in the middle of the cortical units, in OFD1 depleted cells, basal bodies located between the units or lying under the cell surface are observed (Figure 1B;1C). At the ultra-structural level, whether undocked or partially docked at the membrane, basal bodies (n=23) show defective distal structures (Figure 2B; 2C). The three plates of the transition zone are often absent (65%; n=15) or partially assembled (35%; n=8). Rare undocked basal bodies prolonged by microtubules are also detected which could result from a premature extension of the basal bodies (Figure. 2D)

### **OFD1 is recruited early during basal body duplication and localizes at the transition zone proximal part after anchoring**

To ascertain the localization of OFD1, we expressed a GFP-tagged protein either under the control of its own regulators or under the control of the constitutive calmodulin gene-regulatory elements. After transformation we observed the signal on transformants displaying a wild type growth rate and phenotype. Whatever the vectors used for driving the expression of the tagged protein, the fluorescence localized at the distal end of all basal bodies as demonstrated by labeling with ID5 (Figure. 3A).

In *Paramecium*, the basal body duplication process starts at the equatorial zone and propagates towards the cell poles according to a precise spatio-temporal pattern. Consequently, in a dividing cell, several types of cortical units containing basal bodies at different stages of the duplication process coexist: unduplicated, duplicating and fully assembled. Because several rounds of duplication occur during cell division, one basal body can give rise to several new ones, yielding clusters of four to six basal bodies. Observations of dividing transformants (Figure 3B) allowed us to precise that, as already described for FOR20 [8], OFD1 is recruited early during basal body biogenesis before its anchoring at the cell

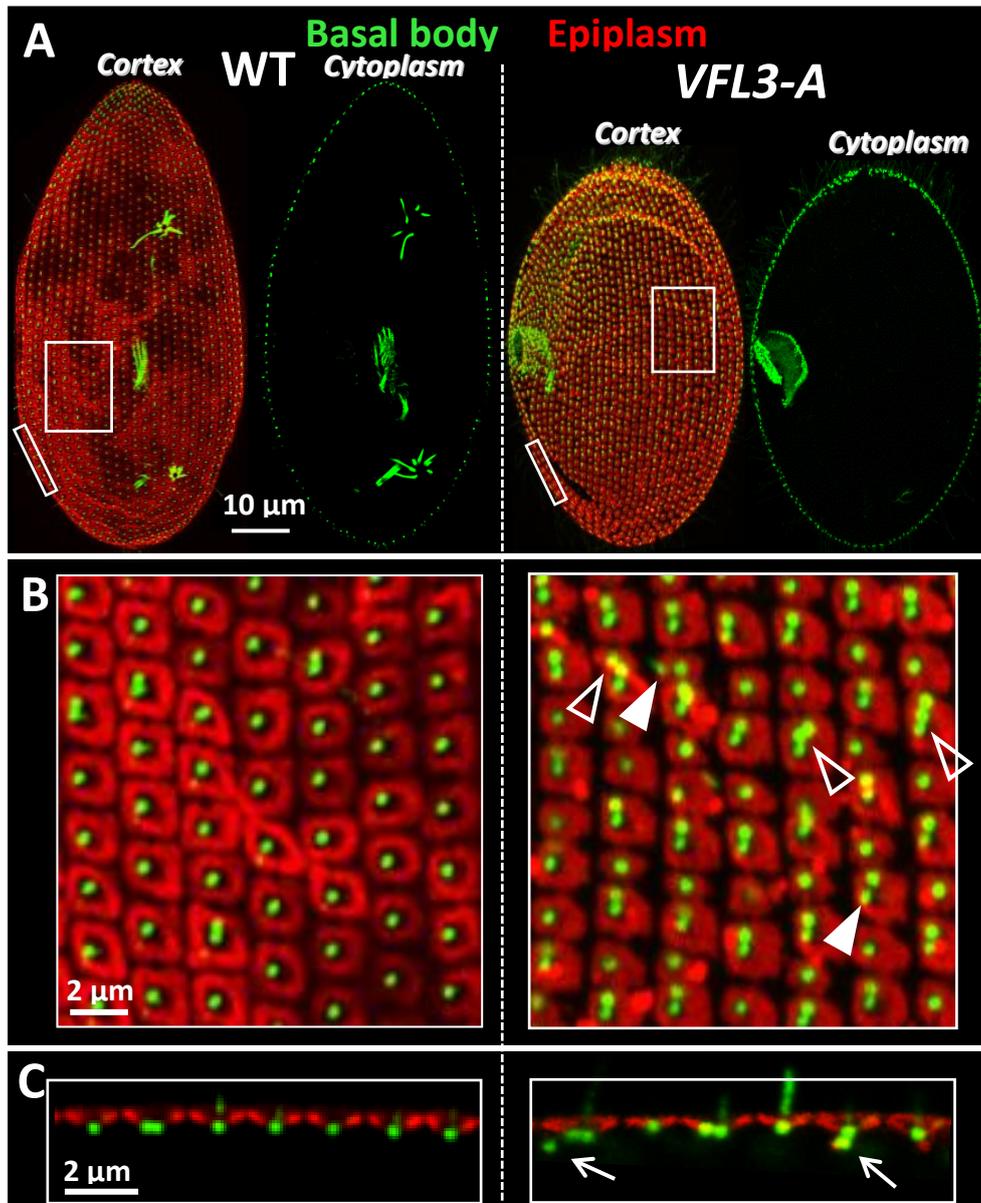


surface. Indeed GFP fluorescent dots, not yet labelled by the anti-tubulin ID5, are observed close to the preexisting basal bodies, at the position corresponding to the assembly site of the new basal body (Figure 3B red inset). In the anterior part of the cells, a subset of basal body doublets does not follow a classical duplication pattern. In this region, the anterior basal body of each pair disassembles, its disappearance being followed by the assembly of a new basal body which replaces the disassembled one [36]. In contrast to what is observed in the other parts of the cell (Figure 3B: green inset vs red inset), a dual GFP labelling is detected near the posterior basal body of the pair when the new basal body assembles: one corresponding to the nascent basal body and the other one corresponding to the anchoring site of the disassembled one. This indicates that OFD1 is stably incorporated at the cell surface as previously shown for FOR20.

We ascertained the localization of OFD1 at the ultrastructural level (Figure 3C). No morphological basal body defect was observed in transformants expressing GFP tagged OFD1. Gold particles were detected in about 50% (n=24) and 30% (n=14) of basal body longitudinal sections observed after pre and post-embedding processing, respectively. 87 % (pre-embedding) and 95% (post-embedding) of the gold particles were located in the basal body distal part corresponding to the transition zone. Most of these particles localize between the axoneme and the membrane above the terminal plate which marks the limit between the basal body microtubule triplets and the axonemal doublets. This localization is similar to that observed for FOR20.

### **Relationships between OFD1-FOR20-Centrin 2**

We then investigated the relationships between OFD1 and both FOR20 and Centrin 2 which are also required for assembly of the basal body distal part. We followed the fate of the fluorescence in GFP-OFD1 transformants after knockdown of FOR20 and Centrin 2 and carried reciprocal experiments in which OFD1 was silenced in transformants expressing GFP-FOR20 or GFP-Centrin 2 (Figure S4). After two or three divisions under RNAi conditions, all basal bodies retained fluorescence in the GFP-OFD1 transformants silenced for Centrin 2 as well as in GFP-Centrin 2 transformants inactivated for OFD1. This indicates that there is no relationship between OFD1 and Centrin 2 for their recruitment at the basal bodies. In contrast, the GFP signal decreases in transformants expressing GFP-OFD1 silenced for FOR20 and



**Figure 4**

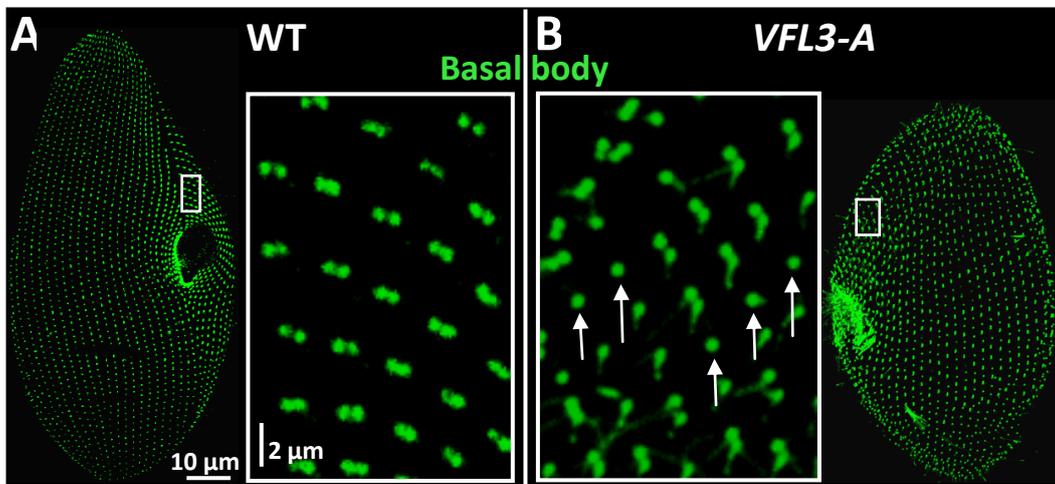
**VFL3-A depletion alters basal body positioning.** (A) Projections of optical sections through the dorsal surface (cortex) and the cytoplasm of cells labelled with ID5 (green), a marker of basal bodies and the anti-epiplasm antibody (red). *VFL3-A*: cell observed after one division upon *VFL3-A* depletion. The depleted cell is smaller than the control. (B) Magnification of A. Singlets and some doublets appear in the center of the units in the wild type cells. Numerous basal bodies doublets and some triplets (empty arrowheads) are observed in *VFL3-A* depleted cells. Some basal bodies are mispositioned (filled arrowhead) (C) Optical transverse sections (top: outside; bottom: inside the cell) performed across the cell surface. In the *VFL3-A* depleted cell, basal bodies lying under the cell surface are observed (arrow).

in GFP-FOR20 transformants depleted of OFD1. This reveals an interdependence between OFD1 and FOR20 for their localization/stability at the basal bodies.

### **The *VFL3-A* gene family is involved in basal body anchoring**

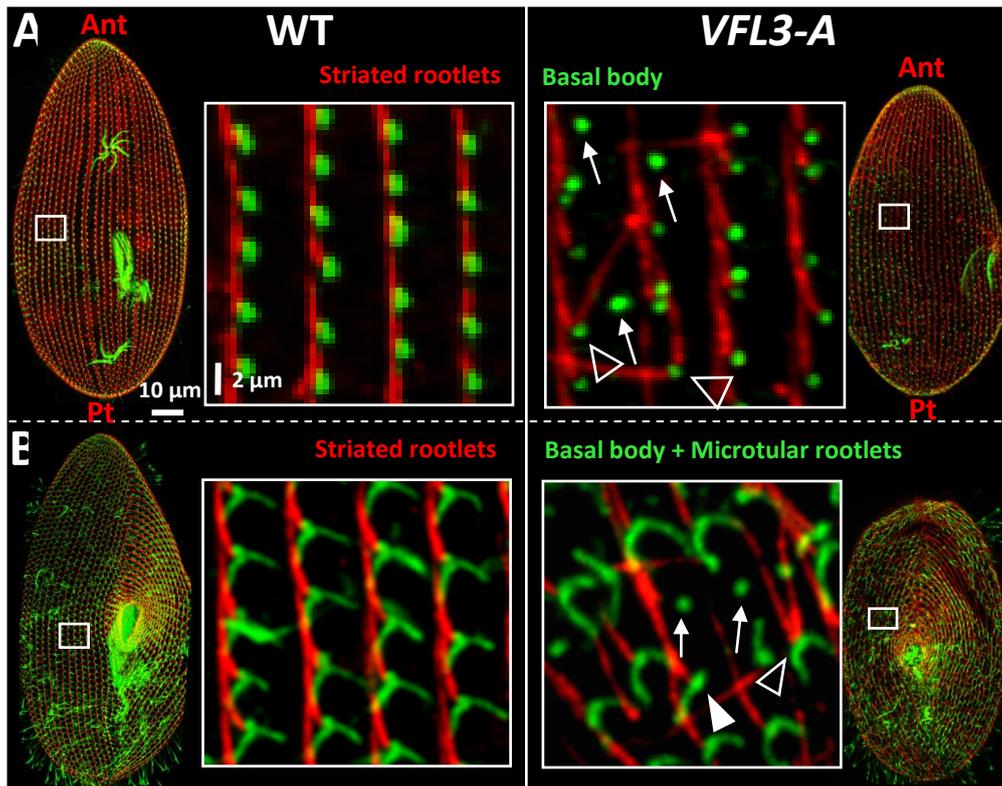
To ascertain the function of the *VFL3-A* and *VFL3-B* genes, two different RNAi vectors targeting specifically and simultaneously both genes of each family were used. As observed for OFD1, the knockdown of the *VFL3-A* genes induces a growth defect and size reduction after 1 division and cellular death after 4/5 divisions. In contrast, inactivation of the *VFL3-B* genes does not produce any detectable phenotype. The efficiency and specificity of each vector to silence its targets was confirmed by controlling the effective messenger depletion of the four *VFL3* genes in response to the inactivation (see Figure S5). A very weak signal was detected with the probe corresponding to the *VFL3-4* gene (*VFL3-B* family) in the control as well as in the silenced cells, indicating that the gene is probably expressed at a very low level. The lack of complementation of the *VFL3-A* genes by the expression of the *VFL3-3* isoform (*VFL3-B* family) indicates that the two *VFL3-A* and *VFL3-B* gene subfamilies have different functions. The 63% reduction of the expression of the *VFL3-3* gene does not seem sufficient to induce a cellular phenotype.

The effect of *VFL3-A* depletion on the basal bodies was tested by immuno-staining with the ID5 antibody and the anti-epiplasm antibody. Contrary to what was observed in OFD1 depleted cells, in very rare cases basal bodies were present in the cytoplasm after the first division upon inactivation (Figure 4A). However, basal bodies mispositioned on the cortex or lying beneath the cell surface (Figure 4B, 4C) were observed. An excess of basal body pairs (32±6% in inactivated cells (n=11) vs 6±1% in control cells (n=7)) as well as clusters of three basal bodies, never observed in wild type interphase cells, were also associated with *VFL3-A* depletion. This excess can arise either from over-duplication during the assembly of the basal body pairs, or from a defect in the segregation of the new versus old basal bodies after their assembly. Examination of the so-called invariant field, a region where basal bodies are associated in pairs in all units, allowed us to eliminate the first hypothesis (Figure 5). In this region, cortical units containing a single basal body were observed, indicating that the depletion of *VFL3-A* could affect in some way new basal body assembly.



**Figure 5**

**Basal body duplication is impaired upon *VFL3-A* depletion.** (A) Wild type cell (WT) and (B) *VFL3-A* depleted cells labelled by the ID5 antibody (green). The insets correspond to the “invariant fields”, a part of the cortex displaying only basal body doublets in wild type cells (A). Presence of singlets (arrows) in *VFL3-A* depleted cells (B) reveals anomalies in basal body duplication.



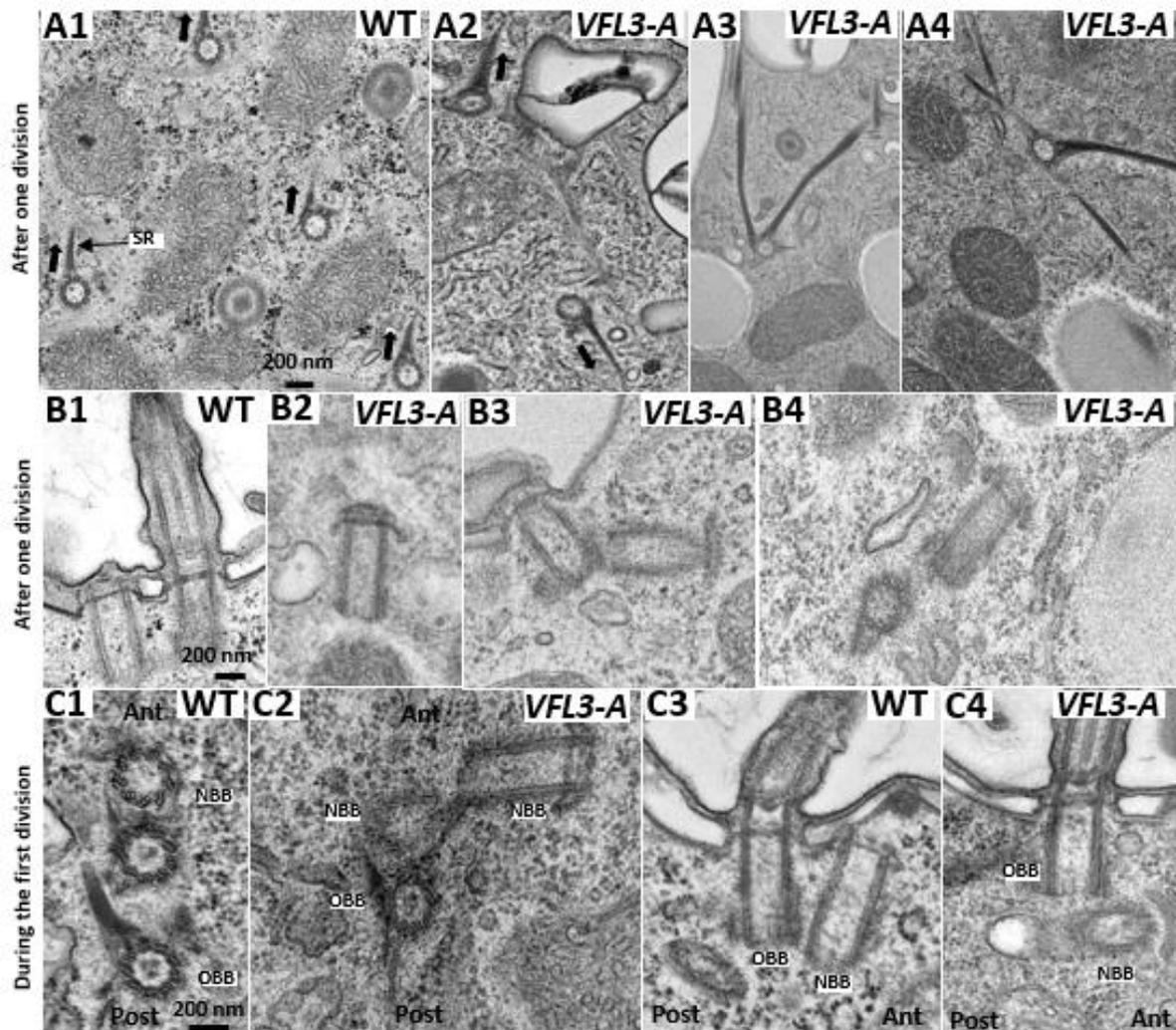
**Figure 6**

**The assembly of basal body appendages is impaired in *VFL3-A* depleted cells.** (A) Double staining of wild type (WT) and *VFL3-A* depleted cells by KD2 (red), a marker of the striated rootlets and ID5, a marker of basal bodies (green). WT: an unique striated rootlet mark the basal bodies. All striated rootlets point to the anterior part of the cell (Ant). *VFL3-A*: the basal body mispositioning is associated with the misalignment of the striated rootlets. Some basal bodies are completely devoid of striated rootlet (arrows) and other assemble several striated rootlets (arrowheads). (B) Double staining of WT and *VFL3-A* depleted cells by KD2 (red) and TEU318, a marker of basal bodies and microtubular rootlets. WT: In addition to the striated rootlet, two microtubular rootlets mark the basal bodies (green). *VFL3-A*: Basal bodies devoid of striated rootlet are generally not associated with microtubular rootlets (arrows). Some basal bodies are associated with a single microtubular rootlet (white arrowhead). Pt: posterior part of the cell.

### **VFL3-A controls the correct assembly of the basal body proximal appendages.**

In *Paramecium*, three appendages associated to the proximal part of the basal body organize the movements and separation of the basal bodies during the duplication process [37]: one striated rootlet and two microtubular ribbons. We thus analyzed the organization of these appendages in VFL3-A depleted cells. Double staining by KD2 (a marker of the striated rootlets) and ID5 (a marker of basal bodies) or TEU318 (a marker of the microtubular ribbons) reveals abnormalities in the organization of these structures. The striated rootlets are disoriented relative to the cellular antero–posterior axis and pointed in all directions (Figure 6A). More surprising is the presence of basal bodies devoid of striated rootlet ( $11.5 \pm 2\%$ ) which generally also lack their microtubular appendages (Figure 6B). In addition we also observed basal bodies carrying more than one striated rootlet ( $3 \pm 1.5\%$ ) a phenotype never observed in the wild type strain. These alterations affect only the basal bodies assembled during the VFL3 depletion which represent approximately 50% of the basal bodies present in the daughter cells after the Inactivation. Thus we can estimate that the number of basal bodies which form abnormal appendages during the VFL3-A depletion represents about 30% ( $(11.5\% + 3\%) \times 2$ ) of the newly assembled basal bodies.

The ultra-structural analysis confirmed the overall basal body misorientation in *VFL3-A* inactivated cells and the defect in assembly of their striated rootlets. In the wild type strain, a unique striated rootlet is associated with all basal bodies, all of them pointing to the same direction (Figure 7A1). In addition to the defect in the orientation of these fibers (Figure 7A2), more than one striated rootlet were found associated with some basal bodies in VFL3-A depleted cells (Figure 7A3, A4). In most of the VFL3-A depleted cells observed after one division upon inactivation, the non-anchored basal bodies appeared fully assembled and harbored distal structures equivalent to the pro-transition zone present in the wild type cells (Figure 7B2). Observations on proliferating basal body units in cells undergoing their first division under VFL3-A depletion (Figure 7C2, C4) revealed the presence of daughter basal bodies developing at inaccurate sites, reaching their mature length while developing with abnormal orientation and unable to tilt up. Defect of spacing between old and new basal bodies as well as attachment of newly formed basal bodies to their parent by an abnormal filament were also observed as if the severing step was impaired.



**Figure 7**

**Ultrastructural anomalies of basal bodies induced by VFL3-A depletion.** (A) Cross section of wild type cell (A1): one striated rootlet (SR) is associated with basal body, all pointing in the same direction (black arrows). *VFL3-A*: the striated rootlets are disoriented (A2) and two or three rootlets can develop from a basal body (A3, A4). (B) Longitudinal sections of basal bodies in wild type cell (B1) and *VFL3* depleted cells observed after one division upon inactivation (B2, B3, B4). (B1) Ultrastructure of non-ciliated and ciliated basal bodies in wild-type cell. (B2) 80% of the observed undocked basal bodies (n=50) assemble normal pro-transition zone. (B3, B4) These sections reveal fully mature new basal bodies that did not tilt up to a position parallel to their mother. (C) Transversal and longitudinal sections of basal-bodies during the duplication process in wild type cell (C1, C3) and *VFL3-A* depleted cells (C2, C4). Cells were observed during the first division upon inactivation. In the wild type cell, duplicating basal body are aligned (C1, C3). In *VFL3* depleted cell, the new basal bodies did not separate from the old one. The most anterior one do not tilt up to a position parallel to the old one. An abnormal filamentous structure links new and ancient basal body (C2). The longitudinal section reveals new basal body that have developed in abnormal orientation (C4). Ant: anterior part, post: posterior part.

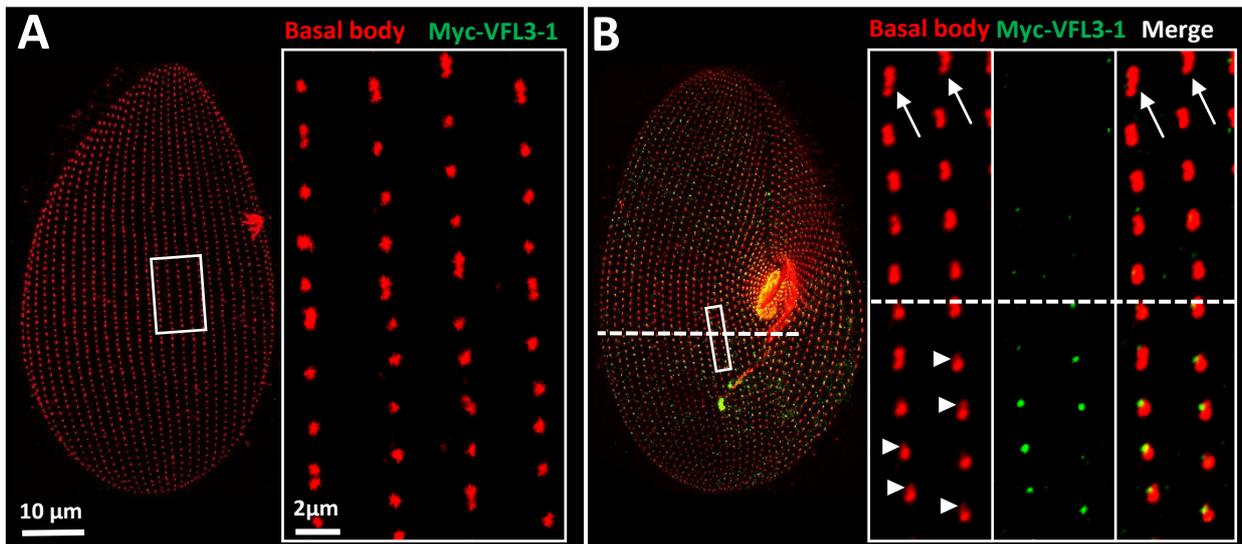
## **VFL3 localization**

One gene of each *VFL3* family (*VFL3-1* and *VFL3-3*) was tagged by the GFP or Myc epitope. After transformation we observed the signal on transformants which displayed a wild type growth rate and phenotype. A very weak fluorescence associated with the basal bodies was observed at all stages of the cell cycle in transformants expressing GFP or Myc tagged *VFL3-3* (Figure S6). In contrast, the Myc-tagged *VFL3-1* isoform is recruited to the cortex only during the division. No labeling is observed during the interphase (Figure 8A), whereas double staining with the anti-Myc and ID5 antibodies reveals a signal during the basal body duplication process (Figure 8B). This was observed regardless of the regulatory sequences used for driving the expression of the fusion protein. Figure 8B illustrates the localization of Myc-*VFL3-1* in a dividing cell at the onset of division. In the part of the cell where basal body duplication is in progress (below the dashed line), as judged by a weaker ID5 labelling of the developing anterior basal body, the Myc labeling is observed. Once the basal bodies are duplicated (above the dashed line), the Myc labeling is no longer detected, indicating that *VFL3-1* is present only during an early step of the new basal body assembly.

The localization of *VFL3-1* with respect to the basal bodies was analyzed by stimulated emission depletion super resolution microscopy (STED). The triple labeling by ID5 (basal bodies), KD2 (striated rootlet) and anti-Myc antibodies indicates that *VFL3-1* localizes between the proximal part of the striated rootlets and the microtubule wall of the basal body (Figure 9).

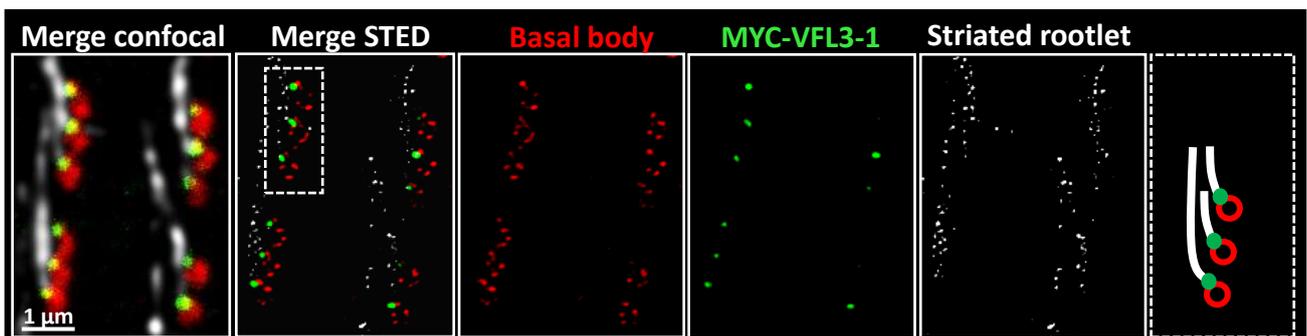
## **Relationship between VFL3-A and Centrin 3**

To explore the relationships between *VFL3-A* and Centrin 3 which is required for the basal body movement toward the cell surface, we followed the fate of the fluorescence in GFP-Centrin 3 transformants after knockdown of *VFL3-A*. After two or three divisions, the GFP signal decreases in transformants indicating that *VFL3-A* is required for the recruitment of Centrin 3 (Figure S7). This could indicate that the assembly of the transient ALF structure which requires Centrin 3 for assembly could also be impaired by the *VFL3* depletion.



**Figure 8**

**Myc-VFL3-1 is expressed during basal body duplication.** Transformants expressing the Myc-VFL3-1 protein were stained by ID5 (red) and anti Myc antibody (green). (A) Interphase cell, (B) cell at an early stage of the division process. Insets show higher magnifications of the white squares on the corresponding cells. (A) In the interphase cell, only singlets and some doublets coexist in the surface (right inset). No Myc labeling is observed. (B) Right inset, bottom of the dashed line: the basal bodies duplication is in progress as judged by the appearance of a ID5 weak signal (arrowhead) anterior to the mother basal bodies. Myc labelling is observed. Top of the dashed line: basal bodies are fully duplicated as judged by the presence of doublets and some triplets (arrows). No Myc labelling is observed.



**Figure 9**

**Localization of Myc-VFL3-1.** Myc-VFL3-1 expressing transformants were stained by ID5 (basal body) in red, anti-Myc (VFL3-1) in green and KD2 (striated rootlets) in white. Confocal and corresponding STED imaging. The irregular KD labelling observed in confocal images appear as dots in STED imaging. The basal body microtubules visualized as single dots in confocal imaging appear as several puncta signals in STED imaging. VFL3-1 labelling localizes between the striated rootlet and the basal body microtubules to which they are attached. Right panel, scheme of the MYC-VFL3-1 localization at the basal body proximal region.

## Discussion

One homolog of OFD1 is encoded in the *Paramecium tetraurelia* genome, whereas four isoforms clustered into two families (*VFL3-A* and *VFL3-B*) encode proteins related to VFL3. The VFL3-A subfamily is more closely related to the *Chlamydomonas* protein. We show that OFD1 localizes at the proximal part of the transition zone and is required for the assembly of the basal body tip and for correct basal body anchoring at the cell surface. While the recruitments of OFD1 and Centrin 2 proceed independently, the localization/stability of OFD1 and FOR20 at the basal body are interdependent. The knock down of the VFL3-B family which encodes proteins permanently associated with the basal bodies, did not induce any phenotype. In contrast, the VFL3-A proteins are shown to be required for both the correct positioning of the basal body at the cell surface and the regular organization of its appendages which mark its rotational asymmetry. Contrary to the effect of OFD1 depletion, the non-anchored basal bodies display a fully organized distal part. The VFL3-1 protein localizes transiently, at an early stage of the basal body duplication process, to the proximal region of the parental basal body, between the striated rootlet and the microtubules to which it is associated. These results suggest a role of VFL3-A as an extrinsic factor controlling the basal body rotational polarity. The anchoring defect could be due to the loss of this polarity, which specifies the sites of assembly of the different structures which guide the movement of the basal body toward the cell surface.

### A conserved role of OFD1 in motile cilia anchoring process

We have shown that OFD1, which localizes at the distal part of the ciliated and unciliated basal bodies, is recruited early during the formation of the basal body. Its loss leads to a defective transition zone and prevents basal body anchoring at the cell surface. This is in agreement with the known function of OFD1 in the assembly of the primary cilium in mammalian cells. Associated to the distal ends of both procentrioles and centrioles, it acts to build the distal appendages [16] that help to anchor the mother centriole to the ciliary vesicle during the intracytoplasmic ciliogenesis process. Our results do not fit observations in zebrafish which showed that *OFD1* invalidation does not completely prevent axoneme extension of the Kupffer's vesicle cilia. In this case however, it was considered that only a fraction of OFD1 protein was depleted [38]. No clear defect of basal body docking was either



observed in brain cells of mutant mice carrying a deletion of exons 4 and 5 of *OFD1* [39]. But a cDNA generated by the deletion [40] encoded a 106 amino acids long protein which retained the TOF/LisH/ conserved domain required for centrosomal targeting [18]. The expression of such a protein could thus partially complement the entire OFD1 loss. We cannot exclude the hypothesis that the anchoring process differs from one cellular type to another. Nevertheless our results are consistent with the docking impairment observed in airways multiciliated cells of patients with OFD1 mutations (Thauvin-Robinet et al., 2013). They also indicate that OFD1 is required in the basal body anchoring process which involves a direct docking at the cell surface.

We localized OFD1 at the proximal part of the transition zone, between the ciliary membrane and the microtubule doublets. This result confirms and precises the observations obtained through super-resolution analysis on primary and motile cilia [41]. After labelling by an anti-OFD1 antibody, a ring of ninefold symmetry was observed at the interface between basal body and the cilium, suggesting that OFD1 could be associated with the microtubule doublets at this interface. Upon OFD1 depletion, we also observed rare intracytoplasmic basal bodies containing microtubules extension beyond the abnormal transition zone. This observation provides further support to the hypothesis that OFD1 could control the elongation of the microtubules doublets [16].

The interdependence of OFD1 and FOR20 for their recruitment/stability at the basal bodies suggests that they could form a complex within the basal bodies. This is supported by our previous work [8] which showed that like OFD1, FOR20 is recruited early in the assembly of basal bodies is localized between the axoneme and the ciliary membrane of the transition zone and remains stably associated to the cortex when the basal body disassembles. There is evidence that such a complex could be formed in association with OFIP at the centrosome and pericentriolar satellite in mammalian cells [19]. It is thus possible that this complex could also be formed during the basal body assembly, since OFIP is conserved in *Paramecium*. Surprisingly, whereas we previously showed that Centrin 2 is required for FOR20 recruitment, we observed that its loss does not prevent the localization of OFD1 at the basal body. One explanation for this discrepancy could be that, in the absence of Centrin 2, as previously shown for OFIP [19], FOR20 and OFD1 do not form a complex. In this case, the lack of both Centrin 2 and FOR20 would not influence the stability/recruitment of OFD1.



## **VFL3-A: a conserved role in the development of basal body appendages and basal body positioning**

We show here that the expression of the *VFL3-B* genes does not complement the inactivation of *VFL3-A*, indicating that the genes have different functions. A single gene of each family, *VFL3-A* and *VFL3-B*, is encoded in the genome of *P. caudatum*, a *Paramecium* species which did not undergo the last two whole genome duplications observed in *P. tetraurelia* [35]. Two genes were also identified in the genome of *Tetrahymena thermophila* indicating that the *VFL3* gene duplication is at least as old as the origin of the Ciliates. One can thus suppose that after duplication, one copy of *VFL3* developed a function completely distinct of the ancestral gene in Ciliates. Another possibility is that several functions were originally performed by the ancestral gene and then have been independently retained in each isoform after sub-functionalization. In *Paramecium*, the inability of the basal bodies in the *VFL3-A* depleted cells to segregate, to dock at the cell surface as well as to assemble their appendages at the right position, is quite similar to the phenotypical defects observed in the *VFL3* mutant of *Chlamydomonas* (Wright et al., 1983). The genes of the *Paramecium* *VFL3-A* family have thus conserved at least one common ancestral function with the *VFL3* gene of *Chlamydomonas*. Further analyses will be required to understand the function of the *VFL3-B* family.

While OFD1 depletion leads to defects in basal body tip assembly, *VFL3-A* depleted cells display abnormalities in the organization of their associated rootlets, *ie* striated rootlets and microtubular ribbons. In addition, *VFL3* is also required for the recruitment of Centrin 3 and thus, although not demonstrated here, its depletion would most probably affect the assembly of the ALF (Anterior Left Filament), a transient Centrin 3 dependent structure [13]. All these appendages have been demonstrated to play a crucial role in basal body positioning *ie* basal body segregation and tilting [37] and required for the basal anchoring at the cell surface. These data strongly suggest that abnormalities of the system of rootlets result in basal body segregation and anchoring defects observed during the *VFL3* depletion. This is in agreement with the conclusion of Wright et al. [20] concerning the effect of the *VFL3* mutation in *Chlamydomonas* and with studies in *Tetrahymena* which indicate that the DisAp mutation which affect the length of the striated fibers cause defect in basal body orientation [42,43].



## **VFL3-A an actor in the establishment of the basal body rotational asymmetry**

Among the different phenotypical abnormalities which accompany the anchoring defect in VFL3-depleted cells, the ability of basal bodies to assemble several striated rootlets is the most surprising. The association of single striated rootlet per basal body is one character shared by all Ciliates. In all species, this rootlet has the same orientation with respect to the cell polarity and the direction of the ciliary beating [44,45], and the same function of anchoring the basal bodies to the cell surface [46–48]. Together with two other rootlets, the postciliary and transverse microtubules ribbons, the striated rootlet marks the basal body rotational asymmetry revealing the specificity of each of the nine microtubule triplets [49]. In wild type cells, the asymmetry of the basal body and associated rootlets is strictly transmitted from one generation to the next during basal body duplication [45]. The fact that several striated rootlets may be associated with basal bodies after VFL3-A depletion strongly suggests that this protein could be required for the acquisition of triplet specification allowing the establishment of rotational asymmetry.

The mechanisms of establishment of the rotational asymmetry are still unknown and remain an open debate: does this asymmetry result from an intrinsic property of the basal body/centriolar structure or is it externally imposed by the environment? One of these factors could be the mispositioning of the nascent basal body observed during VFL3-A depletion. The fact that such abnormalities are not observed after Centrin 3 depletion, which also generates mispositioned fully assembled basal bodies [13], suggests that the mispositioning *per se* does not induce a loss of polarity.

Two markers which localize asymmetrically within the basal body lumen in *Chlamydomonas* reveal an intrinsic asymmetry of the basal bodies: the acorn, a complex structure which attaches to specific triplets [51] and VFL1, a molecule which localizes near a subset of the microtubules triplets that faces one of its associated fibers [52]. We show here for the first time that a protein required for the expression of this asymmetry, VFL3, localized transiently outside the basal body during assembly of the neoformed one. This result indicates that the asymmetry is at least partially imposed by an external factor. VFL3-A could be a crucial actor in the asymmetry by allowing the recruitment of external or internal proteins, such as VFL1, which induce a specification of the microtubular triplets of the basal body in *Chlamydomonas*



[52]. Further experiments on the respective roles of VFL3 and VFL1 in the establishment of the circumferential asymmetry of the basal bodies are needed to analyze these mechanisms.

### **Concluding remarks.**

The present study extends our knowledge on the molecular mechanisms involved in the basal body anchoring/positioning process in the multiciliated cell *Paramecium tetraurelia*. We show that this process depends on the function of the OFD1 and VFL3-A protein families. Their loss prevents insertion and orientation of the basal bodies along the cellular antero-posterior axis and induces an accumulation of subcortical basal bodies. Although the phenotypical defects are quite similar, the underlying mechanisms are different and highlight the importance of the assembly of both distal and proximal structures of the basal body in the orientation and the docking process at the cell surface. In addition our results suggest that the mispositioning of the basal bodies at the cell surface might result of the loss of the rotational asymmetry of their microtubular triplets



## **Acknowledgements**

We thank Dr. Mireille Betermier for her help in RNA extraction; northern blot and hybridizations. We thank all the members of the laboratory for fruitful discussions and their critical reading of the manuscript. We are indebted to Leica Microsystems for making a STED microscope available. We are very grateful to Dr. Ulf Schwarz for making the STED imaging. This study was supported by the Agence Nationale de la Recherche: Grant n°ANR15-CE11-0002-01

## **Abbreviation**

ALF: Anterior Left Filament

FOR20: FOP-related protein of 20 kDa

OFD1: oro facial syndrome de type 1

OFIP: FOR20 interacting protein

VFL3: Variable flagellar number mutant 3

VFL1: Variable flagellar number mutant 1

Immuno EM: Immuno electron microscopy

WT Wild type

## References

1. Sorokin SP. Reconstructions of Centriole Formation and Ciliogenesis in Mammalian Lungs. *Journal of Cell Science*. 1968;3:207–30.
2. Sorokin S. Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 1962;15:363–77.
3. Hagiwara H, Shibasaki S, Ohwada N. Ciliogenesis in the Human Oviduct Epithelium during the Normal Menstrual Cycle. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 1992;41:321–9.
4. Park TJ, Mitchell BJ, Abitua PB, Kintner C, Wallingford JB. Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nat. Genet.* 2008;40:871–9.
5. Burke MC, Li F-Q, Cyge B, Arashiro T, Brechbuhl HM, Chen X, et al. Chibby promotes ciliary vesicle formation and basal body docking during airway cell differentiation. *J Cell Biol.* 2014;207:123–37.
6. Wei Q, Ling K, Hu J. The essential roles of transition fibers in the context of cilia. *Current Opinion in Cell Biology*. 2015;35:98–105.
7. Dippell RV. The development of basal bodies in paramecium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968;61:461–8.
8. Aubusson-Fleury A, Lemullois M, Loubresse NG de, Laligné C, Cohen J, Rosnet O, et al. The conserved centrosomal protein FOR20 is required for assembly of the transition zone and basal body docking at the cell surface. *J Cell Sci*. 2012;125:4395–404.
9. Dute R, Kung C. Ultrastructure of the proximal region of somatic cilia in *Paramecium tetraurelia*. *J. Cell Biol.* 1978;78:451–64.
10. Aubusson-Fleury A, Lemullois M, Bengueddach H, Abdallah S, Shi L, Cohen J, et al. Transition zone: the sequential assembly of its components parallels its dual role in basal body anchoring and ciliary function. *Cilia*. 2015;4:P26.

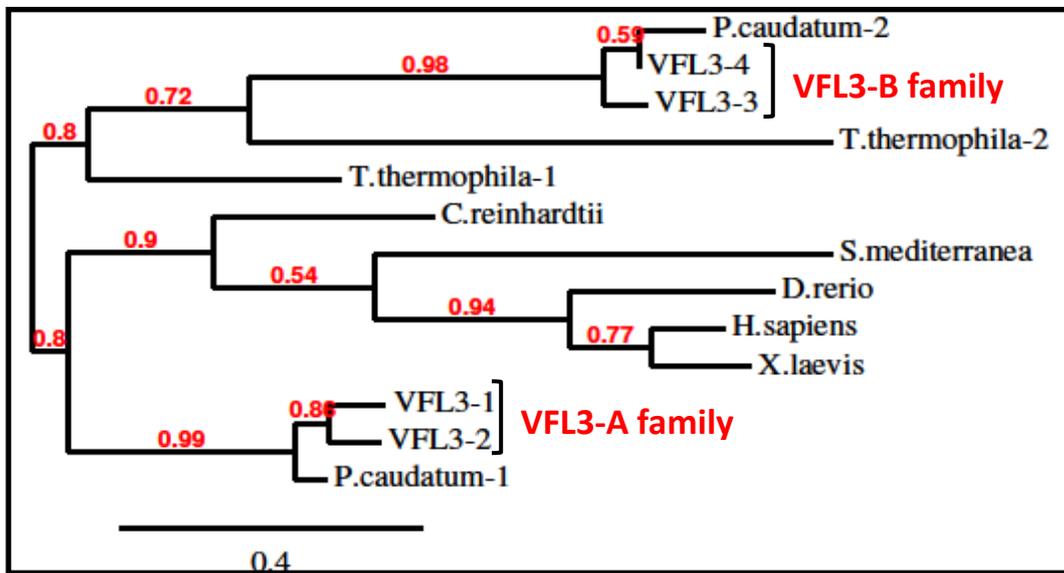
11. Iftode F, Cohen J, Ruiz F, Rueda AT, Chen-Shan L, Adoutte A, et al. Development of surface pattern during division in *Paramecium*. I. Mapping of duplication and reorganization of cortical cytoskeletal structures in the wild type. *Development*. 1989;105:191–211.
12. Iftode F, addoute A, Fleury Anne. The surface pattern of *paramecium tetraurelia* in interphase: an electron microscopic study of basal body variability, connections with associated ribbons and their epiplasmic environment. *European journal of protistology*. 1996;
13. Jerka-Dziadosz M, Koll F, Włoga D, Gogendeau D, Garreau de Loubresse N, Ruiz F, et al. A Centrin3-dependent, transient, appendage of the mother basal body guides the positioning of the daughter basal body in *Paramecium*. *Protist*. 2013;164:352–68.
14. Ruiz F, Garreau de Loubresse N, Klotz C, Beisson J, Koll F. Centrin deficiency in *Paramecium* affects the geometry of basal-body duplication. *Curr. Biol*. 2005;15:2097–106.
15. Ferrante MI, Giorgio G, Feather SA, Bulfone A, Wright V, Ghiani M, et al. Identification of the gene for oral-facial-digital type I syndrome. *Am. J. Hum. Genet*. 2001;68:569–76.
16. Singla V, Romaguera-Ros M, Garcia-Verdugo JM, Reiter JF. Ofd1, a human disease gene, regulates the length and distal structure of centrioles. *Dev Cell*. 2010;18:410–24.
17. Azimzadeh J, Nacry P, Christodoulidou A, Drevensek S, Camilleri C, Amiour N, et al. Arabidopsis TONNEAU1 Proteins Are Essential for Preprophase Band Formation and Interact with Centrin. *Plant Cell*. 2008;20:2146–59.
18. Sedjaï F, Acquaviva C, Chevrier V, Chauvin J-P, Coppin E, Aouane A, et al. Control of ciliogenesis by FOR20, a novel centrosome and pericentriolar satellite protein. *J. Cell. Sci*. 2010;123:2391–401.
19. Chevrier V, Bruel A-L, Dam TJPV, Franco B, Scalzo ML, Lembo F, et al. OFIP/KIAA0753 forms a complex with OFD1 and FOR20 at pericentriolar satellites and centrosomes and is mutated in one individual with oral-facial-digital syndrome. *Hum. Mol. Genet*. 2016;25:497–513.
20. Wright RL, Chojnacki B, Jarvik JW. Abnormal basal-body number, location, and orientation in a striated fiber-defective mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol*. 1983;96:1697–707.

21. Gupta GD, Coyaud É, Gonçalves J, Mojarad BA, Liu Y, Wu Q, et al. A Dynamic Protein Interaction Landscape of the Human Centrosome-Cilium Interface. *Cell*. 2015;163:1484–99.
22. Jakobsen L, Vanselow K, Skogs M, Toyoda Y, Lundberg E, Poser I, et al. Novel asymmetrically localizing components of human centrosomes identified by complementary proteomics methods. *EMBO J*. 2011;30:1520–35.
23. Skouri F, Cohen J. Genetic approach to regulated exocytosis using functional complementation in *Paramecium*: identification of the ND7 gene required for membrane fusion. *Mol. Biol. Cell*. 1997;8:1063–71.
24. Sonneborn TM. Chapter 12 Methods in *Paramecium* Research\*. In: Prescott DM, editor. *Methods in Cell Biology*. Academic Press; 1970. p. 241–339.
25. Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*. 1998;395:854.
26. Aury J-M, Jaillon O, Duret L, Noel B, Jubin C, Porcel BM, et al. Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Nature*. 2006;444:171–8.
27. Lepère G, Bétermier M, Meyer E, Duharcourt S. Maternal noncoding transcripts antagonize the targeting of DNA elimination by scanRNAs in *Paramecium tetraurelia*. *Genes Dev*. 2008;22:1501–12.
28. Galvani A, Sperling L. RNA interference by feeding in *Paramecium*. *Trends Genet*. 2002;18:11–2.
29. Beisson J, Bétermier M, Bré M-H, Cohen J, Duharcourt S, Duret L, et al. Immunocytochemistry of *Paramecium* Cytoskeletal Structures. *Cold Spring Harb Protoc*. 2010;2010:pdb.prot5365.
30. Wehland J, Weber K. Turnover of the carboxy-terminal tyrosine of alpha-tubulin and means of reaching elevated levels of detyrosination in living cells. *J. Cell. Sci*. 1987;88 ( Pt 2):185–203.
31. Janke C, Bulinski JC. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12:773–86.

32. Nahon P, Coffe G, Guyader H, Darmanaden-Delorme J, Jeanmaire-Wolf R, Clerot JC, et al. Identification of the epiplasmins, a new set of cortical proteins of the membrane cytoskeleton in *Paramecium*. *J. Cell. Sci.* 1993;104:975–90.
33. Sperling L, Keryer G, Ruiz F, Beisson J. Cortical morphogenesis in *Paramecium*: A transcellular wave of protein phosphorylation involved in ciliary rootlet disassembly. *Developmental Biology.* 1991;148:205–18.
34. Callen A-M, Adoutte A, Andrew JM, Baroin-Tourancheau A, Bré M-H, Ruiz PC, et al. Isolation and characterization of libraries of monoclonal antibodies directed against various forms of tubulin in *Paramecium*. *Biology of the Cell.* 1994;81:95–119.
35. McGrath CL, Gout J-F, Doak TG, Yanagi A, Lynch M. Insights into three whole-genome duplications gleaned from the *Paramecium caudatum* genome sequence. *Genetics.* 2014;197:1417–28.
36. Romero MR, Torres A. Cortical development associated with conjugation of *Paramecium*. *Development.* 1993;117:1099–112.
37. Iftode F, Fleury-Aubusson A. Structural inheritance in *Paramecium*: ultrastructural evidence for basal body and associated rootlets polarity transmission through binary fission. *Biol. Cell.* 2003;95:39–51.
38. Ferrante MI, Romio L, Castro S, Collins JE, Goulding DA, Stemple DL, et al. Convergent extension movements and ciliary function are mediated by *ofd1*, a zebrafish orthologue of the human oral-facial-digital type 1 syndrome gene. *Hum Mol Genet.* 2009;18:289–303.
39. D'Angelo A, De Angelis A, Avallone B, Piscopo I, Tammaro R, Studer M, et al. *Ofd1* controls dorso-ventral patterning and axoneme elongation during embryonic brain development. *PLoS ONE.* 2012;7:e52937.
40. Ferrante MI, Zullo A, Barra A, Bimonte S, Messaddeq N, Studer M, et al. Oral-facial-digital type I protein is required for primary cilia formation and left-right axis specification. *Nat Genet.* 2006;38:112–7.

41. Lee YL, Santé J, Comerci CJ, Cyge B, Menezes LF, Li F-Q, et al. Cby1 promotes Ahi1 recruitment to a ring-shaped domain at the centriole–cilium interface and facilitates proper cilium formation and function. *Mol. Biol. Cell.* 2014;25:2919–33.
42. Galati DF, Bonney S, Kronenberg Z, Clarissa C, Yandell M, Elde NC, et al. DisAp-dependent striated fiber elongation is required to organize ciliary arrays. *J. Cell Biol.* 2014;207:705–15.
43. Jerka-Dziadosz M, Jenkins LM, Nelsen EM, Williams NE, Jaeckel-Williams R, Frankel J. Cellular Polarity in Ciliates: Persistence of Global Polarity in a disorganized Mutant of *Tetrahymena thermophila* That Disrupts Cytoskeletal Organization. *Developmental Biology.* 1995;169:644–61.
44. Lynn DH. The Organization and Evolution of Microtubular Organelles in Ciliated Protozoa. *Biological Reviews.* 1981;56:243–92.
45. Sleight MA, Silvester NR. Anchorage functions of the basal apparatus of cilia. *Journal of Submicroscopic Cytology.* 1983;15:101–4.
46. Peck RK. The ultrastructure of the somatic cortex of *Pseudomicrothorax dubius*: structure and function of the epiplasm in ciliated protozoa. *J. Cell. Sci.* 1977;25:367–85.
47. Williams NE, Vaudaux PE, Skriver L. Cytoskeletal proteins of the cell surface in *Tetrahymena* I. Identification and localization of major proteins. *Exp. Cell Res.* 1979;123:311–20.
48. Aubusson-Fleury A, Bricheux G, Damaj R, Lemullois M, Coffe G, Donnadiou F, et al. Epiplasmins and epiplasm in paramecium: the building of a submembraneous cytoskeleton. *Protist.* 2013;164:451–69.
49. Grain J. Le cinétosome et ses dérivés chez les ciliés. *Ann Biol.* VIII:59–97.
50. Beisson J, Sonneborn TM. Cytoplasmic inheritance of the organization of the cell cortex in *Paramecium aurelia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1965;53:275–82.

51. Geimer S, Melkonian M. The ultrastructure of the *Chlamydomonas reinhardtii* basal apparatus: identification of an early marker of radial asymmetry inherent in the basal body. *Journal of Cell Science*. 2004;117:2663–74.
52. Silflow CD, LaVoie M, Tam LW, Tousey S, Sanders M, Wu W, et al. The Vf11 Protein in *Chlamydomonas* localizes in a rotationally asymmetric pattern at the distal ends of the basal bodies. *J. Cell Biol.* 2001;153:63–74.
53. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:W465-469.



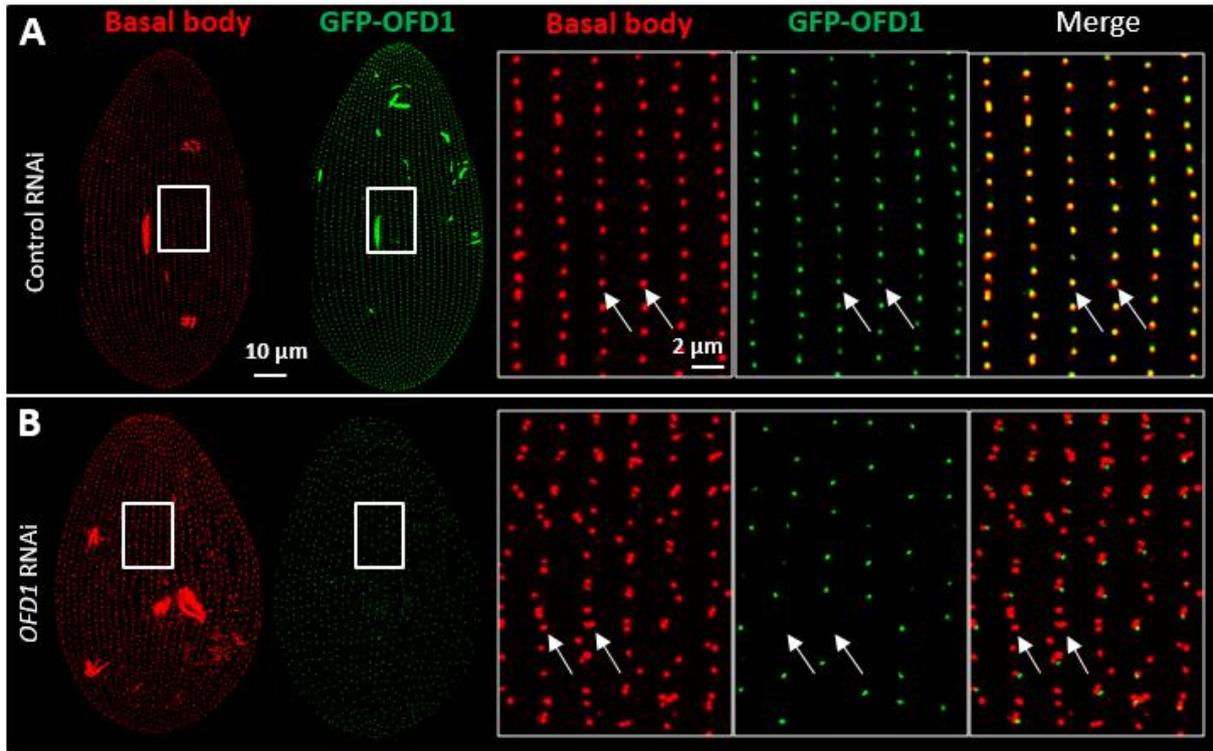
**Figure S1.**

**A phylogenetic analysis of VFL3.** Cladogram showing the relationships between the four *Paramecium tetraurelia* VFL3 isoforms (VFL3-1, VFL3-2, VFL3-3 and VFL3-4) and their homologs in other species. The evolutionary history, based on the alignment of the conserved N-terminal parts of the proteins was inferred by using the one click mode at Phylogeny.fr (Dereeper et al., 2008). Bootstrap value are displayed as probability. The scale is in the units of the number of amino acid substitutions per site. H.sapiens: ENSP00000263284; T. thermophila-1: XP\_001015880; T. thermophila-2: XP\_001012873; X. laevis: NP\_001089598; D. rerio: XP\_005161271; C. reinhardtii: XP\_001695308; S. mediterranea: SMU15034611; P.caudatum-1: PCAUDP15713; P.caudatum-2: PCAUDP02708; P. tetraurelia: VFL3-1: GSPATP00031209001; VFL3-2: GSPATP00018236001; VFL3-3: VFL3-3 GSPATP00013051001; VFL3-4: GSPATP00008368001.

|               |     |   |
|---------------|-----|---|
| H.sapiens     | 1   | MMAQSNMFTVADVLSQDELRRKLYQFFRDRGLDILDLKTLQLRNQLIHLMHPVLSGELQPRISIVVEGS--SLLIGASNSLVADHLQRCGYE  |
| X.laevis      | 1   | -----MSSADFKSLSQEELRRKLYQFFKNGVLDLSLKTOLRNQLIHFKHPAFNGEPGHYTEALESD--SLLHRAASNSMVADHLRKCQGYE   |
| D.rerio       | 1   | -----MSASKEESLSPDEMROKLYQFFKNSGLDILDLKTLQLRNQLIQLQAPVRRGESASRRSADHTD--SVLYSACNSVVDHLRSAGYE    |
| P.tetraurelia | 1   | -----MDCSFNDRFCQCELEQREGVMENKRTQDRYKLELRLRDMQCKRIPSSDKVSESE----MLLRRLVLSAVADYLRREARM          |
| T.thermophila | 1   | -----MEQGEDNNDQYKELHLFSDTGMNSVRAQMRHKIIEKLVKRSOKVQCVQCKIHDEKNQHKALLMRLVASTVSEYFDKNDYS         |
| C.reinhardtii | 1   | -----MSEPTDACEGLDCAAFNRKMLTHMSSGSSVGVQVKLLTQLQKQGIIVLGLPPPPGRP--GLKRRHALNSMLADYMRVAVQYN       |
| H.sapiens     | 89  | YLSLVFFPESGLAKEKVFVFMQDLLQLIKINPTSSLYKSLVSGSDKNCKGFLMHLKELAEYHQAESCNMETQTSST-FNRDSIAEKLQ      |
| X.laevis      | 84  | YLSLVFFPECCGLEKEMFTVHFLQLLKNPKSRLYKSLTSSARNESAKGFFQILLMELTDYHLHREGRDADTQTVTSPYKDSIVEKLIK      |
| D.rerio       | 84  | YLSLVFFPECCGLSKDKVLSRQVLOLMKISPHMPLYKSLVSNIQ-SQSGFLLKSLMELTDHSVYRDCSINSTQTTSTIAAKESLVEKMQ     |
| P.tetraurelia | 76  | YLSLVFFPEPTFFG-AAALNKEEIKKLLKIDN-----LQG--SILSQMFSQDILLLNPREPLKSNAAATQTFYGDAVINLECKLS         |
| T.thermophila | 83  | YSNSIFQPESGYA-NKILQRFEILDIMNCKN-----IDNEKISLLETQVETYLNNYKNVPKINCATQTEHADAIFNLECSLN            |
| C.reinhardtii | 77  | YLSLVFKEESGWESESRPLLEDLMDVLLKIDREISFQSYMKSKAHGSDACVIMNLSAISAAAAAGKE--SFTQIIGDHYCLEVRMK        |
| H.sapiens     | 178 | HIDDEQFADAYP--QRIKESLEIKLNEYKREIEEQLNAEMCCKLKFKDTETAKIKMEAKKKYKELTMEQNDDEKRCQARSEALVIREK      |
| X.laevis      | 174 | FIDDEQFEEIYP--RKNEESLESKLSDYREMEEQLETEMACKLQHFQDVEITAKIKLDETEKSCREMSDPRRELEKYOAKLEGLVSRK      |
| D.rerio       | 173 | HIDDEYEVLRH--RGDRNASVPAKLAEYRKEIQEQAQLELNAKLOHEMDVETAKVQEEKERSRKEIIEPRRDMEKAYELKSEALISREK     |
| P.tetraurelia | 150 | MVDNMYKSKTENELLKPOYDMEERILKMKREHEQRLNTELATETTRIREPCHIRLEBADKYRQLQDYRELEKNEOEKLNVLDRREN        |
| T.thermophila | 159 | TVDHKYREKVQ-EINTPAHEIEERLQRFKREIENRTAEMNAEIVRIRREFEEMAAVRMEPEQEKYRRMSEYRELEKEMDRLTLDRREK      |
| C.reinhardtii | 165 | QLEDEYQSRIRNARLSENAGIFEERTALYQEIIEQAAAEVARQVERVREMEWAAARLDKASKARRALEAERLELDRLHGERTIAKLRQEE    |
| H.sapiens     | 266 | STLERIHKHQEIEEKEIYVORCILLKDMDDLRCREAELEKQVEAEFELNCKLQEEKHKSTTEALRRQEQNKSKSFEETYDRKLNKEL----   |
| X.laevis      | 262 | NATERLQHQEIEEKEIYVORCSLLKDIISVRARESILRCRMEADERTQKLEAEKRNRSIDELRRKRELEVKNIEDTFDQKLNKELLRFR-    |
| D.rerio       | 261 | NATERLQHQEIEEKEIYVORCAVLEIEISVRSREMLRCRMEAFDRSCALHEEKVKTMEDILRRKRELVSKTMEDESPQKLSKELLYQL      |
| P.tetraurelia | 240 | ETLRMAAQKRELESINYOYRQKILKEHEIILKRECEKTEKQRIANEEELKFCQKRLDVMERDLSKRLADANGNEDVIRRRVEAQAHAARK    |
| T.thermophila | 248 | DTLEKCTNKMKREIESINHDRORILKDFELLRMREDEIDKQRIINDEMLKIKQKQKLENLEQELKENIKKRAEESALIIERRKYNDIDAYTKL |
| C.reinhardtii | 255 | EMDKLRQCORQDVENVAYEYRORILREBEELRNHKTETIQCCQSRQCEQKQLERSLELRERAVGAREAAAEKKIAEATEAAAQAAVEARQ    |

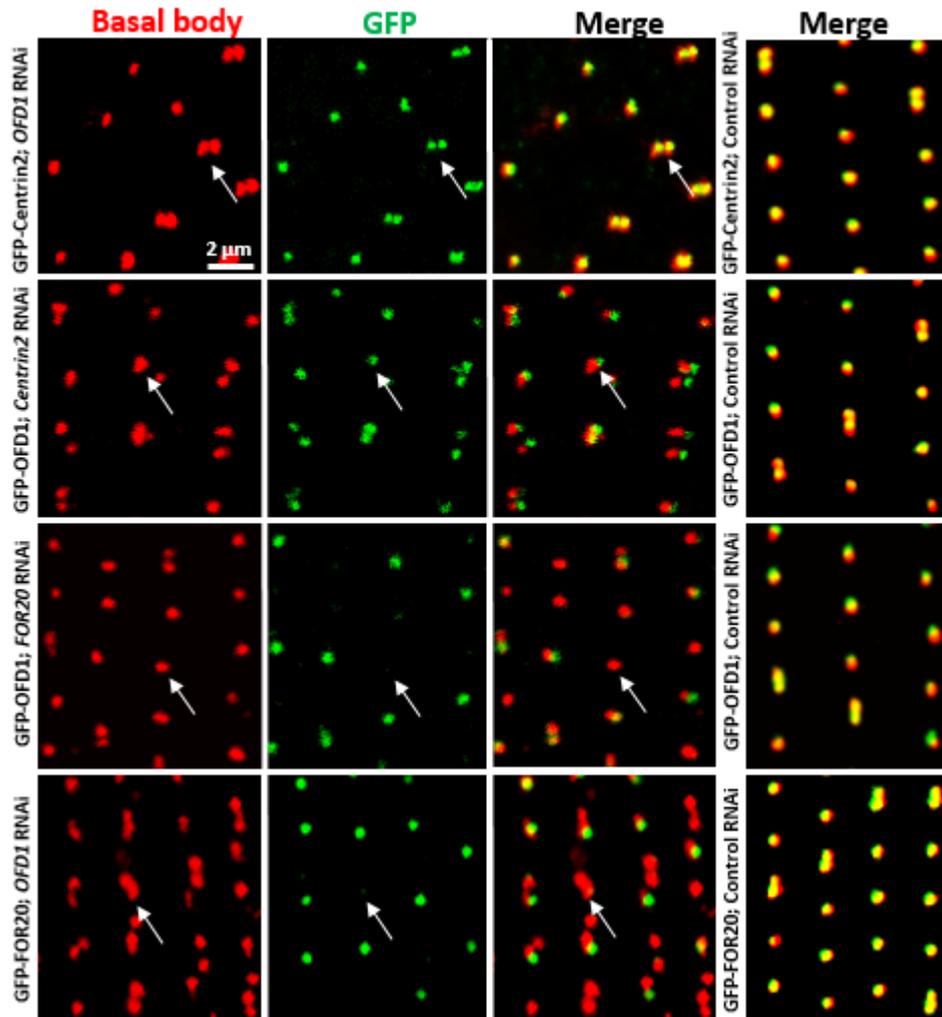
**Figure S2.**

**OFD1 are evolutionary conserved proteins.** Alignment of the N-terminal part of the *Paramecium tetraurelia* OFD1 protein with OFD1 proteins of other species. H.sapiens: NP\_003602; T.thermophila: XP\_001007171; P.tetraurelia: GSPATP00001073001; X.laevis: XP\_018102518; D.rerio: XP\_009303289.



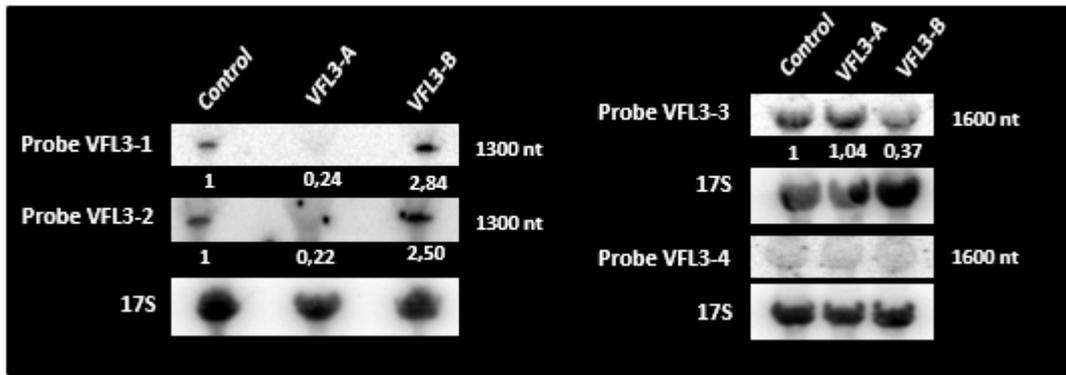
**Figure S3**

**Decrease of the GFP signal in a GFP-OFD1 transformant after OFD1 depletion.** The efficiency of the OFD1 RNAi vector to inactivate the corresponding gene was evaluated by following the fluorescence in GFP-OFD1 expressing cells upon inactivation. Direct GFP fluorescence observed after ID5 labelling on cells inactivated by the control vector (**A**) or by the OFD1 RNAi vector (**B**). Enlargements show that numerous basal bodies are devoid of fluorescence in OFD1 depleted cell (arrows).



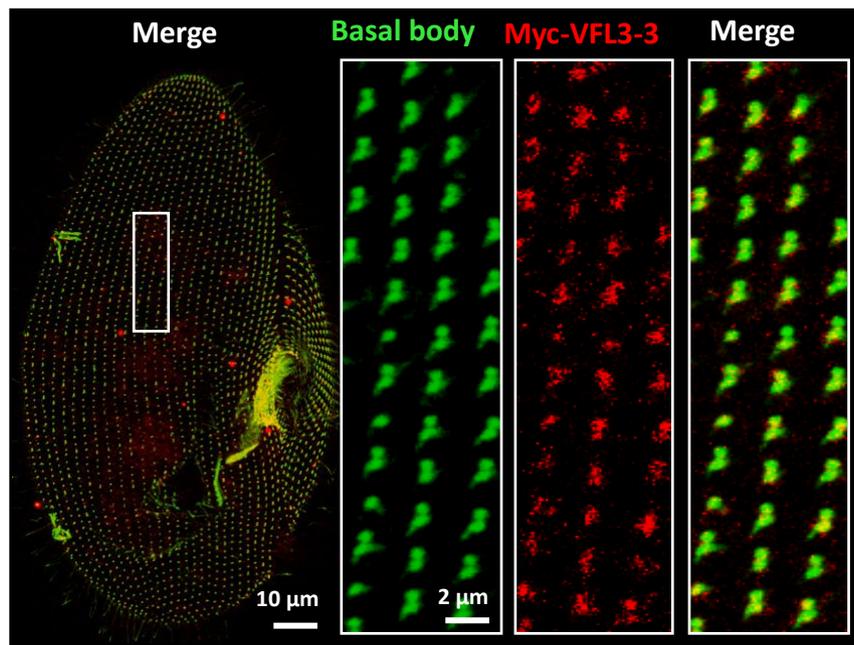
**Figure S4**

**Relationships of OFD1 with Centrin 2 and FOR20.** In all experiments, the endogenous GFP signal was observed on cells labeled by ID5 (red). In the control cells all the basal bodies retained the GFP signal. Inactivation of OFD1 in GFP-Centrin2 expressing cells and inactivation of Centrin2 in GFP-OFD1 expressing cells show that the GFP signal is retained in all basal (arrows) bodies after 2 divisions upon inactivation. In contrast, inactivation of FOR20 in GFP-OFD1 expressing cells and inactivation of OFD1 in GFP-FOR20 expressing cells reveal numerous basal bodies devoid of fluorescence (arrows). FOR20 and OFD1 are associated with the distal part of the basal bodies. In inactivated cells, the misorientation and mispositioning of basal bodies with regard to the cell surface explain that the GFP and ID5 labelling do not overlap.



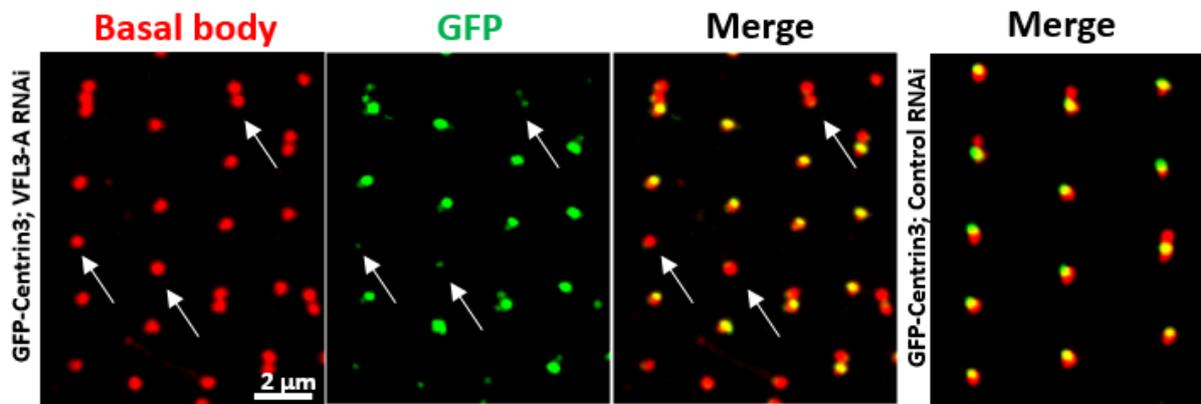
**Figure S5**

**VFL3-A RNAi and VFL3-B RNAi efficiencies.** Efficiency of the *VFL3-A* and *VFL3-B* RNAi vectors to inactivate their target sequences was tested by northern Blots. RNA extracted from cells inactivated for *VFL3-A* family (*VFL3-1* and *VFL3-2* genes), *VFL3-B* family (*VFL3-3* and *VFL3-4* genes) and *ND7* (a gene involved in trichocyst discharge used as control) were transferred on blots and hybridize with  $^{32}\text{P}$ -labelled probes. Details for all the probes are in Meth. Hybridization signals were normalized using 17S rRNA. Numbers indicate the rate of target expression in RNAi-treated cells, relative to the control. RNAi triggered either by *VFL3-1* or *VFL3-2* (*VFL3-A* family) results in ~75% decrease in the total amount of *VFL3-1* and *VFL3-2* mRNA but does not reduce *VFL3-3* and *VFL3-4* (*VFL3-B* family) mRNA. RNAi triggered *VFL3-3* result in a 63% decrease in the total amount of *VFL3-3* mRNA but not reduce *VFL3-1* and *VFL3-2* (*VFL3-A* family) indicating that the probes are specific of each family. The weak signal observed with the *VFL3-4* probe indicates that the *VFL3-4* gene is poorly expressed.



**Figure S6**

**Localization of Myc-VFL3-3.** Transformants expressing Myc-VFL3-3 were fixed and strained with ID5 (basal body) and anti-Myc antibody (Myc-VFL3-3). The Myc signal colocalized with the ID5 labelling at all basal bodies.



**Figure S7**

**Relationships between VFL3-A and Centrin 3.** The endogenous GFP signal was observed on cells labeled by ID5 (red). In the control cell, the basal bodies retained the GFP signal. Inactivation of the *VFL3-A* isoforms in GFP-Centrin 3 expressing cells induces a reduction of the GFP signal in numerous basal bodies (arrows).

## **VII) Discussions**

Au cours de ce travail je me suis intéressé au phénomène d'ancrage des corps basaux des cils motiles chez la paramécie. Des travaux antérieurs avaient établi que trois protéines conservées, FOR20, Centrine 2 et Centrine 3, recrutées séquentiellement, jouent un rôle dans ce processus d'ancrage. J'ai réalisé l'analyse fonctionnelle de deux autres protéines évolutivement conservées, OFD1 et VFL3 susceptibles d'être impliquées dans ce mécanisme. Si la fonction de VFL3 était peu étudiée lorsque j'ai entrepris ce travail, l'analyse d'OFD1 a été dictée par le fait que sa fonction dans l'assemblage des cils motiles demeurait peu étudiée.

Dans l'espèce *Paramecium tetraurelia*, qui a subi au moins trois duplications globales de génome au cours de l'évolution, un seul gène code la protéine OFD1 tandis que 4 gènes codent 4 isoformes de VFL3 regroupées en deux familles VFL3-A et VFL3-B. L'absence de phénotype induit par l'inactivation des gènes de la famille VFL3-B n'a pas permis de lui attribuer une fonction, mais une de ses isoformes se localise au niveau de tous les corps basaux tout au long du cycle cellulaire suggérant l'implication de cette protéine dans la fonction de ces organites. Les résultats obtenus montrent qu'OFD1 et les protéines de la famille VFL3-A sont impliquées dans le positionnement et l'ancrage des corps basaux mais que les mécanismes dans lesquels elles interviennent sont différents.

### **OFD1**

**OFD1 est impliquée dans l'assemblage de la partie distale des corps basaux et dans leur ancrage à la surface chez la paramécie**

Comme cela avait été préalablement observé pour FOR20 chez la paramécie (Aubusson-Fleury et al., 2012), OFD1 est recrutée précocement au cours de l'assemblage des corps basaux. Elle se localise dans la partie proximale de la zone de transition des corps basaux ancrés à la surface. Elle y est stablement incorporée puisque, dans un territoire particulier de la paramécie, où un corps basal ancré à la surface se désassemble à un stade précis de la division cellulaire, elle reste associée à la surface cellulaire. La déplétion d'OFD1 induit des anomalies de formation de la partie distale des corps basaux qui est vraisemblablement à l'origine des défauts d'ancrage. Ces observations sont cohérentes avec la



majorité des résultats obtenus concernant la fonction d'OFD1 chez les métazoaires. Associée aux parties distales des procentrioles et centrioles (Singla et al., 2010), elle permet en effet la formation des appendices distaux du centriole père essentiels à son ancrage à la vésicule ciliaire lors de la ciliogenèse des cils primaires.

On sait en revanche peu de choses sur sa fonction dans l'assemblage des cils motiles des cellules multiciliées. L'observation de corps basaux localisés dans le cytoplasme de cellules de l'épithélium multicilié bronchique de patients atteints du Syndrome Oro Facial Digital de type 1, qui portent des mutations dans le gène *OFDI*, suggère néanmoins qu'elle participe également à cette fonction (Thauvin-Robinet et al., 2013). De même l'inactivation d'*OFDI* chez la planaire entraîne l'apparition de centrioles non ancrés à la membrane plasmique dans les cellules multiciliées (Azimzadeh et al., 2012).

Etonnamment, on retrouve pourtant dans la littérature des travaux impliquant OFD1 non dans l'étape d'ancrage mais dans l'élongation et le contrôle de la longueur de l'axonème. Ferrante et ses collaborateurs montrent notamment que, dans un contexte d'inactivation d'*OFDI*, des cils plus courts que la normale peuvent s'assembler au sein de la vésicule de Kupffer chez le poisson zèbre (Ferrante et al., 2009). Des résultats semblables ont été obtenus au cours de l'inactivation d'*OFDI* dans des cellules progénitrices des photorécepteurs (Wang et al., 2016). Néanmoins dans le premier cas, les auteurs soulignent que l'inactivation d'OFD1 pouvait être partielle. Cette hypothèse, peut également expliquer les seconds résultats puisque le taux d'expression des messagers OFD1 au cours de l'inactivation n'était réduit que d'environ 50%. Des défauts d'ancrage des corps basaux ne semblent pas non plus être observés dans des cellules de prosencéphales de souris mutantes dans lesquels *OFDI* a été invalidé par une délétion des exons 4 et 5 du gène (D'Angelo et al., 2012). Toutefois dans ce cas, la délétion génère un cDNA susceptible de coder une protéine de 106 acides aminés (Ferrante et al., 2006) qui contient les motifs TOF/LisH nécessaires à la localisation au centrosome (Sedjaï et al., 2010). L'expression de cette protéine tronquée pourrait donc compléter partiellement le dysfonctionnement de la protéine entière. Cette hypothèse paraît d'autant plus plausible que des transcrits, correspondant à la partie 5' du gène, ont été observés et que l'anticorps utilisé pour détecter la présence de la protéine était dirigé contre la partie C-terminale de la protéine entière. Une façon de tester cette hypothèse chez la paramécie était d'exprimer une protéine OFD1 tronquée de sa partie C-terminale mimant la



mutation induite par la délétion chez la souris et étiquetée à la GFP. L'inactivation du gène endogène codant la protéine entière chez les transformants susceptible d'exprimer la protéine tronquée permettait d'analyser le phénotype éventuel induit par son expression. J'ai donc construit un vecteur permettant l'expression d'une protéine de 92 acides aminés correspondant à la région N-terminale de la protéine de paramécie. Je n'ai observé aucune fluorescence chez les transformants obtenus et je n'ai pas poursuivi cette analyse.

Des résultats contradictoires concernent la fonction d'OFD1 dans le développement des cils primaires, pour lesquels deux mécanismes d'assemblage différents ont été décrits (Sorokin, 1962). Dans la voie dite intracellulaire, l'extension de l'axonème se fait à l'intérieur du cytoplasme après fusion de l'extrémité distale des centrioles avec la vésicule ciliaire, étape dans laquelle est impliquée OFD1. Dans la voie dite extracellulaire, on a souvent considéré que l'extension de l'axonème dans le milieu externe suivait une étape d'accrochage direct du corps basal à la membrane plasmique. Ces différences de mode d'ancrage pouvaient donc expliquer les résultats contradictoires. Il est pourtant maintenant admis que, même dans cette voie, des associations entre l'extrémité distale des corps basaux et des vésicules ciliaires puissent précéder l'étape d'insertion à la surface cellulaire, ce qui rend plus difficile l'interprétation de ces contradictions. On ne peut néanmoins pas éliminer l'hypothèse selon laquelle la fonction d'OFD1 pourrait différer en fonction du mode de développement de l'axonème, à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule.

### **Localisation d'OFD1**

Les analyses de microscopie électronique présentées ici montrent qu'OFD1 se localise au niveau de la zone de transition entre la membrane ciliaire et les doublets de microtubules présents dans cette région (Dute and Kung, 1978). Des images obtenues grâce aux techniques de super-résolution après marquage avec des anticorps anti-OFD1 sur des cils primaires et motiles avaient déjà révélé une structure en anneau de symétrie 9 localisée à l'interface entre le corps basal et cil suggérant qu'OFD1 pouvait être associé aux doublets de microtubules présents à cette interface (Lee et al., 2014). Nos résultats confirment et précisent ces observations. Par ailleurs, certains corps basaux intra-cytoplasmiques observés dans les cellules déplétées pour OFD1 sont prolongés par une extension microtubulaire. Cette



observation apporte un argument en faveur de l'hypothèse selon laquelle OFD1 pourrait contrôler l'élongation des doublets de microtubules (Singla et al., 2010).

Outre sa localisation dans la partie distale du corps basal, au niveau des satellites centriolaires et occasionnellement dans le cil chez les mammifères, OFD1 a été également observée au niveau des noyaux (Giorgio et al., 2007). Mes données ne permettent pas d'affirmer sa présence dans le noyau de la paramécie. En effet je n'ai pu observer GFP-ODF1 au niveau du macronoyau que chez certains transformants et que lorsqu'elle était exprimée sous le contrôle des régulateurs de la calmoduline. En revanche, je ne l'ai jamais observée lorsque la protéine hybride était exprimée sous le contrôle de ses propres régulateurs.

### **Les relations d'OFD1, FOR20 et de la Centrine 2 dans l'assemblage du corps basal**

Les défauts d'assemblage de la partie distale des corps basaux observés au cours de la déplétion d'OFD1 m'ont conduit à analyser ses relations avec FOR20 et la Centrine 2, toutes deux nécessaires à cet assemblage chez la paramécie (Aubusson-Fleury et al., 2012). J'ai ainsi pu montrer que le recrutement d'OFD1 et de FOR20 aux corps basaux est interdépendant mais qu'il n'existe pas de relation entre la Centrine 2 et OFD1.

#### *Relation FOR20-OFD1*

L'interdépendance observée entre OFD1 et FOR20 pourrait s'expliquer par l'existence d'un complexe FOR20-OFD1 au niveau des corps basaux. Cette hypothèse est étayée par le fait que ces deux protéines présentent des propriétés communes. Tout comme cela a été démontré pour FOR20 (Aubusson-Fleury et al., 2012), OFD1 est recrutée précocement au cours de l'assemblage des corps basaux, elle se localise dans la partie proximale de la zone de transition des corps basaux ciliés, entre l'axonème et la membrane ciliaire, et elle se maintient au niveau du cortex lorsque les corps basaux se désassemblent. L'existence d'un complexe ternaire formé de FOR20, OFD1 et d'OFIP, une protéine dont les mutations induisent une ciliopathie a été démontrée au niveau des centrosomes et du matériel péricentriolaire des cellules de mammifères (Chevrier et al., 2016). La conservation d'OFIP chez la paramécie



suggérait que ce complexe puisse se former également au niveau des corps basaux et être indispensable à la formation de leur extrémité distale. Cette hypothèse a été testée au laboratoire. Aucun défaut d'ancrage des corps basaux n'a été observé au niveau du cortex de la paramécie. Cependant une désorganisation importante des corps basaux, constituant l'appareil oral, a été observée dont l'origine reste à déterminer. Il serait néanmoins intéressant d'étudier les relations d'épistasie entre OFIP et OFD1/FOR20. En effet une mutation qui abolit son interaction avec FOR20 et OFD1 est à l'origine d'une pathologie de type Oro-facial digital de type V. Caractérisé l'origine des défauts observés chez la paramécie pourrait apporter des éléments permettant de mieux comprendre sa fonction.

Il existe peu de données concernant la fonction de FOR20. L'ensemble des travaux réalisés aussi bien chez la paramécie (Aubusson-Fleury et al., 2012) que dans les cellules de mammifères (Sedjai et al., 2010; Chevrier et al., 2016) suggère néanmoins qu'elle pourrait, en interaction avec OFD1, participer à l'assemblage des appendices distaux/fibres de transition. Cette hypothèse pourrait être testée en déterminant si comme OFD1, FOR20 joue un rôle dans le recrutement des composants des fibres de transition. Si ces structures ont été décrites chez la paramécie (Dute and Kung, 1978) leur composition n'est pas connue. Parmi les 5 composants des appendices distaux identifiés à ce jour chez les métazoaires (CEP164, CEP83, CEP89, FBF1 et SCLT1) (Tanos et al., 2013), seul CEP164 possède des homologues clairement identifiés par des analyses par BLAST chez la paramécie. Il paraîtrait donc intéressant d'établir les relations entre FOR20 et CEP164 chez cet organisme. De même les relations de FOR20 avec des composants des appendices distaux et avec ceux impliqués dans la fusion avec la vésicule ciliaire pourraient être testées dans des cellules de mammifères.

#### *Relation FOR20-OFD1 et Centrine 2*

Si les recrutements d'OFD1 et de FOR20 aux corps basaux de paramécie sont interdépendants, il n'existe pas de relation entre les recrutements de la Centrine 2 et celui d'OFD1. Ces résultats sont en accord avec des observations chez les mammifères. En effet dans les cellules murines déficientes pour OFD1, les centrioles contiennent de la Centrine 2 (Singla et al., 2010). Ils apparaissent néanmoins contradictoires avec les résultats obtenus auparavant chez la paramécie qui indiquent que le recrutement de FOR20 est dépendant de présence de la Centrine 2 (Aubusson-Fleury et al., 2012). Une explication pourrait être que,



comme démontré pour OFIP chez les mammifères, la formation du complexe FOR20-OFD1 soit dépendante de la présence de la Centrine 2. Dans un contexte d'inactivation de la Centrine 2 et donc en absence de formation du complexe, l'absence de FOR20 n'aurait aucune conséquence sur le recrutement ou la stabilité d'OFD1. La formation éventuelle du complexe FOR20, OFD1 dépendant de la présence de la Centrine 2 dans les corps basaux de paramécie reste évidemment à démontrer et nécessiterait des analyses biochimiques.

### **Implication des protéines FOP dans la ciliogenèse.**

En plus de FOR20 et OFD1, il existe chez la paramécie quatre autres familles de gènes codant des protéines de la famille FOP. J'ai réalisé au cours de mon M2 l'inactivation d'une de ces familles qui code des protéines également conservées chez *Tetrahymena*. Cette inactivation n'a pas induit d'internalisation des corps basaux, mais a conduit à des défauts de positionnement au sein du cortex. Cette analyse, qui n'a pas été approfondie, suggère que les protéines de la famille FOP puissent avoir une fonction commune dans l'accrochage des corps basaux à la surface. Dans cette hypothèse, on s'attend à ce que la protéine, membre fondateur de la famille FOP, soit également impliquée dans cet ancrage. Cette hypothèse est étayée par le fait que tout comme OFD1 et FOR20, FGFR1OP se localise préférentiellement à l'extrémité distale des centrioles pères des centrosomes (Acquaviva et al., 2009) et est impliquée dans la ciliogenèse (Lee and Stearns, 2013).

L'ensemble des résultats obtenus sur OFD1 démontrent une conservation fonctionnelle de la protéine dans les mécanismes d'ancrage des cils motiles qui ne font pas intervenir d'intermédiaire vésiculaire chez la paramécie.



## VFL3

Il existe 4 gènes codant des homologues de *VFL3* dans l'espèce *Paramecium tetraurelia*. Une analyse phylogénétique a permis de les regrouper en deux familles *VFL3-A* et *VFL3-B*. La famille *VFL3-A* code des protéines plus proches de la protéine de *Chlamydomonas*, organisme dans lequel elle a été précédemment étudiée (Wright et al., 1983). La diminution de l'expression des gènes de la famille *VFL3-B* n'a pas induit de phénotype évident tandis que celle des gènes de la famille *VFL3-A* a provoqué des défauts d'ancrage des corps basaux. Outre ces défauts d'ancrage, la déplétion des protéines de cette famille entraîne des anomalies de ségrégation des corps basaux et des défauts d'assemblage des trois différentes structures associées à leur partie proximale, la racine striée et les racines microtubulaires transverse et post-ciliaire. De façon étonnante alors qu'une seule racine striée est associée au corps basal des cellules sauvages, on retrouve jusqu'à trois racines striées au niveau des corps basaux dans les cellules déplétées pour *VFL3-A*. Contrairement à ce qui a été observé pour *OFD1*, les corps basaux non ancrés à la surface possèdent des extrémités distales qui semblent parfaitement bien assemblées. L'expression d'une isoforme de chaque famille étiquetée par la GFP ou par l'épitope Myc montre une localisation différentielle. Alors que l'isoforme de la famille *VFL3-B* est présente tout au long du cycle cellulaire au niveau des corps basaux, celle de la famille *VFL3-A* n'est détectée que dans des cellules en division et de façon transitoire au niveau des corps basaux en cours de duplication. Plus précisément elle est localisée dans la partie proximale du corps basal père, entre la racine striée et les microtubules auxquels elle est associée.

### **Des différences fonctionnelles entre *VFL3-A* et *VFL3-B***

Les différences de localisation des protéines des familles *VFL3-A* et *VFL3-B* et l'absence de complémentarité de l'inactivation des gènes de la famille *VFL3-A* par l'expression de gènes de la famille *VFL3-B* indiquent que ces gènes ne sont pas iso-fonctionnels.

L'existence, dans le génome de *Tetrahymena* et d'une autre espèce de paramécie, *P. caudatum*, de deux isoformes de *VFL3* phylogénétiquement reliées aux isoformes existant dans l'espèce *P. tetraurelia* suggère que la duplication ancestrale du gène *VFL3* soit au moins



aussi ancienne que la spéciation des ciliés. On peut donc imaginer qu'après duplication, l'un des gènes dupliqués ait acquis une fonction nouvelle au cours de l'évolution. Cette duplication aurait pu également aboutir à une sous-fonctionnalisation, l'ensemble de la fonction du gène ancestral étant maintenant assuré par les deux copies conservées. Si la fonction des gènes de la famille VFL3-B n'a pu être établie, des analogies phénotypiques ont été observées lors de la déplétion des gènes de la famille VFL3-A chez la paramécie et chez le mutant VFL3 de *Chlamydomonas*. Dans les deux cas, les défauts d'ancrage des corps basaux sont accompagnés de défaut de ségrégation et d'assemblage des structures associées. Il semble donc que les gènes de la famille VFL3-A aient gardé au moins une fonction ancestrale commune à celle de *Chlamydomonas*. Ceci est en accord avec l'analyse phylogénétique qui montre que les protéines de la famille VFL3-A sont plus étroitement apparentées à la protéine VFL3 de *Chlamydomonas* que celle de VFL3-B.

Il reste à comprendre la fonction des protéines de la famille VFL3-B. La localisation d'une de ses isoformes au niveau des corps basaux reflète probablement une fonction de la protéine dans la formation ou l'assemblage de ces organites. Dans l'hypothèse d'une sous-fonctionnalisation des gènes VFL3 au cours de l'évolution, les isoformes VFL3-B pourraient avoir conservé une activité ancestrale différente de celle retenue dans les gènes de la famille VFL3-A. Il est donc important d'établir cette fonction. Sa localisation précise par microscopie à haute résolution ou microscopie électronique pourrait apporter des pistes concernant sa fonction. De même, on pourrait envisager de tester l'effet de sa surexpression chez la paramécie.

Avant de conclure à une complète divergence fonctionnelle des deux familles de protéines VFL3-A et VFL3-B, il reste un point à éclaircir. En effet le northern blot (Figure S9 de l'article) réalisé pour tester l'efficacité et la spécificité des vecteurs utilisés lors de l'inactivation des gènes VFL3 révèle de façon étonnante que l'inactivation des gènes de la famille VFL3-B entraîne une augmentation, d'au moins un facteur 2, de la quantité des transcrits des gènes de la famille VFL3-A. Ces expériences méritent d'être reproduites. Si cette augmentation se confirmait, elle pourrait signifier que la surexpression des protéines de la famille VFL3-A puissent compléter les défauts induits par la déplétion des protéines VFL3-B. Cette complémentation pourrait s'expliquer si, malgré leur spécialisation, reflétée par leur différence de localisation, elles avaient gardé une fonction commune.



## **Les défauts d'ancrage sont associés à des défauts d'assemblages des structures associées aux corps basaux**

Contrairement à ce qui est observé après la déplétion d'OFD1, la déplétion de VFL3-A n'est pas corrélée à des défauts d'assemblages de la partie distale des corps basaux mais à des anomalies de recrutement des structures associées à sa partie proximale. L'assemblage de l'ALF (Anterior Left Filament), une structure filamenteuse associée au corps basaux dont l'apparition transitoire précède le développement du nouveau corps basal pourrait également être compromise. En effet cet assemblage est dépendant de la Centrine 3 dont le recrutement est affecté dans les cellules déplétées pour VFL3-A. Chez la paramécie, l'ensemble de ces structures jouent des rôles importants dans les mécanismes qui accompagnent la duplication des corps basaux, en particulier dans leur ségrégation et les mouvements qui guident le nouveau corps basal vers la surface cellulaire. Les défauts d'ancrage pourraient donc résulter des défauts d'assemblage de ces structures associées. Cette hypothèse est en accord avec celle privilégiée par Wright et ses collaborateurs, pour expliquer les défauts pléiotropes induits par la mutation de *VFL3* chez *Chlamydomonas* (Wright et al., 1983). Elle est également compatible avec les observations chez *Tetrahymena* qui montrent que la mutation DisAp qui raccourcit la racine striée induit des défauts d'espacement et d'orientation des corps basaux (Jerka-Dziadosz et al., 1995; Galati et al., 2014).

## **VFL3-A, des protéines impliquées dans le contrôle de l'asymétrie rotationnelle des corps basaux**

Parmi les anomalies qui accompagnent les défauts d'ancrage des corps basaux dans les cellules déplétées pour VFL3-A, la plus étonnante est leur capacité à assembler deux, voire trois racines striées. Associée à des triplets spécifiques de la partie proximale des corps basaux, la racine striée est l'une des trois structures qui, avec les racines microtubulaires transverses et post-ciliaires, met en évidence l'existence d'une asymétrie rotationnelle de l'organite. L'association de plusieurs racines striées à un même corps basal semble donc révéler une perte de spécificité de ces triplets. Les bases moléculaires conduisant à l'établissement de cette asymétrie sont loin d'être identifiées. Constitue-t-elle une propriété intrinsèque au corps basal ou est-elle imposée par son environnement?

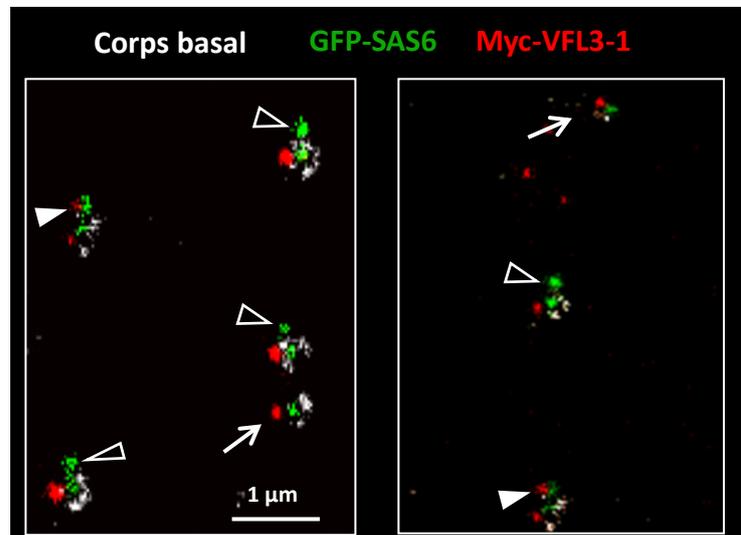


On peut se demander si le défaut d'asymétrie des corps basaux induit par la déplétion de VFL3-A n'est pas une simple conséquence de leur mauvais positionnement. Des anomalies d'assemblages de racines striées n'ont pas été observées lors de la déplétion de la Centrine 3, qui comme celle de VFL3-A induit la formation de corps basaux mal positionnés et parfaitement assemblés (Jerka-Dziadosz et al., 2010). Le défaut de positionnement par lui-même ne semble donc pas constituer le facteur de perte de l'asymétrie du corps basal.

Des éléments structuraux et moléculaires marqueurs d'une asymétrie rotationnelle inhérents au corps basal ont été découverts chez *Chlamydomonas*. En effet au cours de la construction du corps basal deux structures particulières (nommées « acorn » et « V-shaped ») associées à des triplets spécifiques apparaissent précocement à l'intérieur du cylindre au niveau distal du pro-corps basal (Geimer and Melkonian, 2004). Chez *Chlamydomonas*, comme chez la paramécie plusieurs structures associées, dont la racine striée distale, marquent l'asymétrie du corps basal. La protéine VFL1 qui se localise de façon asymétrique à l'intérieur du corps basal au niveau des microtubules à partir desquels se développe cette racine striée est aussi indispensable à sa formation (Adams et al., 1985; Silflow et al., 2001). J'ai montré ici que l'une des isoformes de la famille VFL3-A, également nécessaire à l'expression de cette asymétrie rotationnelle, est localisée à l'extérieur du corps basal, indiquant ainsi que cette asymétrie est imposée au moins partiellement par des facteurs extrinsèques. Les protéines VFL3-A pourraient directement contrôler l'asymétrie des corps basaux en recrutant des protéines présentes soit à l'intérieur, telle que VFL1, soit à l'extérieur des corps basaux qui imposeraient la spécificité aux triplets de microtubules. L'existence d'interaction possible entre VFL3 et VFL1 est étayée par des analyses de protéomique en masse (Hein et al., 2015).

### **Relation entre VFL3-1 et les protéines impliquées dans l'assemblage du corps basal.**

Le recrutement de l'une des isoformes de la famille VFL3-A, VFL3-1, se fait au voisinage des microtubules des corps basaux pères à un stade précoce de leur duplication lorsque le corps basal fils est faiblement reconnu par l'anticorps ID5 (figure 8 de l'article). Cet anticorps, qui reconnaît une modification post-traductionnelle des tubulines, ne permet



**Figure 23: localisation et cinétique de recrutement de Myc-VFL3-1**

**Zoom sur deux champs pris sur deux cellules en début de division observées au STED.** VFL3-1 est localisée de façon asymétrique à proximité des corps basaux pères marqués en blanc (reconnu par l'anticorps ID5) qui n'ont pas encore subi de duplication (flèche). Lors de la duplication, un nouveau corps basal identifié par GFP-SAS6, apparait à l'avant du corps basal père (tête de flèche vide). VFL3-1 est ensuite recruté au niveau de ce dernier (tête de flèche pleine).

pas de visualiser les corps basaux à une étape précoce de leur développement. On pouvait donc se demander si ce recrutement était initié au niveau du corps basal père ou du corps basal fils. Une façon de trancher entre ces deux hypothèses est de comparer les cinétiques de recrutement de VFL3-1 et d'un composant structural du corps basal incorporé de façon précoce au cours de son assemblage, tel que SAS-6 ou Bld10. Nous avons donc construit des transformants exprimant GFP-SAS-6 et Myc-VFL3-1. Dans un premier temps nous nous sommes heurtés à un effet délétère induit par la transformation simultanée avec les deux vecteurs. Nous avons dû modifier le protocole de transformation et commencer à établir une première lignée exprimant GFP-SAS6 que nous avons ensuite transformée par le vecteur exprimant Myc-VFL3-1. Dans ces conditions, des transformants présentant des phénotypes sauvages et exprimant les deux protéines hybrides ont pu être sélectionnés. Ils ont été marqués avec les anticorps anti-Myc et ID5. Les images obtenues après visualisation du triple marquage en microscopie super-résolution (Collaboration Ulf Schwarz, Leica , Mannheim) sont présentées figure 23. Le double marquage GFP-SAS6/ ID5 permet de différencier les corps basaux matures de ceux en cours de développement qui sont visualisés par un simple marquage GFP. La localisation de Myc-VFL3-1 près de corps basaux matures auxquels ne sont pas associés de corps basaux en développement suggère que le recrutement de VFL3-1 précède l'apparition des nouveaux corps basaux. Cette hypothèse est étayée par des observations qui montrent que lorsqu'un nouveau corps basal est détecté par un simple marquage GFP au voisinage de son père, VFL3-1 est toujours étroitement associé aux microtubules du corps basal père. Chez la paramécie, plusieurs vagues de duplication se succèdent au cours de la division. L'association de VFL3-1 à l'avant de corps basaux en cours de développement traduit sans doute le fait que ces derniers vont probablement subir un nouvel événement de duplication. Ces expériences doivent être reproduites et confirmées en suivant la cinétique de recrutement de VFL3-1 et Bld10 par exemple.

Si le recrutement de la protéine VFL3-1 semble précéder l'apparition d'un nouveau corps basal, il est peu probable que cette protéine soit nécessaire au recrutement des protéines impliquées dans leur assemblage. En effet, des défauts de duplication ont été observés au cours de l'inactivation des gènes *VFL3-A*, mais ils sont sporadiques et sont sans commune mesure avec ceux observés lors de la déplétion de SAS-6, Bld10 (Jerka-Dziadosz et al., 2010) et SAS-4 (Gogendeau et al., 2011) chez la paramécie. En outre, les corps basaux sont parfaitement assemblés en absence de VFL3-A contrairement à ce qui a été observé après



déplétion de l'Epsilon tubuline (Dupuis-Williams et al., 2002) ou de la Delta tubuline (Garreau de Loubresse et al., 2001).

Le mécanisme responsable du recrutement de VFL3-1 reste à déterminer. Même lorsqu'elle est exprimée sous le contrôle d'un promoteur constitutif, l'isoforme VFL3-1 n'est présente au niveau des corps basaux qu'au moment de leur duplication. On peut donc se demander si sa présence requiert le recrutement préalable d'une autre protéine. Une autre hypothèse serait qu'elle ne soit recrutée via un constituant déjà associé aux corps basaux qu'après avoir subi une modification post-traductionnelle.

L'ensemble des résultats présentés me conduit à proposer un modèle dans lequel le recrutement de VFL3-A au niveau du corps basal père permettrait l'acquisition de l'asymétrie rotationnelle des corps basaux fils en développement. Les défauts d'asymétrie générés en son absence conduiraient à des anomalies d'assemblage des différents appendices, racines striées, racines microtubulaires et ALF. Ces structures jouant un rôle essentiel dans les mouvements qui accompagnent la duplication des corps basaux, les anomalies d'assemblage auraient pour conséquence non seulement les défauts d'ancrage mais également les défauts de ségrégation observés. Cette hypothèse pourrait également rendre compte des observations faites chez le mutant VFL3 de *Chlamydomonas* (Wright et al., 1983).

### **Comparaison du rôle de VFL3 chez la paramécie et les métazoaires**

Le rôle éventuel des protéines VFL3-A dans le contrôle de l'établissement de l'asymétrie structurale des corps basaux est-il conservé chez les métazoaires? Chez ces organismes cette asymétrie est révélée dans les cellules multiciliées par l'association du pied basal avec des triplets spécifiques, les triplets 5 et 6 (Sandoz et al., 1988). Contrairement aux appendices associés aux corps basaux de la paramécie, le pied basal n'est pas impliqué dans l'étape d'ancrage à la surface. Les dysfonctionnements des protéines nécessaires à son assemblage telle qu'ODF2, la Galectine 3, la Ninéine ou la Zeta-tubuline n'affectent pas cette étape (Delgehyr et al., 2005; Kunimoto et al., 2012; Clare et al., 2014; Turk et al., 2015). Par contre il joue, via ses interactions avec les microtubules sous corticaux, un rôle essentiel dans l'orientation finale et la stabilité des cils motiles à la surface cellulaire. On pourrait donc s'attendre à ce que la perte de l'asymétrie rotationnelle des corps basaux engendrée par l'absence de VFL3-A puisse entraîner des anomalies de positionnement des pieds basaux et



qu'elle ait des répercussions sur l'orientation finale des corps basaux à la surface. Ceci semble être effectivement le cas chez la planaire (Basquin et al, EMBO conférence on Cilia2016).

Ces anomalies d'orientation sont-elles vraiment dues à une perte de l'asymétrie rotationnelle du corps basal? La réponse n'est pas triviale. En effet chez les métazoaires, le pied basal est le seul marqueur de cette asymétrie rotationnelle et ne permet donc de définir qu'une symétrie axiale. L'étude de la localisation de marqueurs d'asymétrie rotationnelle telle que VFL1 pourrait permettre d'avancer sur cette question.

En conclusion les résultats présentés ici apportent des précisions sur les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus d'ancrage/de positionnement des corps basaux chez un organisme unicellulaire *Paramecium tetraurelia*. Ils soulignent la complexité de ce processus qui requière non seulement un assemblage correct de la partie distale de ces corps basaux mais également celui de leurs structures associées en parties proximales. Ils suggèrent par ailleurs que la protéine VFL3-1 pourrait constituer un facteur extrinsèque contrôlant l'asymétrie rotationnelle des corps basaux qui spécifie les sites d'assemblage de ces structures associées.



## VIII) Références bibliographiques

- Acquaviva, C., Chevrier, V., Chauvin, J.-P., Fournier, G., Birnbaum, D., and Rosnet, O. (2009). The centrosomal FOP protein is required for cell cycle progression and survival. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 1217–1227.
- Adams, G.M., Wright, R.L., and Jarvik, J.W. (1985). Defective temporal and spatial control of flagellar assembly in a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* with variable flagellar number. *J. Cell Biol.* 100, 955–964.
- 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.
- Al Jord, A., Lemaître, A.-I., Delgehyr, N., Faucourt, M., Spassky, N., and Meunier, A. (2014). Centriole amplification by mother and daughter centrioles differs in multiciliated cells. *Nature* 516, 104–107.
- Allen, R.D. (1969). THE MORPHOGENESIS OF BASAL BODIES AND ACCESSORY STRUCTURES OF THE CORTEX OF THE CILIATED PROTOZOAN TETRAHYMENA PYRIFORMIS. *J. Cell Biol.* 40, 716–733.
- Alvey, P.L. (1986). Do adult centrioles contain cartwheels and lie at right angles to each other? *Cell Biol. Int. Rep.* 10, 589–598.
- Anderson, R.G.W. (1972). The Three-Dimensional Structure of the Basal Body from the Rhesus Monkey Oviduct. *J. Cell Biol.* 54, 246–265.
- Arnaiz, O., Cain, S., Cohen, J., and Sperling, L. (2007). ParameciumDB: a community resource that integrates the *Paramecium tetraurelia* genome sequence with genetic data. *Nucleic Acids Res.* 35, D439-444.
- Arnaiz, O., Malinowska, A., Klotz, C., Sperling, L., Dadlez, M., Koll, F., and Cohen, J. (2009). Cildb: a knowledgebase for centrosomes and cilia. *Database J. Biol. Databases Curation* 2009, bap022.
- Arnaiz, O., Cohen, J., Tassin, A.-M., and Koll, F. (2014). Remodeling Cildb, a popular database for cilia and links for ciliopathies. *Cilia* 3, 9.
- Aubusson-Fleury, A., Lemullois, M., Loubresse, N.G. de, Laligné, C., Cohen, J., Rosnet, O., Jerka-Dziadosz, M., Beisson, J., and Koll, F. (2012). The conserved centrosomal protein FOR20 is required for assembly of the transition zone and basal body docking at the cell surface. *J. Cell Sci.* 125, 4395–4404.
- Aubusson-Fleury, A., Lemullois, M., Bengueddach, H., Abdallah, S., Shi, L., Cohen, J., Tassin, A., and Koll, F. (2015). Transition zone: the sequential assembly of its components parallels its dual role in basal body anchoring and ciliary function. *Cilia* 4, P26.
- Aury, J.-M., Jaillon, O., Duret, L., Noel, B., Jubin, C., Porcel, B.M., Ségurens, B., Daubin, V., Anthouard, V., Aiach, N., et al. (2006). Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Nature* 444, 171–178.
- Avidor-Reiss, T., and Gopalakrishnan, J. (2013). Building a centriole. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 72–77.

- Awata, J., Takada, S., Standley, C., Lehtreck, K.F., Bellvé, K.D., Pazour, G.J., Fogarty, K.E., and Witman, G.B. (2014). NPHP4 controls ciliary trafficking of membrane proteins and large soluble proteins at the transition zone. *J. Cell Sci.* *127*, 4714–4727.
- Azimzadeh, J. (2014). Exploring the evolutionary history of centrosomes. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *369*.
- Azimzadeh, J., and Basquin, C. (2016). Basal bodies across eukaryotes series: basal bodies in the freshwater planarian *Schmidtea mediterranea*. *Cilia* *5*, 15.
- Azimzadeh, J., Nacry, P., Christodoulidou, A., Drevensek, S., Camilleri, C., Amiour, N., Parcy, F., Pastuglia, M., and Bouchez, D. (2008). Arabidopsis TONNEAU1 Proteins Are Essential for Preprophase Band Formation and Interact with Centrin. *Plant Cell* *20*, 2146–2159.
- Azimzadeh, J., Hergert, P., Delouvé, A., Euteneuer, U., Formstecher, E., Khodjakov, A., and Bornens, M. (2009). hPOC5 is a centrin-binding protein required for assembly of full-length centrioles. *J. Cell Biol.* *185*, 101–114.
- Azimzadeh, J., Wong, M.L., Downhour, D.M., Alvarado, A.S., and Marshall, W.F. (2012). Centrosome Loss in the Evolution of Planarians. *Science* *335*, 461–463.
- Barker, A.R., Renzaglia, K.S., Fry, K., and Dawe, H.R. (2014). Bioinformatic analysis of ciliary transition zone proteins reveals insights into the evolution of ciliopathy networks. *BMC Genomics* *15*, 531.
- Baron, A.T., Greenwood, T.M., and Salisbury, J.L. (1991). Localization of the centrin-related 165,000-Mr protein of PtK2 cells during the cell cycle. *Cell Motil. Cytoskeleton* *18*, 1–14.
- Beisson, J., and Sonneborn, T.M. (1965). CYTOPLASMIC INHERITANCE OF THE ORGANIZATION OF THE CELL CORTEX IN PARAMECIUM AURELIA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *53*, 275–282.
- Beisson, J., Bétermier, M., Bré, M.-H., Cohen, J., Duharcourt, S., Duret, L., Kung, C., Malinsky, S., Meyer, E., Preer, J.R., et al. (2010). Immunocytochemistry of Paramecium Cytoskeletal Structures. *Cold Spring Harb. Protoc.* *2010*, pdb.prot5365.
- Benmerah, A. (2014). La poche ciliaire : fruit des liaisons du centrosome avec le trafic vésiculaire. *Médecine/Sciences* *30*, 962–967.
- Bergmann, C., Frank, V., and Salonen, R. (2016). Clinical utility gene card for: Meckel syndrome - update 2016. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *24*.
- Bloodgood, R.A. (2010). Sensory reception is an attribute of both primary cilia and motile cilia. *J. Cell Sci.* *123*, 505–509.
- Boisvieux-Ulrich, E., Laine, M.C., and Sandoz, D. (1985). The orientation of ciliary basal bodies in quail oviduct is related to the ciliary beating cycle commencement. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* *55*, 147–150.
- Boon, M., Jorissen, M., Proesmans, M., and Boeck, K.D. (2012). Primary ciliary dyskinesia, an orphan disease. *Eur. J. Pediatr.* *172*, 151–162.
- Brancati, F., Dallapiccola, B., and Valente, E.M. (2010). Joubert Syndrome and related disorders. *Orphanet J. Rare Dis.* *5*, 20.

- van Breugel, M., Hirono, M., Andreeva, A., Yanagisawa, H., Yamaguchi, S., Nakazawa, Y., Morgner, N., Petrovich, M., Ebong, I.-O., Robinson, C.V., et al. (2011). Structures of SAS-6 suggest its organization in centrioles. *Science* *331*, 1196–1199.
- Brohmann, H., Pinnecke, S., and Hoyer-Fender, S. (1997). Identification and characterization of new cDNAs encoding outer dense fiber proteins of rat sperm. *J. Biol. Chem.* *272*, 10327–10332.
- Bubenshchikova, E., Ichimura, K., Fukuyo, Y., Powell, R., Hsu, C., Morrical, S.O., Sedor, J.R., Sakai, T., and Obara, T. (2012). Wtip and Vangl2 are required for mitotic spindle orientation and cloaca morphogenesis. *Biol. Open* *1*, 588–596.
- Burke, M.C., Li, F.-Q., Cyge, B., Arashiro, T., Brechbuhl, H.M., Chen, X., Siller, S.S., Weiss, M.A., O’Connell, C.B., Love, D., et al. (2014). Chibby promotes ciliary vesicle formation and basal body docking during airway cell differentiation. *J. Cell Biol.* *207*, 123–137.
- Čajánek, L., and Nigg, E.A. (2014). Cep164 triggers ciliogenesis by recruiting Tau tubulin kinase 2 to the mother centriole. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E2841-2850.
- Carvalho-Santos, Z., Azimzadeh, J., Pereira-Leal, J.B., and Bettencourt-Dias, M. (2011). Evolution: Tracing the origins of centrioles, cilia, and flagella. *J. Cell Biol.* *194*, 165–175.
- Caspary, T., Larkins, C.E., and Anderson, K.V. (2007). The graded response to Sonic Hedgehog depends on cilia architecture. *Dev. Cell* *12*, 767–778.
- Chailley, B., Boisvieux-Ulrich, E., and Sandoz, D. (1982). Ciliary membrane events during ciliogenesis of the quail oviduct. *Biol Cell*.
- 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.
- Chang, P., Giddings, T.H., Winey, M., and Stearns, T. (2003).  $\epsilon$ -Tubulin is required for centriole duplication and microtubule organization. *Nat. Cell Biol.* *5*, 71–76.
- Chavali, P.L., and Gergely, F. (2013). Cilia born out of shock and stress. *EMBO J.* *32*, 3011–3013.
- Chen, J.V., Kao, L.-R., Jana, S.C., Sivan-Loukianova, E., Mendonça, S., Cabrera, O.A., Singh, P., Cabernard, C., Eberl, D.F., Bettencourt-Dias, M., et al. (2015). Rootletin organizes the ciliary rootlet to achieve neuron sensory function in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* *211*, 435–453.
- Chevrier, V., Bruel, A.-L., Dam, T.J.P.V., Franco, B., Scalzo, M.L., Lembo, F., Audebert, S., Baudalet, E., Isnardon, D., Bole, A., et al. (2016). OFIP/KIAA0753 forms a complex with OFD1 and FOR20 at pericentriolar satellites and centrosomes and is mutated in one individual with oral-facial-digital syndrome. *Hum. Mol. Genet.* *25*, 497–513.
- Chien, Y.-H., Werner, M.E., Stubbs, J., Joens, M.S., Li, J., Chien, S., Fitzpatrick, J.A.J., Mitchell, B.J., and Kintner, C. (2013). Bbpf1 is required to maintain cilia orientation. *Dev. Camb. Engl.* *140*, 3468–3477.
- Clare, D.K., Magescas, J., Piolot, T., Dumoux, M., Vesque, C., Pichard, E., Dang, T., Duvauchelle, B., Poirier, F., and Delacour, D. (2014). Basal foot MTOC organizes pillar MTs required for coordination of beating cilia. *Nat. Commun.* *5*, 4888.

Conduit, P.T., Wainman, A., and Raff, J.W. (2015). Centrosome function and assembly in animal cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 611–624.

Craige, B., Tsao, C.-C., Diener, D.R., Hou, Y., Lechtreck, K.-F., Rosenbaum, J.L., and Witman, G.B. (2010). CEP290 tethers flagellar transition zone microtubules to the membrane and regulates flagellar protein content. *J. Cell Biol.* *190*, 927–940.

D'Angelo, A., De Angelis, A., Avallone, B., Piscopo, I., Tammaro, R., Studer, M., and Franco, B. (2012). Ofd1 controls dorso-ventral patterning and axoneme elongation during embryonic brain development. *PLoS One* *7*, e52937.

Deane, J.A., Cole, D.G., Seeley, E.S., Diener, D.R., and Rosenbaum, J.L. (2001). Localization of intraflagellar transport protein IFT52 identifies basal body transitional fibers as the docking site for IFT particles. *Curr. Biol. CB* *11*, 1586–1590.

Delaval, B., Covassin, L., Lawson, N.D., and Doxsey, S. (2011). Centrin depletion causes cyst formation and other ciliopathy-related phenotypes in zebrafish. *Cell Cycle* *10*, 3964–3972.

Delgehyr, N., Sillibourne, J., and Bornens, M. (2005). Microtubule nucleation and anchoring at the centrosome are independent processes linked by ninein function. *J Cell Sci* *118*, 1565–1575.

Dippell, R.V. (1968). The development of basal bodies in paramecium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *61*, 461–468.

Drevensek, S., Goussot, M., Duroc, Y., Christodoulidou, A., Steyaert, S., Schaefer, E., Duvernois, E., Grandjean, O., Vantard, M., Bouchez, D., et al. (2012). The Arabidopsis TRM1-TON1 interaction reveals a recruitment network common to plant cortical microtubule arrays and eukaryotic centrosomes. *Plant Cell* *24*, 178–191.

Dupuis-Williams, P., Fleury-Aubusson, A., de Loubresse, N.G., Geoffroy, H., Vayssié, L., Galvani, A., Espigat, A., and Rossier, J. (2002). Functional role of epsilon-tubulin in the assembly of the centriolar microtubule scaffold. *J. Cell Biol.* *158*, 1183–1193.

Dute, R., and Kung, C. (1978). Ultrastructure of the proximal region of somatic cilia in *Paramecium tetraurelia*. *J. Cell Biol.* *78*, 451–464.

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.

Ferrante, M.I., Giorgio, G., Feather, S.A., Bulfone, A., Wright, V., Ghiani, M., Selicorni, A., Gammaro, L., Scolari, F., Woolf, A.S., et al. (2001). Identification of the gene for oral-facial-digital type I syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *68*, 569–576.

Ferrante, M.I., Zullo, A., Barra, A., Bimonte, S., Messaddeq, N., Studer, M., Dollé, P., and Franco, B. (2006). Oral-facial-digital type I protein is required for primary cilia formation and left-right axis specification. *Nat. Genet.* *38*, 112–117.

Ferrante, M.I., Romio, L., Castro, S., Collins, J.E., Goulding, D.A., Stemple, D.L., Woolf, A.S., and Wilson, S.W. (2009). Convergent extension movements and ciliary function are mediated by ofd1, a zebrafish orthologue of the human oral-facial-digital type 1 syndrome gene. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 289–303.

- Galati, D.F., Bonney, S., Kronenberg, Z., Clarissa, C., Yandell, M., Elde, N.C., Jerka-Dziadosz, M., Giddings, T.H., Frankel, J., and Pearson, C.G. (2014). DisAp-dependent striated fiber elongation is required to organize ciliary arrays. *J. Cell Biol.* *207*, 705–715.
- Galvani, A., and Sperling, L. (2002). RNA interference by feeding in *Paramecium*. *Trends Genet. TIG* *18*, 11–12.
- Garreau de Loubresse, N., Ruiz, F., Beisson, J., and Klotz, C. (2001). Role of delta-tubulin and the C-tubule in assembly of *Paramecium* basal bodies. *BMC Cell Biol.* *2*, 4.
- Geimer, S., and Melkonian, M. (2004). The ultrastructure of the *Chlamydomonas reinhardtii* basal apparatus: identification of an early marker of radial asymmetry inherent in the basal body. *J. Cell Sci.* *117*, 2663–2674.
- Gerlitz, G., Darhin, E., Giorgio, G., Franco, B., and Reiner, O. (2005). Novel functional features of the Lis-H domain: role in protein dimerization, half-life and cellular localization. *Cell Cycle Georget. Tex* *4*, 1632–1640.
- Gibbons, I.R., and Grimstone, A.V. (1960). On Flagellar Structure in Certain Flagellates. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *7*, 697–716.
- Giorgio, G., Alfieri, M., Prattichizzo, C., Zullo, A., Cairo, S., and Franco, B. (2007). Functional characterization of the OFD1 protein reveals a nuclear localization and physical interaction with subunits of a chromatin remodeling complex. *Mol. Biol. Cell* *18*, 4397–4404.
- Gogendeau, D., Hurbain, I., Raposo, G., Cohen, J., Koll, F., and Basto, R. (2011). Sas-4 proteins are required during basal body duplication in *Paramecium*. *Mol. Biol. Cell* *22*, 1035–1044.
- 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.
- Guarguaglini, G., Duncan, P.I., Stierhof, Y.D., Holmström, T., Duensing, S., and Nigg, E.A. (2005). The Forkhead-associated Domain Protein Cep170 Interacts with Polo-like Kinase 1 and Serves as a Marker for Mature Centrioles. *Mol. Biol. Cell* *16*, 1095–1107.
- Guichard, P., Desfosses, A., Maheshwari, A., Hachet, V., Dietrich, C., Brune, A., Ishikawa, T., Sachse, C., and Gönczy, P. (2012). Cartwheel architecture of *Trichonympha* basal body. *Science* *337*, 553.
- Gupta, G.D., Coyaud, É., Gonçalves, J., Mojarad, B.A., Liu, Y., Wu, Q., Gheiratmand, L., Comartin, D., Tkach, J.M., Cheung, S.W.T., et al. (2015). A Dynamic Protein Interaction Landscape of the Human Centrosome-Cilium Interface. *Cell* *163*, 1484–1499.
- Hagiwara, H., Shibasaki, S., and Ohwada, N. (1992). Ciliogenesis in the Human Oviduct Epithelium during the Normal Menstrual Cycle. *J. Electron Microsc. (Tokyo)* *41*, 321–329.
- Hagiwara, H., Kano, A., Aoki, T., Ohwada, N., and Takata, K. (2000). Localization of gamma-tubulin to the basal foot associated with the basal body extending a cilium. *Histochem. J.* *32*, 669–671.
- Hagiwara, H., Ohwada, N., Aoki, T., Suzuki, T., and Takata, K. (2008). The primary cilia of secretory cells in the human oviduct mucosa. *Med. Mol. Morphol.* *41*, 193–198.

Hehnly, H., Chen, C.-T., Powers, C.M., Liu, H.-L., and Doxsey, S. (2012). The centrosome regulates the Rab11- dependent recycling endosome pathway at appendages of the mother centriole. *Curr. Biol.* *CB 22*, 1944–1950.

Hein, M.Y., Hubner, N.C., Poser, I., Cox, J., Nagaraj, N., Toyoda, Y., Gak, I.A., Weisswange, I., Mansfeld, J., Buchholz, F., et al. (2015). A human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances. *Cell* *163*, 712–723.

Huang, L., Szymanska, K., Jensen, V.L., Janecke, A.R., Innes, A.M., Davis, E.E., Frosk, P., Li, C., Willer, J.R., Chodirker, B.N., et al. (2011). TMEM237 is mutated in individuals with a Joubert syndrome related disorder and expands the role of the TMEM family at the ciliary transition zone. *Am. J. Hum. Genet.* *89*, 713–730.

Iftode, F., and Fleury-Aubusson, A. (2003). Structural inheritance in *Paramecium*: ultrastructural evidence for basal body and associated rootlets polarity transmission through binary fission. *Biol. Cell* *Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* *95*, 39–51.

Iftode, F., Cohen, J., Ruiz, F., Rueda, A.T., Chen-Shan, L., Adoutte, A., and Beisson, J. (1989). Development of surface pattern during division in *Paramecium*. I. Mapping of duplication and reorganization of cortical cytoskeletal structures in the wild type. *Development* *105*, 191–211.

Iftode, F., addoute, A., and Fleury Anne (1996). The surface pattern of *paramecium tetraurelia* in interphase: an electron microscopic study of basal body variability, connections with associated ribbons and their epiplasmic environment. *Eur. J. Protistol.*

Inoko, A., Matsuyama, M., Goto, H., Ohmuro-Matsuyama, Y., Hayashi, Y., Enomoto, M., Ibi, M., Urano, T., Yonemura, S., Kiyono, T., et al. (2012). Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. *J. Cell Biol.* *197*, 391–405.

Irigoín, F., and Badano, J.L. (2011). Keeping the balance between proliferation and differentiation: the primary cilium. *Curr. Genomics* *12*, 285–297.

Ishikawa, H., Kubo, A., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2005). Odf2-deficient mother centrioles lack distal/subdistal appendages and the ability to generate primary cilia. *Nat. Cell Biol.* *7*, 517–524.

Jakobsen, L., Vanselow, K., Skogs, M., Toyoda, Y., Lundberg, E., Poser, I., Falkenby, L.G., Bennetzen, M., Westendorf, J., Nigg, E.A., et al. (2011). Novel asymmetrically localizing components of human centrosomes identified by complementary proteomics methods. *EMBO J.* *30*, 1520–1535.

Janke, C., and Chloë Bulinski, J. (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 773–786.

Jerka-Dziodosz, M., Jenkins, L.M., Nelsen, E.M., Williams, N.E., Jaeckel-Williams, R., and Frankel, J. (1995). Cellular Polarity in Ciliates: Persistence of Global Polarity in a disorganized Mutant of *Tetrahymena thermophila* That Disrupts Cytoskeletal Organization. *Dev. Biol.* *169*, 644–661.

Jerka-Dziodosz, M., Gogendeau, D., Klotz, C., Cohen, J., Beisson, J., and Koll, F. (2010). Basal body duplication in *Paramecium*: the key role of Bld10 in assembly and stability of the cartwheel. *Cytoskelet.* *Hoboken NJ* *67*, 161–171.

- Jerka-Dziadosz, M., Koll, F., Włoga, D., Gogendeau, D., Garreau de Loubresse, N., Ruiz, F., Fabczak, S., and Beisson, J. (2013). A Centrin3-dependent, transient, appendage of the mother basal body guides the positioning of the daughter basal body in *Paramecium*. *Protist* *164*, 352–368.
- Jerman, S., Ward, H.H., Lee, R., Lopes, C.A.M., Fry, A.M., MacDougall, M., and Wandinger-Ness, A. (2014). OFD1 and Flotillins Are Integral Components of a Ciliary Signaling Protein Complex Organized by Polycystins in Renal Epithelia and Odontoblasts. *PLoS ONE* *9*, e106330.
- Jiang, K., Toedt, G., Montenegro Gouveia, S., Davey, N.E., Hua, S., van der Vaart, B., Grigoriev, I., Larsen, J., Pedersen, L.B., Bezstarosti, K., et al. (2012). A Proteome-wide screen for mammalian SxIP motif-containing microtubule plus-end tracking proteins. *Curr. Biol. CB* *22*, 1800–1807.
- 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., et al. (2013). CCDC41 is required for ciliary vesicle docking to the mother centriole. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 5987–5992.
- Kasahara, K., Miyoshi, K., Murakami, S., Miyazaki, I., and Asanuma, M. (2014). Visualization of astrocytic primary cilia in the mouse brain by immunofluorescent analysis using the cilia marker Arl13b. *Acta Med. Okayama* *68*, 317–322.
- Khan, S. a., Muhammad, N., Khan, M. a., Kamal, A., Rehman, Z. u., and Khan, S. (2016). Genetics of human Bardet–Biedl syndrome, an updates. *Clin. Genet.* *90*, 3–15.
- Kitagawa, D., Vakonakis, I., Olieric, N., Hilbert, M., Keller, D., Olieric, V., Bortfeld, M., Erat, M.C., Flückiger, I., Gönczy, P., et al. (2011). Structural basis of the 9-fold symmetry of centrioles. *Cell* *144*, 364–375.
- Klos Dehring, D.A., Vladar, E.K., Werner, M.E., Mitchell, J.W., Hwang, P., and Mitchell, B.J. (2013). Deuterosome-mediated centriole biogenesis. *Dev. Cell* *27*, 103–112.
- Kobayashi, T., Tsang, W.Y., Li, J., Lane, W., and Dynlacht, B.D. (2011). Centriolar kinesin Kif24 interacts with CP110 to remodel microtubules and regulate ciliogenesis. *Cell* *145*, 914–925.
- 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.
- Kodani, A., Salomé Sirerol-Piquer, M., Seol, A., Garcia-Verdugo, J.M., and Reiter, J.F. (2013). Kif3a interacts with Dynactin subunit p150 Glued to organize centriole subdistal appendages. *EMBO J.* *32*, 597–607.
- Kohlmaier, G., Loncarek, J., Meng, X., McEwen, B.F., Mogensen, M.M., Spektor, A., Dynlacht, B.D., Khodjakov, A., and Gönczy, P. (2009). Overly long centrioles and defective cell division upon excess of the SAS-4-related protein CPAP. *Curr. Biol. CB* *19*, 1012–1018.
- Kozminski, K.G., Beech, P.L., and Rosenbaum, J.L. (1995). The *Chlamydomonas* kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane. *J. Cell Biol.* *131*, 1517–1527.
- Kroes, H.Y., Monroe, G.R., van der Zwaag, B., Duran, K.J., de Kovel, C.G., van Roosmalen, M.J., Harakalova, M., Nijman, I.J., Kloosterman, W.P., Giles, R.H., et al. (2016). Joubert syndrome: genotyping a Northern European patient cohort. *Eur. J. Hum. Genet.* *24*, 214–220.

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.

Kunimoto, K., Yamazaki, Y., Nishida, T., Shinohara, K., Ishikawa, H., Hasegawa, T., Okanoue, T., Hamada, H., Noda, T., Tamura, A., et al. (2012). Coordinated Ciliary Beating Requires Odf2-Mediated Polarization of Basal Bodies via Basal Feet. *Cell* *148*, 189–200.

Lambacher, N.J., Bruel, A.-L., van Dam, T.J.P., Szymańska, K., Slaats, G.G., Kuhns, S., McManus, G.J., Kennedy, J.E., Gaff, K., Wu, K.M., et al. (2016). TMEM107 recruits ciliopathy proteins to subdomains of the ciliary transition zone and causes Joubert syndrome. *Nat. Cell Biol.* *18*, 122–131.

Lechtreck, K.F. (2015). IFT–Cargo Interactions and Protein Transport in Cilia. *Trends Biochem. Sci.* *40*, 765–778.

Lechtreck, K.-F., and Grunow, A. (1999). Evidence for a Direct Role of Nascent Basal Bodies During Spindle Pole Initiation in the Green Alga *Spermatozopsis similis*. *Protist* *150*, 163–181.

Lechtreck, K.F., and Melkonian, M. (1998). SF-assemblin, striated fibers, and segmented coiled coil proteins. *Cell Motil. Cytoskeleton* *41*, 289–296.

Lee, J.Y., and Stearns, T. (2013). FOP is a centriolar satellite protein involved in ciliogenesis. *PLoS One* *8*, e58589.

Lee, Y.L., Santé, J., Comerci, C.J., Cyge, B., Menezes, L.F., Li, F.-Q., Germino, G.G., Moerner, W.E., Takemaru, K.-I., and Stearns, T. (2014). Cby1 promotes Ahi1 recruitment to a ring-shaped domain at the centriole–cilium interface and facilitates proper cilium formation and function. *Mol. Biol. Cell* *25*, 2919–2933.

Leidel, S., Delattre, M., Cerutti, L., Baumer, K., and Gönczy, P. (2005). SAS-6 defines a protein family required for centrosome duplication in *C. elegans* and in human cells. *Nat. Cell Biol.* *7*, 115–125.

Lepère, G., Bétermier, M., Meyer, E., and Duharcourt, S. (2008). Maternal noncoding transcripts antagonize the targeting of DNA elimination by scanRNAs in *Paramecium tetraurelia*. *Genes Dev.* *22*, 1501–1512.

Li, C., Jensen, V.L., Park, K., Kennedy, J., Garcia-Gonzalo, F.R., Romani, M., Mori, R.D., Bruel, A.-L., Gaillard, D., Doray, B., et al. (2016). MKS5 and CEP290 Dependent Assembly Pathway of the Ciliary Transition Zone. *PLoS Biol* *14*, e1002416.

Liem, K.F., Ashe, A., He, M., Satir, P., Moran, J., Beier, D., Wicking, C., and Anderson, K.V. (2012). The IFT-A complex regulates Shh signaling through cilia structure and membrane protein trafficking. *J. Cell Biol.* *197*, 789–800.

Liew, G.M., Ye, F., Nager, A.R., Murphy, J.P., Lee, J.S., Aguiar, M., Breslow, D.K., Gygi, S.P., and Nachury, M.V. (2014). The intraflagellar transport protein IFT27 promotes BBSome exit from cilia through the GTPase ARL6/BBS3. *Dev. Cell* *31*, 265–278.

Lorenzo, I.M., Liedtke, W., Sanderson, M.J., and Valverde, M.A. (2008). TRPV4 channel participates in receptor-operated calcium entry and ciliary beat frequency regulation in mouse airway epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 12611–12616.

- Lu, Q., Insinna, C., Ott, C., Stauffer, J., Pintado, P.A., Rahajeng, J., Baxa, U., Walia, V., Cuenca, A., Hwang, Y.-S., et al. (2015). Early steps in primary cilium assembly require EHD1- and EHD3-dependent ciliary vesicle formation. *Nat. Cell Biol.* *17*, 228–240.
- Lucas, J.S., Burgess, A., Mitchison, H.M., Moya, E., Williamson, M., Hogg, C., on behalf of the National PCD Service, U.K., Lucasy, J.S., Walker, W.T., Burgess, A., et al. (2014). Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Arch. Dis. Child. archdischild-2013-304831*.
- Lynn, D.H. (1981). The Organization and Evolution of Microtubular Organelles in Ciliated Protozoa. *Biol. Rev.* *56*, 243–292.
- Machemer, H., and Ogura, A. (1979). Ionic conductances of membranes in ciliated and deciliated *Paramecium*. *J. Physiol.* *296*, 49–60.
- Malone, C.J., Misner, L., Le Bot, N., Tsai, M.-C., Campbell, J.M., Ahringer, J., and White, J.G. (2003). The *C. elegans* hook protein, ZYG-12, mediates the essential attachment between the centrosome and nucleus. *Cell* *115*, 825–836.
- Marshall, W.F., Vucica, Y., and Rosenbaum, J.L. (2001). Kinetics and regulation of de novo centriole assembly: Implications for the mechanism of centriole duplication. *Curr. Biol.* *11*, 308–317.
- McGrath, C.L., Gout, J.-F., Doak, T.G., Yanagi, A., and Lynch, M. (2014). Insights into three whole-genome duplications gleaned from the *Paramecium caudatum* genome sequence. *Genetics* *197*, 1417–1428.
- Middendorp, S., Küntziger, T., Abraham, Y., Holmes, S., Bordes, N., Paintrand, M., Paoletti, A., and Bornens, M. (2000). A Role for Centrin 3 in Centrosome Reproduction. *J. Cell Biol.* *148*, 405–416.
- Mitchell, B., Jacobs, R., Li, J., Chien, S., and Kintner, C. (2007). A positive feedback mechanism governs the polarity and motion of motile cilia. *Nature* *447*, 97–101.
- Mogensen, M.M., Malik, A., Piel, M., Bouckson-Castaing, V., and Bornens, M. (2000). Microtubule minus-end anchorage at centrosomal and non-centrosomal sites: the role of ninein. *J. Cell Sci.* *113* ( Pt 17), 3013–3023.
- Mohan, S., Timbers, T.A., Kennedy, J., Blacque, O.E., and Leroux, M.R. (2013). Striated rootlet and nonfilamentous forms of rootletin maintain ciliary function. *Curr. Biol. CB* *23*, 2016–2022.
- Myklebust, R., and Kryvi, H. (1983). Myofibril development in the myocardial cells of the shark *Scyliorhinus canicula*. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* *76*, 465–469.
- Nachury, M.V. (2014). How do cilia organize signalling cascades? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *369*.
- Nachury, M.V., Loktev, A.V., Zhang, Q., Westlake, C.J., Peränen, J., Merdes, A., Slusarski, D.C., Scheller, R.H., Bazan, J.F., Sheffield, V.C., et al. (2007). A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell* *129*, 1201–1213.
- Nahon, P., Coffe, G., Guyader, H., Darmanaden-Delorme, J., Jeanmaire-Wolf, R., Clerot, J.C., and Adoutte, A. (1993). Identification of the epiplasmins, a new set of cortical proteins of the membrane cytoskeleton in *Paramecium*. *J. Cell Sci.* *104*, 975–990.

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.

Nakazawa, Y., Hiraki, M., Kamiya, R., and Hirono, M. (2007). SAS-6 is a Cartwheel Protein that Establishes the 9-Fold Symmetry of the Centriole. *Curr. Biol.* *17*, 2169–2174.

Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M., and Hirokawa, N. (1998). Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* *95*, 829–837.

Oda, T., Chiba, S., Nagai, T., and Mizuno, K. (2014). Binding to Cep164, but not EB1, is essential for centriolar localization of TTBK2 and its function in ciliogenesis. *Genes Cells* *19*, 927–940.

Odor, D.L., and Blandau, R.J. (1985). Observations on the solitary cilium of rabbit oviductal epithelium: Its motility and ultrastructure. *Am. J. Anat.* *174*, 437–453.

O’Toole, E.T., and Dutcher, S.K. (2014). Site-specific basal body duplication in *Chlamydomonas*. Cytoskeleton. Hoboken NJ *71*, 108–118.

Park, T.J., Mitchell, B.J., Abitua, P.B., Kintner, C., and Wallingford, J.B. (2008). Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nat. Genet.* *40*, 871–879.

Pearson, C.G., and Winey, M. (2009). Basal body assembly in ciliates: the power of numbers. *Traffic Cph. Den.* *10*, 461–471.

Pelletier, L., O’Toole, E., Schwager, A., Hyman, A.A., and Müller-Reichert, T. (2006). Centriole assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *444*, 619–623.

Piasecki, B.P., and Silflow, C.D. (2009). The UNI1 and UNI2 Genes Function in the Transition of Triplet to Doublet Microtubules between the Centriole and Cilium in *Chlamydomonas*. *Mol. Biol. Cell* *20*, 368–378.

Popovici, C., Zhang, B., Grégoire, M.-J., Jonveaux, P., Lafage-Pochitaloff, M., Birnbaum, D., and Pébusque, M.-J. (1999). The t(6;8)(q27;p11) Translocation in a Stem Cell Myeloproliferative Disorder Fuses a Novel Gene, FOP, to Fibroblast Growth Factor Receptor 1. *Blood* *93*, 1381–1389.

Prosser, S.L., and Morrison, C.G. (2015). Centrin2 regulates CP110 removal in primary cilium formation. *J. Cell Biol.* *208*, 693–701.

Romero, M.R., and Torres, A. (1993). Cortical development associated with conjugation of *Paramecium*. *Development* *117*, 1099–1112.

Romio, L., Fry, A.M., Winyard, P.J.D., Malcolm, S., Woolf, A.S., and Feather, S.A. (2004). OFD1 Is a Centrosomal/Basal Body Protein Expressed during Mesenchymal-Epithelial Transition in Human Nephrogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* *15*, 2556–2568.

Ruiz, F., Beisson, J., Rossier, J., and Dupuis-Williams, P. (1999). Basal body duplication in *Paramecium* requires gamma-tubulin. *Curr. Biol. CB* *9*, 43–46.

- Ruiz, F., Garreau de Loubresse, N., Klotz, C., Beisson, J., and Koll, F. (2005). Centrin deficiency in *Paramecium* affects the geometry of basal-body duplication. *Curr. Biol.* *CB 15*, 2097–2106.
- Salisbury, J.L., Suino, K.M., Busby, R., and Springett, M. (2002). Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr. Biol.* *CB 12*, 1287–1292.
- Salonen, R., Kestilä, M., and Bergmann, C. (2011). Clinical utility gene card for: Meckel syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* *19*.
- Sandoz, D., Chailley, B., Boisvieux-Ulrich, E., Lemullois, M., Laine, M.C., and Bautista-Harris, G. (1988). Organization and functions of cytoskeleton in metazoan ciliated cells. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* *63*, 183–193.
- Sawant, D.B., Majumder, S., Perkins, J.L., Yang, C.-H., Eysers, P.A., and Fisk, H.A. (2015). Centrin 3 is an inhibitor of centrosomal Mps1 and antagonizes centrin 2 function. *Mol. Biol. Cell* *26*, 3741–3753.
- Scheidecker, S., Etard, C., Pierce, N.W., Geoffroy, V., Schaefer, E., Muller, J., Chennen, K., Flori, E., Pelletier, V., Poch, O., et al. (2014). Exome sequencing of Bardet-Biedl syndrome patient identifies a null mutation in the BBSome subunit BBIP1 (BBS18). *J. Med. Genet.* *51*, 132–136.
- Schmidt, T.I., Kleylein-Sohn, J., Westendorf, J., Le Clech, M., Lavoie, S.B., Stierhof, Y.-D., and Nigg, E.A. (2009). Control of centriole length by CPAP and CP110. *Curr. Biol.* *CB 19*, 1005–1011.
- Schoutedden, C., Serwas, D., Palfy, M., and Dammermann, A. (2015). The ciliary transition zone functions in cell adhesion but is dispensable for axoneme assembly in *C. elegans*. *J. Cell Biol.* *210*, 947–956.
- Schweizer, S., and Hoyer-Fender, S. (2009). Mouse Odf2 localizes to centrosomes and basal bodies in adult tissues and to the photoreceptor primary cilium. *Cell Tissue Res.* *338*, 295–301.
- Sedjaï, F., Acquaviva, C., Chevrier, V., Chauvin, J.-P., Coppin, E., Aouane, A., Coulier, F., Tolun, A., Pierres, M., Birnbaum, D., et al. (2010). Control of ciliogenesis by FOR20, a novel centrosome and pericentriolar satellite protein. *J. Cell Sci.* *123*, 2391–2401.
- Silflow, C.D., LaVoie, M., Tam, L.W., Tousey, S., Sanders, M., Wu, W., Borodovsky, M., and Lefebvre, P.A. (2001). The Vfl1 Protein in *Chlamydomonas* localizes in a rotationally asymmetric pattern at the distal ends of the basal bodies. *J. Cell Biol.* *153*, 63–74.
- 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.
- Simms, R.J., Eley, L., and Sayer, J.A. (2009). Nephronophthisis. *Eur. J. Hum. Genet.* *17*, 406–416.
- Singla, V., Romaguera-Ros, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Reiter, J.F. (2010). Odf1, a human disease gene, regulates the length and distal structure of centrioles. *Dev. Cell* *18*, 410–424.
- Sir, J.-H., Barr, A.R., Nicholas, A.K., Carvalho, O.P., Khurshid, M., Sossick, A., Reichelt, S., D’Santos, C., Woods, C.G., and Gergely, F. (2011). A primary microcephaly protein complex forms a ring around parental centrioles. *Nat. Genet.* *43*, 1147–1153.

Skouri, F., and Cohen, J. (1997). Genetic approach to regulated exocytosis using functional complementation in *Paramecium*: identification of the ND7 gene required for membrane fusion. *Mol. Biol. Cell* 8, 1063–1071.

Snell, and Goodenough (1992). Flagellar adhesion, flagellar-generated signaling, and gamete fusion during mating. In *The Chlamydomonas Sourcebook*, Vol. 3, 2nd edn (ed. Witman, G. B.), pp. 369-394. New York: Elsevier. (Academic Press).

Sorokin, S. (1962). Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 15, 363–377.

Sorokin, S.P. (1968). Reconstructions of Centriole Formation and Ciliogenesis in Mammalian Lungs. *J. Cell Sci.* 3, 207–230.

Spektor, A., Tsang, W.Y., Khoo, D., and Dynlacht, B.D. (2007). Cep97 and CP110 suppress a cilia assembly program. *Cell* 130, 678–690.

Sperling, L., Keryer, G., Ruiz, F., and Beisson, J. (1991). Cortical morphogenesis in *Paramecium*: A transcellular wave of protein phosphorylation involved in ciliary rootlet disassembly. *Dev. Biol.* 148, 205–218.

Steere, N., Chae, V., Burke, M., Li, F.-Q., Takemaru, K.-I., and Kuriyama, R. (2012). A Wnt/beta-Catenin Pathway Antagonist Chibby Binds Cenexin at the Distal End of Mother Centrioles and Functions in Primary Cilia Formation. *PLOS ONE* 7, e41077.

Tammanna, T.V.S., Tammanna, D., Diener, D.R., and Rosenbaum, J. (2013). Centrosomal protein CEP104 (*Chlamydomonas* FAP256) moves to the ciliary tip during ciliary assembly. *J Cell Sci* 126, 5018–5029.

Tang, Z., Lin, M.G., Stowe, T.R., Chen, S., Zhu, M., Stearns, T., Franco, B., and Zhong, Q. (2013). Autophagy promotes primary ciliogenesis by removing OFD1 from centriolar satellites. *Nature* 502, 254–257.

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.

Tateishi, K., Yamazaki, Y., Nishida, T., Watanabe, S., Kunimoto, K., Ishikawa, H., and Tsukita, S. (2013). Two appendages homologous between basal bodies and centrioles are formed using distinct Odf2 domains. *J. Cell Biol.* 203, 417–425.

Teilmann, S.C., and Christensen, S.T. (2005). Localization of the angiopoietin receptors Tie-1 and Tie-2 on the primary cilia in the female reproductive organs. *Cell Biol. Int.* 29, 340–346.

Thauvin-Robinet, C., Thomas, S., Sinico, M., Aral, B., Burglen, L., Gigot, N., Dollfus, H., Rossignol, S., Raynaud, M., Philippe, C., et al. (2013). OFD1 mutations in males: phenotypic spectrum and ciliary basal body docking impairment. *Clin. Genet.* 84, 86–90.

Thauvin-Robinet, C., Lee, J.S., Lopez, E., Herranz-Pérez, V., Shida, T., Franco, B., Jegou, L., Ye, F., Pasquier, L., Loget, P., et al. (2014). The oral-facial-digital syndrome gene C2CD3 encodes a positive regulator of centriole elongation. *Nat. Genet.* 46, 905–911.

Timmons, L., and Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395, 854.

- Tissir, F., Qu, Y., Montcouquiol, M., Zhou, L., Komatsu, K., Shi, D., Fujimori, T., Labeau, J., Tyteca, D., Courtoy, P., et al. (2010). Lack of cadherins *Celsr2* and *Celsr3* impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nat. Neurosci.* *13*, 700–707.
- Tsang, W.Y., Bossard, C., Khanna, H., Peränen, J., Swaroop, A., Malhotra, V., and Dynlacht, B.D. (2008). CP110 suppresses primary cilia formation through its interaction with CEP290, a protein deficient in human ciliary disease. *Dev. Cell* *15*, 187–197.
- Turk, E., Wills, A.A., Kwon, T., Sedzinski, J., Wallingford, J.B., and Stearns, T. (2015). Zeta-Tubulin Is a Member of a Conserved Tubulin Module and Is a Component of the Centriolar Basal Foot in Multiciliated Cells. *Curr. Biol.* *25*, 2177–2183.
- Veleri, S., Manjunath, S.H., Fariss, R.N., May-Simera, H., Brooks, M., Foskett, T.A., Gao, C., Longo, T.A., Liu, P., Nagashima, K., et al. (2014). Ciliopathy-associated gene *Cc2d2a* promotes assembly of subdistal appendages on the mother centriole during cilia biogenesis. *Nat. Commun.* *5*, 4207.
- Voronina, V.A., Takemaru, K.-I., Treuting, P., Love, D., Grubb, B.R., Hajjar, A.M., Adams, A., Li, F.-Q., and Moon, R.T. (2009). Inactivation of Chibby affects function of motile airway cilia. *J. Cell Biol.* *185*, 225–233.
- Wang, C., Low, W.-C., Liu, A., and Wang, B. (2013). Centrosomal protein DZIP1 regulates Hedgehog signaling by promoting cytoplasmic retention of transcription factor GLI3 and affecting ciliogenesis. *J. Biol. Chem.* *288*, 29518–29529.
- Wang, J., Chen, X., Wang, F., Zhang, J., Li, P., Li, Z., Xu, J., Gao, F., Jin, C., Tian, H., et al. (2016). OFD1, as a Ciliary Protein, Exhibits Neuroprotective Function in Photoreceptor Degeneration Models. *PLoS One* *11*, e0155860.
- Wehland, J., and Weber, K. (1987). Turnover of the carboxy-terminal tyrosine of alpha-tubulin and means of reaching elevated levels of detyrosination in living cells. *J. Cell Sci.* *88 ( Pt 2)*, 185–203.
- Wei, Q., Xu, Q., Zhang, Y., Li, Y., Zhang, Q., Hu, Z., Harris, P.C., Torres, V.E., Ling, K., and Hu, J. (2013). Transition fibre protein FBF1 is required for the ciliary entry of assembled intraflagellar transport complexes. *Nat. Commun.* *4*, 2750.
- Wei, Q., Ling, K., and Hu, J. (2015). The essential roles of transition fibers in the context of cilia. *Curr. Opin. Cell Biol.* *35*, 98–105.
- Werner, M.E., Hwang, P., Huisman, F., Taborek, P., Yu, C.C., and Mitchell, B.J. (2011). Actin and microtubules drive differential aspects of planar cell polarity in multiciliated cells. *J. Cell Biol.* *195*, 19–26.
- Williams, C.L., Li, C., Kida, K., Inglis, P.N., Mohan, S., Semenc, L., Bialas, N.J., Stupay, R.M., Chen, N., Blacque, O.E., et al. (2011). MKS and NPHP modules cooperate to establish basal body/transition zone membrane associations and ciliary gate function during ciliogenesis. *J. Cell Biol.* *192*, 1023–1041.
- Wright, R.L., Chojnacki, B., and Jarvik, J.W. (1983). Abnormal basal-body number, location, and orientation in a striated fiber-defective mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* *96*, 1697–1707.

- Yadav, S.P., Sharma, N.K., Liu, C., Dong, L., Li, T., and Swaroop, A. (2016). Centrosomal protein CP110 controls maturation of the mother centriole during cilia biogenesis. *Dev. Camb. Engl.* *143*, 1491–1501.
- Yan, X., Habedanck, R., and Nigg, E.A. (2006). A complex of two centrosomal proteins, CAP350 and FOP, cooperates with EB1 in microtubule anchoring. *Mol. Biol. Cell* *17*, 634–644.
- Yang, J., Liu, X., Yue, G., Adamian, M., Bulgakov, O., and Li, T. (2002). Rootletin, a novel coiled-coil protein, is a structural component of the ciliary rootlet. *J. Cell Biol.* *159*, 431–440.
- Yang, J., Gao, J., Adamian, M., Wen, X.-H., Pawlyk, B., Zhang, L., Sanderson, M.J., Zuo, J., Makino, C.L., and Li, T. (2005). The ciliary rootlet maintains long-term stability of sensory cilia. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 4129–4137.
- Yang, J., Adamian, M., and Li, T. (2006). Rootletin interacts with C-Nap1 and may function as a physical linker between the pair of centrioles/basal bodies in cells. *Mol. Biol. Cell* *17*, 1033–1040.
- Yasunaga, T., Hoff, S., Schell, C., Helmstädter, M., Kretz, O., Kuechlin, S., Yakulov, T.A., Engel, C., Müller, B., Bensch, R., et al. (2015). The polarity protein Inturned links NPHP4 to Daam1 to control the subapical actin network in multiciliated cells. *J. Cell Biol.* *211*, 963–973.
- Ye, X., Zeng, H., Ning, G., Reiter, J.F., and Liu, A. (2014). C2cd3 is critical for centriolar distal appendage assembly and ciliary vesicle docking in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 2164–2169.
- Yee, L.E., Garcia-Gonzalo, F.R., Bowie, R.V., Li, C., Kennedy, J.K., Ashrafi, K., Blacque, O.E., Leroux, M.R., and Reiter, J.F. (2015). Conserved Genetic Interactions between Ciliopathy Complexes Cooperatively Support Ciliogenesis and Ciliary Signaling. *PLoS Genet.* *11*, e1005627.
- Ying, G., Avasthi, P., Irwin, M., Gerstner, C.D., Frederick, J.M., Lucero, M.T., and Baehr, W. (2014). Centrin 2 is required for mouse olfactory ciliary trafficking and development of ependymal cilia planar polarity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 6377–6388.
- Zhao, H., Zhu, L., Zhu, Y., Cao, J., Li, S., Huang, Q., Xu, T., Huang, X., Yan, X., and Zhu, X. (2013). The Cep63 paralogue Deup1 enables massive de novo centriole biogenesis for vertebrate multiciliogenesis. *Nat. Cell Biol.* *15*, 1434–1444.





## Étude de VFL3 et d'OFD1 dans le mécanisme d'ancrage des corps basaux chez la paramécie

### corps basal, ancrage, OFD1, VFL3, asymétrie rotationnelle, paramécie

Les cils sont des organites conservés au cours de l'évolution émanant de corps basaux et qui, motiles ou non, jouent des rôles essentiels dans de nombreux processus physiologiques. Leur formation est conditionnée par le positionnement et l'ancrage correct des corps basaux à la surface cellulaire. Chez la paramécie, trois protéines conservées, FOR20, Centrine 2 et Centrine 3 recrutées séquentiellement jouent un rôle dans ce processus d'ancrage. J'ai réalisé l'analyse fonctionnelle de deux autres protéines évolutivement conservées OFD1 et VFL3 susceptibles d'être impliquées dans cet ancrage. L'analyse d'OFD1 a été également dictée par le fait que sa fonction dans l'assemblage des cils motiles demeurait peu étudiée.

Dans l'espèce *Paramecium tetraurelia*, qui a subi au moins trois duplications globales de son génome au cours de l'évolution, un seul gène code la protéine OFD1 tandis que deux familles VFL3-A et VFL3-B coexistent. La déplétion des protéines de la famille VFL3-B n'ayant pas produit d'effet je n'ai pas pu leur attribuer une fonction mais une de ses isoformes se localise au niveau des corps basaux.

Bien qu'OFD1 et les protéines VFL3-A soient impliquées dans le positionnement et l'ancrage des corps basaux, les mécanismes dans lesquels elles interviennent sont différents. Pour OFD1 les défauts d'ancrage étaient associés à des anomalies de formation de la partie distale des corps basaux, ce qui est en accord avec la fonction connue de cette protéine dans l'assemblage des appendices distaux des corps basaux des cils primaires. Elle se localise au niveau de la zone de transition entre les doublets de microtubules et la membrane ciliaire. Les recrutements d'OFD1 et FOR20 au sein des corps basaux sont interdépendants alors qu'il n'y a pas de relation entre le recrutement d'OFD1 et celui de la Centrine 2. Ces observations démontrent une conservation fonctionnelle de la protéine OFD1 dans les mécanismes d'ancrage des cils motiles et précisent ses relations avec FOR20 et Centrine 2.

Outre les défauts d'ancrage, la déplétion des deux isoformes VFL3-A induit une distribution anarchique des racines striées qui constituent des marqueurs de leur asymétrie rotationnelle. Ceci suggère que ces protéines sont impliquées dans l'établissement de cette asymétrie. Cette asymétrie étant indispensable au positionnement correct des différents appendices qui guident le mouvement des corps basaux néoformés vers la surface cellulaire, son altération pourrait expliquer les défauts d'ancrage observés. Une isoforme de VFL3-A se localise transitoirement à l'extrémité proximale des corps basaux pères à un stade précoce de leur duplication entre la racine striée et les microtubules auxquels elles sont associées. Cette protéine pourrait donc constituer un facteur extrinsèque contrôlant l'asymétrie du corps basal.

L'ensemble de ces résultats souligne la complexité du mécanisme d'ancrage des corps basaux chez cet organisme qui est conditionné non seulement par un assemblage correct de leur extrémité distale mais également par celui de leurs structures associées en partie proximale.

## Roles of VFL3 and OFD1 in basal body anchoring process in *Paramecium*

### basal body, anchoring, OFD1, VFL3, rotational asymmetry, *paramecium*

Cilia are evolutionary conserved organelles developing from basal bodies and which play essential roles in many physiological processes. Their development depends upon a correct anchoring of basal bodies at the cell surface. In *Paramecium*, three conserved proteins, FOR20, Centrin 2 and Centrin 3, sequentially recruited are required for the anchoring process. I analyzed the function of two others conserved proteins, OFD1 and VFL3, likely involved in the anchoring process. In particular, the role of OFD1 in motile cilia biogenesis had not been really studied yet.

In *P. tetraurelia*, which has undergone at least three global genome duplications, a single gene encodes OFD1, while two families VFL3-A and VFL3-B coexist. Depletion of the VFL3-B proteins produced no effect, but VFL3-3 was localized at the basal bodies.

Although OFD1 and the VFL3-A proteins are both involved in the positioning and anchoring of the basal bodies, they participate in different mechanisms. Concerning OFD1, the anchoring defects reflected defects in basal body distal part assembly, in agreement with its known role in the assembly of the distal appendages of primary cilia. It localizes in the transition zone, between the microtubule doublets and the ciliary membrane. The recruitment of OFD1 and FOR20 to the basal bodies is interdependent, while OFD1 and Centrin2 were not. These observations demonstrate the conserved role of OFD1 in the anchoring mechanisms in motile cilia and clarify its relations with FOR20 and Centrin 2.

In addition to the anchoring defects, depletion of the two VFL3-A isoforms causes an anarchic distribution of the striated rootlets which mark the rotational asymmetry of basal bodies. This suggests that these proteins are involved in the establishment of this asymmetry, required for the correct positioning of the different appendages which guide the neofomed basal bodies towards the cell surface. One isoform of VFL3-A is transiently localizes at the proximal tip of the mother basal body, at an early stage of its assembly, between the striated rootlet and the microtubules to which they are associated. VFL3-1 might then be an extrinsic asymmetry factor for the basal body.

Altogether, these results underscore the complexity of the anchoring process which requires not only the correct assembly of the distal part but also of the proximal appendages in *Paramecium*.

