



Caractérisation fonctionnelle de la protéine ANKS3 impliquée dans les ciliopathies rénales et étude de son rôle dans la régulation des ARNs

Gweltas Odyé

► To cite this version:

Gweltas Odyé. Caractérisation fonctionnelle de la protéine ANKS3 impliquée dans les ciliopathies rénales et étude de son rôle dans la régulation des ARNs. Biologie cellulaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. <NNT : 2018USPCB029>. <tel-02490646>

HAL Id: tel-02490646

<https://theses.hal.science/tel-02490646v1>

Submitted on 25 Feb 2020

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.



HAL Authorization

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité

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

Gweltas ODYE

Pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences

Sujet :

**Caractérisation fonctionnelle de la protéine ANKS3
impliquée dans les ciliopathies rénales et étude de son
rôle dans la régulation des ARNs**

Soutenue le 2 Juillet 2018

Composition du Jury

Dr. Jeanne AMIEL
Dr. Bénédicte DURAND
Dr. Brigitte LELONGT
Dr. Hervé LE HIR
Dr. Philippe BASTIN
Dr. Sophie SAUNIER

Les lois de la science ne distinguent pas le passé du futur.
Stephen Hawking

REMERCIEMENTS

1310 jours, 333 Western Blots, 2610 Heures de microscopie, 102 qPCR, plus de 50 000 cils analysés et un papier plus tard, le temps est venu de refermer ce chapitre.

Evidemment tout ceci n'aurait jamais été possible sans apprendre, sans aide ou sans soutien. Je vais donc ouvrir cette thèse par quelques remerciements.

Je tiens d'abord à remercier Sophie qui m'a donné l'occasion de réaliser mon stage de M2 dans son laboratoire et de poursuivre par ma thèse. Merci +++ d'avoir cru que je pouvais le faire et de m'avoir permis d'avoir ce financement. Merci de m'avoir tant appris sur la science mais aussi sur moi-même. Ca n'aura pas été facile tous les jours mais on retiendra le meilleur

L'un n'allant pas sans l'autre, je tiens aussi à remercier Alex et Cécile. Merci pour toutes ces discussions, scientifiques ou non. Merci également d'avoir su arrondir les angles quand il le fallait.

Ensuite je veux remercier ma famille, même si à l'évidence les mots ne sont pas suffisants pour exprimer ce que je pense. Mes parents, mon frère et ma sœur, ma grand-mère et mon parrain sans qui tout cela ne se serait jamais produit, sans qui aujourd'hui je ne serais ni là où je suis, ni qui je suis. Votre soutien pendant ces 4 voire 5 années a été inébranlable, y compris dans les pires moments, alors MERCI. Et il y'a toi, toi qui partageais ma vie au labo et toujours en dehors. Merci de me supporter (et on sait tous à quel point c'est difficile) dans tous les sens du terme. Merci d'avoir su me pousser et me trainer au labo quand il le fallait mais aussi m'apaiser quand j'en avais besoin. Cette thèse est importante pour moi et je n'aurais jamais réussi à la finir si tu n'avais pas accepté les week-ends au labo, les horaires pas possibles, et autres séances d'écriture/relecture interminables.

En parlant de famille, je veux remercier ma seconde famille, celle avec qui j'ai passé la majorité de mon temps durant cette thèse, je parle de celle du labo. Je tiens à préciser qu'il existe à l'évidence une hiérarchie dans ces remerciements, je vous laisse la trouver. Tout d'abord, Flora, merci de m'avoir formé à mon arrivée, de m'avoir soutenu et fait croire en moi, ce sont des choses dont je me rappellerai à vie. Et il y'a Christelle. Je pourrais en écrire des pages, mais je te remercierai juste pour toutes ces discussions (souvent non scientifique), pour tes e-mails enflammés, et évidemment pour ta bonne humeur « petite tête de linotte ». Je pense à Corinne pour toutes les discussions dominicales à propos d'à peu près tout, c'était un vrai plaisir. Merci à Gégé, tu as été la plus grande cause de mon taux de caféine dans le sang. Merci aussi Olivier, pour les discussions sur le sport, pour avoir solutionné plus d'un problème et finalement pour la dose de testostérone quotidienne, y'en avait bien besoin dans

ce labo. En parlant de testostérone, comment ne pas penser à Maxence ? Mon p'tit pote, on s'est serré les coudes dans les moments difficiles et on a fêté les (nombreux) bons moments. Je crois en toi. Merci à Guillaume et Hugo pour les interludes d'enquêtes policières et les bons moments passés ensemble. Merci à Marion avec qui j'ai partagé ce travail, tu m'as beaucoup appris. Merci à Meriem pour sa bonne humeur et pour les créneaux arrangés en sous mains. Loulou et Lala, vous êtes indissociable ce fut un plaisir de partager tous ces bons moments avec vous et merci pour le soutien incroyable dont vous avez fait preuve pendant la rédaction....et les corrections.... (non on ne parlera pas de semi marathon ici). Merci à Evelynne pour m'avoir fait me sentir normal et merci Camille pour les mois de juin tennistique et pour ton rire communicatif. Laurine, tes mails me manqueront toujours et Gaëlle j'espère avoir l'occasion de t'entendre mixer à nouveau. Albane, tu as un peu été un mentor pour moi, mais aussi une amie (et évidemment la meilleure, la plus sympa, la plus belle et la plus intelligente, mon modèle dans la vie). Merci de m'avoir fait découvrir la culture Albanaise et ta passion pour cet art qu'est la collection de cheveux. Je ne remercierai pas Esther et tu sais pourquoi. Sarach, au début je te voyais comme une brute, aujourd'hui c'est toujours le cas, mais merci quand même. Marie et Daniel je vous mets ensemble, vous savez pourquoi ce fut un plaisir de rencontrer d'aussi grands humoristes. Je pense aussi aux autres équipes, « aux Simons » particulièrement à Julie, Zvoni et Maria et « aux Gourdon » notamment à Elodie, Sandra et évidemment Mario, tu as rendu mes gels BET bien plus drôle. Bien sûr je n'ai pas oublié mes colocataires de bureau, je pense à Rebec et à Frances. J'ai tellement partagé avec vous. Pas facile de me supporter à longueur de journée, pas facile de vous supporter à longueur de journée, je pense que l'on faisait un trio parfait ! Merci aussi à Vale, « Team Nature » comme tu disais. Tu m'as accueilli à bras ouverts (ou à tentacules ouvertes comme tu veux Polpo) quand je suis arrivé et tu es devenue une vraie amie. Alors merci d'avoir cru en moi, de m'avoir fait confiance, de m'avoir soutenu et de m'avoir appris à parler parfaitement italien.

Merci également à Alix et Romain pour tout, des discussions scientifiques aux soirées en passant par les conférences de biologie cellulaire à Curie évidemment.

Enfin j'ai une pensée pour la « bande du fond » aujourd'hui tous docteurs, vous auriez pu m'attendre quand même.

En fin, j'aimerais remercier le jury, Brigitte LELONGT, Bénédicte DURAND, Hervé LE HIR, Philippe BASTIN et Jeanne AMIEL et qui ont accepté d'évaluer mon travail.

RESUME

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ANKS3 impliquée dans les ciliopathies rénales et étude de son rôle dans la régulation des ARNs

La néphronophytose (NPH) est une néphropathie tubulo-interstitielle autosomique récessive, caractérisée par la présence d'une fibrose interstitielle massive et la formation de kystes. Elle est une cause majeure d'insuffisance rénale terminale chez l'enfant ou le jeune adulte. Elle peut être isolée ou associée à des atteintes extrarénales. La NPH appartient au groupe des ciliopathies, un ensemble de maladies multisystémiques causées par des mutations dans des gènes codant des protéines participant à la fonction des cils primaires et motiles. Le cil primaire agit, à la surface de la plupart des cellules, comme un mécano et chimiosenseur contrôlant des voies de signalisation essentielles au développement et à l'homéostasie tissulaire (Sonic hedgehog (Shh), Wnt, polycystines/Calcium, mTOR). La NPH est une maladie génétiquement hétérogène, avec vingt-trois gènes NPHP responsables identifiés à ce jour (dont 14 dans notre laboratoire). La plupart de ces gènes codent des protéines assurant des fonctions ciliaires telles que le contrôle de la composition protéique et de la signalisation ciliaire, à la base du cil (zone de transition (TZ)), au niveau du compartiment Inversine (CI), ou lors du transport intraflagellaire (IFT).

Par analyse d'exome, nous avons identifié une mutation homozygote pathogène dans un nouveau gène, *ANKS3*, responsable d'une NPH associée à une fibrose hépatique. *ANKS3* code une protéine à domaines Ankyrines et SAM, connue pour interagir avec plusieurs protéines NPHP de la TZ (NPHP1), du CI (*ANKS6*, *NEK8*) ainsi qu'avec *BICC1*, une ribonucléoprotéine mutée dans les dysplasies rénales kystiques.

Mon projet de thèse a porté sur la caractérisation de la fonction d'*ANKS3* et de l'impact de la mutation humaine dans les processus cellulaires altérés dans les ciliopathies rénales. Ces études ont été réalisées à partir de différents modèles cellulaires : fibroblastes de patients, cellules tubulaires rénales IMCD3 déplétées pour *Anks3* (*ANKS3_KD*) réexprimant la forme sauvage ou mutée.

Mes travaux ont ainsi montrés que la mutation du gène *ANKS3* diminue son interaction avec les composants de la TZ, NPHP1 et du CI, *NEK8*. Par ailleurs, l'absence ou l'expression de la forme mutée d'*ANKS3* perturbe la taille des cils et la biogenèse du CI, avec une relocalisation anormale des composants du CI tout le long du cil. De plus, des perturbations de la signalisation ciliaire de la voie Shh et de la localisation de la protéine Polycystine-2 au cil ont été observées dans les cellules *ANKS3_KD* ou reexprimant la mutation p.P269L. Des altérations de la motilité ciliaire et de l'élévation calcique ont également été observées dans la vésicule de Kupffer du poisson zèbre muté pour *anks3*

(TALEN), entraînant des défauts de latéralité. Outre ces défauts ciliaires, la perte ou la mutation d'ANKS3 entraîne des anomalies de polarité apico-basale dans les cellules tubulaires rénales IMCD, avec une diminution de la hauteur des cellules et un retard de la formation des jonctions serrées, un phénotype déjà observé dans les modèles mutés pour *NPHP1*.

De façon cohérente, nous avons observé une diminution de la stabilité des transcrits *NPHP1* dans les cellules ANKS3_KD et reexprimant la mutation p.P269L, et démontré que la réexpression de *NPHP1* restaure les défauts de polarité dans ces cellules et les cils plus longs dans les cellules exprimant la mutation p.P269L d'ANKS3 suggérant qu'une dérégulation des transcrits *NPHP1* due à l'absence ou la mutation d'ANKS3 est à l'origine de ces phénotypes. Afin de préciser le mécanisme par lequel ANKS3 régule la stabilité des ARNs de *NPHP1*, et possiblement d'autres ARN ciliaires, nous avons étudié l'implication de son partenaire BICC1, connu pour lier et réguler les ARNs. Des analyses transcriptomiques par RNAseq et RIPseq sur des cellules ANKS3-KD, en présence ou non de BICC1, nous ont permis de démontrer qu'ANKS3, en s'associant à BICC1, prévient la liaison de plusieurs transcrits ciliaires à ce dernier, les empêchant ainsi d'être dégradés par le complexe RISC/AGO2.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme de régulation des transcrits ciliaires par le complexe ANKS3/BICC1, dont les mutations causent des ciliopathies rénales.

ABSTRACT

Functional characterization of the renal ciliopathies involving ANKS3 protein and study of its role in RNA regulation

Nephronophthisis (NPH) is an autosomal recessive tubulo-interstitial nephropathy characterized by massive interstitial fibrosis and cyst formation. NPH is a major cause of end-stage renal disease in childhood and can be isolated or syndromic, that is, associated with extrarenal manifestations. NPH belongs to a group of multisystemic diseases known as ciliopathies, caused by mutations in genes encoding proteins of the primary cilium. The primary cilium acts on the surface of most cells as a sensor of mechanical and chemical stimuli, controlling signaling pathways essential for tissue development and homeostasis such as the Shh, Wnt and PC2 / Ca²⁺ signaling pathway. To date, twenty-three NPH causative genes have been identified (including 14 in our laboratory). These genes code proteins implicated in the control of cilia protein composition, ciliary signaling, some transition zone (TZ) and Inversin compartment (IC) proteins, and others involved in intraflagellar transport.

We have identified a homozygous missense mutation in a new gene responsible for NPH associated with liver fibrosis. ANKS3 encodes a protein known to interact with several NPH proteins such as NPHP1, ANKS6 and NEK8 as well as BICC1, a ribonucleoprotein mutated in renal cystic dysplasia.

My thesis project has focused on characterization of ANKS3 function and on the impact of the patient mutation on the cellular processes known to be relevant for renal ciliopathies. These studies were performed in different cellular models including patient fibroblasts and IMCD3 renal tubular cells depleted for Anks3 (ANKS3_KD) re-expressing either the wild-type or mutated form of the protein.

My work has demonstrated that ANKS3 bearing the patient mutation has decreased its interaction with the TZ component NPHP1 and the IC component, NEK8. In addition, the absence or expression of the mutated form of ANKS3 in ANKS3-KD cells affects cilia length and biogenesis of the IC. Indeed, IC components are found to be abnormally relocated all along the primary cilia. We have also observed disruption of the Shh signaling pathway and PC2 protein ciliary localization observed in the ANKS3_KD or KD_P269L cells. This last observation was confirmed in a zebrafish model with an anks3 mutation introduced by TALEN technology. Anks3 mutant fish exhibit a decrease in ciliary motility associated with calcium signaling defects in the Kupffer vesicle, leading to laterality defects (*situs inversus*). In addition to these ciliary defects, the loss or mutation of ANKS3

causes apico-basal polarity defects in IMCD cells, with a decrease in cell height and delay in tight junction formation, a phenotype reminiscent of NPHP1 mutant models.

Consistent with these results we observed a decrease in the stability of Nphp1 transcripts in ANKS3_KD and KD_P269L cells. The re-expression of NPHP1 in these cells rescues the polarity and cilia length defects, underscoring that a link between ANKS3 depletion and Nphp1 transcript stability is responsible for these phenotypes. To elucidate the mechanism by which ANKS3 regulates Nphp1 RNA stability, and possibly the stability of other ciliary RNAs, we investigated whether BICC1, an ANKS3-interacting protein known to bind and regulate RNA, had a role in this process. Transcriptomic analyzes, notably RNAseq and RIPseq on ANKS3-KD and mutated cells in the presence or absence of BICC1, demonstrate that the absence of ANKS3 or a mutant form triggers BICC1 interaction with the targeted mRNA and the RISC-associated protein AGO2, thus targeting ciliary gene transcripts for degradation.

This finding allows us to place ANKS3/BICC1 complex as a key regulator of ciliopathy-related RNA transcripts that orchestrate the biogenesis and function of primary cilia.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
RESUME	5
ABSTRACT	9
SOMMAIRE	13
TABLE DES ILLUSTRATIONS	19
LISTE DES ABREVIATIONS	23
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	27
I- Les ciliopathies	29
I.1. Aspects cliniques	31
I.1.1. La néphronophtise	31
I.1.1.1. Clinique de la néphronophtise	31
I.1.1.2. Histologie	33
I.1.1.2.1. Néphronophtise infantile	34
I.1.1.2.2. Néphronophtise juvénile	35
I.1.1.2.3. Néphronophtise tardive	35
I.1.2. Les formes syndromiques associées à la NPH	35
I.1.2.1. Syndrome Senior-Løken	36
I.1.2.2. Syndrome de Joubert	36
I.1.2.3. Syndrome de Boichis et Caroli	37
I.1.2.4. Syndromes associés à des défauts squelettiques	37
I.1.2.5. Syndrome Bardet Biedl (BBS)	38
I.1.3. Les autres ciliopathies	38
I.1.3.1. Syndrome de Meckel-Gruber (MKS)	38
I.1.3.2. Autre ciliopathie rénale : la Polykystose rénale (PKD)	39
I.1.3.3. Les ciliopathies émergentes	40
I.2. Génétique de la néphronophtise	42
I.2.1. Hétérogénéité génétique	42
I.2.2. Hétérogénéité phénotypique, une relation phénotype-génotype	43
II- Le cil primaire	49
II.1. Structure du cil	52
II.1.1. Le corps basal	52
II.1.2. L'axonème	54
II.1.2.1. La zone de transition (TZ)	55
II.1.2.2. Le compartiment Inversine	57
II.2. La ciliogenèse	59
II.2.1. L'initiation	59
II.2.2. Le transport intraflagellaire	61
II.2.2.1. Le transport IFT	61
II.2.2.2. Le BBSome	63
II.2.3. La régulation	65
II.2.3.1. Cycle cellulaire et cil	66

II.2.3.2.	Cytosquelette et cil	69
II.2.3.3.	Homéostasie protéique et cil	70
II.2.3.4.	Adaptation ciliaire aux signaux environnementaux.....	72
II.2.3.5.	Les facteurs de transcriptions régulant le cil primaire.....	72
II.3.	Les fonctions du cil	75
II.3.1.	Le cil un organel, « senseur ».....	75
II.3.1.1.	Chimio senseur.....	75
II.3.1.2.	Photo senseur	76
II.3.1.3.	Mécano senseur	77
II.3.2.	Le cil une plateforme de signalisation	80
II.3.2.1.	Signalisation du développement.....	80
II.3.2.1.1.	La voie Hedgehog.....	80
II.3.2.1.2.	La voie Wnt	84
II.3.2.1.3.	La voie Hippo	89
II.3.2.1.3.1.	La voie Hippo dans le développement du rein	89
II.3.2.1.3.2.	La voie Hippo dans les ciliopathies rénales	90
II.3.2.1.3.3.	La voie Hippo au niveau du cil primaire	91
II.3.2.2.	Les autres voies de signalisation	92
II.3.2.2.1.	TGF-B.....	92
II.3.2.2.2.	AMPc.....	95
II.4.	Perspectives et études ciliaires	95
III-	Les Néphrocystines, des protéines multitâches	99
III.1.	Localisation et fonction non ciliaire exclusive.....	99
III.1.1.	Jonctions cellule-cellule	99
III.1.2.	Aux microtubules	100
III.1.3.	Au niveau des mitoses	101
III.1.4.	Au niveau du trafic vésiculaire.....	101
III.1.5.	DDR	102
III.2.	Autres gènes NPH-like à fonction extra ciliaire.....	104
IV-	ANKS3, un nouveau candidat de ciliopathies rénales.....	107
IV.1.	Généralités	107
IV.1.1.	Localisation	108
IV.2.	Modèles <i>in vivo</i> et mutation Humaine	108
IV.3.	Les partenaires connus de ANKS3	109
IV.3.1.	Membres d'un réseau NPH.....	109
IV.3.2.	ANKS3 et les NIMA.....	110
IV.3.2.1.	NEK8.....	110
IV.3.2.2.	NEK7.....	110
IV.3.3.	ANKS6	111
IV.3.4.	BICC1, une RNP impliquée dans la régulation des transcrits ciliaires.....	112
IV.3.4.1.	Modèles <i>in vivo</i> de BICC1 et mutations humaines.....	113
IV.3.4.2.	Fonctions de BICC1	113
IV.3.4.2.1.	Localisation	113
IV.3.4.2.2.	Rôle de BICC1 dans la régulation génique	114

V- Régulation Génique.....	116
V.1. Les régulations post transcriptionnelles	118
V.1.1. Régulation spatiale	118
V.1.1.1. Processing Bodies et Granules de Stress.....	118
V.1.1.1.1. Processing bodies	119
V.1.1.1.2. Granules de stress	120
V.1.2. Mécanismes de dégradation ciblée d'ARNm	124
V.1.2.1. Dégradation via déadenylation.	124
V.1.2.2. Voie des miARNs.	126
V.1.2.2.1. Régulation de la traduction	127
V.1.2.2.2. Dégradation ARN	129
RESULTATS.....	133
Partie 1 : Le rôle de ANKS3 dans la régulation génique médiée par BICC1	135
Partie 2 : Résultats Annexes	175
I- L'implication de la protéine ANKS3 dans la migration cellulaire et le remodelage du cytosquelette d'actine.....	175
II- ANKS3 et Granules de Stress	181
DISCUSSION	183
CONCLUSION.....	201
BIBLIOGRAPHIE	205
ANNEXE	269
RESUME	307

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Anatomie du Rein.....	32
Figure 2: Reins normaux et pathologiques	34
Figure 3: Corrélation phénotype/génotype dans les ciliopathies.....	47
Figure 4: Localisation ciliaire des protéines responsables des ciliopathies	51
Figure 5: Structure du corps basal	54
Figure 6: Biogenèse du cil primaire	61
Figure 7: Structure et fonctionnement du cil primaire.....	65
Figure 8: Régulation de la ciliogenèse par le cycle cellulaire	69
Figure 9: Signalisation de la voie Sonic Hedgehog	83
Figure 10: Signalisation de la voie WNT.....	88
Figure 11: Signalisation de la voie du TGF- β	94
Figure 12: Evolution du nombre de publications en référence au cil primaire.....	98
Figure 13: Localisation extra-ciliaire des protéines impliquées dans les ciliopathies.	106
Figure 14: Structure et interactions d'ANKS3, ANKS6 et BICC1	115
Figure 15: Régulation de l'expression génique.....	117
Figure 16: La désadénylation, une étape pré-requise à la formation des PBs	125
Figure 17: Mécanismes d'action des miARNs et du complexe miRISC	129
Figure 18: Vie des ARNm.....	131
Figure 19: Implication d'ANKS3 dans la migration cellulaire	178
Figure 20: ANKS3 régule l'organisation du cytosquelette d'actine.....	179
Figure 21: ANKS3 régule l'adhésion cellulaire	180
Figure 22: ANKS3 est localisée au stress granules après induction d'un stress thermique....	182
Figure 23: Effet hypomorphe de la mutation p.P269L	193
Tableau 1: Superposition des phénotypes issus de ciliopathies rénales	42
Tableau 2: Gènes responsables de la NPH et de ses formes syndromiques.....	48

LISTE DES ABREVIATIONS

(AD/AR) PKD : (Autosomal Dominant / Autosomal Recessive) Polykystose	GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor
AC : Adénylate Cyclase	GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone
ADN : Acide DésoxyRibonucléique	GPCR : G Protein Coupled Receptor
ADTKD : Autosomal Dominant Tubulo-Interstitial Kidney Disease	GS : Granule de Stress
AGO : Argonaute	GTP : Guanosine TriPhosphate
AMPc : Adénosine MonoPhosphate Cyclique	HAT : Histone Acétyl- Transférase
APEX : Engineered ascorbate peroxidase	HDAC : Histone Désacétyl- Transférase
ARN : Acide RiboNucléique	HH : Hedgehog
ARNm : Acide RiboNucléique messenger	HSP : Heat Shock Protein
ATP : Adénosine TriPhosphate	HTA : Hypertension Artérielle
BBS : Bardet-Biedl Syndrome	IFT : IntraFlagellar transport
CAMKII : Calmodulin-dependent Protein Kinase II	mIMCD (3) : Mouse Inner Medullary Collecting Duct cells (3)
CBC : Cap-Binding Complex	IP3 : Inositol 1,4,5 triPhosphate
CED : CranioEctodermal Dysplasia	IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
cGMP : Guanosine MonoPhosphate Cyclique	IRT : Insuffisance Rénale Terminale
CHD : Congenital Heart Disease	JATD : Jeune Asphyxing Thoracic Dystrophy (Syndrome de Jeune)
CHH : Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism	JBTS : Joubert Syndrome
CI : Compartiment Inversine	JNK : Jun-Nterminal Kinase
CM : Cap Mésenchyme	JSRD : Joubert Syndrome and Relative Disorders
CPLANE : Ciliogenesis and Planar Polarity Effectors	KAP : Kinésine Associated Protein
CRB : Complexe CRUMBS Homologue	KD : Knock Down
DAG : 1,2 diacylglycerol	KO : Knock Out
DAP : Centriole Distal Appendages	KH : K Homology
DDR : DNA Damage Response	KS : Syndrome de Kallman
DSB : Double Strand Break	KV : Kupffer vesicle
DVL/DSH : Dishevelled	LCA : Leber Congenital Amaurosis
EHD : Epsin15 Homology Domain	lncRNA : Long Non Coding RiboNucléic Acid
EJC : Exon Junction Complex	MAF : MusculoAponeurotic Fibrosarcoma
ERG : ElectroRétinoGramme	MCKD : Medulary Cystic Kidney Disease
EVC : syndrome Ellis-Van Creveld	miARN : micro Acide RiboNucléique
FCCP : Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone	MKS : Meckel Syndrome
FGF : Fibroblast Growth Factor	MRN : Mre11-Rad50-Nbs1
FSGS : Focal Segmental Glomerulosclerosis	MSS : Saldino-Mainzer Syndrome
FZ : Frizzled	MTOC : Microtubule-organizing center
GDP : Guanosine DiPhosphate	mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
	NIMA : Never in Mitosis A
	NOTO : Notochord homeobox
	NPC : Nuclear Pore Complex
	NPH : Néphronophtise

NPHP: Protéines de la néphronophtise	Ub: Ubiquitine
PABP: PolyA Binding Protein	UPS: Système Ubiquitine-Protéasome
P-bodies /PB: Processing Bodies	UV: UltraViolet
PC1/2: Polycystin 1/2	VA: Volume réAbsorbé
PCD: Primary Ciliary Dyskinesia	VE: Volume Excrété
PCP: Planar Cell Polarity	VF: Volume Filtré
PIC: Pré-Initiation Complex	VS: Volume Sécrété
PIP2: PhosphoInositol 4,5-biPhosphate	WES: Whole Exome Sequencing
PKA: Protéine Kinase A	YAP: Yes associated protein
PKC: Protéine Kinase C	
PolyA: PolyAdénylée	
RBP: RNA Binding Protein	
RCD: Renal Cystic Disease	
RE: Reticulum Endoplasmique	
RFX: Regulatory Factor X	
RIPseq: Séquençage ARNs liant des protéines immunoprécipitées	
RISC: RNA-Induced Silencing Complex	
RNAi: RNA Interference	
RNAseq: Séquençage ARNs totaux	
RP: Rétinite Pigmentaire	
RPE: Epithélium Pigmentaire Rétinien	
SAGA: Spt-Ada-Gcn5-Acetyltrasnferase	
SAM: Sterile Alpha Motif	
SDAP: Centriole SubDistal Appendages	
SHH: Sonic Hedgehog	
SI: Situs Inversus	
siRNA: small interfering RiboNucleic Acid	
SLS: Senior-Løken Syndrome	
SMO: Smoothened	
SNARE: Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor	
SS /SSB: Syndrome de Sensenbrenner	
TAF: TATA-binding protein Associated Factor	
TAZ: Transcriptional coActivator with PDZ-binding motif	
TBS: Townes-Brocks Syndrome	
TF: Facteur de Transcription	
TGF-β: Transforming Growth Factor	
TGN: Trans-Golgi network	
TZ: Zone de Transition	

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Les ciliopathies

Le terme « ciliopathie » étymologiquement « cil » et « pathos », désignant la maladie, regroupe un ensemble de maladies dues au dysfonctionnement des cils primaires ou motiles. Ces petits organites, issus de la polymérisation de microtubules depuis le centriole père du centrosome, sont impliqués dans la transmission de signaux à la surface de la plupart des cellules différenciées et possèdent également un rôle, pour les cils motiles, de génération de mouvement fluide. Historiquement, c'est en 1976 qu'est reconnue la première ciliopathie, la dyskinésie ciliaire primitive (PCD) (Afzelius, 1976). Afzelius et al découvre alors l'existence des bras de dynéine des cils motiles et leur implication dans le mouvement ciliaire. Il a mis en évidence leur absence dans les flagelles des spermatozoïdes de quatre hommes infertiles, rendant le mouvement flagellaire impossible. Cette absence de mouvement flagellaire des spermatozoïdes compte alors parmi les symptômes d'un syndrome plus général, mis en évidence 40 ans plus tôt par Manes Kartagener qui lui donnera son nom. Le syndrome de Kartagener se présente comme une bronchiectasie associée à un *situs inversus* et des sinusites chroniques (Gupta et al., 2013). Ainsi, le premier lien entre cil et pathologie, alors nommé « syndrome des cils immotiles », a été établi. Ce n'est que plus tard que la cause du *situs inversus* de ce même syndrome fut mise en exergue avec la découverte du rôle des cils du nœud embryonnaire. En effet, la mutation d'une sous-unité de la kinésine 2 (gène *Kif3b*) conduit à un défaut de latéralisation des organes chez la souris. Alors connue pour son implication au niveau du cil motile, la kinésine a permis la découverte du rôle des cils du nœud embryonnaire dans la génération du flux nécessaire à la latéralisation des organes lors du développement (Nonaka et al., 1998). Un an plus tard, ces travaux ont conduit à la découverte de la première mutation humaine induisant une PCD dans le gène *DNAI1* (Pennarun et al., 1999). C'est au cours de cette même année que le premier lien entre ciliopathie et rein est établi, faisant état de la localisation du produit du gène *lov-1*, orthologue du gène *PKD1* humain codant la polycystine-1 (PC1), au niveau du cil primaire de neurones sensoriels de *C.elegans* (Barr and Sternberg, 1999). Maureen Barr suggère que le gène *PKD1*, alors reconnu pour son implication dans les polykystoses rénales, aurait un rôle ciliaire dans le développement de la polykystose autosomique dominante (ADPKD) du fait de l'importance de PC1 dans les fonctions du cil des neurones sensoriels. En 2000, la découverte de défauts de cils primaires au niveau de cellules tubulaires rénales des souris mutées pour le gène *Tg737*, et exhibant une polykystose rénale, va permettre une avancée capitale dans la compréhension du rôle du cil primaire dans les pathologies rénales. *Tg737*, homologue murin du gène humain *IFT88*, code une protéine du transport intraflagellaire

(IFT) et est indispensable à la ciliogenèse (cf Le transport intraflagellaire). L'étude d'une mutation faux-sens de *Tg737* chez la souris montre une réduction de la ciliogénèse, tant par le nombre de cils que par leur taille, entraînant une létalité précoce due à des reins kystiques (Pazour et al., 2000), tandis que la déplétion totale du même gène dans le modèle murin *Tg737Δ2-3βGal* conduit à un phénotype bien plus sévère avec *situs inversus* (SI), défauts de développement du tube neural et une létalité embryonnaire (Murcia et al., 2000). En effet, la déplétion de *Tg737* conduit à un phénotype comparable au phénotype causé par les mutations de *Kif3b* (létalité embryonnaire, sévères défauts développementaux et de définition de la latéralité), confirmant ainsi le *situs inversus* (SI) comme un phénotype ciliaire (Murcia et al., 2000; Nonaka et al., 1998) (cf Hétérogénéité phénotypique, une relation phénotype-génotype). Le diagnostic clinique facilitant le diagnostic génétique et inversement, le SI, en tant que signe clinique de ciliopathies, sera la base de la découverte de nombreux gènes ciliaires. D'autres part, l'étude des phénotypes associés au SI a permis l'élargissement du spectre des phénotypes rénaux, allant des reins polykystiques avec la découverte du gène *BBS8* impliqué dans le syndrome de Bardet Biedel (BBS) (Ansley et al., 2003), à la NPH infantile avec la découverte de mutations dans le gène *INVS* codant l'inversine (Simons et al., 2005), alors déjà connu chez la souris (Mochizuki et al., 1998). C'est à partir de la découverte de mutations dans le gène *INVS* alias *NPHP2*, et de la localisation de l'inversine au cil primaire des cellules tubulaires rénales, ainsi que de son interaction avec d'autres protéines déjà impliquées dans la NPH (*NPHP1*, *NPHP3* et *NPHP4*), que la NPH se révèle être une ciliopathie (Morgan et al., 2002; Otto et al., 2003). Dès lors, un nombre croissant de pathologies, notamment rénales, neurologiques ou encore développementales, déjà mises en évidence ou nouvellement caractérisées, vont venir allonger la liste des ciliopathies grâce à l'identification des gènes causaux, démontrant soit la localisation au cil primaire du produit des gènes mutés soit leur implication dans la fonction ciliaire.

Finalement, les ciliopathies regroupent un ensemble de syndromes aux atteintes multisystémiques touchant notamment la rétine, le vermis cérébelleux, le squelette, mais aussi le foie, retrouvé dans plus de 30% des cas comportant une atteinte rénale. Il est toutefois intéressant de noter que, malgré une faible prévalence de chacun de ces syndromes, regroupés sous le terme de "ciliopathies", leur cumul en fait des affections plus fréquentes puisqu'elles représentent 1 naissance sur 2000.

I.1. Aspects cliniques

I.1.1. La néphronophtise

En 1945, Graham et Smith décrivent pour la première fois, sous le nom de maladie kystique de la médullaire rénale (MCKD), un ensemble de maladies génétiques reliées par des caractéristiques similaires, notamment la présence de fibrose rénale interstitielle et la présence de kystes dans la médullaire dont l'évolution se fait inéluctablement vers l'insuffisance rénale terminale (IRT). La MCKD a depuis été renommée ADTKD (maladie rénale tubulo-interstitielle autosomique dominante) afin de mettre plus en avant les caractéristiques de la maladie. En 1951, Fanconi distingue la néphronophtise (NPH) de la ADTKD selon 3 critères : le mode de transmission (récessif dans le cas de la NPH et dominant pour la ADTKD), le type d'organes extra-rénaux impliqués (dégénérescence rétinienne chez la NPH; hyperuricémie chez l'ADTKD), et enfin l'âge d'apparition de l'insuffisance terminale (durant l'enfance pour la NPH versus à l'âge adulte pour la ADTKD). Cette dernière caractéristique permet alors de distinguer trois différentes formes de NPH : la NPH infantile, la NPH juvénile et la NPH tardive. La NPH est reconnue comme une des causes génétiques les plus courantes d'insuffisance rénale terminale (IRT) chez l'enfant, avec 10 à 20% des cas d'IRT chez les enfants (Cantani *et al.*, 1986; Salomon *et al.*, 2009). Bien qu'il s'agisse d'une maladie rare, la NPH juvénile est la forme la plus commune de la maladie, avec une incidence variant de 0,13 sur 10 000 naissances en Finlande et 1 sur 50 000 naissances au Canada à 9 sur 8,3 millions de naissances aux Etats-Unis (Hildebrandt and Zhou, 2007; Pistor *et al.*, 1985; Potter *et al.*, 1980). On notera de façon intéressante que le gène *NPHP1* est muté de façon homozygote chez 0,5% des patients présentant une insuffisance rénale terminale à l'âge adulte (Snoek et al., 2018).

I.1.1.1. Clinique de la néphronophtise

Cliniquement, la NPH se traduit, dans un premier temps, par une polydipsie et une polyurie, soit une augmentation du volume d'absorption de liquide due à une soif excessive associée à une augmentation du volume des urines. La polyurie est caractérisée par l'importance de la diurèse (supérieure ou égale à 3 litres chez l'adulte contre 1,5 litre pour un individu sain). Le volume d'urine excrété (VE) peut être généralisée comme étant la résultante du volume d'urine filtrée (VF) au niveau glomérulaire associée au volume d'urine sécrétée au niveau tubulaire (VS) moins le volume réabsorbé (VA), que l'on peut écrire $VE = (VF + VS) - VA$. La polyurie est expliquée par l'impossibilité du rein dysfonctionnel à concentrer les urines (défaut de sécrétion tubulaire) associée à une faible réabsorption du

sodium au niveau des tubules rénaux, tandis que le volume de filtration glomérulaire reste physiologique (Gusmano *et al.*, 1998) (cf [Figure 1: Anatomie du Rein](#)).

La polydipsie est la conséquence de la polyurie ; c'est un mécanisme compensatoire visant à diminuer la déshydratation occasionnée par la polyurie. Des symptômes secondaires peuvent être associés à la NPH, comme une hypovolémie sanguine ou une hyponatrémie, engendrée par le défaut de réabsorption de sodium au niveau du rein. L'apparition de l'IRT, souvent élément déclencheur du diagnostic, entraîne l'aggravation des symptômes qui se traduisent pas une anémie, due à la baisse de production d'érythropoïétine par le rein, une acidose métabolique due à l'augmentation de déchets acides, mais aussi une anorexie pouvant être expliquée par un dérèglement hormonal général. On notera que l'apparition de la protéinurie se fait généralement à la suite de l'IRT.

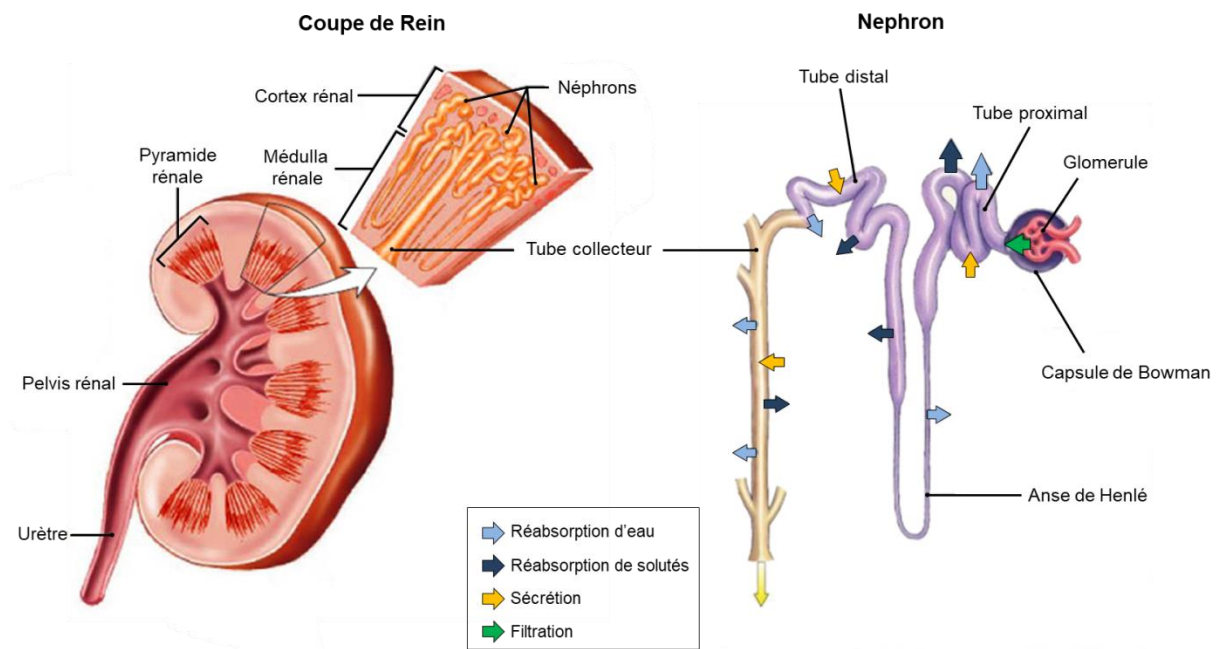


Figure 1: Anatomie du Rein

La coupe sagittale du rein montre la forme des principales parties du rein: le cortex, la médulla et le pelvis rénal qui collecte les urines dans l'urètre conduisant à la vessie. Les néphrons sont principalement formés de 2 parties : le glomérule où le sang est filtré et les tubules rénaux où l'urine est formée. Les tubules rénaux sont constitués d'un segment proximal, de la partie descendante et ascendante de l'anse de Henlé et d'un segmental distal suivi du tube collecteur. Adapté du manuel Merck.

I.1.1.2. Histologie

L'étude de Graham et Smith ayant permis la classification de la MCKD est principalement basée sur l'histologie particulière du rein. Bien que les reins pathologiques puissent paraître de taille normale à l'échographie, on observe souvent une hyperéchogénicité du parenchyme rénal associée à une dédifférenciation cortico-médullaire, caractéristiques de la NPH. Dans certains cas et à des stades avancés de la maladie, les reins peuvent exhiber la présence de kystes médullaires, même si ces derniers restent de taille réduite (Aguilera *et al.*, 1997; Blowey *et al.*, 1996). Les caractéristiques particulières des reins NPH se retrouvent davantage au niveau interstitiel, où une fibrose massive se développe, entraînant parfois quelques infiltrats de cellules immunitaires. Les atteintes tubulaires sont également importantes et variées, observables en microscopie optique. On observe aussi bien des tubules atrophiés que des tubules dilatés et collabés. La lame basale de ces tubes apparaît généralement feuilletée et plus ou moins épaissie, ou bien encore détériorée ou absente par endroit (Zollinger *et al.*, 1980). Ces défauts de la lame basale sont retrouvés plus fréquemment dans la NPH que dans d'autres tubulopathies, et sont un des aspects histologiques permettant de distinguer la NPH des autres néphropathies tubulo-interstitielles.

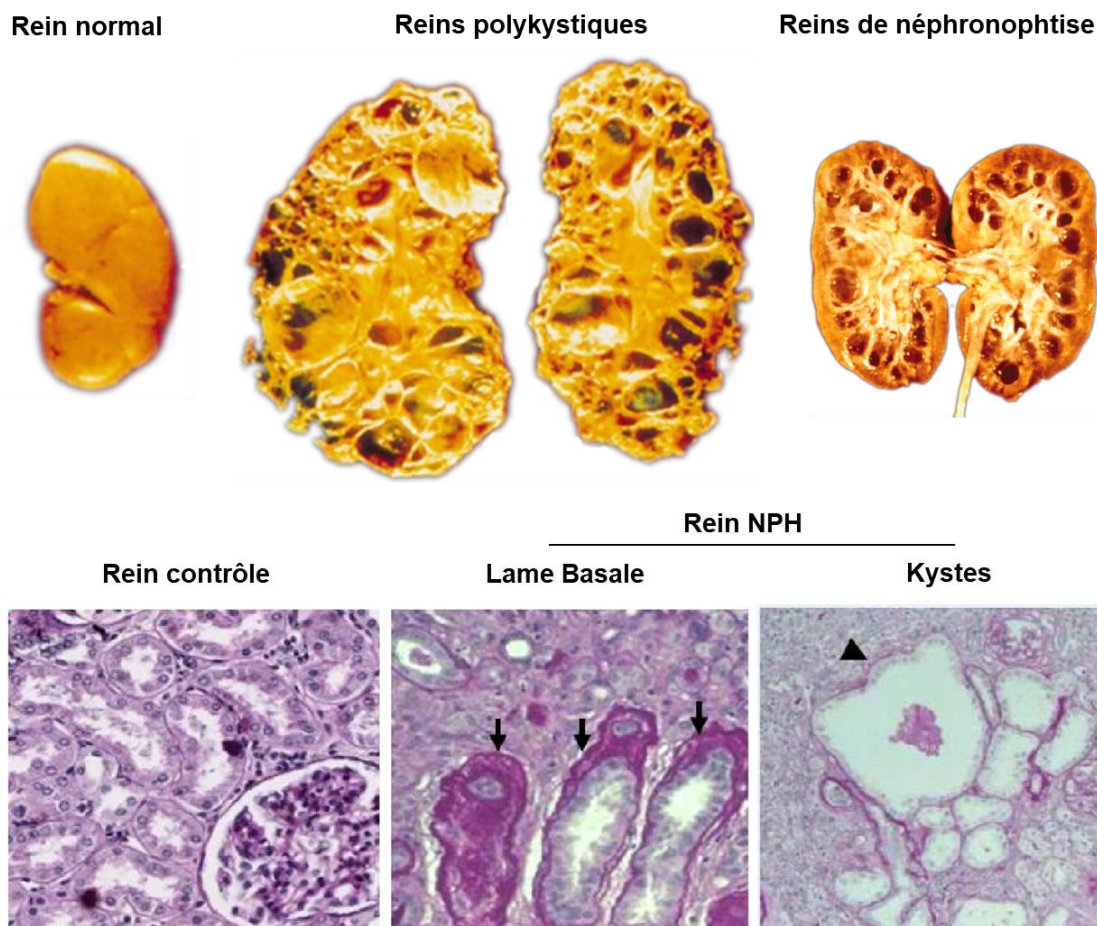


Figure 2: Reins normaux et pathologiques

Les reins de patients atteints de néphronophtise présentent une importante fibrose interstitielle, des tubes atrophiques cernés par une membrane basale tubulaire épaissie (flèches) et d'autres tubes dilatés. Ils sont de tailles comparables aux reins normaux contrairement aux reins polykystiques dont la taille est grandement augmentée par la présence de kystes (pointe de flèche), dans le parenchyme.

I.1.1.2.1. Néphronophtise infantile

La NPH infantile est avant tout classifiée par l'apparition précoce d'une dysfonction rénale avec une IRT moyenne à l'âge de 2 ans (Gagnadoux *et al.*, 1989). Histologiquement, la NPH infantile possède des caractéristiques spécifiques la différenciant des formes plus tardives. Les reins sont souvent de taille élargie et les kystes sont présents sur l'ensemble du parenchyme. En revanche, les atteintes de la membrane basale tubulaire sont rarement retrouvées chez les patients atteints de NPH infantile. Toutefois, certains cas de NPH infantile présentant les aspects histologiques d'une NPH juvénile ont déjà été rapportés (Tory *et al.*, 2009). Outre l'aspect histologique, la NPH infantile se distingue aussi cliniquement, puisqu'il n'est pas rare qu'elle soit associée à une hypertension artérielle (15% des cas), ce qui est rarement le cas pour les autres formes de NPH.

I.1.1.2.2. Néphronophtise juvénile

La néphronophtise juvénile est la forme la plus fréquente de la maladie. L'IRT apparaît en moyenne à l'âge de 13 ans, même si des cas plus tardifs ont déjà été rapportés, rendant la différenciation avec la forme tardive plus difficile (Bollée et al., 2006; Hildebrandt et al., 1997a). Histologiquement, on retrouve dans cette forme le développement d'une fibrose interstitielle généralement plus importante que dans la forme infantile du fait de la progression plus lente de la maladie.

I.1.1.2.3. Néphronophtise tardive

Aussi appelée forme de l'adolescent, la forme tardive est une forme autosomique dont l'existence a été mise en évidence avec l'identification de mutations du gène *NPHP3* au sein d'une famille dont les individus ont développé une IRT à l'âge de 19 ans (Omran *et al.*, 2000). Depuis, plusieurs cas de lésions rénales de type NPH ont été révélés de façon très tardive, avec notamment des patients mutés pour le gène *NPHP1* en IRT à 43 ans et 61 ans, mais aussi des patients présentant un syndrome de Senior-Løken avec une IRT à 62 ans dont la cause génétique demeure inconnue (Georges et al., 2000; Hoefele et al., 2011; Snoek et al., 2018). D'un point de vue histologique, les lésions causées par la forme tardive sont très similaires aux lésions retrouvées dans la NPH juvénile (cf [Figure 2: Reins normaux et pathologiques](#)).

La néphronophtise, qu'elle soit infantile, juvénile ou tardive, provoque des lésions rénales qui peuvent être isolées, ou bien associées à des atteintes extra-rénales ; on parle alors de NPH syndromique. Ces atteintes extra-rénales se retrouvent dans 15%-45% des cas selon les cohortes. Chez les patients mutés pour *NPHP1*, près de 20% présentent un retard de développement et un dégénérescence rétinienne (König et al., 2017; Srivastava et al., 2018). De plus, les NPH infantiles sont fréquemment associées à des atteintes cardiaques (Otto *et al.*, 2003), mais aussi à des inversions d'organes appelées *situs inversus* (Otto *et al.*, 2003).

I.1.2. Les formes syndromiques associées à la NPH

La NPH a été rapportée dans différents syndromes : le syndrome de Senior-Løken lorsque la NPH est associée à une rétinite pigmentaire, le syndrome de Cogan quand elle est combinée à une apraxie oculomotrice et une atteinte audio-vestibulaire, le syndrome de Boichis lorsque l'on observe également une fibrose hépatique, le syndrome de Joubert lorsqu'elle est accompagnée d'une aplasie du vermis cérébelleux, et les syndromes de Saldino-Mainzer et Jeune en cas d'association à des défauts du squelette. Les spectres ayant

tendance à se chevaucher entre les différents syndromes, il est parfois difficile “d'étiqueter” un patient pour un syndrome spécifique.

I.1.2.1. Syndrome Senior-Løken

La plus fréquente des atteintes extra-rénales observées est une dystrophie rétinienne atteignant les cônes, des cellules photoréceptrices, et retrouvée associée dans 10 à 15% des cas de NPH juvéniles. La fréquence de l'atteinte oculaire retrouvée chez les patients atteints de NPH varie en fonction du gène muté. Elle peut être d'origine ciliaire ou due à une dégénérescence neuronale. Cliniquement, l'atteinte oculaire est également variable, pouvant aller d'une forme asymptomatique à une forme sévère, de type amaurose congénitale de Leber (LCA) (Salomon *et al.*, 2009). A l'origine, le syndrome de Senior-Løken (SLS) a été décrit chez des patients atteints de NPH et de troubles visuels (Løken *et al.*, 1961; Senior *et al.*, 1961). Par la suite, le SLS a été défini comme l'association d'une NPH avec une dégénérescence rétinienne de type rétinite pigmentaire (RP) ou LCA (Contreras, Espinoza, 1960; Løken *et al.*, 1961; Senior *et al.*, 1961). La dégénérescence pigmentaire se caractérise cliniquement par un électrorétinogramme (ERG) drastiquement réduit voire totalement plat, dû à une dégénérescence des photorécepteurs, avant même que la RP puisse être constatée par examen physique (Hartong *et al.*, 2006; Salomon *et al.*, 2009).

I.1.2.2. Syndrome de Joubert

Les symptômes cliniques du syndrome de Joubert se traduisent souvent, dès les premiers mois de vie, par une hypotonie, un retard psychomoteur, des mouvements anormaux des yeux de type nystagmus ou apraxie oculomotrice de Cogan, et des troubles respiratoires ou tachypnées épisodiques. Il existe également d'autres manifestations, moins fréquentes, telles qu'une polydactylie, un encéphalocèle occipitale, ou encore d'autres atteintes oculaires de type colobome rétinien (défaut du développement structurel de l'œil) ou LCA. Observable à l'IRM cérébrale, l'hypoplasie du vermis cérébelleux est définie comme une déformation prenant la forme d'une « dent molaire », due à la proéminence de deux pédoncules cérébelleux (Castori *et al.*, 2005; Gleeson *et al.*, 2004; Parisi and Dobyns, 2003). L'hypoplasie ou l'aplasie du vermis caractérise le syndrome décrit par Marie Joubert sous le nom de Syndrome de Joubert (JBTS) (Cogan, 1945; Gleeson *et al.*, 2004; Joubert *et al.*, 1968; Parisi and Dobyns, 2003; Saraiva and Baraitser, 1992; Valente *et al.*, 2005). Il est associé à une NPH à hauteur de 20 à 30% des cas, avec une prévalence de 1 sur 200 000 naissances, (Wolf, 2015) sous le nom de syndrome cérébello-oculo-renal (CORS) (Saraiva and Baraitser, 1992; Satran *et al.*, 1999) ou de syndrome de Joubert type B (JBTS-B) (Hildebrandt *et al.*, 1992).

L'hétérogénéité clinique des symptômes, mais aussi génétique de ce syndrome, ont donné lieu à plusieurs syndromes associés dont le COACH, associant un JBTS à une fibrose hépatique (Verloes and Lambotte, 1989). La diversité de ces syndromes compliquant le diagnostic, les atteintes ont été plus largement regroupées sous le terme de syndrome de Joubert et maladies apparentées (JSRD) (Valente *et al.*, 2013)..

I.1.2.3. Syndrome de Boichis et Caroli

La fibrose hépatique inflammatoire est une atteinte extra-rénale communément associée à la NPH (près de 10%). Toutefois, la cause génétique est très hétérogène : elle est fréquemment associée à des mutations du gène *NPHP3* (Halbritter *et al.*, 2013a ; Tory *et al.*, 2009). Ces atteintes hépatiques ont pour origine commune une dysgénésie biliaire. Le syndrome de Boichis associe NPH avec une atteinte hépatique de type hépatomégalie (augmentation de la taille du foie) et fibrose modérée avec prolifération canaliculaire légère (Boichis *et al.*, 1973).

La fibrose hépatique couplée à une dilatation congénitale et une ectasie des voies biliaires intra-hépatiques forme, quand elle est associée à une atteinte rénale, le syndrome de Caroli. Il a été montré associé à la NPH pour les gènes *TTC21B*, *TMEM67* et principalement *WDR19* mais il est de façon plus récurrente associé à la PKD (GUNAY-AYGUN, 2009; Summerfield *et al.*, 1986).

I.1.2.4. Syndromes associés à des défauts squelettiques

De nombreuses anomalies osseuses ont été décrites et associées à la NPH définissant divers syndromes classés selon l'atteinte squelettique. Ainsi, on connaît majoritairement le syndrome de Saldino-Mainzer (MSS), aussi dénommé syndrome cône-rénal, regroupant une NPH, une rétinite pigmentaire et une atteinte squelettique remarquable de type épiphyses en cônes des phalanges principalement (Mainzer *et al.*, 1970). Le syndrome de Sensenbrenner ou dysplasie cranio-ectodermale (CED), et la dysplasie thoracique asphyxiante de Jeune (JATD) appelée aussi syndrome de Jeune ou des côtes courtes, partagent en plus des épiphyses en cônes, des anomalies des côtes courtes, des os longs raccourcis ou encore une polydactylie. Néanmoins, une craniosynostose (forme du crâne anormale par fusion des os prématurés) et des anomalies ectodermiques (notamment remarquables au niveau de la formation des dents) sont caractéristiques des patients atteints du syndrome de Sensenbrenner (Fry *et al.*, 2009; Jeune *et al.*, 1955; Sensenbrenner *et al.*, 1975; de Vries *et al.*, 2010). On retrouve par ailleurs des atteintes extra-squelettiques telles qu'une

rétinite pigmentaire, une fibrose hépatique et des défauts cardiaques. D'autres syndromes, plus rares, ont été décrits, tels que le syndrome Ellis-Van Creveld (EVC) pour lequel les patients présentent un retard de croissance, des côtes courtes, une polydactylie, une dysplasie des ongles et des dents et une malformation des cloisons cardiaques pour 60% des cas (Moudgil *et al.*, 1998), ou encore du syndrome de RHYNS qui associe rétinite pigmentaire, hypopituitarisme, NPH et dysplasie squelettique (Di Rocco *et al.*, 1997).

I.1.2.5. Syndrome Bardet Biedl (BBS)

Le syndrome de Bardet-Biedl est principalement caractérisé par une obésité infantile ainsi qu'une dystrophie rétinienne, une polydactylie, une déficience intellectuelle, un hypogonadisme et des atteintes rénales conduisant à l'IRT qui peuvent aussi bien être des NPH que des dysplasies rénales (Barakat *et al.*, 1990; Beales *et al.*, 1999). Avec une prévalence de 1/150000, le syndrome de Bardet-Biedl est marqué par une mortalité par IRT dans 40% des cas (O'Dea *et al.*, 1996).

Ainsi, d'autres syndromes ont été répertoriés et recensent des atteintes rénales plus ou moins sévères allant de la NPH tardive à des formes développementales extrêmement sévères telles des dysplasies rénales kystiques. Elles sont également associées à un grand nombre d'anomalies développementales touchant d'autres organes comme par exemple le syndrome d'IveMarck associant une hétérotaxie, des défauts cardio-vasculaires à l'absence de rate (Larson *et al.*, 1995).

De façon intéressante, la présence de manifestations communes entre ces syndromes, comme la présence quasi systématique de côtes courtes, suggère une origine génétique commune (Beals and Weleber, 2007; Tsimaratos *et al.*, 1998).

I.1.3. Les autres ciliopathies

I.1.3.1. Syndrome de Meckel-Gruber (MKS)

Des similarités autant cliniques que génétiques ont déjà été démontrées entre les syndromes de BBS, JBTS et le Syndrome de Meckel-Gruber (MKS), sous-entendant que le MKS pourrait être, dans certains cas, une forme létale de ces pathologies (Baala *et al.*, 2007a; Delous *et al.*, 2007; Leitch *et al.*, 2008). Le MKS est une forme syndromique sévère létale, avec une durée de vie moyenne de 24h. En 1822, Meckel identifie le syndrome comme associant un encéphalocèle, une dysplasie kystique rénale avec des reins élargis, et une polydactylie post-axiale (Tanriverdi *et al.*, 2002). En 1971, Hsia *et al.* suggèrent que deux signes cliniques

sur les trois généralement retrouvés sont suffisants pour poser le diagnostic de MKS s'ils sont associés à d'autres anomalies mineures, comme des défauts de développement hépatique (Baala et al., 2007b; Delous et al., 2007; Hsia et al., 1971). En 2007, un allélisme entre le MKS et JBTS a été mis en évidence, indiquant que les deux syndromes peuvent être les formes modérées et sévères d'une même maladie (Baala et al., 2007b; Delous et al., 2007).

I.1.3.2. Autre ciliopathie rénale : la Polykystose rénale (PKD)

Le large spectre phénotypique des ciliopathies avec atteinte rénale entraîne certaines superpositions cliniques entre différents syndromes (cf [Tableau 1: Superposition des phénotypes issus de ciliopathies rénales](#)). Le terme de polykystose rénale est utilisé pour décrire deux maladies, la polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD) et la polykystose rénale autosomique récessive (ARPKD). La prévalence de l'ADPKD est la plus importante au sein des ciliopathies (1/1000), du fait de son mode de transmission, et est due aux mutations des gènes *PKD1*, *PKD2* et *GANAB* (Porath et al., 2016). Elle est caractérisée par une dilatation progressive des tubules rénaux qui forment de multiples kystes remplis de liquide, entraînant une insuffisance rénale à 57 ans en moyenne (Bergmann, 2015; Büscher et al., 2014; Knight et al., 2015; Paul et al., 2014; Zerres and Ortiz Brüchle, 2012) (cf [Figure 2: Reins normaux et pathologiques](#)). Ces kystes peuvent provenir de tous les segments du néphron, et leur apparition varie de l'enfance à l'âge adulte (Kaimori *et al.*, 2007). L'expansion progressive du kyste et l'élargissement rénal conduisent à une insuffisance rénale chez les patients, qui doivent alors subir une dialyse jusqu'à une possible transplantation (Czarnecki and Steinman, 2013; Riella *et al.*, 2014).

L'ARPKD d'autre part, est caractérisée par l'association d'une maladie kystique rénale et d'une fibrose hépatique congénitale. Elle peut être périnatale, néonatale, infantile, ou encore dans de rares cas, juvénile. Cependant, l'apparition de kystes a lieu pendant la vie fœtale et entraîne une dilatation fusiforme des canaux collecteurs qui sont distribués de la moelle au cortex (Hiesberger *et al.*, 2005; Igarashi *et al.*, 2005). De façon intéressante, l'insuffisance rénale terminale de l'ARPKD apparaît à un âge moyen similaire de l'ADPKD. Contrairement à l'ADPKD, l'ARPKD est causée uniquement par les mutations du gène *PKHD1*.

I.1.3.3. Les ciliopathies émergentes

Les récentes études de cartographie des protéines et fonctions ciliaires (cf Perspectives et études ciliaires), et la découverte d'un rôle au cil du produit des gènes responsables de pathologies non étiquetées ciliopathies, ont permis d'étendre le spectre des ciliopathies à de nouveaux syndromes. C'est le cas pour le syndrome de Townes-Brocks (TBS), une maladie autosomique dominante, pour laquelle l'implication du gène *SALL1* (SAL-Like 1), un des 4 membres de la famille des gènes *SALL* (Botzenhart *et al.*, 2007; Kohlhasse *et al.*, 1998), a été récemment mise en évidence (Bozal-Basterra *et al.*, 2018). Le TBS est caractérisé par la présence d'un anus non perforé et d'oreilles dysplasiques. Ces symptômes majeurs sont fréquemment associés à des défauts du conduit auditif, et des malformations des orteils (polydactylie, duplication ou hypoplasie) (Powell and Michaelis, 1999). De façon intéressante, les patients atteints de TBS présentent une insuffisance rénale terminale, des reins kystiques, et des malformations cardiaques. *SALL1* code un facteur de transcription à domaines à doigts de zinc, connu pour entraîner la répression transcriptionnelle des gènes cibles via le complexe de déacétylation du nucléosome (NuRD) (de Celis and Barrio, 2009; Kiefer *et al.*, 2002). Il a récemment été démontré que des défauts de *SALL1* dans les fibroblastes de patients atteints de TBS entraînent des défauts de désassemblage des cils affectant la signalisation de la voie SHH. Ces défauts ne sont toutefois pas liés à sa fonction de facteur de transcription mais à un nouveau rôle de *SALL1* dans la séquestration cytoplasmique de protéines centriolaires indispensables au désassemblage du cil primaire. Le TBS peut ainsi être classé parmi les ciliopathies (Bozal-Basterra *et al.*, 2018).

Le gène *WDR11* a été relié à l'hypogonadisme hypogonadotrope congénital (CHH) et au syndrome de Kallmann (KS). Le KS et le CHH sont des pathologies pour lesquelles les patients présentent des défauts développementaux dans différents organes, notamment au niveau du cerveau, du squelette, des oreilles, des yeux mais aussi du cœur et des reins (Boehm *et al.*, 2015; Kim, 2015). Le gène *WDR11* code la protéine du même nom, contenant 12 domaines WD, et interagissant avec le facteur de transcription EMX1, indispensable au développement neuronal (Kim *et al.*, 2010a). Récemment, *WDR11* a été montrée indispensable pour la ciliogenèse et la signalisation de la voie du développement SHH. En effet, *WDR11* interagit avec EMX1, mais aussi avec la protéine GLI3, pour réguler l'expression de GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), l'hormone caractéristique du développement pubertaire. Les modèles de poisson zèbre et de souris déplétés pour *Wdr11* présentent des défauts de ciliogenèse et de signalisation de la voie SHH (Kim *et al.*, 2018).

Ainsi, les syndromes CHH et KS appartiennent désormais à la grande famille des ciliopathies.

Le nanisme, incluant l'achondroplasie et la dysplasie thanatophore est connu pour être causé par des mutations du gène *FGFR3* (Delezoide *et al.*, 1998; Le Merrer *et al.*, 1994; Ornitz and Legeai-Mallet, 2017; Ornitz and Marie, 2015). *FGFR3* (Fibroblast Growth Factor Receptor 3) joue un rôle critique dans la croissance de la plaque cartilagineuse en inhibant le taux de prolifération, l'initiation et l'hypertrophie des chondrocytes. Ainsi, des défauts dans la signalisation FGF entraînent des défauts de croissance par désorganisation des chondrocytes de la plaque cartilagineuse, ce qui a pour conséquence des défauts d'élongation des os. Jusqu'à présent, le mécanisme moléculaire par lequel *FGFR3* pouvait induire ces phénotypes demeurait inconnu. Toutefois, le rôle de *FGFR3* dans la morphologie et la signalisation ciliaire a été récemment démontré comme primordial pour l'homéostasie du cartilage. En effet, une mutation gain de fonction de *FGFR3* conduit à des cils primaires de longueur significativement réduite, aussi bien dans les chondrocytes fœtaux humains que dans les chondrocytes embryonnaires murins. Ce défaut de taille est associé à une accumulation de l'IFT20 au niveau du corps basal du cil primaire. De façon intéressante, l'inhibition de l'activité tyrosine kinase de *FGFR3* est capable de sauver le phénotype ciliaire des chondrocytes mutés pour *FGFR3*, suggérant un rôle essentiel de l'activité kinase de *FGFR3* dans la localisation de l'IFT20, et donc dans la ciliogenèse (Martin *et al.*, 2018).

Ainsi, la caractérisation récurrente de syndromes déjà décrits en tant que ciliopathies suggère un rôle important du cil primaire dans de nombreux processus et signalisations cellulaires développementaux jusqu'alors insoupçonnés.

Tableau 1: Superposition des phénotypes issus de ciliopathies rénales

MANIFESTATIONS CLINIQUES	Polykystose Rénale	Néphronoptise	Senior-Løken	Bardet-biedl	Jeune	Sensenbrenner	Joubert	Meckel
Reins kystiques	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Néphropathie Tubulointerstitielle	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Dégénérescence Rétinienne			✓	✓	✓	✓	✓	
Atteinte Hépatique	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓
Défauts de Latéralité		✓		✓	✓			✓
Polydactylie				✓	✓	✓	✓	✓
Obésité / Hypogonadisme				✓				
Anomalies Canio-faciales						✓		✓
Dysgénésie du vermis Cérébelleux					✓	✓	✓	✓
Défauts du tube Neural							✓	✓
Dysplasie Squelettique					✓	✓		✓
Dysplasie Ectodermale						✓		

I.2. Génétique de la néphronoptise

La NPH est une maladie monogénique récessive présentant une large hétérogénéité, aussi bien sur le plan génétique que clinique (Salomon *et al.*, 2009; Wolf, 2015) (cf [Figure 3: Corrélation phénotype/génotype dans les ciliopathies](#)). L'émergence récente des stratégies de séquençage haut débit (aussi appelé NGS pour Next Generation Sequencing) a permis l'accélération de l'identification des gènes impliqués dans la NPH et les ciliopathies associées au cours des 10 dernières années. Ainsi, après l'identification des 5 premiers gènes entre 1997 (NPHP1) et 2005 (NPHP5), 17 autres gènes ont été identifiés, portant le nombre actuel à 23 gènes reconnus pour être impliqués dans la NPH.

I.2.1. Hétérogénéité génétique

Différentes techniques ont permis l'identification des gènes impliqués dans la NPH. Evidemment l'histoire génétique de la NPH a commencé en 1997 avec l'identification du gène *NPHP1* (Hildebrandt *et al.*, 1997b; Saunier *et al.*, 1997). Puis, les études génétiques ont allié une approche par clonage positionnel suivi du séquençage par la méthode Sanger de gènes candidats permettant la découverte des gènes *NPHP2* à *NPHP5*. Par la suite, les analyses de liaison dans des familles consanguines multiplexes permettant d'identifier les régions d'homozygotie, couplées au séquençage Sanger des gènes candidats a permis de

découvrir 4 nouveaux gènes responsables de NPH, *NPHP6/CEP290* (Sayer *et al.*, 2006; Valente *et al.*, 2006), *NPHP7/GLIS2* (Attanasio *et al.*, 2007), *NPHP8/RPGRIP1L* (Arts *et al.*, 2007; Delous *et al.*, 2007), *NPHP9/NEK8* (Otto *et al.*, 2008a). Enfin, des stratégies plus récentes telles que le NGS d'exons ciblés pour des gènes connus ou candidats ciliaires (comme le ciliome), d'exome total (WES), ou encore des approches d'analyses protéomiques ont permis la mise en évidence des autres gènes, tout d'abord *NPHP10/SDCCAG8* (Otto *et al.*, 2010), le premier gène identifié par exome total puis *NPHP11/MKS3/TMEM67* (Gilissen *et al.*, 2012; Otto *et al.*, 2009), *NPHP12/JBTS11/TTC21B* (Davis *et al.*, 2011), *NPHP13/WDR19* (Bredrup *et al.*, 2011), *NPHP14/ZNF423* (Chaki *et al.*, 2012), *NPHP15/CEP164* (Chaki *et al.*, 2012), , *NPHP16/ANKS6* (Hoff *et al.*, 2013; Taskiran *et al.*, 2014), *NPHP17/IFT172* (Halbritter *et al.*, 2013a), *TRAF3IP1/IFT54* (Bizet *et al.*, 2015) et *NPHP20/MAPKBP1* (Macia *et al.*, 2017) également par séquençage d'exome total. En revanche, *IFT140* (Perrault *et al.*, 2012), *NPHP18/CEP83* (Failler *et al.*, 2014), *NPHP19/DCDC2* (Girard *et al.*, 2016; Schueler *et al.*, 2015) ont été identifiés par ciliome. Au total, ces 22 gènes représentent à peine la moitié des cas de NPH, de 30% à 52% selon les cohortes (Hildebrandt *et al.*, 2009 et cohorte de l'Hôpital Necker). Néanmoins, *NPHP1* demeure le gène principalement impliqué dans la NPH puisqu'il est retrouvé, le plus souvent délété, chez 20% à 28% des patients NPH (Halbritter *et al.*, 2013b et cohorte Necker) (cf [Figure 3: Corrélation phénotype/génotype dans les ciliopathies](#)).

I.2.2. Hétérogénéité phénotypique, une relation phénotype-génotype

Comme vu précédemment, les phénotypes liés à la NPH, et plus généralement aux ciliopathies, peuvent être très variés. La multitude de gènes impliqués, leur modèle d'expression spatio-temporel et la nature des mutations contribuent à cette variabilité phénotypique, qui se traduit par une variabilité dans l'âge d'apparition et la sévérité des phénotypes rénaux, mais surtout extra-rénaux (cf [Figure 3: Corrélation phénotype/génotype dans les ciliopathies](#)).

Il existe des corrélations entre le génotype et le phénotype au sein de la NPH. Par exemple, certains gènes comme *NPHP1* ou *NPHP4* sont préférentiellement impliqués dans les formes juvéniles de NPH avec une IRT à 13 ans en moyenne (Hildebrandt *et al.*, 1997b; Saunier *et al.*, 1997). D'autres, comme *NPHP2/INVS* ou *NEK8/NPHP9*, le sont dans les formes infantiles (Haider *et al.*, 1998; Otto *et al.*, 2003). Tandis que certains gènes, comme *NPHP1*, sont davantage associés à des formes isolées (80% des cas), d'autres gènes sont préférentiellement impliqués dans des formes syndromiques, comme *INVS/NPHP2* avec les *situs inversus*, *CEP290* et *IQCB1/NPHP5* avec les défauts rétiniens, *NPHP8/RPGRIP1L* et

NPHP11/MKS3/TMEM67 dans les syndromes de types JBTS et MKS (Baala et al., 2007b; Dawe et al., 2007; Delous et al., 2007; Doherty et al., 2010; Frank et al., 2008; Otto et al., 2009; Sayer et al., 2006; Wolf et al., 2007) ou encore les gènes codant les IFTs, *TTC21B*, *IFT140*, *WDR19* dans les syndromes de Jeune et Saldino-Mainzer (Bredrup et al., 2011; Davis et al., 2011; Perrault et al., 2012)(Bredrup et al., 2011).

Par ailleurs, pour un même gène, il peut exister une importante variabilité phénotypique au sein des ciliopathies, s'expliquant en partie par la nature de la mutation (mutation perte de fonction versus mutation hypomorphe). On peut citer notamment les mutations de *NPHP3*, originellement associées à des formes tardives de NPH, mais aussi retrouvées chez des formes infantiles plus sévères (Otto et al., 2008b; Tory et al., 2009). De plus, les mutations du gène *NPHP17/IFT72* peuvent être associées à la fois à des syndromes de Jeune et à des syndromes de Saldino-Mainzer (Halbritter et al., 2013a). De nombreux autres cas ont ensuite été étudiés, notamment l'impact de l'hétérogénéité des mutations pour des gènes liés à de larges variations phénotypiques, comme *NPHP3* et *TMEM67*. En effet, des mutations faux-sens de ces deux gènes conduisent au développement d'une NPH juvénile avec une atteinte extra-rénale modérée, tandis que des mutations tronquantes (perte de fonction) ont pour conséquence des défauts développementaux sévères de type syndrome MKS (Bergmann et al., 2008; Dawe et al., 2007; Olbrich et al., 2003; Otto et al., 2009; Tory et al., 2009). On peut aussi noter l'exemple de mutations tronquantes de *NPHP8/RPGRIP1L*, entraînant chez les patients des phénotypes de type MKS. En revanche, les patients hétérozygotes composites pour ce même gène avec une mutation stop et une mutation faux-sens exhibent un syndrome de Joubert (Delous et al., 2007). La présence d'un allèle hypomorphe (entraînant un produit protéique moins fonctionnel) versus un allèle perte de fonction semble donc favoriser un phénotype plus modéré. Cette observation a été faite pour d'autres gènes, avec des patients hétérozygotes composites pour une mutation faux-sens hypomorphe et une tronquante de *NPHP13/WDR19*, qui présentent soit une NPH isolée, soit un syndrome de Sensenbrenner. Le phénotype est beaucoup plus sévère, avec des patients atteints d'un syndrome de Jeune, lorsque la mutation est une faux-sens à l'état homozygote, associée à une perte de fonction de la protéine (Bredrup et al., 2011). Un autre exemple à considérer est le gène *TTC21B*, pour lequel deux mutations hétérozygotes composites (c.2758-2A>G et p.P209L ou p.C552X et p.P209L) conduisent à une forme précoce de la NPH, alors qu'une mutation homozygote p.P209L conduit à une NPH plus tardive. Enfin, une mutation d'épissage homozygote (c.2211+3 A>G) du gène *TTC21B* entraîne chez le patient

une IRT à 8 ans associée à une protéinurie, une hypertension artérielle et une fibrose rénale tandis que deux mutations hétérozygotes composites, une faux-sens (c.1552 T>C) et une duplication associée à un décalage du cadre de lecture (c.1456dupA), entraînent un phénotype similaire mais avec une IRT à 1 an et la présence de phalanges courtes et d'un *situs inversus* chez un autre patient (Zhang *et al.*, 2017). Ici, l'explication réside dans la fonction ciliaire et non ciliaire de la protéine IFT139. En effet, la mutation d'épissage affecte moins la fonction ciliaire de la protéine que sa fonction non ciliaire : le patient ne développe pas de *situs inversus*, ni d'anomalies du développement squelettique et présente une IRT plus tardive. De ce fait, il présente un phénotype d'atteinte glomérulaire d'apparition généralement tardive, entraînant une protéinurie et une HTA associée à l'atteinte NPH (Cong *et al.*, 2014). Il s'agit donc encore une fois d'un exemple de phénotypes plus ou moins sévères selon l'impact de la mutation sur la fonction de la protéine.

Un dernier mécanisme génique, évoqué pour expliquer la variabilité des phénotypes cliniques associés aux ciliopathies, serait la charge mutationnelle (Lee and Weatherbee, 2010). Elle a été décrite avec la découverte de la mutation p.P209L dans *TTC21B* à l'état hétérozygote associée chez un patient présentant un BBS avec des reins kystiques (Davis *et al.*, 2011). Ainsi, il est supposé que, en plus d'être un gène causal, *TTC21B* pourrait avoir un rôle de gène modificateur (Davis *et al.*, 2011). Ce mécanisme, connu sous le nom de « charge mutationnelle », suppose que la présence d'une ou de plusieurs mutations hétérozygotes additionnelles pourrait contribuer à aggraver le phénotype associé à une mutation causale, pouvant expliquer l'existence de phénotypes différents pour une même mutation génétique causale. En effet, dans les cas des ciliopathies récessives, l'effet d'une mutation à l'état hétérozygote dans un gène modificateur, ne conduira pas à un phénotype, alors qu'associée à une mutation homozygote ou deux hétérozygotes composites, elle aggravera le phénotype. Le principal exemple de ce phénomène, dans le cas de la NPH, est l'aggravation des phénotypes dus à des mutations bialléliques de *NPHP1* lorsqu'elles sont associées à une mutation hétérozygote des gènes *NPHP6/CEP290* ou *AHI1/JBTS3*; les phénotypes évoluent alors de NPH juvéniles isolées à des syndromes de Joubert, plus sévères, avec atteinte neurologique (Tory *et al.*, 2007). De manière similaire à cette corrélation *NPHP1/NPHP6*, il existe un enrichissement de la mutation p.P209L du gène *NPHP12/TTC21B* à l'état hétérozygote au sein d'une large cohorte de patients atteints de ciliopathies, notamment de BBS (Davis *et al.*, 2011). Il en est de même pour des mutations hétérozygotes du gène *NPHP8/RPGRIP1L*, notamment la variation p.A229T qui, lorsqu'elle est associée à des

mutations homozygotes pour des gènes de la NPH, contribue au phénotype de rétinite pigmentaire en addition de l'atteinte rénale. D'autres exemples ont depuis été étudiés et peuvent être cités, notamment la présence de mutations hétérozygotes de *Ahi1* chez les souris *Nphp1*^{-/-} et au sein d'une cohorte de patients atteints de NPH qui augmente par plus de 7 fois la probabilité d'une dégénérescence rétinienne (Louie et al., 2010). De même, la mutation c.14G>T (p.Arg5Leu) perte de fonction de *NPHP1* à l'état hétérozygote entraîne un accroissement de la sévérité du syndrome BBS (Lindstrand et al., 2014).

Dès lors, on peut non seulement voir un effet additif des mutations hétérozygotes en tant que gènes modificateurs, mais aussi un effet synergique entre deux gènes spécifiques. Cependant, une autre étude montre que des mutations homozygotes *NPHP1* associées à des mutations hétérozygotes de *NPHP2/INVS* et *NPHP3*, résultant en des NPH infantiles associées à des défauts cardiaques à l'état homozygote, n'aggravent pas le phénotype de NPH juvénile isolée (Hoefele et al., 2007). Ceci montre que l'effet modificateur des gènes ciliaires serait différent en fonction des gènes associés, suggérant une redondance ou une compensation entre certains gènes et une complémentarité pour d'autres (cf [Tableau 2: Gènes responsables de la NPH et de ses formes syndromiques](#)).

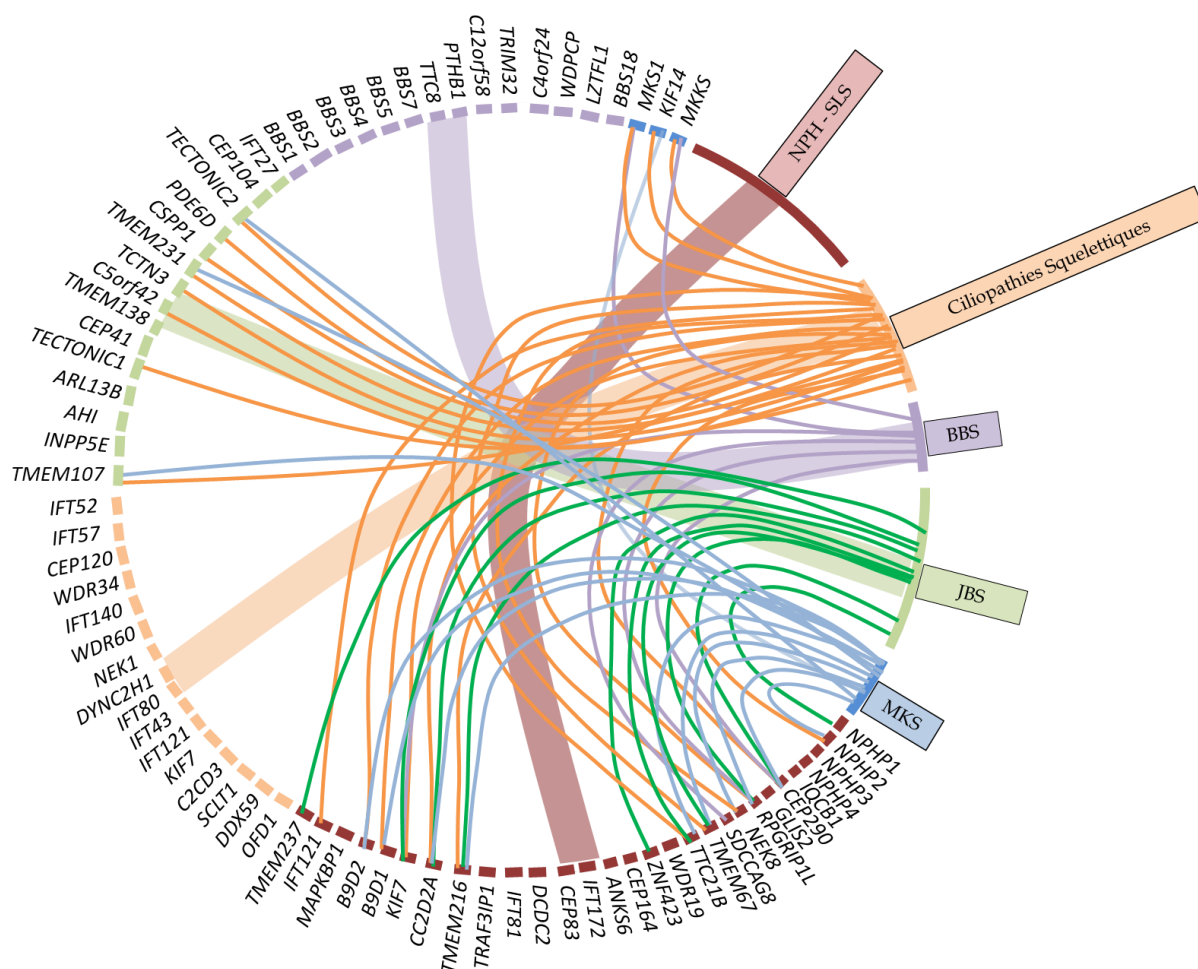


Figure 3: Corrélation phénotype/génotype dans les ciliopathies

Principaux syndromes associés aux ciliopathies et gènes associés. JBTS : syndrome de Joubert ; MKS : syndrome de Meckel ; BBS : syndrome de Bardet-Biedl ; NPH-SLS : néphronophytose et syndrome de Senior-Løken ; les ciliopathies squelettiques incluent le syndrome oro-facial-digital ; la dysplasie cranio-ectodermique et les dysplasies thoraciques aux côtes courtes.

Tableau 2: Gènes responsables de la NPH et de ses formes syndromiques

Gène	NPH isolée	NPH syndromique					Autres	Références
		Fibrose hépatique	Défaut de latéralisation	Rétinite pigmentaire (SLS)	SNC (JBTS-B)	Anomalies osseuses (MSS, JATD, SS)		
NPHP1	juvénile			x	x		LCA	Saunier et al. 1997; F. Hildebrandt et al. 1997
INVS/NPHP2	infantile	x	x	x				Edgar A. Otto et al. 2003
NPHP3	infantile / juvénile		x	x			MKS	Olbrich et al. 2003
NPHP4	x			x	x			Mollet et al. 2002; Hoefele et al. 2005
IQCB1/NPHP5				x				Edgar A. Otto et al. 2005
CEP290/NPHP6	infantile			x	x		LCA / BBS-like /MKS	B. Chang et al. 2006
GLIS2/NPHP7	juvénile							Attanasio et al. 2007
RPGRIP1L/NPHP8/MKS5					x		LCA / MKS	Delous et al. 2007; Wolf et al. 2007
NEK8/NPHP9	infantile		x					Edgar A. Otto et al. 2008
SDCCAG8/NPHP10				x			BBS-like	Edgar A. Otto et al. 2010
TMEM67/NPHP11		x			x		BBS-like / MKS	E. A. Otto et al. 2009
TTC21B/NPHP12	x	x	x			x	FSGS	Davis et al. 2011; Huynh Cong et al. 2014
WDR19/NPHP13	x	x		x	x	x		Bredrup et al. 2011
ZNF423/NPHP14			x		x			Chaki et al. 2012
CEP164/NPHP15	infantile			x	x			Chaki et al. 2012
ANKS6/NPHP16	infantile				x			Hoff et al. 2013
IFT172/NPHP17	x	x		x		x	BBS	Halbritter, Bizet, et al. 2013
CEP83/NPH18	infantile	x						Failler et al. 2014
DCDC2/NPHP19		x	x					Schueler et al. 2015 ; Girard et al 2016
TRAF3IP1 / IFT54				x		x		Bizet et al. 2015
MABKBP1 / NPHP20	juvénile				x	x	Scoliose	Macia et al, 2017
IFT140	juvénile	x		x		x		Perrault et al, 2012

II- Le cil primaire

La NPH, ainsi que les autres maladies et syndromes cités (BBS, MKS, JATD, LCA, PKD), sont regroupés au sein d'un ensemble d'affections appelées « Ciliopathies », littéralement « maladie du cil ». Il existe deux différents types de cil, les cils primaires et les cils motiles. Les cils sont de petits organites très conservés au cours de l'évolution, formés de microtubules qui polymérisent depuis une ancre centriolaire, connue sous le nom de corps basal. Depuis le corps basal, entouré de matériel péri-centriolaire, les cils s'étendent à la surface des cellules.

Au sein des cils motiles, on peut différencier les flagelles, qui permettent la mise en mouvement de la cellule ou de l'organisme dans son milieu environnant, comme chez *Paramecium tetraurelia*, *Chlamydomonas* ou chez les gamètes de la plupart des espèces, et les cils motiles impliqués dans le déplacement de fluides biologiques comme la circulation du mucus dans les voies respiratoires et du liquide céphalo-rachidien dans le système nerveux central. Chez l'Homme, la fécondation de l'ovocyte par le spermatozoïde dépend du battement flagellaire du gamète, mâle, mais également du battement des cils motiles de la surface des cellules épithéliales des trompes de Fallope. Ces derniers permettent le déplacement de l'ovule au sein des trompes grâce à leur rôle de propulsion de fluides physiologiques. Cette fonction des cils motiles est également retrouvée à la surface des cellules épithéliales des voies respiratoires ou des cellules épendymaires du cerveau afin de respectivement évacuer le mucus vers les voies aériennes supérieures et mettre en mouvement le liquide céphalorachidien. Par leurs rôles spécifiques, les cils motiles entraînent des ciliopathies caractéristiques. Ainsi, le syndrome de Kartagener (Boon et al., 2013; Escudier et al., 2009) associe un *situs inversus* à une dyskinésie ciliaire primitive (DCP). La DCP, initialement appelée syndrome des cils immobiles, est causée par une altération de battements des cils motiles au sein du tractus respiratoire, générant des défauts du transport du mucus. Il s'agit donc d'une maladie respiratoire définie par une bronchorrhée chronique et des infections récurrentes touchant autant les voies basses (bronchectasies) que les voies hautes (sinusites chroniques).

Le cil primaire quant à lui s'étend à la surface de la plupart des cellules mammifères quiescentes pour agir comme une « antenne » cellulaire qui est capable de capter différents signaux depuis l'environnement extra-cellulaire, incluant notamment la lumière, des molécules chimiques de faibles poids moléculaire, des protéines et les stimuli mécaniques.

Bien qu'aujourd'hui reconnu pour l'importance de ses nombreuses fonctions spécifiques et dépendantes du type cellulaire, mais généralement considéré comme un acteur majeur de la transmission de signaux depuis l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, le cil primaire a longtemps été négligé. Il est décrit et étudié pour la première fois en 1968, après avoir été observé et dénommé cil vestigial en 1961 (BARNES, 1961; Sorokin, 1968). C'est dans les années 2000 que la théorie de la fonction régulatrice du cil primaire, et son rôle de perception et transmission du signal pouvant expliquer les phénotypes de ciliopathies, va connaître un essor et entraîner son étude plus approfondie (Berbari *et al.*, 2009; Singla and Reiter, 2006). L'étude des ciliopathies a permis de comprendre les mécanismes moléculaires impliquant le cil primaire, incluant les différentes voies de signalisation, mais également les mécanismes de recyclage protéique, de transport intra-ciliaire, de trafic vésiculaire, ou de maturation du corps basal. Surtout, il est apparu que les protéines résultantes de gènes de ciliopathies s'articulent au sein du cil primaire en différents modules fonctionnels, parmi lesquels on retrouve les protéines centriolaires, les protéines des appendices distaux, les protéines de la zone de transition (TZ), les protéines du compartiment Inversine (CI) et les protéines du transport intra-flagellaire (IFT), permettant ainsi l'organisation structurale du cil (cf [Figure 4: Localisation ciliaire des protéines responsables des ciliopathies](#)).

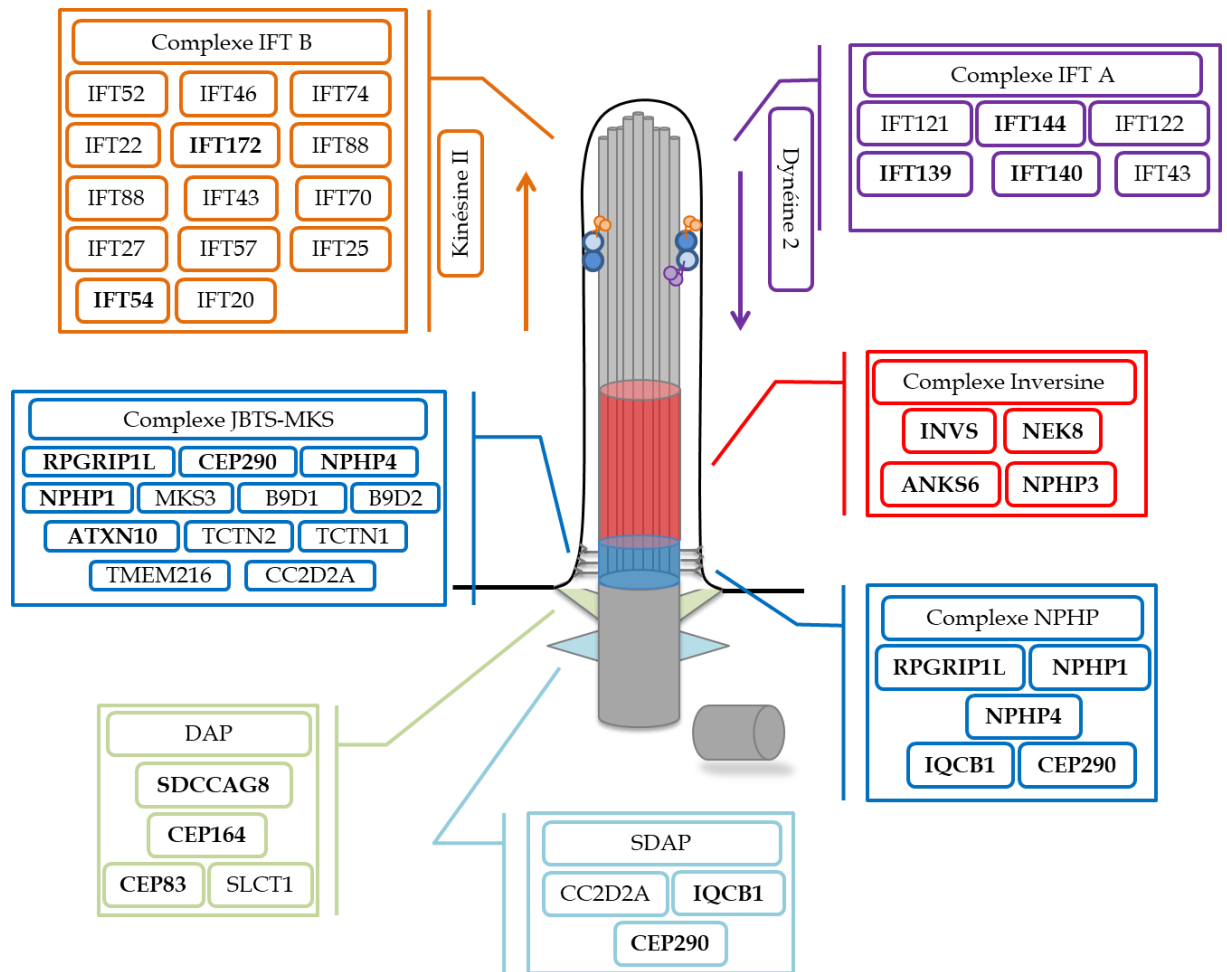


Figure 4: Localisation ciliaire des protéines responsables des ciliopathies

La plupart des protéines ciliaires ont été retrouvées mutées dans différentes ciliopathies. Les gènes en gras correspondent aux gènes de la NPH. DAP : appendices distaux, SDAP : appendices sub-distaux

II.1. Structure du cil

Les cils qu'ils soient motiles ou primaires sont composés d'une façon générale d'un squelette de 9 doublets de microtubules appelé axonème et qui prend forme à partir d'un organite appelé corps basal. Ce corps basal est issu du centrosome et composé de deux centrioles pour les cils primaires et de un seul pour certains cils motiles (*Chlamydomonas reinhardtii*) (Brazelton *et al.*, 2001; Perkins *et al.*, 1986; Silflow and Lefebvre, 2001).

II.1.1. Le corps basal

Le corps basal du cil primaire est composé de deux centrioles, le centriole père et le centriole fils, issus du centrosome (cf [Figure 5: Structure du corps basal](#)). Les centrioles, père et fils, sont formés à la base de 9 triplets de microtubules polarisés entourant un groupement de γ -tubuline, puis à la partie distale de 9 doublets de microtubules entourant un groupement de centrine (Paoletti *et al.*, 1996) (Bettencourt-Dias and Glover, 2007) (cf [Figure 5: Structure du corps basal](#)). Ces doublets de microtubules sont formés d'un microtubule A et d'un microtubule B, tandis que les triplets sont formés de microtubules A, B et C, construits autour du microtubule A qui soutient les deux autres. Les triplets sont édifiés autour d'un squelette de 9 filaments, appelé « cartwheel », chacun lié au microtubule central (A) (Nakazawa *et al.*, 2007). Les microtubules A et B sont les seuls microtubules capables de se prolonger après le squelette filamenteux (Guichard *et al.*, 2010). La distinction centriole père/centriole fils se fait par la présence d'appendices distaux (DAP) et subdistaux (SDAP) ancrés aux microtubules B (Paintrand *et al.*, 1992). Les DAP et SDAP ont deux fonctions distinctes : Les DAP permettent l'ancrage à la membrane tandis que les SDAP permettent le recrutement des acteurs de la ciliogenèse, les rendant tous deux indispensables à cette dernière. Plus précisément, les SDAP sont situés sous les DAP au niveau du centriole père et permettent l'ancrage des microtubules cytoplasmiques au centrosome. Ils sont constitués d'ODF2, de centrioline, ϵ -tubuline, EB1, CEP170 et de la nineine, la protéine d'ancrage des appendices aux microtubules (Chang *et al.*, 2003; Gromley *et al.*, 2003; Guarguaglini *et al.*, 2005; Lange and Gull, 1995; Louie *et al.*, 2004; Mogensen *et al.*, 2000; Nakagawa *et al.*, 2001). Les DAP sont constitués de plusieurs protéines, CEP89/CEP123, SCLT1, CEP164 et FBF1, qui s'assemblent autour de la protéine CEP83. Les protéines CEP83, FBF1 et CEP164 sont les trois composantes des appendices distaux, créant la liaison avec la membrane cellulaire via leur interaction avec RAB8, IFT54 et IFT20 (cf [Figure 5: Structure du corps basal](#)). D'autres protéines sont nécessaires à l'élaboration des DAP, telles que OFD1 et C2CD3, deux constituants de l'extrémité distale des centrioles qui régulent l'élongation, sans pour autant y

être localisées, tout comme ODF2, composant des SDAP (Singla *et al.*, 2010; Tateishi *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2014). Une fois la ciliogenèse accomplie, les DAP prennent alors le nom de fibres de transition. Les fibres de transition jouent un rôle primordial dans le contrôle et la sélection des protéines ciliaires, et dans la mise en place de la machinerie nécessaire au transport protéique dans le cil, notamment en servant de base pour l'ancrage des protéines du transport intra-flagellaire (IFT) aux microtubules (Wei *et al.*, 2013, 2015).

A l'image des DAP, on retrouve à l'extrémité opposée des centrioles, l'extrémité proximale, une structure importante pour l'ancrage du corps basal, les racines ciliaires. Les racines ciliaires ont pour rôle principal, au sein des cellules non ciliées, de relier physiquement les deux centrioles afin de maintenir l'intégrité du centrosome. De façon intéressante, elles ne sont pas nécessaires à la ciliogenèse ni aux fonctions du corps basal. En revanche, elles confèrent à la base du cil une grande stabilité, essentielle à leur viabilité à long terme, en s'associant aux filaments intermédiaires et au cytosquelette d'actine (Lemullos *et al.*, 1987; Yang *et al.*, 2006). Moléculairement, elles sont constituées majoritairement de la protéine rootletine, qui par ses domaines coiled-coil forme des homodimères permettant la polymérisation en protofilaments des racines ciliaires (Yang *et al.*, 2002).

Outre son rôle ciliaire, le centrosome est également un acteur majeur de la régulation de la division ou de l'orientation lors de la mobilité cellulaire, notamment par sa capacité de liaison aux microtubules. Cette omniprésence du centrosome dans de nombreux processus cellulaires primordiaux relatifs à la liaison microtubulaire a donné lieu au nom de MTOC (centre de nucléation et d'ancrage des microtubules) (Kellogg *et al.*, 1994).

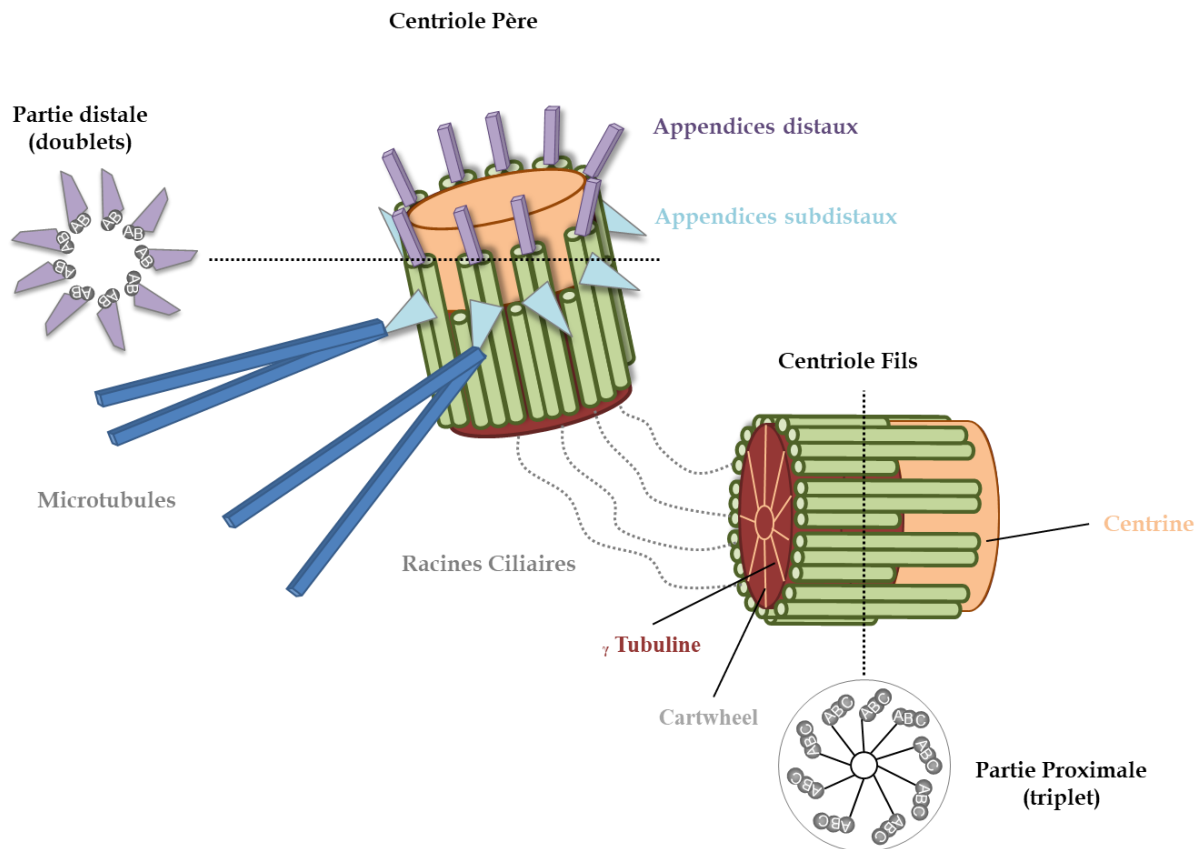


Figure 5: Structure du corps basal

Le corps basal est composé de 2 centrioles perpendiculaires l'un à l'autre et reliés par les racines ciliaires. La partie proximale des centrioles est formée de triplets de microtubules tandis que la partie distale ne contient plus le microtubule C, et est donc formée de doublets. Ces microtubules sont assemblés autour d'une structure stable nommée cartwheel. La centrine est un marqueur spécifique de la partie distale des centrioles tandis que la γ -tubuline marque la partie proximale.

II.1.2. L'axonème

L'axonème du cil primaire se développe à partir du centriole père du corps basal, préalablement ancré à la membrane plasmique. Les microtubules A et B du centriole vont alors croître au-delà du squelette du centriole en étendant ainsi la membrane cellulaire. Ces microtubules A et B vont s'organiser pour former le cytosquelette du cil sous forme de doublets stables disposés en cercle formant une architecture 9+0. Il est intéressant de noter que cette organisation demeure la même pour les cils motiles, mais que les microtubules périphériques sont organisés autour d'un doublet central formant une architecture 9+2, reliés tous ensemble à la base du cil au niveau de la zone de transition (cf La zone de transition (TZ) (Gilula and Satir, 1972). Les microtubules de l'axonème sont polarisés et construits à partir d'hétérodimères d'alpha et β -tubuline. La base du cil correspond donc à leur extrémité négative, apportant au cil sa stabilité et un ancrage solide à la cellule, tandis que c'est par l'extrémité positive que la croissance se développe, donnant à cette région son dynamisme

puisque rythmée par les catastrophes (Rosenbaum and Child, 1967). Encore une fois, comme pour les autres microtubules cellulaires, la tubuline ciliaire est aussi soumise à diverses modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation (L'Hernault and Rosenbaum, 1985), la détyrosination (Stephens, 1992), la polyglycation (Xia *et al.*, 2000) ou la polyglutamylation (Fouquet *et al.*, 1994; Plessmann and Weber, 1997). L'acétylation des microtubules du cil primaire est d'ailleurs utilisée comme marqueur du cil en immunofluorescence. Cette architecture de l'axonème forme le squelette du cil primaire, autour duquel s'organisent et s'associent, de manière précise et contrôlée des complexes protéiques et lipidiques différents du reste de la cellule, permettant la segmentation fonctionnelle de l'axonème. On retrouve notamment deux segments prédominants, la zone de transition (TZ) faisant lien entre le centriole père et l'axonème, et le compartiment inversine (CI) situé juste à la suite de la TZ (cf [Figure 7: Structure et fonctionnement du cil primaire](#)).

II.1.2.1. La zone de transition (TZ)

La TZ est un domaine spécialisé présent à la base de l'axonème, et caractérisé par des projections en forme de Y qui relient les microtubules axonémaux à la membrane ciliaire. Décrite en 1972 et requise pour la compartimentalisation du cil, la TZ forme une barrière de filtration protéique régulant la composition des protéines ciliaires, et est associée aux fibres de transition délimitant le compartiment ciliaire du reste de la cellule (Chih *et al.*, 2012; Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011; Gilula and Satir, 1972; Hu and Nelson, 2011; Hu *et al.*, 2010; Sang *et al.*, 2011a).

La TZ est composée de plusieurs modules protéiques : le module NPHP (NPHP1/NPHP4/NPHP8) composé des protéines majoritairement altérées dans la NPH isolée, d'abord décrit chez *C. elegans* puis dans les cils des cellules tubulaires rénales (Arts *et al.*, 2007; Delous *et al.*, 2007; Fliegauf *et al.*, 2006; Schermer *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2011; Winkelbauer *et al.*, 2005), le module CEP290/NPHP6 et NPHP5 permettant notamment via CEP290 de faire le lien avec les autres modules, ce dernier étant retrouvé le long de l'axonème, au niveau des fibres de transitions et du corps basal (Hong *et al.*, 2003; Otto *et al.*, 2005; Sang *et al.*, 2011a; Sayer *et al.*, 2006; Schäfer *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2015) et enfin, le module MKS, composé d'une quinzaine de protéines dont les mutations entraînent un syndrome de MKS (Chih *et al.*, 2012; Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011; Sang *et al.*, 2011a). Le rôle de chacune de ces protéines au sein de la TZ de *Chlamydomonas reinhardtii* a été étudié par l'inactivation alternative des différents composants. Il a ainsi été montré qu'en l'absence de

protéines de la TZ, la composition protéique ciliaire est altérée, mais aussi que l'ancrage à la membrane notamment médié par CEP290 et NPHP4 est défectueux (Awata *et al.*, 2014; Craige *et al.*, 2010; Jauregui *et al.*, 2008). Bien que la localisation des modules NPHP et MKS ne dépende pas de l'un ou l'autre module (Jensen *et al.*, 2015; Williams *et al.*, 2011), la délétion de la protéine MKS5 chez *C.Elegans* (homologue de NPHP8/RPGRIP1L), induit une délocalisation des deux modules au niveau de la TZ, suggérant un rôle structural de protéine d'échafaudage (Huang *et al.*, 2011a; Jensen *et al.*, 2015; Roberson *et al.*, 2015; Williams *et al.*, 2011).

Le rôle de la TZ de contrôle de la composition protéique du cil est à double sens, elle favorise l'entrée de certaines protéines et en filtre d'autres. Ainsi, en absence du complexe MKS, plusieurs protéines membranaires telles que ARL13B, PKD2, GPR161 ou encore *smoothed* (SMO) ne s'accumule pas à la membrane ciliaire (Chih *et al.*, 2012; Dowdle *et al.*, 2011; Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011; Roberson *et al.*, 2015; Sang *et al.*, 2011a; Yee *et al.*, 2015) induisant des défauts de signalisation ciliaire (cf La voie Hedgehog) (Sang *et al.*, 2011a; Williams *et al.*, 2011). De plus, les protéines membranaires des protéines du plasma sont également contrôlée, par exemple l'absence de composants du complexe MKS, comme TCTN-1 entraîne l'entrée inadéquate de protéine normalement exclue du cil chez *C.Elegans* (Williams *et al.*, 2011; Yee *et al.*, 2015). De façon similaire chez les mammifères, la déplétion du complexe MKS entraîne l'entrée ciliaire de protéine de fusion telle que la GFP-CEACAM1 normalement exclue du cil (Chih *et al.*, 2012). Bien que le mécanisme de filtration ne soit pas totalement expliqué, il semble que le poids moléculaire joue un rôle important dans cette dernière puisque les protéines ou le dextran de moins de 70kDa ne sont pas retenus par la barrière de filtration à l'entrée du cil (Awata *et al.*, 2014; Breslow *et al.*, 2013; Calvert *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2013; Najafi *et al.*, 2012).

Enfin il semble important de noter que pour le contrôle de la composition ciliaire la TZ pourrait ne pas agir seule. En effet des études ont montré que chez *C.Elegans*, les complexes NPHP et MKS interagissent génétiquement avec les composant du BBSome (cf La voie Hedgehog) suggérant une interaction fonctionnelle entre les deux complexes pour le contrôle de la ciliogenèse, de trafic et de la signalisation ciliaire (Yee *et al.*, 2015). De plus bien que parfaitement définit et délimitée dans sa structure et sa fonction, la TZ maintient des interactions avec le reste des compartiments ciliaires, notamment le CI.

II.1.2.2. Le compartiment Inversine

Le compartiment inversine (CI) se positionne de façon plus distale par rapport à la TZ, et se limite environ à la moitié de l'axonème. Il ne possède pas de projections en forme de Y et présente une composition protéique différente de la TZ (Shiba *et al.*, 2009). Son nom lui vient de la protéine Inversine/NPHP2/INVS qui y est localisée et définit à elle seule la répartition du compartiment et ce indépendamment de la longueur du cil (Morgan *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2003). Outre NPHP2, le CI est aussi composé de trois autres protéines, NPHP3, NEK8/NPHP9 et ANKS6/NPHP16 (Hoff *et al.*, 2013; Sang *et al.*, 2011a; Shiba *et al.*, 2010). L'INVS est nécessaire à la localisation de ses partenaires NEK8, NPHP3 et ANKS6 au CI, et ne nécessite aucune autre protéine pour y être elle-même (Shiba *et al.*, 2010). Cependant, l'INVS n'est pas suffisante pour la localisation et l'activation des composants du CI. En effet, c'est la liaison d'ANKS6 à la protéine NEK8 qui permet non seulement de localiser ANKS6 au CI mais aussi d'activer l'activité kinase de NEK8, dont l'un des substrats n'est autre que ANKS6 elle-même (Czarnecki *et al.*, 2015). Il s'exerce ainsi une relation d'interdépendance entre les protéines du CI pour aboutir à un compartiment fonctionnel. Cette relation d'interdépendance a été confirmée récemment via l'étude d'un mutant NPHP3, ne pouvant plus être adressé au cil par un défaut d'adressage (Nakajima *et al.*, 2018). Bien que ce mutant n'impacte pas la localisation ciliaire de NEK8 ou INVS, il altère la phosphorylation d'ANKS6 (Nakajima *et al.*, 2018), phosphorylation qui permet la transduction d'ANKS6 du cilioplasme vers le cytoplasme. Ainsi la balance d'ANKS6 ciliaire et cytoplasmique semble agir comme un messenger de la signalisation ciliaire faisant le lien entre le cil et le cytoplasme dans la régulation de la morphogénèse rénale (Nakajima *et al.*, 2018).

De façon intéressante, toutes les mutations de gènes codant pour des protéines du CI entraînent des phénotypes sévères et relativement similaires avec notamment une NPH infantile ou des dysplasies multikystiques sévères accompagnée d'un *situs inversus* et d'anomalies cardiaques voire hépatiques (Bergmann *et al.*, 2008; Grampa *et al.*, 2016; Hoff *et al.*, 2013; Olbrich *et al.*, 2003; Taskiran *et al.*, 2014). Bien que les protéines du CI ont été fortement étudiées séparément ou en tant que complexe, le rôle exacte du compartiment reste assez flou. Cependant, certaines études tendent à montrer un rôle important des composants du CI dans le maintien de la signalisation cellulaire induite par le cil, telle que la voie calcique via la régulation des polycystines 1/2 (PC1/2). En effet, NEK8 interagit avec la protéine PC1 et induit la phosphorylation de la protéine PC2, requise pour la signalisation

calcique dépendante du cil (cf La voie Wnt) (Otto *et al.*, 2008a; Sohara *et al.*, 2008). Par ailleurs, les souris polykystiques *Jck*, porteuses d'une mutation homozygote de *Nek8*, présentent une expression accrue de *Pkd1/Pkd2* au niveau ARN, entraînant une accumulation des protéines PC1 et PC2 au niveau du cil (Sohara *et al.*, 2008). Ces résultats indiquent que NEK8 et possiblement le CI contrôlent l'expression et la localisation au cil de GPCRs nécessaires à la signalisation ciliaire.

Le rôle de l'INVS est plus controversé. L'INVS a été rapportée pour interagir avec Dishevelled (Dvl) et à la fois activer la voie Wnt PCP (planar Cell Polarity) et inhiber la voie Wnt canonique en adressant Dvl au protéasome (Simons *et al.*, 2005). D'autres composants du CI, tel que NPHP3, ont également été décrit pour réguler négativement la voie Wnt canonique via Dvl (Bergmann *et al.*, 2008). Toujours en termes de signalisation ciliaire, INVS interagit avec la forme phosphorylée de la kinase sérine-thréonine AKT au niveau du cros basal. AKT est capable de phosphoryler la protéine INVS facilitant alors son interaction et la dimérisation d'INVS. L'inhibition de ce mécanisme inhibe la croissance cellulaire et entraîne des désalignements des fuseaux mitotiques (Suizu *et al.*, 2016). Il est important de noter que la localisation extrêmement dynamique de la protéine INVS avec notamment au cil, au corps basal, au noyau, aux jonctions cellulaires dans les cellules en interphase ou encore aux pôles du fuseau mitotique en anaphase, ne facilite pas la compréhension de son rôle ciliaire et non ciliaire dans les mécanismes cellulaires (Morgan *et al.*, 2002; Nürnberger *et al.*, 2002, 2004).

Désormais, il apparaît que le rôle de l'INVS dans l'échaffaudage du CI soit primordial (à l'instar de NPHP4 ou RPGRIP1L pour la TZ). En effet, le phénotype induit par l'absence de INVS chez le poisson zèbre serait dû à l'absence de NEK8 au cil. Le sauvetage phénotypique des poissons zèbre mutés pour l'INVS par l'injection d'ARNm de NEK8, confirme le rôle de NEK8 en aval de l'INVS (Fukui *et al.*, 2012). Ce rôle structural de INVS est renforcé par sa capacité à interagir avec les protéines des différents modules de la TZ notamment NPHP1 et NPHP4 (module NPHP) ainsi que IQCB1/NPHP5 (module CEP290), même si la localisation des protéines de la TZ ne semble pas être régulée par l'INVS et vice et versa (Mollet *et al.*, 2005; Olbrich *et al.*, 2003; Otto *et al.*, 2003; Sang *et al.*, 2011a; Warburton-Pitt *et al.*, 2014; Yakulov *et al.*, 2015a). Le dynamisme important dont fait preuve la protéine INVS dont le recyclage est très rapide va cependant à l'encontre de ce rôle uniquement structural laissant penser que INVS pourrait avoir un rôle bien plus complexe (Shiba *et al.*, 2009).

II.2. La ciliogenèse

La ciliogenèse, de cil et genèse (formation) correspond à l'étape durant laquelle le cil tel qu'il est connu se met en place ; sous-entendant de l'ancrage du centriole père à la membrane jusqu'à la mise en place du recyclage du cil en passant par l'apport de tous les constituants nécessaires à la structure et la fonction du cil via le transport intraflagellaire, le BBSome et l'exocytose.

II.2.1. L'initiation

L'initiation de la ciliogenèse est la mise en place de tous les acteurs et de toutes les conditions nécessaires à l'élongation. L'étape d'initiation correspond à l'ancrage du centriole père à la membrane. Deux modèles ont été décrits selon le type cellulaire (cf [Figure 6: Biogenèse du cil primaire](#)). Dans les cellules non polarisées, telles que les fibroblastes, l'initiation se fait à l'intérieur du cytoplasme. Plus précisément, le centrosome et les appendices distaux s'associent à une vésicule, dites vésicule ciliaire, elle-même provenant de la fusion de plusieurs petites vésicules via les protéines EHD (Epsin15 Homology Domain) et SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) (Lu *et al.*, 2015). La reconnaissance entre cette vésicule et les appendices distaux est médiée par CEP83, potentiellement associée à IFT20 et RAB8 (Follit *et al.*, 2006; Joo *et al.*, 2013; Peränen, 2011). Le rôle conjoint de ces trois protéines permet la fusion de la vésicule ciliaire aux appendices distaux mais aussi au transport de la vésicule jusqu'à ces derniers. Par la suite, la croissance des microtubules à partir du centriole père (cf Le corps basal) pousse la vésicule contre la membrane plasmique avec laquelle elle fusionne pour libérer le cil dans le milieu extracellulaire (Ghossoub *et al.*, 2011; Sorokin, 1968). C'est cette étape qui crée la poche ciliaire, une invagination membranaire, vestige de la vésicule ciliaire et particularité des cils des cellules non polarisées (SOROKIN, 1962; Sorokin, 1968). En plus de son rôle dans le trafic vésiculaire via son interface avec le cytosquelette d'actine, la poche ciliaire serait impliquée dans l'activité endocytaire et l'exocytaire au niveau du cil (Ghossoub *et al.*, 2011). Le centrosome restant proche du noyau, que se soit avant ou après la fusion avec la vésicule ciliaire, le cil se retrouve en partie "enfoncé dans la cellule" et non à la surface (cf [Figure 6: Biogenèse du cil primaire](#)).

Dans les cellules ciliées polarisées, telles que les cellules tubulaires rénales, les cils sont à la surface de la cellule. Dans ce modèle il n'existe pas de poche ciliaire, mais un transport du

centrosome au plus près de la membrane plasmique, où les appendices distaux fusionnent directement avec cette dernière (cf [Figure 6: Biogenèse du cil primaire](#)).

Les protéines des appendices distaux, principalement CEP89, SCLT1, FBF1 et CEP164 sont recrutées lors de leur assemblage par CEP83 (Tanos *et al.*, 2013) et jouent un rôle indispensable dans l'initiation de la ciliogénèse. Leur rôle précis lors des différentes étapes a été étudié et montre une place prépondérante de CEP164 et ODF2, notamment nécessaire à l'ancrage à la membrane. Ceci explique que la plupart des gènes codant pour les constituants des appendices distaux sont retrouvés mutés dans les ciliopathies. Leur mutations entraînent des défauts de ciliogénèse et des phénotypes cliniques sévères avec des NPH infantiles et des anomalies cérébrales pour CEP83/NPHP18 (Failler *et al.*, 2014), CEP164/NPHP15 (Chaki *et al.*, 2012) et SCLT1 (Adly *et al.*, 2014).

On notera également l'importance de la protéine CP110, distincte des DAP, considérée comme la coiffe du centriole père et qui inhibe par sa présence la polymérisation des microtubules (Graser *et al.*, 2007; Oda *et al.*, 2014; Schmidt *et al.*, 2012). La présence ou l'absence de CP110 associée à CEP97 au niveau du centriole père, sous le contrôle de la protéine KIF24, est un facteur clé de l'initiation de la ciliogénèse. Ce processus, régulé par le cycle cellulaire, sera détaillé dans la suite du manuscrit.

Enfin, et valable pour les 2 modèles, il existe autour des centrioles nombre de protéines regroupées sous le nom de matériel péricentriolaire (Tollenaere *et al.*, 2015). Leur fonction dans l'initiation et formation du cil a été mise en évidence. C'est le cas entre autre de la protéine péri centriolaire-1 (PCM-1). PCM-1 interagit avec CEP290 et en permet la localisation aux centrioles et des satellites. Ensemble PCM-1 et CEP290 sont indispensables à la localisation au corps basal et au cil de RAB8, elle-même indispensable à la fusion des appendices distaux et de la vésicule ciliaire comme déjà évoqué (Kim *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2014).

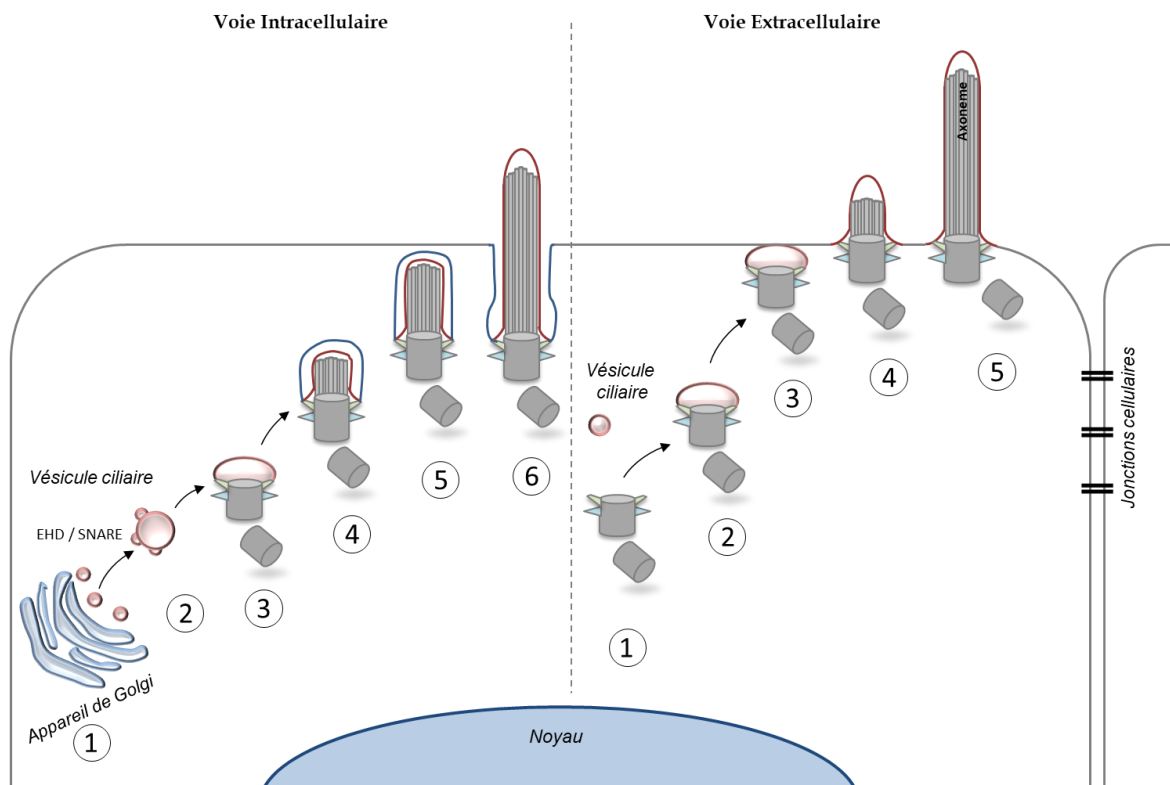


Figure 6: Biogenèse du cil primaire

La voie intraciliaire présente la formation des cils primaires issus de cellules non polarisées (fibroblastes) tandis que la voie extraciliaire présente la formation des cils primaires dans les cellules polarisées épithéliales. Ces deux voies de biogenèse du cil ont en commun la présence d'une vésicule ciliaire.

II.2.2. Le transport intraflagellaire

II.2.2.1. Le transport IFT

Du fait de l'absence de traduction protéique au sein du cil, un transport intraflagellaire ou IFT dynamique est nécessaire aussi bien pour l'apport de protéines essentielles à l'échafaudage de la structure du cil ainsi que son recyclage, que pour l'apport de protéines nécessaires à la fonction du cil notamment à la transduction du signal (Morga and Bastin, 2013; Pedersen and Rosenbaum, 2008). Le fait de parler de renouvellement sous-entend un transport bidirectionnel des protéines au sein du cil. Ainsi le transport intraflagellaire comprend un transport de cargos protéiques de la base vers l'extrémité distale du cil (transport antérograde) et un transport depuis l'extrémité distale vers la base du cil (transport rétrograde). Initialement découvert dans les flagelles de *Chlamydomonas* (Kozminski *et al.*, 1993, 1995), le transport IFT a été longtemps confiné à cet organisme avant d'être observé chez *C.elegans* (Signor *et al.*, 1999), dans le flagelle de *Trypanosoma brucei* (Absalon *et al.*, 2008) et dans les cils primaires des cellules tubulaires rénales de la souris (Tran *et al.*, 2008a), démontrant son rôle indispensable conservé au cours de l'évolution.

L'IFT est induit par des complexes protéiques, associés à des moteurs moléculaires (kinésine et dynéine).

Ce mécanisme complexe est organisé et hiérarchisé principalement autour de deux modules, les IFTA et IFTB (Piperno and Mead, 1997). Ces deux modules sont associés à des moteurs moléculaires afin de permettre un transport actif au sein du cil. Ainsi on distingue deux moteurs différents, un moteur antérograde de la famille des kinésines-II associé au complexe IFTB et un moteur rétrograde formé de la dynéine-2 associé au complexe IFTA. Le moteur antérograde est en réalité un complexe hétérotrimérique formé de KIF3A et KIF3B, les sous unités motrices et de la Kinésine associated Protein (KAP), la sous unité non motrices. Il est intéressant de noter que l'absence de la protéine KIF3A chez la souris ou de ses orthologues chez la drosophile ou *Chlamydomonas* entraîne systématiquement des altérations de l'assemblage du cil suggérant l'implication des Kinésines-II dans tous les systèmes ciliaires (Kozminski *et al.*, 1995; Marszalek *et al.*, 1999; Morris and Scholey, 1997; Nonaka *et al.*, 1998; Sarpal *et al.*, 2003; Scholey *et al.*, 2004). Le moteur impliqué dans le transport rétrograde, la dynéine 2 est formée de plusieurs sous unités, notamment une chaîne lourde DHC1b, de deux chaînes intermédiaires WDR34 et WDR60 et de deux chaînes légères TCTEX-1 et TCTEX1D2 (Asante *et al.*, 2014; Huangfu and Anderson, 2005; Huber *et al.*, 2013; May *et al.*, 2005; McInerney-Leo *et al.*, 2013; Palmer *et al.*, 2011). L'invalidation chez les mammifères de la chaîne lourde de la dynéine 2 entraîne un élargissement de la partie distale du cil du à l'accumulation de matériel (Huangfu and Anderson, 2005). De façon similaire l'invalidation des deux chaînes légères entraîne un allongement des cils (Asante *et al.*, 2014 ; Palmer *et al.*, 2011).

Le complexe IFTB, composé de 16 protéines, IFT20, IFT22, IFT25, IFT27, IFT38, IFT46, IFT52, IFT54, IFT56, IFT57, IFT70, IFT74, IFT80, IFT81, IFT88 et IFT172 permet en association avec la kinésine-II le transport antérograde (Kozminski *et al.*, 1995; Marszalek *et al.*, 1999; Morris and Scholey, 1997; Nonaka *et al.*, 1998; Sarpal *et al.*, 2003; Scholey *et al.*, 2004) quand Le complexe IFTA lui est composé de 6 protéines, IFT43, IFT121, IFT122, IFT139, IFT140 et IFT144 et associé à la dynéine 2 permet le transport rétrograde (Pedersen and Rosenbaum, 2008; Taschner and Lorentzen, 2016). Logiquement les deux complexes sont interdépendants, le complexe IFTB permet l'entrée du complexe IFTA au sein du cil pendant que ce dernier permet le recyclage du complexe IFTB de l'extrémité apicale du cil vers le cytoplasme (Absalon *et al.*, 2008; Efimenko *et al.*, 2006; Iomini *et al.*, 2001, 2009; Tran *et al.*, 2008a; Tsao and Gorovsky, 2008). Il se par ces transports un équilibre entre l'entrée et la sortie, entre

assemblage des microtubules par apport de tubuline et désassemblage des microtubules de façon active (Marshall and Rosenbaum, 2001; Song and Dentler, 2001; Stephens, 1997). Ainsi, quand l'inactivation du complexe IFTB entraîne des cils plus courts voire la perte totale de ciliogénèse, l'inactivation du complexe IFTA entraîne une accumulation de matériel à l'extrémité apical du cil lui conférant une extrémité ciliaire en forme de "cuillère" dénommée en anglais "spoon shape" (Brazelton *et al.*, 2001; Deane *et al.*, 2001; Follit *et al.*, 2006; Fujiwara *et al.*, 1999; Haycraft *et al.*, 2003; Huangfu *et al.*, 2003; Pazour *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 2007).

Il a de plus été retrouvé plusieurs mutations dans les gènes codant des composants du complexe IFTA causant des ciliopathies principalement avec anomalies du squelette comme des syndromes de Sensenbrenner et de Jeune, mais également des NPH isolées (IFT144). De façon intéressante, des mutations humaines ont été rapportées dans seulement 6 des 14 gènes codants des composants du complexe IFTB (IFT27, IFT52, IFT80, IFT81 IFT172 et IFT54) suggérant un effet sévère des mutations IFTB, non compatible avec la vie, du fait de l'absence totale de formation de cils. (Arts *et al.*, 2011; Beales *et al.*, 2007; Bizet *et al.*, 2015; Cong *et al.*, 2014; Duran *et al.*, 2017; Halbritter *et al.*, 2013a; Perrault *et al.*, 2012; Walczak-Sztulpa *et al.*, 2010).

Enfin, on notera au niveau du corps basal, la présence d'un complexe protéique, CPLANE (Ciliogenesis et Planar polarity Effectors) récemment été caractérisé et formé par FUZ, RSG1 et les trois protéines OFD, INTU, WDPCP et C5orf42, a. C5orf42 est l'ancre de ce complexe et régule la hiérarchie des composants de CPLANE. Le complexe CPLANE interagit avec le complexe IFT-A et a été montré déterminant pour le recrutement des protéines périphériques des IFT-A (IFT144, IFT43, IFT121 et IFT139) et leur pré-assemblage cytosolique. De façon intéressante, l'inhibition de CPLANE affecte le transport intraflagellaire et induit un raccourcissement des cils. Les mutations des gènes de CPLANE provoquent l'apparition de syndromes oraux-faciaux-digitaux (Bruel *et al.*, 2017; Toriyama *et al.*, 2016).

II.2.2.2. Le BBSome

Plusieurs protéines d'un même complexe et pouvant participer au transport intraflagellaire ont été identifiées comme interagissant avec les protéines de l'IFT, les protéines du BBSome dont les gènes sont mutés dans le syndrome de Bardet-Biedl (Ansley *et al.*, 2003; Blacque *et al.*, 2004; Myktyyn *et al.*, 2004). Ce complexe est formé d'un cœur de 3 protéines BBS, BBS2, BBS7, BBS9 stabilisé par la liaison à BBS7 de 3 sous-unités, BBS6, BBS10 et BBS12.

Autour s'ajoute les protéines BBS1, BBS4, BBS5 et BBS8 (Nachury et al., 2007; Zhang et al., 2012b). A ce complexe central s'ajoute d'autres acteurs comme BBIP10 recruté par BBS4 pour acétyler les microtubules ciliaires ou aussi BBS3 (GTPase ARL6) acteur principal du BBSome pour son interaction à la membrane ciliaire permettant l'entrée du BBSome au cil mais aussi son interaction avec les cargos ciliaire (Jin et al., 2010; Mourão et al., 2014).

De façon intéressante, l'altération du BBSome ou de la fonction de la GTPase ARL6 entraîne la perte de localisation ciliaire des GPCRs (Recepteurs couplés aux protéines G) Somatostatin Receptor 3 (SSTR3) et Melanocortin Concentrating Hormone Receptor 1 (MCHR1) (10 29 30). De façon similaire, l'inactivation du BBSome conduit également à une diminution de la localisation ciliaire des protéines Polycystine-1 (PC1) et Smoothed (Smo) (Klink et al., 2017; Seo et al., 2011; Su et al., 2014). La découverte par Jin et al., 2010 de l'interaction directe entre le BBSome et SSTR3 a permis de faire le premier lien entre le BBSome et l'import ciliaire de protéines. De façon surprenante, l'accumulation de Smo dans les cellules non stimulées par un agoniste de la voie a été démontrée dans les cellules déplétées pour la dynéine-2 mais également pour le BBSome ou ARL6, suggérant également un rôle du BBSome dans le recyclage des protéines à partir du cil (Liew et al., 2014; Ocbina and Anderson, 2008; Zhang et al., 2011). Ainsi, en plus d'être nécessaire à l'import de protéine dans le cil, le BBSome est nécessaire à la sortie de protéines depuis le cilioplasme. C'est le cas des protéines DRD1, SSTR3, GPR161 et du récepteur de la voie Hedgehog Patched 1 (Domire et al., 2011; Liew et al., 2014; Nager et al., 2017; Ye et al., 2018; Yee et al., 2015; Zhang et al., 2012b).

Enfin, un nouveau modèle de sortie des protéines ciliaires du cil impliquant le BBSome a émergé. En effet, l'imagerie en temps réelle a démontré que les GPCRs activées qui ne sont pas sorties du cil primaire par le BBSome sont pris en charge par une machinerie qui vise à les exclure du cil après avoir été pris en charge par des vésicules extracellulaire se formant/s'invagineant à la pointe du cil. Ce processus est connu sous le nom d'exocytose (Nager et al., 2017), est permis par . Bien que l'exocytose soit un processus régulé et que l'encapsidation des récepteurs par les vésicules soit spécifiques, les protéines de la membrane ciliaire qui ne sont pas des recepteurs sont elles aussi impliquées entraînant des pertes non spécifiques de protéines ciliaires. Ainsi on peut imaginer que les défauts de localisation ciliaire de récepteurs chez les mutants du BBSome puissent être dus à une exocytose accrue plutôt qu'à un défaut d'import.

Le premier lien entre le syndrome de Bardet-Biedl et des défauts de cil primaires a été fait suite à l'identification de mutations dans le gène *BBS8* (Ansley et al., 2003). Depuis 22 gènes ont été identifiés responsables de la pathologie dont les mutations entraînent des phénotypes au spectre étroit suggérant l'implication dans la même voie de signalisation, regroupant cependant une large gamme de manifestations cliniques: atteinte oculaire, polydactylie, atteinte rénale, obésité, hypogonadisme ect..(Weihbrecht et al., 2017).

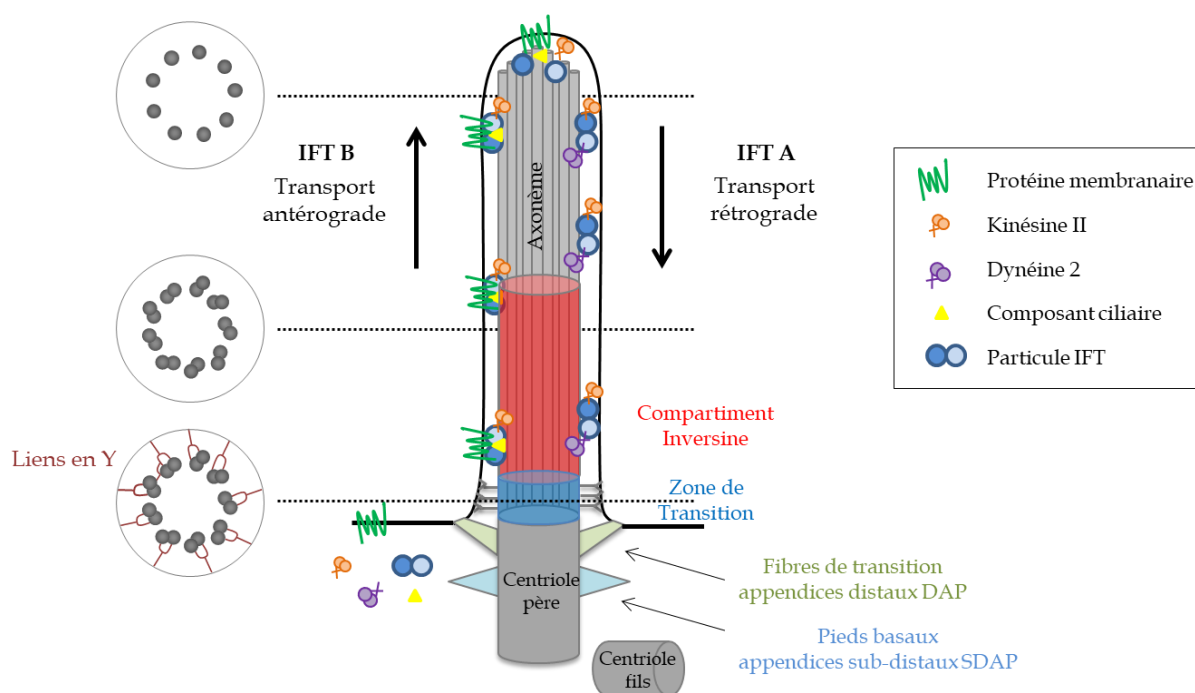


Figure 7: Structure et fonctionnement du cil primaire

Le cil primaire est composé de 3 principaux segments, la zone de transition (bleue), le compartiment Inversine (rouge) et l'axonème (gris). Le cil primaire s'assemble autour de 9 doublets de microtubules périphériques et sans doublet centraux (9+0) comme le montre les sections du schéma. Le microtubules sont reliés à la membrane ciliaire au niveau de la zone de transition par des fibres en Y formant une barrière sélective (bordeaux). Le transport de cargo au sein de l'axonème est réalisé par les particules IFT utilisant le moteur kinésine II de façon entérograde et le moteur dynéine 2 de façon rétrograde.

II.2.3. La régulation

La formation et la résorption du cil, que ce soit en condition physiologique, pathologique ou en réponse à un stress démontre une fois encore le dynamisme et l'importance de cet organel. Ainsi pour pouvoir répondre à ces conditions, toute la machinerie, de transport, mais aussi de construction du cil nécessite une fine régulation temporelle et spatiale. De ce fait, le cil primaire se développe uniquement dans les cellules quiescentes en phase G0 du cycle cellulaire, indiquant un lien entre cil primaire et cycle cellulaire. Ce lien est particulièrement compréhensible lorsque l'on sait que le corps basal, ou centrosome, est nécessaire à l'ancrage du cil et donc à la ciliogénèse (cf L'initiation), est aussi

indispensable à l'établissement du fuseau mitotique durant la division cellulaire (Pan and Snell, 2007). Plus que le cycle cellulaire, 3 autres processus cellulaires ont récemment été mis en avant dans la régulation de la ciliogenèse : l'influence du cytosquelette d'actine, l'homéostasie protéique et enfin la réponse aux signaux environnementaux via le cil.

II.2.3.1. Cycle cellulaire et cil

Le cil primaire est présent durant les phases G0 et G1 précoce, pour être ensuite désassemblé durant la phase G1/S ou résorbé durant la phase G2/M.

Tout d'abord, le cycle cellulaire et la division cellulaire correspond aussi à l'amplification du centrosome et sa division. Le centriole père s'ancre à la membrane pour former un cil primaire, en phase G0, tandis que le centriole fils bien que toujours lié au centriole père est immature. Lors de la duplication de l'ADN, en phase S/G2, les centrioles père et fils se dupliquent donnant lieu à un nouveau centriole fils pour former deux centrosomes. Juste avant la mitose, phase M, le cil est résorbé et les deux centrosomes deviennent chacun un MTOC (Ke and Yang, 2014). Ces deux centrosomes se positionnent à chaque extrémité du fuseau mitotique durant la mitose et sont séparés pour donner à chaque cellule fille un centrosome avec deux centrioles. Chaque cellule fille peut alors entrer en phase G0/G1 et utilise son centriole père pour former un nouveau cil. L'élongation et la résorption du cil doivent être finement régulées pour être synchrone avec le cycle cellulaire, et vice versa. L'analogie entre la régulation des centrioles/centrosome et la régulation du nombre de chromosomes dans la cellule peut être faite. En effet, le cycle cellulaire correspond avant tout à la duplication et à la division du matériel génétique entre deux cellules filles, il en est de même pour les centrosomes. A l'image des aberrations chromosomiques aux conséquences sévères au niveau cellulaire et de l'organisme, des défauts de duplication du centrosome conduisent à des ciliopathies comme cela peut être le cas pour les mutations *MKS1* et *MKS3* (Peel et al., 2007; Tammachote et al., 2009). Au niveau cellulaire, les défauts de duplication de centrosomes se traduisent par la formation soit d'anomalies du fuseau mitotique pouvant entraîner la formation de cellules aneuploïdes, soit par la présence de plusieurs centrosomes dans une cellule fille conduisant à l'élongation de plusieurs cils, conduisant à des anomalies de signalisation cellulaire et de transmission du signal et une incapacité de la cellule à répondre à son environnement. (Mahjoub and Stearns, 2012).

Il existe une interdépendance entre cil et cycle cellulaire. Le désassemblage du cil nécessaire à la duplication centrosomale est contrôlé par des protéines impliquées dans le cycle cellulaire. Une famille de protéine est particulièrement impliquée dans ce processus, les NIMA (Never in Mitosis A). Cette famille de 11 protéines, NEK1 à NEK11 possède plusieurs membres déjà étudiés pour leur rôle dans le cycle cellulaire, notamment NEK2, NEK6, NEK7 et NEK9 qui contribuent à l'établissement du fuseau mitotique et à la stabilité des microtubules mitotiques tandis que NEK1, NEK10 et NEK11 sont impliquées dans la réponse aux dommages liés à l'ADN (Du et al., 2008; Moniz and Stambolic, 2011; O'Connell et al., 2003; O'regan et al., 2007; Park and Rhee, 2013; Quarmbly and Mahjoub, 2005). Mais l'exemple le plus clair est celui de la protéine NEK8, impliquée dans le cycle cellulaire. Elle est localisée au CI (cf Le compartiment Inversine), et incarne la liaison ciliogénèse/cycle cellulaire. La protéine NEK8 joue un rôle clé dans la voie de signalisation Hippo (cf La voie Hippo) qui consiste en une cascade de phosphorylation réprimant la transcription de gènes favorisant la prolifération et la survie (Edgar, 2006; Justice *et al.*, 1995; Pan, 2007; Xu *et al.*, 1995). La protéine NEK8 a pour rôle de stabiliser YAP et TAZ, deux co-activateurs transcriptionnels, dans le noyau, augmentant ainsi la prolifération cellulaire (Habbig *et al.*, 2011a). Les mutations ou la perte de NEK8 entraînent des ciliopathies sévères et des défauts ciliaires au niveau des cellules rénales (Grampa *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2006; Sohara *et al.*, 2008). NEK1 est aussi un exemple de protéine impliquée dans le cycle cellulaire, régulant la ciliogénèse, mais semble opposé à l'effet de NEK8 (Thiel et al., 2011; White and Quarmbly, 2008). Enfin la dernière NIMA que l'on évoquera ici est la protéine NEK2. NEK2 est impliquée dans le désassemblage du cil. Pour se faire, NEK2 active par phosphorylation sa cible, KIF24, qui est ensuite dans la mesure de stabiliser la protéine CP110 à l'extrémité apicale du centriole père (cf Le corps basal). De ce fait, l'inhibition de KIF24 (ou de NEK2) va entraîner une déstabilisation de CP110 et donc une ciliogénèse aberrante, y compris dans les cellules en cycle (Izawa *et al.*, 2015). Inversement, une surexpression de KIF24 va inhiber toute ciliogénèse en maintenant CP110 aux centrioles (Kim *et al.*, 2015b; Li *et al.*, 2013). NEK2 et CP110 sont liées au cycle cellulaire, par leur niveau d'expression. Il a en effet été démontré que le niveau d'expression de NEK2 est régulé tout au long du cycle cellulaire, avec un faible niveau d'expression durant les phases G0/G1, et une augmentation progressive jusqu'à la phase G2 où elle atteint un fort niveau d'expression pour inhiber la ciliogénèse (Schultz *et al.*, 1994). Il en est de même pour la protéine CP110 qui est la cible du miRNA (cf Voie des miARNs.) miR-129-3p et d'une phosphorylation par une cycline CDK2 l'inactivant lors des phases G2/M et G0/G1, permettant une faible expression protéique et donc une ciliogénèse

normale (Tsang and Dynlacht, 2013) (cf [Figure 8: Régulation de la ciliogenèse par le cycle cellulaire](#)).

Enfin, outre la famille des NIMA, des protéines impliquées dans la stabilité microtubulaire participent à la régulation du cycle cellulaire et la ciliogénèse. C'est notamment le cas de la protéine kinase Aurora A, retrouvée au centrosome, et connue pour son activité de régulation de l'entrée en mitose via l'activation de la cycline B1-Cdk1. HEF1 (Enhancer of Filamentation 1), connue pour son rôle dans le désassemblage du cil, active Aurora A (Pugacheva *et al.*, 2007). par phosphorylation ce qui entrain l'activation de l'histone désacétylase HDAC6 provoquant la désacétylation des microtubules et ainsila résorption du cil (Pugacheva *et al.*, 2007) (cf [Figure 8: Régulation de la ciliogenèse par le cycle cellulaire](#)).

S'il existe une régulation de la ciliogénèse par le cycle cellulaire, la réciproque est vraie. En effet, certaines voies de signalisation ciliaires influencent la régulation du cycle cellulaire. Le premier exemple est celui de *PKD1* et *PKD2* (codant PC1 et PC2) comme gènes suppresseurs de tumeur (régulateur négatif de la prolifération cellulaire). En effet, par leur effet sur l'activation de p21, PC1 et PC2 inhibent la translocation nucléaire du facteur de transcription ID2 et par conséquent la prolifération cellulaire. La surexpression de PC1 et PC2 aura alors pour effet le blocage de la cellule en phase G0/G1 (Irigoín and Badano, 2011). Plusieurs autres exemples sont aussi rapportés dans la littérature comme celui de IFT88 capable d'activer le suppresseur de tumeur Rb qui bloque le cycle cellulaire en phase G1 et donc inhibe la prolifération (Robert *et al.*, 2007). A l'inverse NDE1 (nuclear distribution gene E homologue 1), protéine retrouvée au centrosome, semble favoriser l'entrée en cycle et la transition G1/S (Kim *et al.*, 2011). De façon intéressante, l'inactivation de NDE1 augmente le temps de passage en phase S et la longueur des cils. De plus, l'inactivation simultanée de NDE1 et d'IFT88 restaure le phénotype induit par l'inactivation de NDE1. Il semble donc y avoir une compétition entre les acteurs favorisant le cycle cellulaire et ceux favorisant la ciliogénèse, une interdépendance tendant vers un équilibre finement régulé.

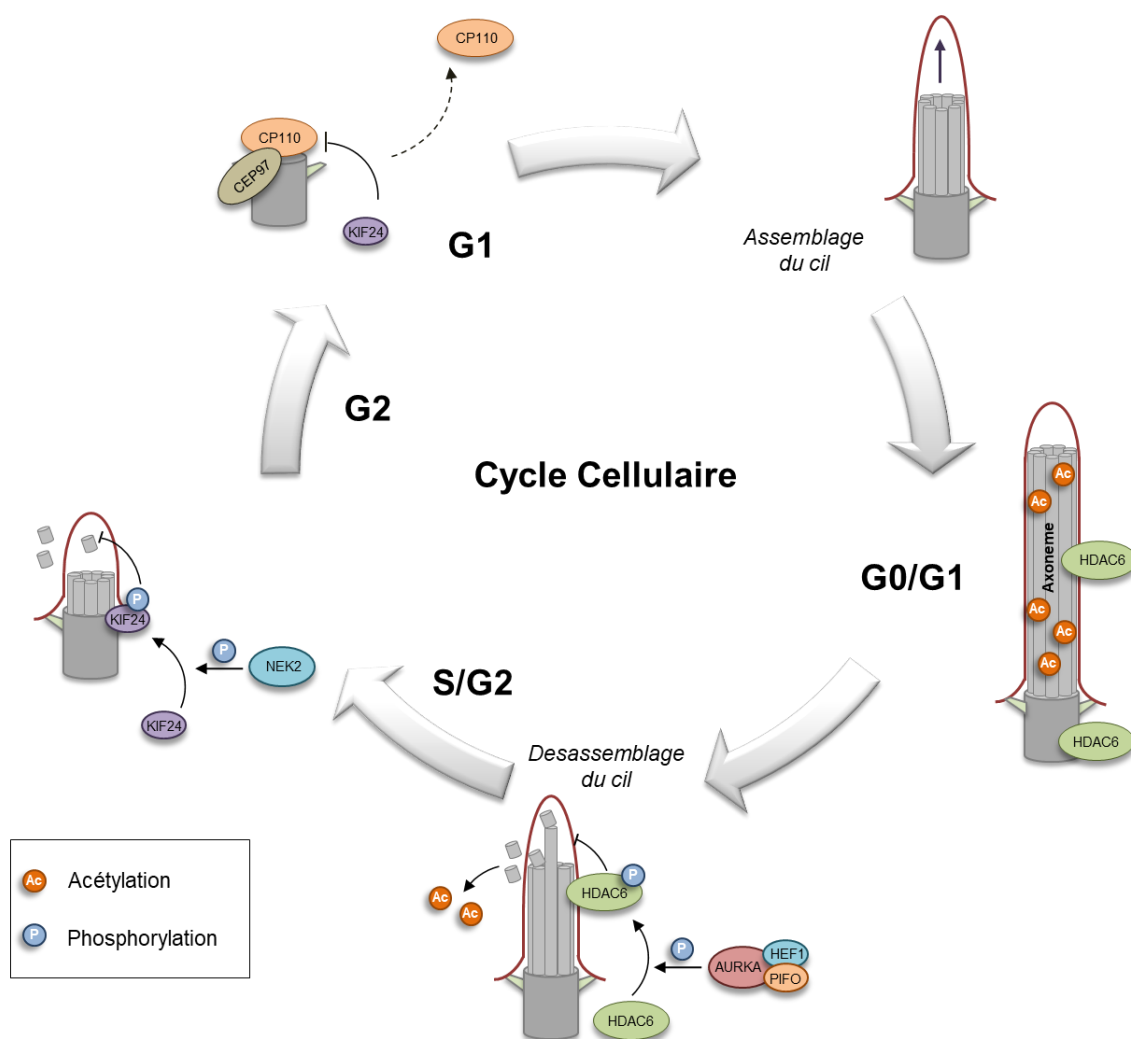


Figure 8: Régulation de la ciliogenèse par le cycle cellulaire

La taille des cils au cours du cycle cellulaire est remarquable par les microtubules (cylindres gris) liés à la membrane ciliaire (ligne rouge). Le centriole père est indiqué par un cylindre gris à la base du cil. La tubuline acétylée stable est indiquée en phase G0 par les groupes acétylés (orange). Les actions de phosphorylation de AURKA et NEK2 sont représentées par le transfert d'un groupe phosphate indiqué par un P (bleu).

II.2.3.2. Cytosquelette et cil

Le cytosquelette d'actine exerce une fonction inhibitrice sur la formation du cil et ce, selon au moins 3 différents mécanismes : l'inhibition du trafic vésiculaire, le contrôle de l'ancrage du corps basal, et la régulation de la polarité apico-basale.

D'abord, le cytosquelette d'actine agit comme une barrière mécanique au mouvement vésiculaire comme le montre l'accumulation de vésicule contenant la protéine SMO au corps basal lors du désassemblage du cytosquelette d'actine (Cao et al., 2012; Kim et al., 2010b, 2015a). Ainsi le cytosquelette d'actine pourrait bloquer le trafic vésiculaire nécessaire à l'activation de l'élongation ciliaire. Il semble également que la polymérisation des filaments d'actine entraîne un désassemblage du cil par l'activation de la voie YAP/TAZ activant elle-

même les protéines Aurora A et HDAC6 précédemment montré comme régulateur négatif de la ciliogenèse (Kim et al., 2014; Zhang et al., 2008).

Ensuite, le centrosome à récemment été démontré comme étant un organisateur du cytosquelette d'actine suggérant ainsi que le cytosquelette d'actine puisse avoir une influence sur l'ancrage du corps basal et donc sur la ciliogenèse (Farina et al., 2016).

Le troisième mécanisme est celui de la régulation de la polarité apicobasale. En effet, le cil primaire est présent dans pratiquement toutes les cellules qui présentent une organisation avec une polarité apico-basale. C'est cette membrane apicale qui est en relation avec la lumière des tubes et autres cavités et donc sujette aux stimuli extérieurs. Bien que le mécanisme par lequel le corps basal reconnaît la polarité reste inexpliqué, il semble qu'elle implique le remodelage du cytosquelette d'actine environnant notamment par la voie des RhoGTPases (Fan et al., 2004; Omori and Malicki, 2006; Park et al., 2008; Yasunaga et al., 2015). Cependant cette dernière régulation est pour l'instant connue uniquement dans les cellules multociliées et reste à démontrer pour le cil primaire.

Enfin, de façon intéressante, la chaîne légère de la dynéine-2, TCTEX-1, impliquée dans le transport rétrograde, active la polymérisation de l'actine suggérant une relation d'interdépendance entre cil et cytosquelette d'actine (Hernandez-Hernandez et al., 2013; Li et al., 2011). D'autres protéines ciliaires notamment des IFT et des NPHP comme NPHP1 régulent également le cytosquelette d'actine.

II.2.3.3. Homéostasie protéique et cil

La viabilité de la cellule dépend de la présence de protéines fonctionnelles dans des quantités appropriées, un équilibre entre la synthèse des protéines et les voies de dégradation. Il existe maintenant des preuves que le cil primaire joue un rôle dans la régulation de l'homéostasie protéique en influençant plusieurs mécanismes clés de maintenance des protéines, dont le système ubiquitine-protéasome (UPS), l'autophagie et la signalisation mTOR. De façon intéressante, la réciproque est également vraie et l'autophagie et le système UPS régule le cil primaire en régulant notamment la dégradation des protéines ciliaires.

L'importance de la dégradation du protéasome dans la ciliogenèse est apparue pour la première fois d'après des études sur *Chlamydomonas*. En effet, pendant le désassemblage des flagelles, l'ubiquitination des protéines flagellaires augmente et les protéines

désassemblées telles que l' α -tubuline et PC2 sont marquées à l'ubiquitine puis transportées vers le cytoplasme (Ub) (Huang et al., 2009). Une étude a démontré que la dégradation protéosomale affecte la stabilité des protéines (par exemple, β -caténine, JAG1, GLI2, GLI3 et SUFU) impliquées dans plusieurs voies de signalisation liées aux cils, notamment Wnt, Notch et Shh (Liu et al., 2014). Il a également été montré que les protéines du cil et du corps basal BBS4 et OFD1, interagissent et colocalisent avec les composants du protéasome à la base des cils. De plus, l'inhibition de la fonction du protéasome augmente de façon significative la longueur des cils. Enfin, plusieurs protéines du protéasome sont trouvées dans les cils, et RPGRIP1L se lie à la sous-unité régulatrice du protéasome Psmd2 (Gerhardt et al., 2015).

L'autophagie est une autre voie qui a récemment été étudiée pour son implication dans la ciliogenèse. En général, elle intervient dans la dégradation non sélective des protéines et organites tels que les mitochondries, les ribosomes et les peroxysomes pour fournir des acides aminés en réponse à des conditions de stress telles que la privation de nutriments (He and Klionsky, 2009; Khaminets et al., 2016; Nakatogawa et al., 2009). De récentes études démontrent que l'autophagie peut être sélective. Dans le contexte de la ciliogenèse, LC3 (analogue de Ub pour l'autophagie) interagit avec un groupe de protéines satellites centriolaires, notamment PCM1, CEP131 et OFD1 (Tang et al., 2013). De façon intéressante, OFD1 est exclue des satellites centriolaires lors de la privation de sérum au début de la ciliogenèse. Chez les mutants de l'autophagie, tels que ATG5, la dégradation d'OFD1 est altérée et la ciliogenèse inhibée. Ces observations suggèrent que l'autophagie d'OFD1 est une étape primordiale dans la formation des cils.

Le complexe mTOR (cible mammalienne de la rapamycine) 1 (TORC1) est une kinase qui relie la disponibilité des acides aminés à la croissance cellulaire. En effet, mTORC1 est également un régulateur positif de la ciliogenèse dans les cellules de mammifères (Jin et al., 2015) et chez le poisson zèbre et *Chlamydomonas* grâce à son rôle dans la synthèse des protéiques (Yuan et al., 2012). En outre, TSC1, composant du complexe TSC1/2 et régulateur négativement la voie mTOR, est localisé au corps basal, et sa perte ou celle de TSC2 augmente la ciliogenèse (Armour et al., 2012; Hartman et al., 2009; Yuan et al., 2012). Bien que cela n'ait pas été étudié à ce jour, la voie mTOR pourrait également améliorer la maintenance des cils en réduisant l'autophagie basale.

II.2.3.4. Adaptation ciliaire aux signaux environnementaux

De façon surprenante, le cil primaire possède la capacité d'ajuster sa morphologie en réponse aux conditions environnementales. L'élargissement du cil pour améliorer sa capacité de détection de signal ou, inversement, la résorption pour diminuer sa réactivité aux signaux, a un sens intuitif en tant que mécanisme d'adaptation du signal sensoriel. En effet, les cils semblent agir comme une antenne qui se contrôle elle-même, et modifie sa taille et sa forme en fonction de la puissance des signaux qu'elle détecte. Par exemple, les cils des neurones olfactifs de *C. elegans* passent d'une morphologie en forme de doigt à celle d'un éventail en l'absence de stimuli particuliers, permettant ainsi d'améliorer la réceptivité olfactive (Mukhopadhyay et al., 2008). De plus, en réponse à l'écoulement de fluides, un mécanisme similaire conduit à une réduction de la longueur des cils, diminuant ainsi la sensibilité des cils aux stimuli mécaniques (Besschetnova et al., 2010). Les changements de forme des cils contrecarrent donc les fluctuations de l'intensité du signal, adaptant les structures sensorielles à la force des stimuli. Dans d'autres contextes, tels que la signalisation de la leptine ou de la prostaglandine, la présence du signal augmente la ciliogenèse, créant alors potentiellement une boucle de rétrocontrôle positif (Jin et al., 2014a; Kang et al., 2015).

De façon intéressante, on peut relier cette capacité à adapter sa morphologie du cil aux mutations affectant la taille des cils. En effet dans de nombreux modèles (*AC3*, *IFT54*, *IFT172*) les mutations entraînent dans les cellules une augmentation de la taille des cils couplée à une absence de récepteurs ciliaires. On peut alors penser que l'agrandissement de ces cils serait un mécanisme compensatoire afin de tenter de palier au manque de sensation du cil du fait de l'absence des récepteurs.

II.2.3.5. Les facteurs de transcriptions régulant le cil primaire

La régulation via le cycle cellulaire requiert une régulation génique spécifique dans le temps et l'espace afin d'exprimer ou réprimer les gènes clés de la ciliogenèse. Ainsi deux familles de facteurs transcriptions spécifiquement impliqués dans les gènes ciliaires ont été à ce jour identifiés, il s'agit des facteurs de la famille RFX (Regulatory Factor X), et du facteur Foxj1 (Choksi et al., 2014; Swoboda et al., 2000; Vieillard et al., 2014; Vij et al., 2012).

Foxj-1 (Forkhead box J1) est un facteur de transcription de type forkhead/winged-helix qui contrôle l'expression de gènes ciliaires et par conséquent de la ciliogenèse. Foxj-1 est connu pour son rôle dans la modulation de la formation des cils motiles chez les vertébrés (souris, poisson zèbre et xénope) (Blatt et al., 1999; Brody et al., 2000; Hackett et al., 1995; Yu et

al., 2009a). Bien que ses gènes cibles sont principalement des gènes impliqués dans la motilité ciliaire, comme *dnah9*, *tektin1* et *efhc1* (Hellman *et al.*, 2010), il existe tout de même plusieurs lien entre *foxj-1* et le cil primaire. En effet, *Foxj-1* est principalement exprimé dans des tissus pourvus de cils motiles et son invalidation n'entraîne pas de défaut structurel du cil primaire. Cependant, la surexpression de *Foxj-1* dans des tissus pourvus de cil primaire entraîne des défauts de structure de ces cils. (Brody *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2016; Chien *et al.*, 2018; Choksi *et al.*, 2014; Stubbs *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008). L'expression de *Foxj-1* comme celle de RFX, est soumise à plusieurs voies de signalisations dépendantes du cil primaire dont Shh, FGF, WNT-PCP, NOTCH et NOTO (Notochord homeobox) (cf La voie Hedgehog) (Beckers *et al.*, 2007; Cruz *et al.*, 2010; Neugebauer *et al.*, 2009; Walentek *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2008). Enfin, *Foxj-1* régule aussi l'activité de protéines impliquées dans le réarrangement du cytosquelette d'actine telle que RhoA, Ezrine ou encore ERK7 qui sont notamment nécessaire à l'ancrage apical du corps basal (cf Cytosquelette et cil) et donc indispensable à la ciliogénèse (Pan *et al.*, 2007).

La deuxième famille identifiée est la famille des facteurs RFX, pour leur implication dans le contrôle de gènes ciliaires chez *C.elegans*. La famille RFX est une famille de 7 membres étudiés pour leur domaine de liaison à l'ADN (Durand *et al.*, 1994; Emery *et al.*, 1996a, 1996b; Reith *et al.*, 1990, 1994). Ce domaine, de type winged-helix, leur permet de se lier à une région spécifique du promoteur de leur gène cible, la boîte X et ainsi d'en réguler l'expression (Gajiwala *et al.*, 2000). La famille peut être divisée en 2 sous-groupes : RFX1-4 et RFX6 capables de se dimériser, et RFX5 et RFX7 incapables de le faire. De façon intéressante, seule les protéines RFX capables de se dimériser ont été identifiées comme régulatrices de protéines ciliaires. L'étude de la régulation de l'expression des gènes ciliaires chez *C.elegans* a permis de montrer le rôle principal du facteur *daf-19*, orthologue de RFX1 (Swoboda *et al.*, 2000). RFX1 est impliqué dans la régulation de nombreux gènes ciliaires codant des protéines des différents compartiment du cil notamment de nombreuses IFTB, le complexe BBS ou encore la rootlétine (protéine nécessaire à la cohésion des centrioles du corps basal (Laurençon *et al.*, 2007) et des protéines de la TZ telles que NPHP1 et NPHP4 (Winkelbauer *et al.*, 2005). Un autre facteur de la famille RFX, RFX3, a été mis en avant pour son rôle dans la régulation transcriptionnelle de gènes des dynéines, notamment de *Dync2li1* (la chaîne légère de la dynéine), des dynéines axonémales *Dnahc11* et *Dnahc9* (la chaîne lourde de la dynéine) ainsi que plusieurs gènes connus pour leur implication dans les dyskinésies du cil primaire (PCD) chez l'humain, comme *BBS4* (El Zein *et al.*, 2009). L'inactivation de RFX3 chez

la souris induit un phénotype de ciliopathie, notamment, des anomalies de latéralisation droite gauche et une hydrocéphalie dues au rôle prédominant de RFX3 dans la régulation de la croissance du cil primaire notamment au niveau du nœud embryonnaire et du pancréas murin (Ait-Lounis et al., 2007; Baas et al., 2006; Bonnafe et al., 2004). De façon intéressante, RFX3 est également un co-activateur de Foxj-1. En effet, RFX3 est capable de se fixer au promoteur du gène *Foxj-1* (et activer l'expression de ce dernier), démontrant une interdépendance RFX3 et Foxj-1 dans l'induction de promoteur de gènes ciliaires (Didon *et al.*, 2013).

Outre les facteurs de régulations communs aux cils motiles et aux cils primaires, tels que Foxj-1 et RFX3, le rôle des facteurs spécifiques à chacun est à ajouter (El Zein *et al.*, 2009; Stubbs *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008). Ainsi la formation spécifique d'un type de cil peut faire appel à des facteurs de transcription dit accessoires. Chez *C.Elegans* il a donc été démontré que les gènes requis pour l'assemblage des cils possèdent en plus du motif de liaison aux protéines RFX, une boîte C nécessaire à leur activation, apportant une spécificité supplémentaires aux gènes ciliaires (Burghoorn et al., 2012). Toutefois, les facteurs de liaison à la boîte C demeurent inconnus. Toujours chez *C. elegans*, l'activation du facteur de transcription FKH-2 (forkhead-2), sous contrôle de la protéine DAF-19, permet le contrôle de la kinesine-2 et donc de la ciliogenèse, mais uniquement pour les cils chemosenseurs des neurones (Mukhopadhyay et al., 2007). Le mécanisme par lequel DAF-19 régule uniquement la ciliogenèse de ces cellules reste non élucidé et il ne faut pas exclure un possible rôle accessoire indépendant de la ciliogenèse (Stasio et al., 2018). Enfin, chez la souris, des facteurs de transcription cruciaux contrôleraient de la ciliogenèse. C'est le cas du facteur HNF1 (hepatocyte nuclear factor 1b) qui en régulant les gènes *Pkhd1* et *Pkd2* joue un rôle majeur dans la régulation de la signalisation ciliaire au niveau du rein (Gresh et al., 2004).

Cependant la régulation transcriptionnelle et génique nécessaire à l'induction de la ciliogenèse reste encore incomprise et de nombreuses nuances et autres cas particuliers restent à expliquer comme l'activation de OFD2/cenexin, nécessaire pour la formation du cil primaire, dont le promoteur n'est ni la cible de RFX3, ni celle de FOXj1, mais semble activé par la voie de réponse au stress Junk (JNK) (Pletz *et al.*, 2013).

II.3. Les fonctions du cil

Comme le démontre le large spectre phénotypique des ciliopathies (cf Aspects cliniques), le cil possède des fonctions cellulaires importantes et diverses telles que la mobilité et la fonction de senseur. Le cil joue le rôle d'une antenne qui reçoit les signaux de l'environnement extracellulaire, tels que la lumière, les composés chimiques, les facteurs de croissance, et les stimuli mécaniques. Certains cils comme les cils 9+0 du nœud embryonnaire et les cils 9+2 des eucaryotes unicellulaires, aussi appelés flagelle, peuvent être impliqués dans les deux fonctions en même temps. De manière générale les cils, qu'ils soient motiles ou immotiles, possèdent un rôle senseur (Fliegauf and Omran, 2006; Perkins *et al.*, 1986). Le rôle senseur des cils s'explique par l'enrichissement du nombre de récepteurs à la membrane notamment les récepteurs couplés aux protéines G, RCPG, connus pour leur implication dans la transduction du signal (Hilgendorf *et al.*, 2016; Schou *et al.*, 2015; Wettschureck and Offermanns, 2005; Wettschureck *et al.*, 2005).

II.3.1. Le cil un organel, « senseur »

II.3.1.1. Chimio senseur

Le rôle chimiosenseur du cil primaire a été mis en évidence dans les cellules de l'épithélium rénal pour leur capacité à capter des signaux extracellulaires notamment des hormones peptidiques comme l'angiotensine, la dopamine ou les ions chlorites présents dans le milieu extracellulaire (Abdul-Majeed and Nauli, 2011; Upadhyay *et al.*, 2014).

Mais le rôle du cil primaire dans la réponse aux composés chimiques s'illustre particulièrement dans les neurones olfactifs. Ces neurones, au sein même de l'épithélium nasal, possèdent en leurs extrémités distales une vingtaine de cils sensoriels qui permettent la mise en contact des RCPG présents à leur membrane avec les molécules odorantes, ligands qui vont ainsi induire la signalisation olfactive. L'activation de l'adénylate cyclase III (ACIII) au niveau des cils olfactifs entraîne la formation d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) à partir d'ATP (adénosine triphosphate). Le neurone olfactif, sensible à la concentration d'AMPc va ainsi se dépolymériser et entraîner une réponse présynaptique électrique (McEwen *et al.*, 2008).

Le fait que la signalisation olfactive se fait via des récepteurs et molécules ciliaires, explique les défauts d'olfaction (anosmie) observés chez de nombreux patients atteints de ciliopathies, notamment les patients mutés pour *CEP290/NPHP6* entraînant un syndrome de BBS (Kulaga *et al.*, 2004). De la même manière, la thermosensation cutanée via les neurones

thermosensibles a été montré comme dépendante des récepteurs ciliaires TRPV1 et 4 (Tan *et al.*, 2007).

Un autre exemple de perception chimique des cils primaires est celui de la réponse calcique. En effet, la présence de canaux calciques notamment médiés par PC2, TRPV4 ou PIEZO1 à la membrane ciliaire permettrait l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire dans le cilioplasme induisant une réponse calcique intracellulaire (Delling *et al.*, 2016; Fill and Copello, 2002; Jin *et al.*, 2014b; Su *et al.*, 2013). Toutefois, cet aspect détaillé dans le chapitre « La voie Wnt » reste aujourd'hui très controversé.

II.3.1.2. Photo senseur

Le cil sensoriel présent dans les cellules photoréceptrices de la rétine est aussi impliqué dans la perception physique de la lumière. Ainsi, de nombreux patients atteints de ciliopathies et notamment de SLS, BBS, JBTS, JATD, MZS, présentent des défauts de vision (Contreras, Espinoza, 1960; Loken *et al.*, 1961; Senior *et al.*, 1961 ; Mainzer *et al.*, 1970 ; Barakat *et al.*, 1990; Beales *et al.*, 1999).

Le cil connecteur des cellules photoreceptrices, peut être assimilé à un cil primaire ayant subi des modifications au cours de l'évolution. La cellule photoréceptrice aussi appelée bâtonnet est une longue cellule cylindrique formée de deux segments, le segment interne dont l'extrémité distale est un bouton synaptique, et un segment externe assimilable au cil primaire présentant un enrichissement important en rhodopsine. Entre ces deux segments, la TZ du cil est remplacée par une zone dénommée "cil connecteur". La rhodopsine du segment externe, qui est une protéine RCPG capable de capter un photon lumineux et d'activer la transducine en réponse est en constant renouvellement (Besharse and Hollyfield, 1979; Besharse *et al.*, 1977; Hollyfield *et al.*, 1977). Le dynamisme dont fait preuve la rhodopsine dans le segment externe est favorisé par un transport de type IFT (Pazour *et al.*, 2002). Il a par ailleurs été montré que des défauts d'IFT chez la souris notamment avec la déplétion du gène *kif3a* codant la kinésine II (cf Le transport intraflagellaire) ou du gène codant l'IFT88, conduisent à une cécité (Berbari *et al.*, 2009).

La transducine, qui est l'association hétérotrimérique Gt-alpha-GDP, subit un échange GDP en GTP sous l'effet de la rhodopsine après captation du photon lumineux. Cet échange entraîne la libération de la protéine G du récepteur le rendant actif. Cette activation entraîne alors la fermeture canaux cationiques spécifiques, conduisant à l'hyperpolarisation

de la cellule rétinienne (bâtonnet) et inhibant la sécrétion du transmetteur glutamate à l'autre bout de la cellule (diminution de l'activité présynaptique) (Fung *et al.*, 1981).

II.3.1.3. Mécano senseur

Le rôle mécano senseur du cil consistant en la détection de signaux physiques et mécaniques a d'abord été décrit dans le rein. Des analyses d'imagerie en temps réel sur des cellules MDCK ont permis de montrer que le cil primaire se penche de façon réversible sous l'influence du flux entraînant alors une entrée de calcium intracellulaire dépendante de la présence du cil (Praetorius *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 1997). En revanche, l'induction d'un flux sur ces mêmes cellules MDCK non confluentes, et donc sans présence de cils, ou après déplétion du cil par acide chloridrique, n'engendre pas cette réponse calcique (Praetorius and Spring, 2003; Praetorius *et al.*, 2004). Ces études indiquent que le flux à la surface des cellules épithéliales induit une réponse cellulaire via le rôle mécanosenseur du cil primaire (Praetorius 2005). Très vite est fait le lien entre cette réponse calcique et les protéines PC1 et PC2, des protéines de la famille des TRP avec une de canal à cation (respectivement Lov1 et Pkd2 chez *C.elegans*) (Barr and Sternberg, 1999; Barr *et al.*, 2001). En effet, l'induction par un flux d'une inclinaison ciliaire où PC1 et/ou PC2 sont absents n'entraîne pas de signal calcique (Boehlke *et al.*, 2010; Hughes *et al.*, 1995; Kotsis *et al.*, 2008; Mochizuki *et al.*, 1996; Nauli *et al.*, 2003). Le fait que le cil maintienne en l'absence de PC1 et/ou PC2 son intégrité physique malgré son incapacité à être senseur reste surprenant. Ce mécanisme mécano senseur du cil primaire a aussi été rapporté dans différents types cellulaires d'origine épithéliales notamment au niveau du pancréas et du foie (Housset, 2005; Masyuk *et al.*, 2008; Nauli *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009).

Toutefois, le signal calcique via le cil reste controversé. De récentes études basées sur un modèle de souris transgénique exprimant un indicateur calcique ciliaire Arl13b-mCherry-GECO1.2, montrent une absence de réponse calcique du cil primaire aux flux mécanique dans différentes cellules notamment les cellules tubulaires rénales, les cellules du nœud embryonnaire et les stéréocils de l'oreille interne. Ces travaux vont à l'encontre de toutes les études générées cette dernière décennie et les auteurs expliquent cette réponse calcique jusqu'alors visualisée, comme un artefact dû à la rupture partielle ou totale du cil primaire sous un flux trop important (Delling *et al.*, 2016). Ainsi, le sujet de la réponse calcique induite par le cil primaire est soumis à différentes hypothèses (DeCaen *et al.*, 2013; Delling *et al.*, 2016).

Outre la question de la réponse calcique en réponse au flux mécanique, la question générale du mécanisme mécanosenseur du cil primaire et ses conséquences se pose. En 2006, l'implication de la régulation de l'orientation des mitoses lors de la néphrogenèse dans les phénomènes de kystogenèse observés dans plusieurs modèles murins d'inactivation de gènes ciliaires, dont *Hnf1 β* (facteur de transcription de *Pkd2* et *Pkhd1*) et *Ift88* (Fischer et al., 2006; Pazour et al., 2000). La division cellulaire dans les tubules rénaux doit se faire le long de l'axe du tubule, si cette régulation est opérée par le cil, l'absence de cil entraîne des divisions anarchiques induisant alors un élargissement du diamètre des tubules rénaux formant des kystes, phénotypes communs à plusieurs ciliopathies. Toutefois, il existe plusieurs contre exemples. Ainsi, bien qu'altérant la formation et la fonction ciliaire, l'inactivation d'*Ift140* chez les souris induit des reins kystiques sans défaut d'orientation de mitoses lors de l'élongation des tubes néphroniques (Jonassen *et al.*, 2012). De plus en 2010, Nishio et al. montrent que les défauts d'orientation des mitoses observés chez les souris kystiques mutées pour *Pkd1* et *Pkd2* n'apparaissent qu'après la formation de ces mêmes kystes, et que les souris mutées pour le gène *Pkhd1* présentent un défaut d'orientation de la division cellulaire dans les tubules rénaux sans développer de kystes (Nishio *et al.*, 2010). En effet, l'orientation de la division cellulaire est primordiale pour la kystogenèse parce qu'elle est finement reliée à la polarité planaire, expliquant la compensation de cette perte de contrôle de l'orientation de la division cellulaire dans les reins de souris *Wnt9b* et *Prickle1*, par une augmentation du phénomène de convergence extension (Karner et al., 2009; Yu et al., 2009b).

Le fait que plusieurs événements différents conduisant à la même finalité, le développement de kystes rénaux, laisse penser que le rôle du cil dans la formation kystique est dépendant de nombreux facteurs. C'est justement ces différents facteurs influençant le rôle du cil dans la kystogenèse qui ont été mis en avant ces dernières années. En effet, le développement de kystes dans les reins des souris invalidées pour les gènes ciliaires notamment *Ift88* et *Pkd1* dépend du moment où le gène a été inactivé, l'apparition de kystes ne survenant que si les gènes ciliaires sont inactivés avant le 13ème jour après naissance. En revanche, si ces gènes ciliaires sont déplétés après ce stade, le développement des kystes sera beaucoup plus tardif et moins sévère (Davenport *et al.*, 2007; Piontek *et al.*, 2007). Il semblerait donc que les fonctions ciliaires soient différentes au cours du développement, le développement de kystes étant accéléré par l'état prolifératif des cellules au cours du développement (Patel *et al.*, 2008). (Bukanov *et al.*, 2006; Lanoix *et al.*, 1996; Woo, 1995).

Un autre rôle mécanosenseur du cil primaire est celui nécessaire à l'établissement de la latéralité gauche droite. Un défaut d'asymétrie droite gauche est à l'origine des *situs inversus* observés dans le cas nombreuses ciliopathies (cf Aspects cliniques). Chez la souris et les vertébrés, la latéralisation est établie par le nœud embryonnaire au cours du développement. Cette structure transitoire, localisée dans la partie ventrale de l'embryon, possède des cils motiles bien que de type 9+0. Le sens ainsi que la fréquence de battements de ces cils en un mouvement circulaire va permettre de créer un flux de liquide nécessaire à l'établissement de la latéralisation (Berbari *et al.*, 2009). Le battement ciliaire nécessaire est dépendant de moteurs moléculaires, les dynéines. Ces dynéines forment des complexes protéiques, appelés bras de dynéines, composés de chaînes lourdes, intermédiaires et légères. Chez le poisson zèbre, la vésicule de kuppfer (KV) est l'organe responsable de la latéralité où s'établit un flux ordonné généré par les cils motiles tapissant sa paroi (Essner *et al.*, 2005; Kawakami *et al.*, 2005; Kreiling *et al.*, 2007; Okabe *et al.*, 2008; Supatto *et al.*, 2008). Le cil primaire pourrait également avoir un rôle en aval du flux et être capable en tant que mécanosenseur d'y répondre.

Ainsi les mutations des gènes de dyskinésie ciliaire primitive (*DNAH5*, *DNAI1*, *DNAI2*, *CCDC40*, *CCDC39* ect...) affectant la structure de ces cils, comme les bras de dynéines internes et externes, et donc conduisant à leur immobilité induisent systématiquement l'apparition de *situs inversus* (Austin-Tse *et al.*, 2013; Blanchon *et al.*, 2012; Olbrich *et al.*, 2002; Pennarun *et al.*, 2000; Zariwala *et al.*, 2006). De façon intéressante, des mutations affectant la signalisation et non la capacité de mobilité ciliaire, comme les mutations du gène *INVS*, *NEK8* *ANKS6* ou *PKD2* entraînent également l'apparition de *situs inversus* (Bataille *et al.*, 2011; Czarnecki *et al.*, 2015; Manning *et al.*, 2013; Tory *et al.*, 2009). De plus, la perte des cils du nœud embryonnaire par mutation de *Kif3a* entraîne aussi des défauts d'établissement de la latéralité, qui ne peuvent être corrigés par l'influence d'un flux artificiel (Yoshida *et al.*, 2012). Ces dernières observations tendent finalement vers l'existence réelle d'un rôle mécano senseur du cil.

Il existe deux modèles tendant à expliquer le rôle mécanosenseur dans la latéralisation. Le premier est la présence d'un morphogène présent dans des vésicules extracellulaires au sein du liquide et qui par le biais du flux est distribué unilatéralement. Le second, prétend que les cils présents dans l'organe de latéralisation perçoivent un flux plus important du côté gauche, entraînant l'établissement de la latéralisation (Norris, 2012).

II.3.2. Le cil une plateforme de signalisation

Ce type de cascade moléculaire induite après la captation du flux par le cil primaire pour entraîner une réponse en conséquence, ici la latéralisation, fait du cil une plateforme de signalisation. Différentes voies sont induites ou dépendantes du cil primaire et font du cil un acteur majeur de la communication inter et intra cellulaire. Ainsi le cil primaire joue un rôle crucial dans l'homéostasie tissulaire, via la voie Hedgehog ou WNT/PCP, mais aussi dans la définition de la taille des organes via la voie Hippo. Outre ces 3 grandes voies, le cil est aussi impliqué à différents niveaux dans la transition épithéliale mésenchymateuse (EMT), la définition des lignages cellulaires via Notch ou encore l'inflammation (Egorova *et al.*, 2011; Ezratty *et al.*, 2011; Pampliega *et al.*, 2013).

II.3.2.1. Signalisation du développement

II.3.2.1.1. La voie Hedgehog

La découverte de la voie Hedgehog (HH) a été faite chez *Drosophila melanogaster* pour son rôle crucial au niveau de la détermination spatiale de l'œuf entier, de la longueur et du nombre de segments de la larve, les animaux mutés exhibant des denticules ectopiques ressemblant à un hérisson (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980).

La signalisation HH chez la drosophile permet la modélisation des organes adultes comme les yeux, les ailes ou encore une fois les pattes (Burke and Basler, 1997). Des mutations dans d'autres gènes partageant les mêmes phénotypes définiront la voie de signalisation Hedgehog dans laquelle HH est le ligand qui agit via le récepteur à la membrane PTCH1 (Patched1) et le récepteur transmembranaire smoothed (SMO) pour contrôler la transcription du facteur Cubitus interruptus (CI) (Forbes *et al.*, 1993; Ingham, 1998). Tous les ligands de la voie, Desert hedgehog (DHH), Indian hedgehog (IHH) et Sonic Hedgehog (SHH) sont conservés dans l'évolution démontrant l'importance de la signalisation (Ingham and McMahon, 2001). La différence majeure entre la signalisation HH chez les vertébrés et chez la drosophile est basée sur le rayon d'action de la voie autour de la source d'activation suggérant que l'activation à distance requiert un système de transduction plus sensible et dépendant du cil primaire.

Dans l'organisation neurale, SHH est d'abord exprimée dans le notochorde qui repose sur le tube neural et agit directement sur les cellules de la moitié ventrale du tube neural pour définir les progéniteurs neuraux (Ericson *et al.*, 1997). Dans les membres, SHH est exprimée de façon classique dans la zone d'activité de polarisation (ZPA) et influence le

développement à distance de la source du signal (Ahn and Joyner, 2004; Harfe et al., 2004). De façon similaire, IHH est aussi capable d'agir à distance pour contrôler la prolifération et la différenciation des chondrocytes (Long et al., 2001; Mak et al., 2008a, 2008b). DHH semble avoir un patron d'expression différent puisqu'elle est restreinte aux niveaux des gonades bien que pouvant dépendre du cil primaire (Nygaard et al., 2015).

Par ailleurs, le cil primaire, par sa concentration importante de composés indispensables à la signalisation dans un volume très restreint, permet une réponse fine à un faible niveau de ligand. Ainsi, lors du développement murin, l'étude des progéniteurs neuraux et de leur organisation par leur différents marqueurs moléculaires, rend possible de distinguer 6 différents types cellulaires spécifiés par différents niveaux d'activité de SHH conduisant à la formation du tube neural (Balaskas et al., 2012; Dessaud et al., 2007, 2008; Ericson et al., 1997).

La découverte du lien HH et cil primaire vient de la caractérisation de mutations affectant le transport intraflagellaire IFT et induisant l'absence de détermination des neurones ventraux (Huangfu et al., 2003). Ainsi les mutants *Ift88* et *Kif3a* exhibant des défauts d'organisation du tube neural, conduisent à l'absence de cil et de signalisation HH. En revanche, les souris porteuses de la mutation *Ift172* "wimple" ou *Ift88* « Polaris » présentent un cil avec des récepteurs à la voie Hedgehog mais une désorganisation de la signalisation en aval, indiquant que l'absence ou les défauts de cils entraînent des défauts de réponses à la voie HH (Huangfu et al., 2003). D'autres mutations d'IFTB ont ensuite été reliées à des défauts de HH, comme les mutations *Ift52*, *Ift54* ou encore *Ift57*, prouvant le lien cil primaire/voie HH. Ces défauts de HH en cas de mutations IFT sont expliqués certes par la nécessité d'un cil dans la réponse au signal, mais aussi par la nécessité d'un transport dynamique des composés de la voie SHH dans l'entrée et la sortie du cil (Corbit et al., 2005; Haycraft et al., 2005). Ainsi, l'étude de double mutant *Ift172*, *Ift88* et *Kif3a* a permis de mettre en évidence le rôle des IFT en aval de l'action de PTCH1 ou SMO, mais aussi en amont des protéines GLI au niveau de la transduction du signal.

Ainsi, la cascade de signalisation de la voie HH correspond, après liaison du ligand HH à son récepteur PTCH1 au niveau du cil, à une translocation de SMO au niveau du cil afin de lever les activités inhibitrices de la voie et permettre aux protéines GLI de sortir du cil et d'être activées dans le cytoplasme. En effet, SMO va permettre le passage de la forme répressive à la forme active de la protéine GLI3 en empêchant son clivage protéolytique (cf [Figure 9: Signalisation de la voie Sonic Hedgehog](#)) (Aza-Blanc et al., 1997; Cooper et al., 2005;

Dai et al., 1999; Haycraft et al., 2005; Kiprilov et al., 2008; Lee et al., 1997; Marigo et al., 1996; Nielsen et al., 2008; Rohatgi et al., 2007; Svärd et al., 2006). Encore une fois le cil primaire, en plus d'accueillir le récepteur PTCH1, la translocation de SMO, et les protéines GLI (au nombre de 3, GLI1, GLI2 et GLI3), semble être le lieu des modifications subies par les GLI. Tout du moins il serait le lieu de clivage de GLI3 tandis que GLI2 n'y subirait pas son activation (Haycraft et al., 2005; Huangfu et al., 2003; Pan et al., 2009) (cf [Figure 9: Signalisation de la voie Sonic Hedgehog](#)).

Bien que les protéines majoritaires soient celles du complexe IFT, de la zone de transition et du module MKS, l'ensemble des composants ciliaires affectent la signalisation HH. Ainsi, on retrouve des protéines nécessaires à la duplication des centrioles comme SAS4 (CPAP/CENPJ), des protéines des appendices distaux comme C2CD3, des protéines centrosomales et donc nécessaires à l'assemblage des cils (TALPID3 et OFD1) mais aussi CP110, les protéines du complexe CPLANE et les JBTS (Bangs et al., 2011; Bazzi and Anderson, 2014; Damerla et al., 2015; Ferrante et al., 2006; Hoover et al., 2008; Toriyama et al., 2016; Yadav et al., 2016; Ye et al., 2014).

Au vue des nombreux processus développementaux régulés par HH, les altérations de la voie sont à l'origine d'un large spectre de phénotypes plus ou moins redondant, impliquant principalement une perte ou une augmentation des neurones ventraux du tube neural et une absence de doigts ou une polydactylie. Par conséquent, des mutations ayant un effet sur le cil ou sur le transport ciliaire peuvent avoir une influence sur la voie HH. La polydactylie et les autres atteintes squelettiques, retrouvées comme phénotypes des ciliopathies associées aux IFT notamment (syndromes de Jeune), sont expliqués en partie par la perte de l'activité répressive de GLI3R. Enfin, les mutations des gènes de la TZ et du corps basal, impliqués tous les deux dans l'induction de la ciliogenèse et la régulation de la composition ciliaire, entraînent des phénotypes associés à une altération de la voie HH comme les atteintes cérébrales et la polydactylie souvent retrouvées dans les syndromes de Joubert et de Meckel (Delous et al., 2007; Garcia-Gonzalo et al., 2011; Weatherbee et al., 2009). Enfin, il est intéressant de noter que même si globalement les phénotypes neuronaux et liés à la segmentation des membres, notamment décrits pour les mutations IFT sont attribués aux défauts de la voie HH, les mutations des complexes IFT A et IFT B et autres modules ciliaires ont des effets différents sur la voie HH (Cortellino *et al.*, 2009; Huangfu and Anderson, 2005; Stottmann *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2008b). Ainsi, les défauts IFTB réduisent l'activité de la voie

HH, tandis que les défauts IFTA et du module MKS sont connus pour suractiver la voie et notamment GLI2A.

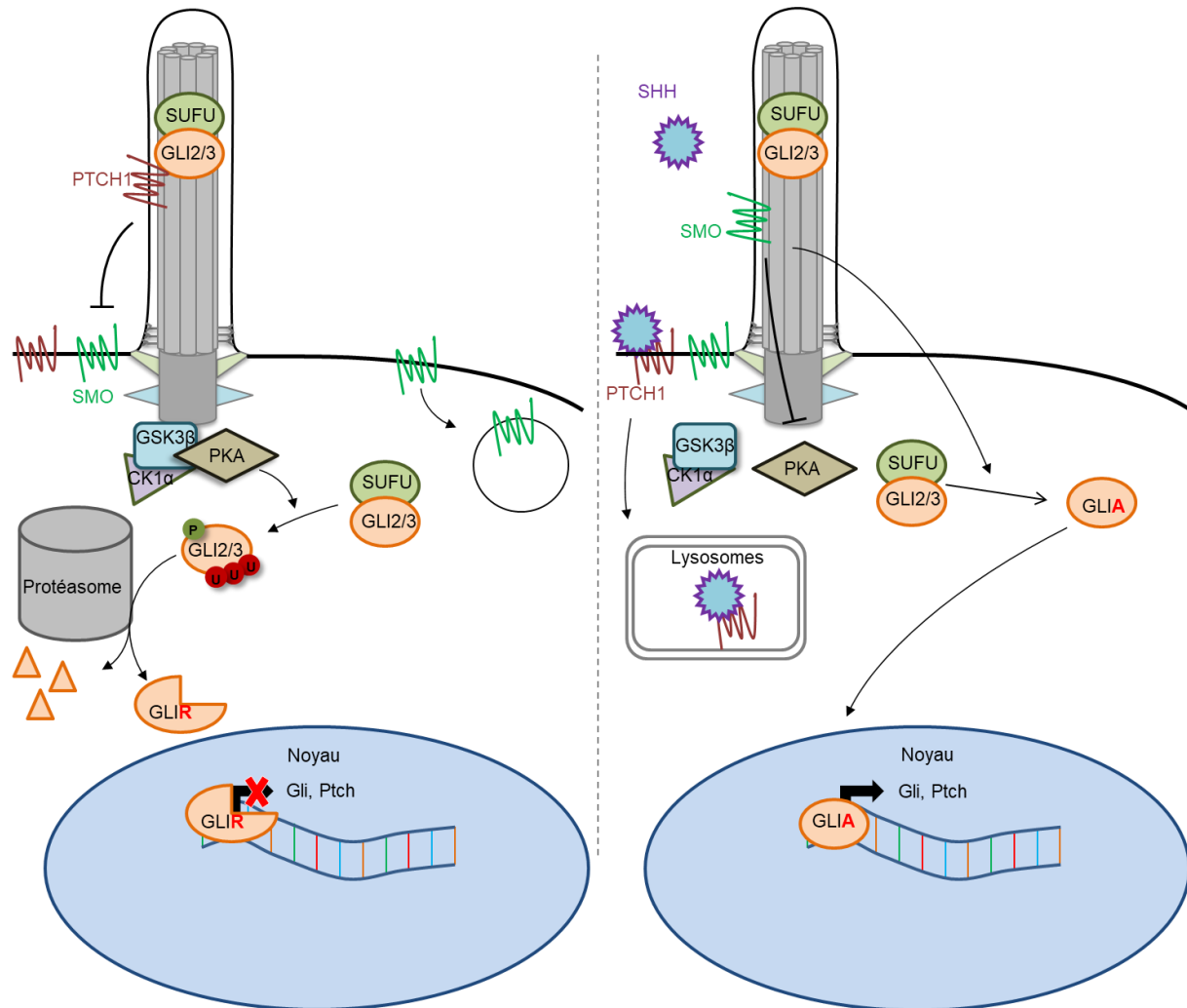


Figure 9: Signalisation de la voie Sonic Hedgehog

La forme activée ou réprimée de la voie HH est caractérisée par la liaison de son ligand SHH au récepteur PTCH1. En absence de liaison, PTCH1 inhibe le récepteur SMO qui est internalisé dans la cellule. Le complexe GSK3β-CK1α-PKA phosphoryle la protéine GLI3 permettant la liaison d'une ubiquitine ligase et ainsi la dégradation partielle de GLI3 par la sous unité 26S du protéasome. Cette dégradation crée la forme répressive de GLI3, GLI3-R. Cette forme tronquée GLI3-R inhibe alors l'expression des gènes cibles de la voie HH. En présence de liaison SHH-PTCH1, PTCH1 est exclue du cil levant ainsi son inhibition spatiale sur SMO. Ce dernier est internalisé dans le cil et inhibe l'action répressive de SUFU sur les GLI qui vont alors sortir du cil et être activés. SMO inhibe également la formation du complexe GSK3β-CK1α-PKA et ainsi la phosphorylation inhibitrice de GLI3. La forme active de GLI3, GLIA, peut alors activer la voie HH en stimulant l'expression de ses gènes cibles.

II.3.2.1.2. La voie Wnt

WNT (ou Wingless (Wg) chez la drosophile) est une glycoprotéine sécrétée pouvant avoir un effet aussi bien autocrine que paracrine. La voie WNT est différenciable en 3 voies, la voie WNT canonique ou WNT/ β caténine, la voie WNT non canonique ou la voie WNT/PCP et la voie WNT/ Ca^{2+} . Ces voies ont des cibles et des finalités variées contrôlant la survie, la polarisation cellulaire, la prolifération, la migration, l'apoptose ou encore la différenciation cellulaire. Initialement différenciées par la nature du ligand WNT (il existe 19 types de protéines WNT), il semble désormais que les divers ligands puissent être impliqués dans les différentes voies canoniques et non canoniques.

La voie WNT canonique a pour réponse l'activité transcriptionnelle de la β -caténine. Le ligand WNT lie son récepteur transmembranaire Frizzled (FZ) qui, via son co-récepteur DVL, va créer un complexe visant à stabiliser et transloquer la β -caténine dans le noyau afin de lui permettre de jouer son rôle de facteurs de transcriptions via les facteurs TCF/LEF (Aberle et al., 1997; Behrens et al., 1998; Berbari et al., 2009; Hart et al., 1998; Ikeda et al., 1998; von Kries et al., 2000; Rubinfeld et al., 1993; Sakanaka et al., 1998; Su et al., 1993; Zeng et al., 1997). Outre TCF/LEF, la β -caténine est également capable de lier d'autres facteurs de transcription ayant des fonctions indépendantes de WNT comme BCL9, Pygopus ou Parafibromine/Hyrax (Cantù et al., 2013, 2014, 2017; Kramps et al., 2002; Mosimann et al., 2006).

Parmi les voies WNT non canoniques, deux voies peuvent être mises en avant, la voie WNT/PCP ou Wnt-Jun-Nterminal kinase (JNK) et la voie WNT calcique. L'implication de la voie WNT dans la polarité planaire ou PCP pour « planar cell polarity » a été mise en évidence chez la Drosophile (cf [Figure 10: Signalisation de la voie WNT](#)). Cette polarité planaire décrit l'orientation vectorielle d'une cellule épithéliale ou d'une structure multicellulaire simple dans le plan d'un épithélium. Ainsi, les cellules de l'épithélium des tubes rénaux se divisent de façon perpendiculaire à l'axe apico-basal.

Une mutation homozygote viable de *Dsh* chez la drosophile entraîne des défauts d'orientation des photorécepteurs, des défauts cellulaires des ailes et des soies sensorielles, caractéristiques des animaux mutés pour des gènes de la PCP (Adler, 2002; Simons and Mlodzik, 2008). Ainsi, pour la première fois le lien entre la signalisation WNT et PCP est établi, donnant naissance au nom de voie WNT/PCP (Simons and Mlodzik, 2008). La PCP regroupe chez les vertébrés plusieurs mécanismes associant migration cellulaire et division

cellulaire des cellules mésodermiques et neuroectodermiques durant la gastrulation, résumé en “phénomènes de convergence extension” (Axelrod, 2001; Keller *et al.*, 2000; Strutt, 2001; Tree *et al.*, 2002; Wallingford *et al.*, 2000). La signalisation induite lors de la PCP et permettant à ces mécanismes de se mettre en place est également en aval de la signalisation DVL et passe par l’activation des RhoGTPases et plusieurs kinases dont JNK, participant à la stabilisation du cytosquelette d’actine (Habas *et al.*, 2001; Strutt *et al.*, 1997).

La voie non canonique calcique, quant à elle, déclenche, après la liaison de WNT à son récepteur FZ, une cascade de réaction engendrant l’accumulation intracellulaire de calcium (cf [Figure 10: Signalisation de la voie WNT](#)). La liaison récepteur/ligand permet l’activation de la phospholipase C qui va induire l’hydrolyse du PIP2 (phosphoinositol 4,5-biphosphate) en inositol 1,4,5 triphosphate (IP3) et en 1,2 diacylglycerol (DAG). L’IP3 libéré dans le cytoplasme va alors interagir avec les canaux calciques présents à la membrane du réticulum endoplasmique (RE), induisant le relargage d’ions Ca^{2+} qui vont à leur tour activer la protéine kinase calmoduline calcium dépendante II (CamKII) (Kühl *et al.*, 2000). Le DAG, produit lors de l’hydrolyse du PIP2, va lui activer la protéine Kinase C (PKC) (Sheldahl *et al.*, 1999). La PKC et la CAMKII activent alors différents facteurs de transcriptions (NF κ B et CREB). De façon similaire, le calcium relâché par le RE est capable d’activer la calcineurine qui elle-même activera NFAT, capable de promouvoir l’expression de différents gènes neuronaux, cardiaques ou encore pro-inflammatoires dans les lymphocytes (Feske *et al.*, 2003; Hogan *et al.*, 2003). La liaison WNT/FZ peut aussi engendrer l’activation de la phosphodiesterase 6 (PDE6) de façon calcium dépendante, entraînant une diminution du cGMP (guanosine monophosphate cyclique) (Wang *et al.*, 2004). Cette voie calcique serait à la base de la régulation des mouvements directionnels lors de la gastrulation (Hutchins *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2010; Slusarski *et al.*, 1997).

Que se soit la voie WNT canonique ou les voies non canoniques, il existe des liens entre ces signalisations et le cil primaire. La première évidence est venue de l’analyse de souris mutées pour les gènes *Ift88* et *Kif3a*. D’abord étudiés au niveau cellulaire, ces mutants montrent une dérégulation de la voie WNT canonique et non canonique. L’absence de cil chez les souris mutantes *Kif3a* et *Ift88* entraîne une augmentation significative de l’expression de la protéine β -caténine, due à un défaut de régulation de la phosphorylation de DVL (Corbit *et al.*, 2008). (Cano *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2003). Cette observation a ensuite été remise en cause en 2009 puisque la perte du cil ou un transport altéré au sein de ce dernier dans des modèles murins présentant une altération des gènes *Kif3a*, *Ift172*, *Ift88* ou encore *Dync2h1*

n'affecte pas l'activation de la voie WNT canonique (Ocbina et al., 2009). En revanche, l'invalidation de ces mêmes gènes *ift88* et *kif3a* ou encore des gènes *bbs* chez le poisson zèbre entraînent des défauts de PCP se traduisant par une courbure de l'axe ventral (Gerdes et al., 2007; Ross et al., 2005; Song et al., 2016). Ainsi, les défauts ciliaires peuvent conduire à des défauts de convergences extensions, mécanisme clé de la voie WNT/PCP. Cependant encore une fois et à l'image des études s'opposant sur le rôle ciliaire dans l'activation de la voie WNT chez la souris, la mutation chez le zebrafish de gènes associés à des fonctions ciliaires tels que *seahorse* ou *Lrrc6l* entraîne l'apparition de kystes rénaux en affectant les processus de convergences extensions sans que la ciliogenèse ne soit affectée (Kishimoto et al., 2008; Serluca et al., 2009). Ainsi le rôle ciliaire dans la régulation de la voie WNT semble encore aujourd'hui sujet à controverse bien que de nombreux indices tendent à les rapprocher. Un rôle de l'inversine, composé majeur du CI, dans la régulation de la balance entre les voies canonique et non canonique a été rapporté, via la régulation de DVL. La forme cytoplasmique de DVL dégradée par l'inversine inhiberait la voie canonique tandis que les voies non canoniques dépendraient de la forme de DVL associée aux membranes (Simons *et al.*, 2005). Mais c'est aussi la régulation de DVL à la base du cil par le complexe INVS, RPGRIP1L et NPHP4 qui régulerait la PCP (Burcklé et al., 2011; Mahuzier et al., 2012; Park et al., 2008). Enfin, le dernier lien entre WNT et cil primaire fait état du rôle important que pourrait jouer PC1 comme récepteur de WNT9b dans l'induction de la réponse calcique de la voie WNT. Il semblerait effectivement que WNT9b utilise les canaux calciques ciliaires de PC2 pour entraîner un relargage d'ions Ca^{2+} dans le cytoplasme (Kim *et al.*, 2016b).

A cela s'ajoute le fait que WNT9b est associée à la régulation du diamètre tubulaire via des phénomènes de convergences extensions. En effet, la dérégulation de la signalisation WNT9b entraîne des défauts de polarité planaire. De ce fait, les divisions cellulaires durant le développement embryonnaire au sein du tube rénal se font de façon hasardeuse, entraînant l'apparition de kystes. Ces défauts de convergences extensions sont cohérents avec les phénotypes kystiques observables chez les mutant *Pkd1/Pkd2* (Karner *et al.*, 2009). Ces derniers exemples nous montrent l'ampleur de la complexité de la voie WNT qui semble en réalité établir un dialogue entre les différentes voies, canoniques et non canoniques.

Ainsi, plusieurs études tendent à démontrer une régulation négative de la voie WNT canonique par la voie WNT non canonique. En effet, la suppression de *wnt5a* présentée comme ligand de la voie non canonique inhibe la formation de l'axe secondaire par *wnt8* chez le xénope (Torres *et al.*, 1996). Une hypothèse pouvant expliquer ce résultat est

l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine par WNT5a via l'activation de la phosphorylation de TCF4 par la Nemo like Kinase (NLK) (Ishitani *et al.*, 2003). Comme vu avec l'exemple de l'inversine, on peut aussi penser que la compétition entre les voies canoniques et non canoniques pourrait être dépendante de formes ou de disponibilités différentes de DVL (Huang *et al.*, 2011b).

Encore une fois, les processus cellulaires et développementaux mis en jeu par la signalisation de la voie WNT en font un des principaux acteurs des ciliopathies. Ainsi, de nombreuses mutations conduisant à des phénotypes associés à la NPH, notamment dans les gènes *INVS/NPHP2*, *NPHP4*, *RPGRIP1L*, *GLIS7*, *CYLD* ou encore *DCDC2*, ont été présenté comme étant des régulateurs négatifs de la voie WNT canonique au profit de la voie WNT/PCP (Bergmann *et al.*, 2008; Lancaster *et al.*, 2009; Otto *et al.*, 2003; Schueler *et al.*, 2015; Simons *et al.*, 2005).

Il semble donc finalement, que le nombre de combinaisons de liaisons ligands/récepteurs, considérable du fait du nombre important de formes de chacun, soit supplémente de conditions cellulaires spécifiques incluant des co-récepteurs. Il apparait de surcroit que la voie WNT soit aussi étroitement liée à d'autres voies de signalisation, notamment HH. En effet, CPLANE, impliquée dans les mouvements de convergence extensions, est reliée à la voie WNT et à ses effecteurs, entraîne aussi des défauts de la voie HH en cas de déplétion (cf La voie Hedgehog) (Park *et al.*, 2006; Toriyama *et al.*, 2016). Finalement ce lien reliant toutes ces voies de signalisation n'est-il pas simplement le cil primaire?

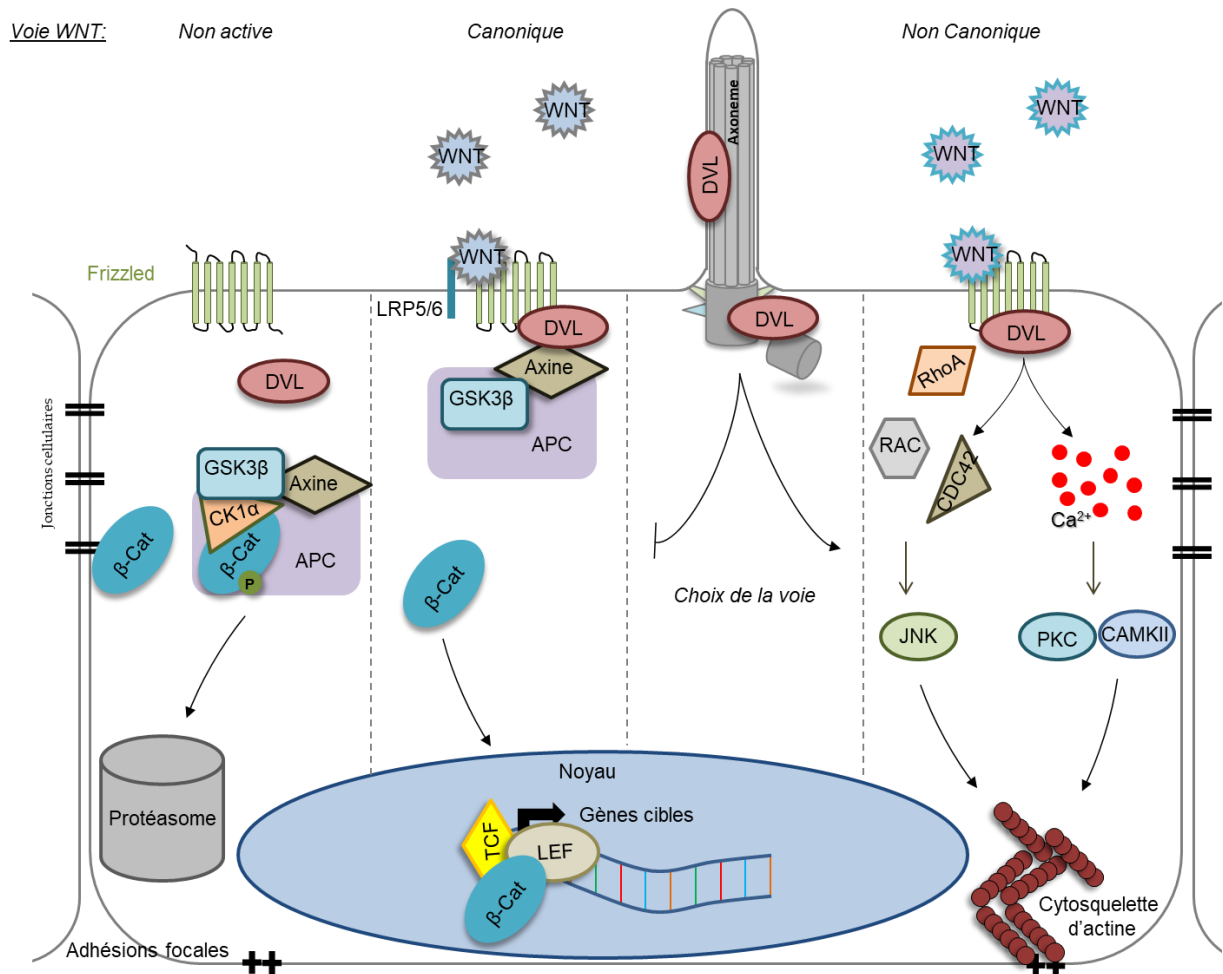


Figure 10: Signalisation de la voie WNT

La voie WNT peut être divisée en 2 voies, la voie canonique et la voie non-canonique pouvant être toutes les deux à l'état actif ou inactif. Le choix entre ces deux voies pouvant hypothétiquement être régi par le cil primaire. En absence du ligand WNT, le complexe axine-CK1α-GSK3β-APC inhibe la signalisation WNT en promouvant la dégradation de la β-caténine par le protéasome. La kinase de GSK3 va phosphoryler la β-caténine qui alors reconnu par la ligase E3 SCFβ-TrCP va être ubiquitinée et adressée au protéasome pour dégradation. En présence d'un ligand WNT au niveau de son récepteur Frizzled, le récepteur à l'aide de son co-récepteur LRP5/6 recrute DVL. DVL va à son tour recruter l'axine et la protéine GSK3, déstabilisant et inhibant ainsi le complexe GSK3/APC/Axine. La β-caténine n'est alors non dégradé et elle active les gènes cibles de la voie via les facteurs de transcriptions TCF-LEF qui se lient aux éléments "enhancer" des gènes cibles de la voie. Il s'agit de la voie canonique de la voie WNT. La voie non canonique active la voie des Rho GTPases et la libération de calcium intracellulaire suite au recrutement de DVL en réponse à la liaison WNT-FZ.

II.3.2.1.3. La voie Hippo

La voie Hippo a été reliée aux ciliopathies rénales notamment via l'implication des protéines NPHP4 (Habbig *et al.*, 2012) et NEK8/NPHP9 (Frank *et al.*, 2013; Grampa *et al.*, 2016). La voie Hippo est une voie conservée dans l'évolution et impliquée dans le développement et le contrôle de la taille des organes via la régulation de la prolifération et de la mort cellulaire ou encore le destin cellulaire. Initialement identifiée dans des études génétiques de la drosophile comme un suppresseur de surcroissance d'organes (Justice *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1995), le nom d'hippo lui vient d'une des kinases majeure de la voie, Hpo chez la Drosophile, qui quand dérégulée entraîne des organes surdimensionnés aussi appelés phénotypes "hippopotamus". La voie Hippo canonique consiste en une cascade de kinases principalement médiée par MST1/2 et LATS1/2 qui préviennent la translocation nucléaire de deux régulateurs de la transcription, la protéine associée YES (YAP) et de son coactivateur transcriptionnel comprenant le motif de liaison PDZ (TAZ). L'activation de la voie Hippo est induite par l'augmentation de la densité cellulaire et donc des contacts cellulaires, qui conduit alors à la translocation cytosolique et à la phosphorylation de la protéine YAP, inhibant de fait l'expression de ses gènes cibles pro-prolifératifs (Zhao *et al.*, 2007). D'autres activateurs de la voie Hippo ont par ailleurs été décrits, notamment des composants du complexe protéique établissant la polarité apico-basale (le complexe CRUMBS homologue (CRB), les protéines des jonctions serrées (aPKC, PAR3 et PAR6), les protéines des jonctions adhérentes (α -catenine) et du cytosquelette d'actine (Johnson *et al.*, 2002; Varelas *et al.*, 2010).

II.3.2.1.3.1. La voie Hippo dans le développement du rein

Les embryons de souris invalidés pour la protéine YAP (*Yap*^{-/-}) présentent une létalité embryonnaire à 8,5 jours (E8.5) associée à des défauts de la vasculogenèse du sac vitellin, de la fusion chorio-allantoïque et de l'allongement de l'axe du corps suggérant que la protéine YAP est impliquée dans les étapes précoces de l'embryogénèse (Morin-Kensicki *et al.*, 2006). Reginensi *et al* ont invalidé chez la souris YAP spécifiquement au niveau du mésenchyme condensé (CM pour « cap mésenchyme »), appelée *Yap*^{CM}^{-/-}, afin de prévenir toute létalité précoce. Dans ce modèle, la déplétion de YAP résulte en un phénotype drastique entraînant une létalité 48h après la naissance. Les mutants *Yap*^{CM}^{-/-} présentent à P0 des reins hypoplasiques avec une perte des néphrons, une désorganisation du cortex interne et une médullaire principalement composée de tubes collecteurs avec une réduction drastique de l'anse de Henlé, démontrant ainsi le rôle de YAP dans la néphrogénèse (Reginensi *et al.*, 2013). A contrario, chez les 3 modèles murins d'inactivation du gène *Taz* rapportés, la moitié

des animaux présentent une létalité à la naissance, les autres survivent lors de la première année en développant une maladie rénale multikystique, avec des kystes glomérulaires, non sans rappeler la PKD humaine (Hossain *et al.*, 2007; Makita *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2007). De plus, la déplétion de la protéine Taz entraîne un phénotype ciliaire avec des cils plus courts dans les tubules kystiques (Hossain *et al.*, 2007). Fait intéressant, des niveaux élevés de polycystine-2 ont également été observés chez ces souris mutantes, liés à l'incapacité de TAZ à promouvoir la dégradation de PC2 via le protéasome par la liaison du complexe SCFb-Trcp E3 ligase 5 (Tian *et al.*, 2007). Dans tous les modèles, les kystes rénaux provenant du glomérule et des tubes proximaux après 15.5 jours (E15.5) suggèrent que la protéine TAZ, contrairement à YAP, n'est pas requise pour les événements précoces de branchement du bourgeon urétéral (Makita *et al.*, 2008). En conclusion, même si Yap et Taz sont étroitement apparentés comme activateurs co-transcriptionnels, au cours du développement rénal, ils jouent des rôles distincts, dans lesquels YAP est essentiel pour la néphrogenèse et TAZ pour le maintien physiologique des tubules rénaux via la dégradation de PC2.

Deux des modèles de souris *Taz*^{-/-} présentent également un phénotype extrarénal avec des espaces aériens élargis dans les poumons, rappelant l'emphysème pulmonaire humain et évoquant donc un possible lien avec les ciliopathies (Makita *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2007).

II.3.2.1.3.2. La voie Hippo dans les ciliopathies rénales

Une augmentation de la localisation du YAP nucléaire a été observée dans les biopsies rénales humaines des ADPKD et ARPKD, en particulier dans les kystes et le tissu fibrotique (Happé *et al.*, 2011a, 2011b). Dans un modèle murin inductible de *Pkd1*, *Pkd1del2-11/lox2-11*, appelée souris cKO, l'expression nucléaire de YAP a été fortement détectée seulement 10 semaines après induction dans les tubules distaux et les canaux collecteurs, suggérant que les altérations de la voie Hippo sont des événements secondaires favorisant la formation de kystogénèse (Happé *et al.*, 2011a, 2011b). De plus, les protéines ciliaires NPHP4 et NEK8/NPHP9, mutées dans la NPH et des formes plus sévères d'hypodysplasie kystiques, ont été proposées comme régulateurs de la navette nucléaire de YAP/TAZ (Grampa *et al.*, 2016; Habbig *et al.*, 2011a, 2012). NPHP4 est capable d'abroger la phosphorylation médiée par LATS sur TAZ et YAP, permettant leur translocation nucléaire (Habbig *et al.*, 2011b). De plus, les mutations de NEK8, entraînent soit une accumulation nucléaire anormale ou un défaut de translocation nucléaire de YAP dans les cellules de patients renforçant l'implication de la voie Hippo dans la néphronophtise (Grampa *et al.*, 2016). Ainsi, la dérégulation de la voie

Hippo chez les patients présentant des mutations de gènes ciliaires s'accompagne de phénotypes de ciliopathies sévères tels que la dysplasie rénale, *situs inversus* et également des défauts cardiaques (Frank et al., 2013; Grampa et al., 2016).

II.3.2.1.3.3. La voie Hippo au niveau du cil primaire

Récemment, plusieurs travaux importants ont lié les protéines de la voie Hippo au cil primaire. Il a été montré que dans les cellules ciliées de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE), l'homologue de Salvador 1 (SAV1), une protéine d'échafaudage de la voie canonique Hippo, était localisée au centrosome des cellules en prolifération, alors que les formes phosphorylées de MST1 et SAV1 étaient retrouvées au niveau du corps basal, suggérant que ces protéines Hippo sont activées dans les cils (Kim *et al.*, 2014). Dans le même modèle cellulaire, l'inactivation indépendante des deux protéines MST1/2 et SAV1 conduit à une réduction du nombre de cellules ciliées. Dans les modèles animaux, la déplétion de SAV1 induit un phénotype rappelant les ciliopathies chez le poisson zèbre, notamment caractérisé par une courbure de l'axe du corps, un œdème cardiaque et des kystes pronephriques d'une sévérité variable. Au niveau moléculaire, le complexe MST1/2 interagit et active la kinase Aurora A (AURKA), qui peut à son tour renforcer l'activité de l'histone désacétylase 6 (HDAC6) (Pugacheva *et al.*, 2007). De plus, le complexe MST1/2 s'associe au complexe NPHP1/NPHP4, favorisant la localisation de plusieurs cargo ciliaire, dont Rab8, Smo, RPGR et Arl13b (Kim *et al.*, 2014). Il est intéressant de noter que YAP et TAZ régulent le trafic des vésicules ciliaires par le biais de LIMK2 et TESK1, deux facteurs de remodelage de l'actine (Kim et al., 2015a) qui diminuent également le pourcentage de cellules ciliées. Enfin, un lien important a été fait entre l'acteur majeur du CI, NEK8, et la voie YAP/TAZ, suggérant un possible rôle du CI dans l'activation de la voie au sein de modèles *in vitro* et *in vivo* mutant pour NEK8 (Grampa *et al.*, 2016). En effet, les mutations de *NEK8* entraînent le maintien de la protéine YAP au sein du noyau dans les cellules confluentes et par conséquent une suractivation de ses gènes cibles. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs de YAP, la Verteporfin a permis de restaurer les phénotypes induits par les mutations *NEK8* (Grampa *et al.*, 2016). Toutes ces données indiquent que la voie Hippo pourrait contrôler la prolifération et la différenciation, non seulement par l'activation transcriptionnelle de ses gènes cibles, mais aussi par le contrôle de la ciliogénèse et les de signalisations ciliaires qui en découlent.

II.3.2.2. Les autres voies de signalisation

II.3.2.2.1. TGF- β

La voie du TGF- β (Transforming growth factor) est impliquée dans de nombreux processus cellulaires notamment, l'apoptose, la différenciation, la prolifération et la migration cellulaire (Anders *et al.*, 1997, 1998; Di Guglielmo *et al.*, 2003; Ikushima and Miyazono, 2011). La signalisation issue du TGF- β est activée via la liaison du ligand à ses récepteurs TGF- β kinase serine-thréonine de type I et II (TBRI/II) au niveau de la membrane plasmique (Anders *et al.*, 1997, 1998; Di Guglielmo *et al.*, 2003; Ikushima and Miyazono, 2011). La liaison de ce ligand, entraîne la formation du complexe TBRI/TBRII, dans lequel TBRII active par phosphorylation TBRI (Anders *et al.*, 1997, 1998; Di Guglielmo *et al.*, 2003; Ikushima and Miyazono, 2011). Cette activation de TBRI conduit au recrutement et à la formation de complexes protéiques Smad2/3/4 qui sont alors transloqués au noyau pour y réguler l'expression de gènes cibles (Derynck and Zhang, 2003; Hocevar *et al.*, 2001; Massagué, 1998; Massagué *et al.*, 2005). La voie du TGF- β est contrôlée négativement par la protéine inhibitrice Smad7 qui se lie à TBRI, conduisant au recrutement de Smurf2, une E3 ubiquitine Ligase, et à la dégradation du complexe TBRI-Smad7 (Abdollah *et al.*, 1997; Eichhorn *et al.*, 2012; Kavsak *et al.*, 2000; Nakao *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2012c) (cf [Figure 11: Signalisation de la voie du TGF- \$\beta\$](#)).

Le lien entre la voie du TGF- β et le cil primaire a tout d'abord été établi dans le modèle murin muté pour *lft88*, évoquant des défauts de la voie TGF- β (Clement *et al.*, 2009). De façon intéressante, les souris présentent une augmentation au niveau des cellules endothéliales de la phosphorylation de SMAD2 et du gène α -SMA régulant la transition épithélio-mésenchymateuse induite par le TGF- β (Clement *et al.*, 2009, 2013; Egorova *et al.*, 2011). Par la suite, les récepteurs TBRI et TBRII ont été retrouvés au niveau du cil primaire, plus précisément à la base du cil primaire au niveau des vésicules d'endocytoses au niveau de la poche ciliaire des cellules non polarisées (cf [Figure 6: Biogenèse du cil primaire](#)) (Benmerah, 2014; Clement *et al.*, 2013; Gencer *et al.*, 2017). Enfin, de façon intéressante, l'inhibition de la voie d'endocytose dépendante de la clathrine diminue de façon significative la réponse de la signalisation ciliaire du TGF- β et la localisation des complexes SMAD2/3 et ERK1/2 à la base du cil (Clement *et al.*, 2013).

Bien que les cellules épithéliales soient dépourvues de poche ciliaire (Benmerah, 2014), la signalisation du TGF- β est active dans les cellules tubulaires rénales de souris mIMCD3. De façon intéressante, les récepteurs au TGF- β sont aussi retrouvés au cil primaire de ces

cellules (ainsi qu'en basolatérale) et un traitement avec des ligands de ces récepteurs en apical active la voie (communications internes Albane Bizet). Ces informations tendent à prouver également le rôle du cil dans la signalisation au TGF- β dans les cellules épithéliales rénales.

Cette signalisation ciliaire du TGF- β a été montrée pour réguler les processus de migration des cellules épithéliales d'adenocarcinomes (Gencer *et al.*, 2017). Les processus de migration collective étant cruciaux pour le maintien de l'épithélium rénal, et altérés dans plusieurs modèles de NPHP *in vitro*, une dérégulation de la voie du TGF- β pourrait être en cause. Surtout les processus de transition épithélio-mésenchymateuse sus-cités, régulés par le TGF- β , pourraient conduire à l'importante fibrose rénale caractéristique de la NPH.

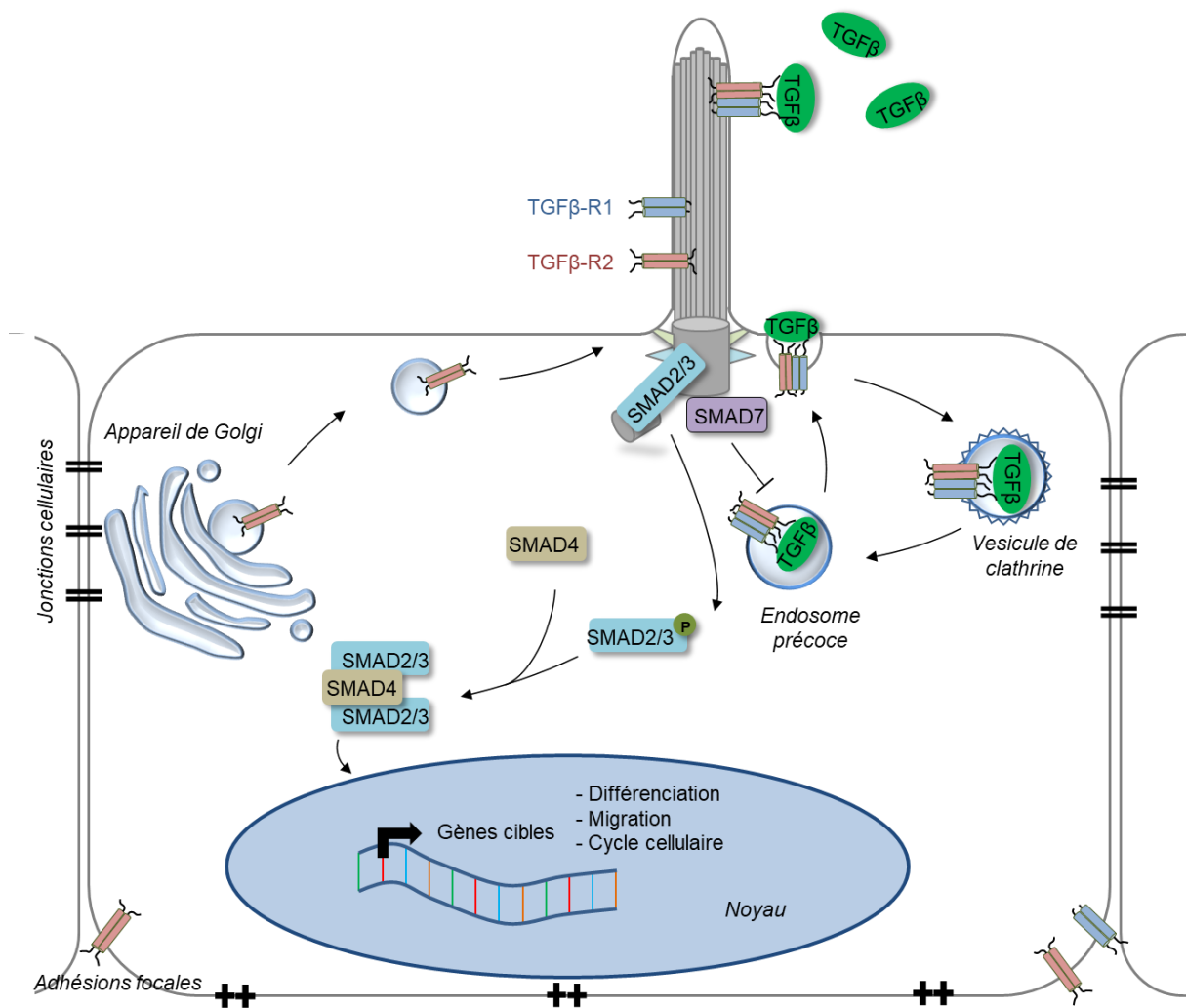


Figure 11: Signalisation de la voie du TGF- β

La signalisation du TGF- β , est activée par la liaison du TGF- β à son récepteur qui se dimérise à partir des sous unités TGF- β -R1 et TGF- β -R2. La liaison de ce récepteur au TGF- β induit son internalisation via la voie d'endocytose dépendante de la clathrine. Sous l'impulsion de cette internalisation les protéines SMAD2 et 3 sont phosphorylées. Un complexe SMAD2/3 et 4 se forme induisant alors l'induction de l'expression des gènes cibles de la voie du TGF- β .

II.3.2.2.2. AMPc

Au sein de la signalisation HH, deux différents états sont remarquables, l'état activé, et l'état basal dit SHH-off durant lequel la protéine Kinase A (PKA) dépendante de l'Adénosine Mono Phosphate cyclique (AMPc) phosphoryle les protéines Gli, entraînant leur clivage en forme transcriptionnellement répressive (Wang *et al.*, 2000). Ainsi l'activité de la protéine PKA est essentielle à la régulation de la voie HH, particulièrement dans le maintien de l'état basal de la signalisation. Pour cette régulation, la protéine PKA a été retrouvée au sein du cil primaire (Barzi *et al.*, 2010; Mick *et al.*, 2015; Tuson *et al.*, 2011). L'activité de PKA dépend du niveau d'AMPc, lui-même régulé par les protéines RCPGs. De nombreux RCPGs sont présents au niveau du cil, notamment SMO, GPR175 impliqués dans la régulation de la voie HH, mais aussi GPR161 et les récepteurs EP (récepteurs de la prostaglandine) activant l'Adénylate cyclase (AC) qui produit l'AMPc (Mukhopadhyay *et al.*, 2013; Philipp and Caron, 2009; Riobo *et al.*, 2006a, 2006b; Singh *et al.*, 2015).

L'AMPc est régulé au sein du cil primaire par différents acteurs clés les adénylates cyclases. Les adénylates cyclases de types III (seules adénylates cyclases retrouvées chez les mammifères) sont au nombre de 9 AC1-AC9 (Linder, 2006). Actuellement 3 AC sont reconnus de façon globalement ubiquitaire au niveau du cil primaire, il s'agit d'AC3 AC5 et AC6 (Defer *et al.*, 2000). La surexpression de ces AC entraînent une répression de la voie HH tandis que leur déplétion entraîne une activation anormale de la voie (Bishop *et al.*, 2007; Vuolo *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2011). Pour souligner d'autant plus l'importance de la protéine PKA comme régulateur ciliaire, les molécules d'AMPc et de Ca^{2+} sont des régulateurs critiques de la taille des cils primaires (Besschetnova *et al.*, 2010; Mukherjee *et al.*, 2016). Enfin, une production même faible de molécules d'AMPc, entraîne une augmentation significative de la concentration en AMPc au cil, suffisante pour activer la PKA au sein du cil et inhiber la voie HH (Moore *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2012a). Ainsi l'AMPc serait un régulateur du cil primaire possiblement via HH.

II.4. Perspectives et études ciliaires

Depuis plusieurs années, le rôle du cil dans la signalisation cellulaire, et plus largement dans de nombreux processus clés au niveau de l'organisme total, a été démontré comme primordial (cf [Figure 12: Evolution du nombre de publications en référence au cil primaire](#)). Comme le démontre les nombreux projets sur le cil, en particulier le projet européen SYSCILIA, dont le but était de disséquer les fonctions ciliaires et leurs liens avec les pathologies, le cil primaire ne demeure cependant que partiellement élucidé. Le rôle

prépondérant du cil primaire dans les pathologies humaines a été confirmé par l'émergence de nouvelles maladies étiquetées « ciliopathie », ceci en partie dû au développement des techniques de séquençage d'exome. Pour cette raison, et grâce à l'évolution de nouvelles technologies, de nombreuses études ont été menées sur la biologie du cil primaire au cours des trois dernières années. Ainsi, différentes approches globales protéomiques ou de criblage par interférence ARN ont permis de définir l'ensemble des protéines exprimées au cil ou jouant un rôle clé dans la biogenèse du cil, et identifier ainsi de nouvelles voies de signalisation liées à cet organel, replaçant le cil plus que jamais au centre de l'attention dans le développement de pathologies humaines. Ces différentes études réalisées dans plusieurs modèles cellulaires et animaux comprennent des études de criblage par interférence ARN, des études par biotinylation de protéines ciliaires couplées à une approche protéomique, le tout regroupant pas moins de 7 études majeures dans différents modèles lors des 2 dernières années.

Dans un premier temps, des analyses de la ciliogenèse par immunofluorescence ou cytométrie en flux ont été réalisées après l'invalidation de l'ensemble des gènes du génome par interférence ARN. Deux sur 3 études, ont utilisées une protéine smo-EGFP comme rapporteur sur des cellules rétinienne humaines RPE1 et une étude a couplé des cellules rénales murines mIMCD3 et RPE1 utilisant l' α -tubuline acétylée comme marqueur du cil (Kim *et al.*, 2016a; Roosing *et al.*, 2015; Wheway *et al.*, 2015). Wheway *et al.* en 2015 détecte 1829 gènes sur 19059 affectant la ciliogénèse, et seulement 194 de ces gènes n'affectent pas le nombre de cellules et ont été validé par un second et un troisième criblage dans des mIMCD3 et des RPE1. Roosing *et al* 2015 identifie 1299 gènes impliquant la ciliogénèse sur 18045 gènes dans les RPE1. Sur ces 1299 gènes, 591 gènes sont considérés comme étant de très bons candidats ciliaires. Enfin, Ji Hyun Kim *et al* en 2016 identifient 825 gènes impliqués dans la ciliogénèse qu'ils classent en 3 sous-groupes en fonction de leur effet sur le cycle cellulaire. Ainsi 20% de ces gènes entraînent des défauts de ciliation et bloquent l'entrée et/ou le maintien des cellules en état de quiescence.

Deux autres études utilisent l'approche par biotinylation des protéines ciliaires dans des cellules mIMCD3. Le principe est de créer une protéine de fusion à partir d'une protéine ciliaire et d'ascorbate peroxidase APEX. Sous l'influence du peroxyde d'hydrogène H₂O₂, l'APEX catalyse la conversion de biotine-phenol en radicaux biotine-phenoxyde très instable. Ces radicaux seront capables de se lier de façon covalente aux acides aminés environnant, marquant alors toutes les protéines alentour. Une purification des protéines biotinylées par

des billes de streptavidine et une approche de spectrométrie de masse permettront l'analyse et l'identification de ces protéines. Cette approche a été utilisée avec deux différents rapporteurs, NPHP3 (Mick *et al.*, 2015) et le GPCR HTR6 (Kohli *et al.*, 2017). Les résultats des deux études sont similaires et permettent d'obtenir un peu plus de 350 protéines retrouvées au cil. En parallèle, une cinquantaine de nouveaux gènes, notamment relatifs au cytosquelette d'actine (Actn1/Acn4/Tmp3/Tmp4/Coroc1c/Ezrine/Gelsoline) ont ainsi été identifiés.

Enfin, deux études d'analyses protéomiques couplées à des études phylogénétiques ont permis d'établir différentes listes de protéines du cil ou ciliomes en fonction de leur degrés de conservation (Roncaglia *et al.*, 2017; Sigg *et al.*, 2017). Cette méthode a permis de confirmer 437 gènes ciliaires hautement conservés au cours du temps soulignant leur importante fonction dans les voies de signalisation (Sigg *et al.*, 2017). La deuxième étude a identifié 285 gènes candidats dont 24 sur 36 testés (soit 66%) ont été validés dans des cellules RPE et IMCD (Roncaglia *et al.*, 2017). Ces gènes candidats associés aux gènes déjà validés comme ciliaires forment une base de données, CiliaCarta, de 836 gènes.

Ainsi, ces récentes études permettent une meilleure compréhension et surtout une meilleure cartographie des protéines ciliaires. Cette cartographie permet alors la priorisation de variants identifiés dans ces gènes candidats lors du séquençage haut débit de patients atteints de ciliopathies. De fait, de nouveaux gènes de ciliopathies et de nouveaux phénotypes cliniques ont été mis en évidence. C'est le cas de *TALPID3* dans le JBTS ou du gène *ENKUR* dont les mutations, causent un *situs inversus* chez l'humain du fait de son rôle au cil motile (Sigg *et al.*, 2017) (Abedin Sigg *et al.* 2017). C'est aussi cette nouvelle cartographie qui permet de voir l'émergence de nouvelles pathologies étiquetées « ciliopathie » comme il a pu être détaillé précédemment avec l'achondroplasie (cf Les ciliopathies émergentes).

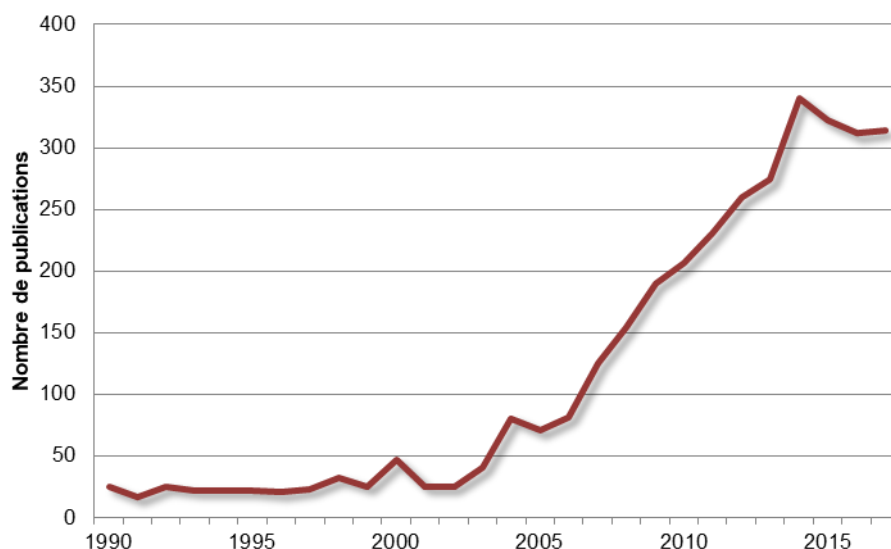


Figure 12: Evolution du nombre de publications en référence au cil primaire

Graphique représentant le nombre de publications scientifiques en référence au cil primaire, publiées lors des 30 dernières années (1988-2018) via le moteur de recherche Pubmed.

Les études sur la composition ciliaire ont aussi permis de définir ou de confirmer de nouvelles voies de signalisation impliquant le cil primaire, telle que la voie de signalisation de l'AMPK (Mick et al., 2015). En effet, il apparaît que la protéine STRAD β co-localise au cil avec la kinase LKB1, un régulateur des voies mTOR et AMPK (Boehlke et al., 2010; Mick et al., 2015; Zeqiraj et al., 2009), et est nécessaire à sa localisation ciliaire. Bien que la protéine AMPK n'ait jamais été retrouvée au niveau du cil primaire, notamment dû à son importante dynamique, elle est retrouvée au cil des cellules déplétées pour IFT27, dans laquelle le transport des protéines ciliaire défectueux. Ces résultats ont permis de démontrer que le cil primaire est impliqué, via la voie STRAD β -LKB1-AMPK et mTOR, dans le métabolisme énergétique (Jansen et al., 2009). La découverte de nouvelle voie de signalisation, comme celle sus-citée, au niveau du cil primaire permet de mieux comprendre la physiopathologie des ciliopathies et donc d'en élargir le spectre thérapeutique.

III- Les Néphrocystines, des protéines multitâches

Comme déjà largement abordé, la plupart des protéines dont les gènes sont mutés dans la NPH sont localisées au cil primaire, mais pas uniquement. Leurs fonctions sont principalement reliées aux fonctions ciliaires, probablement en grande partie à l'origine des phénotypes observés. Cependant, des fonctions annexes, indépendantes du cil ont également été reportées pour ces protéines. Cette localisation extra ciliaire et le rôle extra ciliaire des NPHP et IFT ne doit pas être négligé dans l'apparition du phénotype rénal, voire extra-rénal, qui uniquement expliqués par la théorie ciliaire constituerait une simplification des mécanismes moléculaires sous-jacents. De plus, de rares gènes NPHP ne sont pas rapportés au cil, tel que MAPKBP1/NPHP20 (Macia *et al.*, 2017), le facteur de transcription ZNF423/NPHP14 (Chabi *et al.*, 2012) ou encore GLIS2/NPHP7 (Attanasio *et al.*, 2007).

III.1. Localisation et fonction non ciliaire exclusive

Même si la protéine MAPKBP1 est l'une des rares protéines non ciliaires reconnues pour son implication dans la NPH (Macia *et al.*, 2017), bien d'autres protéines NPHP et IFT présentent une localisation ciliaire non exclusive. Ainsi, les NPHP ont pu être notamment retrouvées au centrosome, aux pôles du fuseau mitotique au cours du cycle cellulaire, aux jonctions cellulaires comme NPHP1 et NPHP2 ou encore associées aux microtubules comme IFT54, ou IFT139 (cf [Figure 13: Localisation extra-ciliaire des protéines impliquées dans les ciliopathies.](#)).

III.1.1. Jonctions cellule-cellule

Plusieurs NPHP ont été retrouvées au niveau des jonctions cellulaires, notamment NPHP1, NPHP2/Inversine, RPGRIP1L, NPHP4, ou encore SDCCAG8 (Donaldson *et al.*, 2000; Mollet *et al.*, 2005; Otto *et al.*, 2005; Sang *et al.*, 2011a; Simons *et al.*, 2005). Il a en effet été montré que NPHP1 et NPHP4 co-localisent et interagissent avec et les protéines responsables de la polarité apico-basales PALS1, PAR6 et PATJ au niveau des jonctions cellulaires (Delous *et al.*, 2009a) (cf [Figure 13: Localisation extra-ciliaire des protéines impliquées dans les ciliopathies.](#)). Ainsi, il n'est pas étonnant d'observer un retard dans la formation des fonctions cellulaires et des défauts d'établissement de la polarité apico-basale dans les cellules épithéliales mIMCD3 et MDCK lorsque celles-ci sont déplétées pour les protéines NPHP1/4 et 8 (Delous *et al.*, 2009b; Sang *et al.*, 2011a).

De plus, les protéines NPHP1 et NPHP4 interagissent également avec les protéines impliquées dans la régulation des adhésions focales, pyk2, tensine et p130Cas (Benzing *et al.*,

2001; Mollet *et al.*, 2005). Le rôle des NPHP dans l'organisation du cytosquelette sera alors souligné par l'activation anormalement élevée de Pyk2 et p130Cas en cas de déplétion de NPHP4 ou de surexpression de NPHP1, entraînant un remodelage du cytosquelette d'actine (Liebau *et al.*, 2011; Mollet *et al.*, 2005). De façon intéressante, une inactivation de Pyk2 dans un modèle murin réduit drastiquement la fibrose rénale induite après une occlusion urétrale (Sonomura *et al.*, 2012). La présence des protéines ciliaires NPHP1-NPHP4-NPHP8 et INVS aux jonctions cellulaires souligne leur rôle dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium rénal et suggère que la régulation des voies de signalisation par ces protéines, telle que la voie WNT, serait due à leur localisation au niveau du cil primaire mais également aux jonctions cellulaires (Mahuzier *et al.*, 2012). Par ailleurs, les protéines ciliaires régulant l'organisation du cytosquelette d'actine pourrait influencer la ciliogenèse comme discuter au paravant (cf Cytosquelette et cil).

III.1.2. Aux microtubules

Comme vue précédemment, les mutations dans les gènes impliqués dans la NPH offre une grande diversité de phénotypes. Particulièrement, des patients porteurs d'une mutation homozygote p.P209L du gène *TTC21B/NPHP12* codant pour l'IFT139, impliquée dans le transport rétrograde, présentent une NPH associée à une glomérulopathie de type hyalinose segmentaire et focale (HSF) (Cong *et al.*, 2014; Davis *et al.*, 2011). Ces lésions glomérulaires retrouvées dans le syndrome néphrotique, sont souvent causées par des mutations dans des gènes codant des protéines régulant le cytosquelette d'actine et de microtubule au niveau des cellules glomérulaires appelées podocytes (Machuca *et al.*, 2009). Ainsi, IFT139 localisée au cil primaire des podocytes immatures, se relocalise au niveau du réseau de microtubules cytoplasmiques dans les podocytes matures non ciliés. De fait, la déplétion d'IFT139 entraîne une désorganisation du réseau de microtubules et un défaut de nucléation de ces derniers (Cong *et al.*, 2014).

Ce double rôle ciliaire et dans l'organisation des microtubules cytoplasmiques à également été observé pour une autre protéine IFT, IFT54. IFT54, codée par le gène *TRAF3IP1*, est un membre du complexe des IFTB connue pour interagir avec la protéine microtubulaire TRAF3 (facteur associé au récepteur du TNF3) (Ling and Goeddel, 2000; Morris *et al.*, 2003). Des mutations de *TRAF3IP1* ont été identifiées chez des patients atteints de NPH associée à une atteinte rétinienne (Bizet *et al.*, 2015). Ces mutations perturbent l'interaction de IFT54 avec la protéine MAP4 (Microtubule associated protein 4), protéine connue pour stabiliser les microtubules (Bizet *et al.*, 2015; Ghossoub *et al.*, 2013; Holmfeldt *et*

al., 2009), et provoque sa fixation anormale aux microtubules. Ainsi, les mutations *TRA3IP1* entraînent une stabilisation anormale des microtubules cytoplasmiques conduisant à des défauts de polarité cellulaire dans les cellules tubulaires rénales et les reins de patients (Bizet *et al.*, 2015).

III.1.3. Au niveau des mitoses

Comme le cil primaire, les pôles du fuseau mitotique sont des structures microtubulaires. Ces deux éléments cellulaires sont aussi tous les deux différenciés à partir des centrosomes et partagent dans leur composition un certain nombre de protéines telle que NPHP2/Invs (Morgan *et al.*, 2002), NPHP4 (Mollet *et al.*, 2005) et plusieurs IFT dont IFT20 (Follit *et al.*, 2006), IFT71 (Iomini *et al.*, 2004), IFT52 (Deane *et al.*, 2001) et enfin IFT88 (Robert *et al.*, 2007). Parmi celles-ci, IFT88 est l'IFT qui a été la plus étudiée au niveau des pôles du fuseau mitotique. Le rôle d'IFT88 au niveau du processus mitotique a été mis en évidence via son interaction avec la dynéine-1 permettant alors le transport et la nucléation des microtubules périphériques au niveau pôles du fuseau mitotique. L'invalidation d'IFT88 désorganise donc les pôles du fuseau mitotique induisant des défauts d'orientation des mitoses tant *in vitro* qu'*in vivo* (Delaval *et al.*, 2011). Ces défauts d'orientation des mitoses ne sont pas sans rappeler la théorie de formation des kystes évoquée plus haut (cf La voie Wnt) et pourrait alors relier une nouvelle fois le rôle non ciliaire des NPHP à la pathologie. Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'invalidation d'IFT88 chez le poisson zèbre conduit à des défauts de convergence extension (PCP) se traduisant chez l'animal par des anomalies de croissance antéro-postérieure (McIntyre *et al.*, 2012) (cf [Figure 13: Localisation extra-ciliaire des protéines impliquées dans les ciliopathies.](#)).

III.1.4. Au niveau du trafic vésiculaire

Les défauts de polarité apico-basales dans les cellules tubulaires rénales invalidées pour les gènes *NPHP* sont prépondérants. Le trafic intracellulaire est nécessaire à l'établissement de la polarité apical, comme cela est le cas pour la protéine membranaire AQP2 (Moeller *et al.*, 2018), et par conséquent certaines NPHP pourraient être impliquées dans ce mécanisme. L'IFT54, par exemple, pourrait exercer un rôle redondant à celui de la septine-2. En effet SEPT2 inhibe la liaison de MAP4 aux microtubules de façon similaire à IFT54, et maintient la polyglutamylation des microtubules permettant alors le transport de protéines nécessaires à l'établissement de la polarité apico-basale depuis l'appareil Trans-Golgi (TGN) vers la membrane plasmique (Bizet *et al.*, 2015; Spiliotis *et al.*, 2008).

Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'IFT54 interagit avec IFT20 (Follit *et al.*, 2009), une protéine IFT B localisée à l'appareil cis-Golgi qui participe à l'adressage de protéines ciliaires au cil (Follit *et al.*, 2006). L'invalidation modérée d'IFT20 affecte la physiologie ciliaire en impactant le transport de polycystin-2 du golgi au cil primaire (Follit *et al.*, 2006). De plus, une mutation dans le gène *PIK3R4*, codant pour la protéine VPS15, impliquée dans l'autophagie et le trafic membranaire (Lindmo *et al.*, 2008; Volinia *et al.*, 1995), impacte la localisation ciliaire d'IFT20 et conduit à un phénotype de ciliopathie (Pampliega *et al.*, 2013; Stoetzel *et al.*, 2016).

Cette interaction et localisation avec l'appareil de golgi donne à IFT20 des rôles extraciliaires importants, comme son rôle dans la sécrétion de collagène (Noda *et al.*, 2016). Dans un type cellulaire spécialisé, les cellules immunitaires, IFT20 exerce encore une fois un rôle dans le trafic intracellulaire indépendamment de son rôle de transport intraflagellaire. Il a en effet été démontré que l'absence d'IFT20 perturbe le recyclage du complexe TcR/DC3 au niveau de la synapse immunologique, conduisant à une accumulation de ce complexe pouvant induire de potentiels syndromes immunitaires chez les patients (Finetti *et al.*, 2009).

Avec ces exemples un lien direct ou indirect peut être établi entre des protéines comportant un double rôle ciliaire et de trafic cellulaire notamment via IFT54. Ainsi, le rôle non ciliaire des protéines ciliaires, telles que les NPHP et les IFT, et leur impact sur les phénotypes dits « ciliaires » observés dans les ciliopathies ne semblent plus à négliger.

III.1.5. DDR

Un autre mécanisme cellulaire impliquant plusieurs protéines de ciliopathies rénales est la voie de signalisation de réponse aux dommages causés à l'ADN (DDR pour DNA Damage Response). Cette voie comporte comme principaux acteurs ATM (Ataxia telangiectasia mutated) et ATR (Rad3-related protein) conduisant tous les deux à l'arrêt du cycle cellulaire (Bartek and Lukas, 2003). L'ATM est activée suite à une cassure double brin de l'ADN (DSB pour Double Strand Break) tandis qu'ATR est liée aux défauts et erreurs de réplication (Cimprich and Cortez, 2008).

Parmi les gènes dont les mutations aboutissent à des défauts de DDR, on retrouve les gènes *ZNF423/NPHP14*, *CEP164/NPHP15* et *MRE11*, responsables d'une NPH associée à un *situs inversus*, de malformations du cerebellum et/ou d'une fibrose hépatique et pulmonaire (Chaki *et al.*, 2012). Ainsi que *SDCCAG8/NPHP10*, *NEK8/NPHP9* et *MAPKBP1/NPHP20* mutés respectivement dans des syndromes de Bardet-Biedl et des NPH infantile ou

hypodysplasies rénales kystiques et NPH tardives (Grampa et al., 2016; Macia et al., 2017; Schaefer et al., 2011).

Ainsi, dans les cellules mutées ou invalidées pour ces gènes, il a été observé une augmentation du marquage γ H2AX, un marqueur des DSB de l'ADN, cohérent avec une altération de la réponse au DDR. (Airik et al., 2016; Choi et al., 2013; Kuo and Yang, 2008; Macia et al., 2017; Sivasubramaniam et al., 2008).

ZNF423 code pour une protéine à doigts de zinc qui se localise au niveau nucléaire. De façon intéressante, *ZNF423* peut se lier à la protéine PARP1, qui elle est capable de recruter les protéines MRE11 et ATM en cas de lésion de l'ADN (Sato et al 1992). Comme évoqué précédemment, MRE11 est un élément essentielle à la DDR, par son implication dans le complexe Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) qui se lit aux cassures doubles brins et participe à la réponse médiée par ATM que ATR (Lafrance-Vanasse et al., 2015; Lamarche et al., 2010; Rein and Stracker, 2014). On notera qu'en cas de lésions DSB ou de stress au niveau de la réplication, CEP164 localisée au niveau des centrioles, peut être phosphorylée au niveau de sa Ser186 et relocalisée au noyau où elle est requise pour la phosphorylation de γ H2AX, CHK2 et RPA (Sivasubramaniam et al., 2008). Ainsi la perte de fonction du gène *cep164* chez le poisson zèbre entraine une réponse aux dommages à l'ADN altérée (Chaki et al., 2012). Cependant une étude plus récente tend à démontrer l'absence d'implication de CEP164 dans la réponse aux dommages à l'ADN. En effet la déplétion de *cep164* dans des cellules de poulet (DT40) ou sa mutation dans des cellules rétinienne humaine (RPE1) n'entraine pas de sensibilité accrue aux dommages à l'ADN en réponse aux rayonnements ioniques ou ultraviolets (Daly et al., 2016). Ainsi le rôle principal de CEP164 dans l'établissement de la ciliogenèse n'est pas remis en question contrairement à son rôle secondaire dans la réponse aux dommages ADN qui pourrait être un artefact issus des défauts entraînés par l'absence de cil primaire (Chaki et al., 2012; Daly et al., 2016; Sivasubramaniam et al., 2008).

Le modèle murin *Sdccag8*^{-/-}, quant à lui, a montré un blocage anormal du cycle cellulaire des cellules présentant une hyperactivation d'ATM associée à l'élévation du niveau de γ H2AX (Airik et al., 2016).

Finalement, la protéine NEK8 semble intervenir à différent niveau dans la régulation du processus de DDR, notamment en se liant au système de phosphorylation d'ATR et au complexe Cyclin A-CDK2, mais aussi en recrutant la protéine RD51 au niveau de la fourche de réplication de l'ADN permettant ainsi sa protection (Abeyta et al., 2017; Choi et al., 2013).

Ainsi, NEK8 joue un rôle crucial dans la régulation des dommages à l'ADN via son rôle dans la réparation mais également dans la protection. Les défauts de la voie de DDR entraînent une accumulation de lésions de l'ADN qui conduit à une apoptose anormale chez les patients mutés pour NEK8 et atteints d'hypodysplasie et agénésie rénales (Grampa *et al.*, 2016).

Toutes ces études tendent à montrer le lien existant et cohérent avec la pathologie entre DDR et NPH. En effet, les patients NPH présentent des reins de taille normale voir diminuée, avec des tubes atrophiques observables en histologie. Ainsi un niveau de cellules apoptotiques anormalement élevée a été observée dans plusieurs modèles et patients atteints de NPH (notamment les patients porteurs de mutations NPHP1) (Grampa *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018; Wodarczyk *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2012).

III.2. Autres gènes NPH-like à fonction extra ciliaire

Après avoir démontré le rôle extra ciliaire de certaines NPHP, il existe aussi certaines NPHP dont la localisation est uniquement extra ciliaire. De façon intrigante, MAPKBP1 n'a jamais été localisée au niveau du cil primaire mais est recrutée aux pôles du fuseau mitotique au moment des phases précoces de la mitose où elle colocalise avec WDR62, une protéine d'échafaudage de la voie JNK à travers laquelle elle contrôle la réponse au stress, la migration cellulaire et la stabilité du fuseau mitotique. De façon étonnante, les cellules de patients mutées pour MAPKBP1 présentent en outre une augmentation de la signalisation du DDR sans que le mécanisme par lequel elle agit ne soit totalement identifié (Macia *et al.*, 2017).

D'autres gènes codant des protéines non ciliaires ont été révélés mutés chez des patients avec une atteinte rénale de type néphropathie tubulo-interstitielle similaire à la NPH dénommé « nephronophthise-like ». On peut citer pour exemple le gène NPHP1L, FAN1 (Zhou *et al.*, 2012), ZNF423 (Chaki *et al.*, 2012) ou encore SLC41A1.

Ce dernier gène *SLC41A1* code une protéine du même nom jouant le rôle de transporteur intracellulaire de Mg^{2+} . Une mutation entraînant la délétion de l'exon 6 du gène a été retrouvée chez une famille exhibant une néphrite tubulo interstitielle associée à une bronchiectasie, « NPH-like ». Bien que la protéine soit uniquement retrouvée à la membrane plasmique, son invalidation par morpholinos entraîne des phénotypes caractéristiques de ciliopathies chez le poisson zèbre, notamment une courbure de l'axe ventral, des kystes rénaux et une hydrocéphalie (Hurd *et al.*, 2013; Kolisek *et al.*, 2008; Mandt *et al.*, 2011).

Une mutation dans le gène *XPNPEP3NPHP1L* entraîne une néphrite tubulo interstitielle « NPH-like » associée à des atteintes symptomatiques d'une atteinte mitochondriale (O'Toole et al., 2010). *XPNPEP3* est une protéine mitochondriale qui n'est pas localisée au cil. Cependant le phénotypes ciliaires observés chez le poisson zèbre suite à l'extinction du gène par morpholino renforce un lien déjà existant entre troubles mitochondriaux et syndromes rénaux (Martín-Hernández et al., 2005; Niaudet, 1998). On notera également le lien entre *XPNPEP3* et le cil primaire, puisque différentes protéines ciliaires dont *CEP290/NPHP6*, *ALMS1*, et *LRRC50* se trouvent être des cibles de l'activité protéolytiques de *XPNPEP3* (O'Toole et al., 2010). Enfin il a récemment été montré que *XPNPEP3* est une cible de la régulation de la voie WNT, dépendante du cil primaire (Kumar et al., 2018).

Ainsi les atteintes rénales de type « NPH-like » pourraient aussi bien être une nouvelle fois expliquées par un rôle extraciliaire de la protéine jouant sur le métabolisme comme par son rôle sur les protéines ciliaires (cf La régulation).

Ces exemples permettent d'exposer que certains défauts comme des défauts de DDR, d'homéostasie du magnésium ou encore des défauts mitochondriaux peuvent conduire à des phénotypes « NPH-like » de façon totalement indépendante du cil primaire. Cela nous permet donc d'imaginer que les atteintes de type néphrites tubulo interstitielles retrouvées chez les patients NPH pourrait être causées par différents mécanismes associés aux fonctions diverses des gènes NPH.

Enfin, la dernière partie de ce chapitre s'intéressera à deux protéines *BICC1* et *ANKS3* dont les mutations ont été identifiées dans des familles avec NPH et atteintes hépatiques et dont les fonctions ciliaires et extraciliaires ont fait l'objet de mon travail de thèse (cf Aspects cliniques).

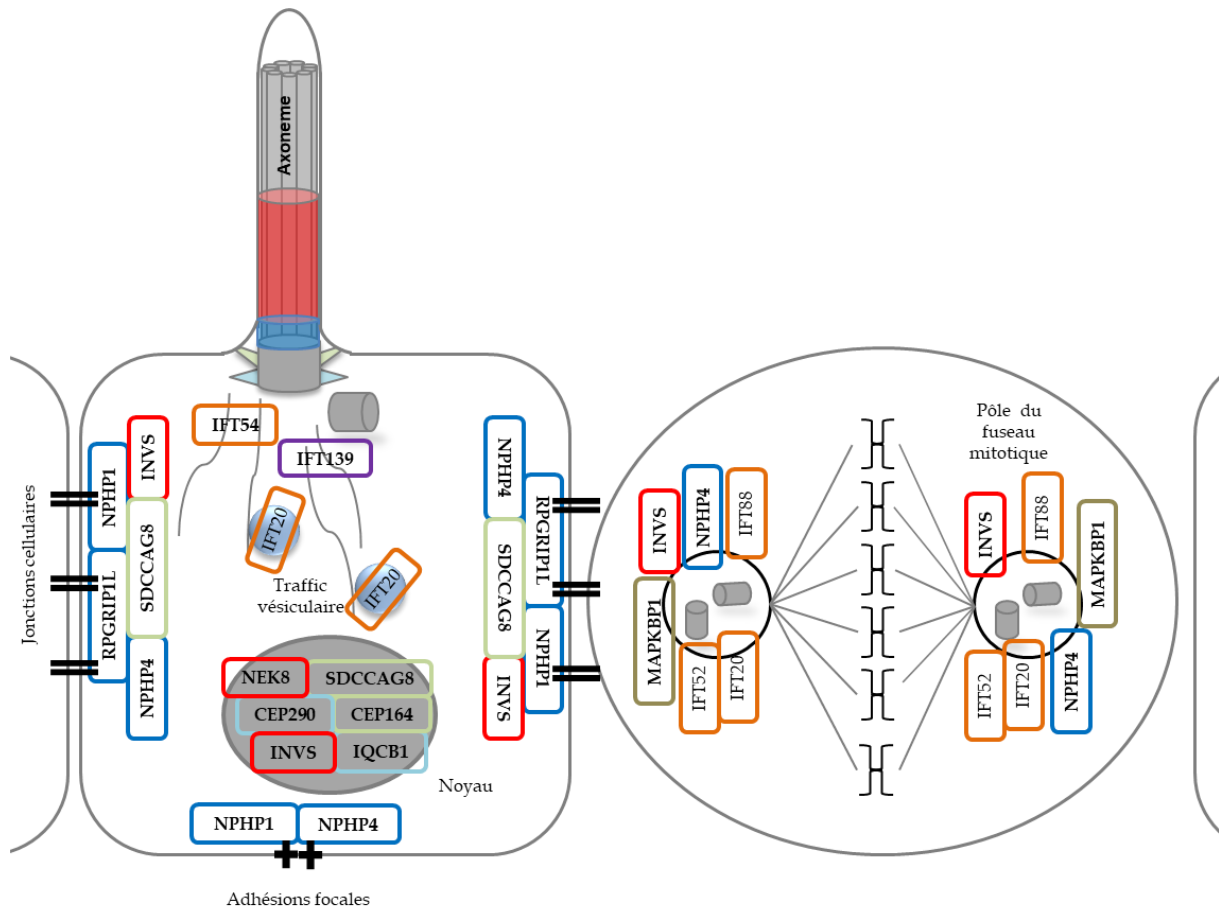


Figure 13: Localisation extra-ciliaire des protéines impliquées dans les ciliopathies.

Plusieurs protéines NPHP et IFT se localisent aux jonctions cellulaires où elles interagissent avec les adhésions focales, au noyau, au niveau des vésicules cellulaires et des microtubules. Dans les cellules en division on peut les retrouver au niveau des pôles du fuseau mitotique. Les NPHPs sont notées en gras

IV- ANKS3, un nouveau candidat de ciliopathies rénales

Comme vu précédemment, il existe une grande hétérogénéité génétique au sein de la NPH et des ciliopathies, environ 40% des patients n'ayant pas de mutations causales encore identifiées. Par des approches d'analyse de liaison et de séquençage d'exomes, nous avons identifié de nouveaux gènes candidats de ciliopathie. Parmi eux, *ANKS3*, pour lequel nous avons mis en évidence une mutation faux-sens homozygote chez 3 individus présentant une NPH tardive, avec un âge d'IRT moyen de 35ans, et une fibrose hépatique.

IV.1. Généralités

La protéine ANKS3 (Ankyrin Repeat And Sterile Alpha Motif Domain Containing 3) est une protéine de 656 acides aminés présentant 3 groupes structurels distincts. ANKS3 présente dans sa partie N-terminale, une répétition de 6 domaines Ankyrine (acides aminés 34 à 220), et dans sa partie C-terminale un domaine SAM (425 à 488), tous deux séparés par une région riche en leucine (cf [Figure 14: Structure et interactions d'ANKS3, ANKS6 et BICC1](#)). Les domaines Sterile Alpha Motif (SAM) sont parmi les modules plus communs au sein des protéines du génome eucaryotes et retrouvés dans plus de 1000 protéines (Knight *et al.*, 2011; Qiao and Bowie, 2005; Stapleton *et al.*, 1999). De plus, la présence d'un domaine SAM au sein d'une protéine implique des fonctions diverses pour celle-ci. En effet, que ce soit sous forme de polymères (Baron *et al.*, 2006, 2006; Harada *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2001, 2005a; Qiao *et al.*, 2004) ou d'oligomères (Douziech *et al.*, 2006; Leone *et al.*, 2008; Qiao *et al.*, 2004; Rajakulendran *et al.*, 2008; Ramachander *et al.*, 2002), les domaines SAM sont connus pour se lier entre eux mais aussi à d'autres domaines, tels aux MAP kinases (Qiao *et al.*, 2006), aux ARNs comme peut le faire la protéine Smaug (Johnson and Donaldson, 2006) ou encore aux lipides (Bhunja *et al.*, 2009). Les domaines ANK eux sont connus pour se compacter les uns avec les autres avec un léger angle de torsion au sein d'un motif de type hélice-boucle-hélice-B-épingle à cheveux-boucle afin de créer des interactions protéines spécifiques (Li *et al.*, 2006; Mosavi *et al.*, 2004).

IV.1.1. Localisation

Nombre d'interactants d'ANKS3 sont des protéines ciliaires : parmi lesquelles des protéines du CI : ANKS6, NEK8, INVS et NPHP3 (Hoff *et al.*, 2013; Sang *et al.*, 2011b; Shiba *et al.*, 2010), et les protéines de la TZ, NPHP1 et NPHP4 (Mollet *et al.*, 2002, 2005).

Concernant la localisation cellulaire et ANKS3, elle semble variée selon les types cellulaires et les modèles analysés. De façon assez attendue, dans les reins de souris, ANKS3 a été retrouvée localisée au cil (Delestré *et al.*, 2015), tandis que l'utilisation d'une protéine de fusion ANKS3-GFP chez le Xénope révèle la présence de la protéine sous forme de large foci au niveau des corps basaux des cellules multiciliées (Yakulov *et al.*, 2015a). Cependant, dans les cellules rénales HEK293T et mIMCD3, la protéine endogène ou une protéine fusionnée à la GFP semble être exclue du cil primaire et retrouvées de façon cytoplasmique plus ou moins granulaire en fonction du degré de polarisation des cellules IMCD3 (Rothé *et al.*, 2015, 2018). La localisation de ANKS3 apparaît donc dynamique et multiple, sa localisation au cil restant une donnée discutée. De plus, ANKS3 n'a été retrouvée dans aucune des analyses protéomiques menées récemment sur le cil. Etant donné la multitude de partenaires, également localisés à différents endroits de la cellule, la localisation cytoplasmique d'ANKS3 semble la seule permettant d'expliquer toutes les interactions possibles.

IV.2. Modèles *in vivo* et mutation Humaine

Plusieurs modèles de rongeurs, nématodes ou encore poissons zèbre ont été utilisés pour comprendre la fonction de ANKS3. Ainsi, le rôle d'ANKS3 dans la détermination de la latéralité et la kystogenèse rénale a été souligné, supportant un rôle au niveau du cil. En effet, l'inactivation d' *anks3* chez le poissons zèbre conduit à l'apparition de kystes au niveau du pronephros aux premiers stades de développement associés à des défauts d'établissement de la latéralité (*situs inversus*) (Yakulov *et al.*, 2015). L'utilisation du Xénope à quant à elle permis de démontrer la présence d'ANKS3 au niveau des cils motiles des cellules multiciliées de l'épiderme (Yakulov *et al.*, 2015). De plus, il apparaît dans ce modèle que la protéine NPHP1 est nécessaire à l'agrégation d'ANKS3. Enfin, chez le rat, ANKS3 est exprimée au niveau des tubes proximaux, siège des kystes chez les rats délétés du domaine SAM d'ANKS6. Ainsi, les différents partenaires d'ANKS3 semblent avoir un rôle dans sa localisation.

Par ailleurs, par analyse d'exome, une mutation faux sens homozygote dans le domaine ankyrine de la protéine ANKS3 a été identifiée chez un patient de 4ans présentant

un *situs inversus*, des atteintes cardiaques associés à une hypoplasie du corps calleux et une atrophie diffuse du cerveau. On notera alors le phénotype suggérant des troubles développementaux causé par cette mutation p.H147N au niveau des domaines ANK de ANKS3. Toutefois, le patient ne présente pas d'atteinte rénale ou d'autres atteintes évocatrices d'une ciliopathie (Shamseldin *et al.*, 2016) (cf Discussion)).

IV.3. Les partenaires connus de ANKS3

ANKS3 est devenu d'autant plus étudié après son apparition comme acteur d'un réseau protéique, au sein d'une étude protéomique TAP-FLAG menée à partir de la protéine ANKS6 (Hoff *et al.*, 2013). Depuis, deux autres études ont permis de confirmer et d'étendre le réseau d'interactions de la protéine ANKS3 parmi lesquelles on retrouvera principalement ANKS6, BICC1, NPHP1 et NPHP4 et plusieurs NIMA Kinases dont NEK8 (Leettola *et al.*, 2014; Yakulov *et al.*, 2015). ANKS3 a été reliée à la pathologie de la NPH par ses interactions avec les protéines NPHP.

IV.3.1. Membres d'un réseau NPH

Outre son interaction avec ANKS6, ANKS3 a été démontré par co-immunoprecipitation, comme interagissant aussi avec les autres protéines du complexe CI tel que NPHP3, INVS/NPHP2 et NEK8 (Yakulov *et al.*, 2015a). Utilisant un screen protéomique basé sur des gènes candidats de la NPH, il a ensuite été montré que ANKS3 est aussi capable d'interagir avec d'autres NPHP dont notamment NPHP1 et NPHP9/NEK8. Comme présenté précédemment (cf La zone de transition (TZ)), NPHP1, NPHP4 et NPHP8/RPGRIP1L ont déjà été montré comme interagissant ensemble (Delous *et al.*, 2007; Mollet *et al.*, 2002, 2005) formant un complexe fonctionnel au niveau de la TZ et dans l'organisation apicale des cellules épithéliales polarisées (Sang *et al.*, 2011b). La précipitation de RPGRIP1L a ainsi montré une interaction entre NPHP1, NPHP4 et ANKS3 mais pas avec ANKS6, suggérant qu'ANKS3, à l'image de NPHP3 puisse interagir avec les protéines des deux modules, NPH et CI (Yakulov *et al.*, 2015). Ainsi ANKS3 a été présentée par ses interactions comme une protéine NPHP-Like.

IV.3.2. ANKS3 et les NIMA

Comme cité précédemment, ANKS3 est connue pour interagir avec plusieurs protéines de la famille des NIMA kinase telles que la protéine NEK8 et la protéine NEK7.

IV.3.2.1. NEK8

NEK8 est un acteur majeur du compartiment CI et de la détermination de la latéralité droite gauche. Son rôle principal est la phosphorylation de substrats parmi lesquels on retrouve de Polycystine 2 (Sohara *et al.*, 2008) et ANKS6 (Czarnecki *et al.*, 2015; Nakajima *et al.*, 2018). Ainsi l'utilisation de modèles de souris *in vivo* « ANKS6^{Streaker} », présentant une diminution d'interaction entre ANKS6 et NEK8 et le modèle « NEK8^{Roc} » dont la fonction Kinase de NEK8 est inactivée ont permis de révéler la synergie de ces deux acteurs. En effet, l'absence d'interaction entre NEK8 et ANKS6 ou l'absence de phosphorylation de ANKS6 par NEK8 induisent le même phénotype, à savoir des défauts cardiopulmonaires, des reins kystiques et un *situs inversus*, n'étant pas sans rappeler les phénotypes induits par l'inactivation des acteurs du CI (Bergmann *et al.*, 2008; Manning *et al.*, 2013; McQuinn *et al.*, 2001).

Curieusement, malgré leur forte ressemblance structurale et leurs interaction mutuelle avec NEK8, ANKS3 à contrario de ANKS6 n'est ni le substrat ni l'activateur de la fonction kinase de NEK8 (Czarnecki *et al.*, 2015).

IV.3.2.2. NEK7

Les NEK Kinases contrôlent de nombreux et différents aspects du cycle cellulaire et de la mitose. Bien qu'aucune protéines NEK ne soit indispensable à l'entrée en mitose, il est néanmoins établi que NEK2, NEK6, NEK7 et NEK9 participent à de nombreux changements structuraux au moment de la transition de l'interphase à la mitose des cellules. Notamment, ces NEK participent à la formation du pôle mitotique à la condensation de la chromatine ou encore à la rupture de l'enveloppe nucléaire (De Souza *et al.*, 2000; Grallert and Hagan, 2002; Grallert *et al.*, 2004; Holland *et al.*, 2002; Krien *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1998). NEK7 est localisée au cytoplasme et dans le noyau mais sa localisation centrosomale est particulièrement augmentée au cours du cycle cellulaire (Kim *et al.*, 2007; Ramachandran *et al.*, 2015). De façon intéressante, lors de la coexpression de NEK7 avec ANKS3, NEK7 se retrouve totalement exclue du noyau, pouvant ainsi avoir une incidence sur le cycle cellulaire (Ramachandran *et al.*, 2015). De plus, la kinase NEK7 semble affecter le statut post traductionnel de la protéine ANKS3 en modulant la majorité des sites de phosphorylation Serine/Threonine de

l'extrémité N terminal des domaines Ankyrines d'ANKS3. De plus, des modifications entraînant de plus fortes répercussions, comme une possible SUMOylation des acides aminés 193-196 des domaines Ankyrines d'ANKS3 est envisageable. De façon intéressante, ces modifications apparaissent même en présence d'une forme « kinase dead » de NEK7 suggérant que NEK7 recruterait d'autres kinases et/ou une SUMO E3 ligase pour agir sur ANKS3. Jusqu'à présent, aucune preuve d'une quelconque affection du cycle cellulaire par ANKS3 n'a été démontrée mais il reste possible que cette exclusion de NEK7 du noyau par ANKS3 puisse avoir un effet sur ce mécanisme.

IV.3.3. ANKS6

Comme déjà initié, les protéines de la famille ANKS tel qu'ANKS6 ou ANKS3 sont caractérisées par la présence des répétitions des motifs Ankyrine mais aussi par la présence d'au moins un domaine SAM (cf [Figure 14: Structure et interactions d'ANKS3, ANKS6 et BICC1](#)). Ainsi la protéine ANKS6 contient 11 répétitions de domaine Ankyrine en son extrémité N terminale et un domaine SAM en son extrémité C terminale, quand la protéine ANKS3 contient 6 répétitions de domaine Ankyrine et un domaine SAM suivi de 168 acides aminés à l'extrémité C terminale (cf [Figure 14: Structure et interactions d'ANKS3, ANKS6 et BICC1](#)). Elle présente donc une forte homologie structurale avec la protéine ANKS3 et leur deux types de domaines identifiables leur permettent d'interagir l'une avec l'autre via les interactions ANK/ANK et SAM/SAM. L'identification des partenaires protéiques d'ANKS6 et la caractérisation de leurs rôles biologiques au sein du tissu rénal contribue à la compréhension des mécanismes de kystogénèse. Ainsi les interactions entre ANKS6 et les protéines associées à la NPH tel que INVS, NEK7, NEK8 ou encore NPHP3 supportent le rôle de ANKS6 dans la physiopathologie des maladies kystiques (Czarnecki et al., 2015; Hoff et al., 2013). Plusieurs mutations de *ANKS6/NPHP16* ont déjà été reportées (Hoff et al., 2013; Taskiran et al., 2014) et selon leur nature et leur localisation, elles entraînent des phénotypes de sévérité variable. Ces mutations incluent des mutations tronquantes dans le domaine SAM et une mutation faux-sens dans les domaines ANK associées respectivement à des formes syndromiques ou isolés de polykystoses rénales tandis qu'une mutation d'un site d'épissage induisant la perte du dernier exon a été retrouvée chez une famille présentant une NPH juvénile. Une mutation homozygote induisant un décalage du cadre de lecture (c.1010_1011del, p.G337Afs*16) entraîne un phénotype létal similaire aux mutations perte de fonction de *NEK8*, à savoir des reins kystiques associés à une fibrose pancréatique, un *situs inversus* et une cardiopathie. De façon intéressante, le phénotype induit par des mutations

tronquantes de *ANKS6* est similaire au phénotype du modèle murin *Anks6Streaker* (reins kystiques, *situs inversus* et anomalies cardiaques), où la mutation p.M187K entraîne une altération de l'interaction de *ANKS6* avec *NEK8*. Les autres modèles animaux porteurs des mutations du gène *Anks6* présentent tous un phénotype de type polykystose rénal. De plus, deux modèles, respectivement de rat cy/+ et de souris ENU-induites, porteurs de la mutation p.I747N à l'état hétérozygote présentent des reins polykystiques (Bailey et al., 2015; Nagao et al., 2010). Même si ces deux modèles présentent une mutation au niveau des domaines SAM, ils présentent des phénotypes de polykystoses rénales différents tant d'un point de vue de la progression, que de la présence de kystes, de fibrose pancréatique ou hépatique et du type de segments néphrotiques où les kystes se développent (Bailey et al., 2015).

IV.3.4. BICC1, une RNP impliquée dans la régulation des transcrits ciliaires

ANKS3 et *ANKS6* forment un complexe multiprotéique avec la protéine *BICC1* (Bailey et al., 2015; Delestré et al., 2015; Leettola et al., 2014; Ramachandran et al., 2015; Stagner et al., 2009; Yakulov et al., 2015a) (cf [Figure 14: Structure et interactions d'ANKS3, ANKS6 et BICC1](#)). *BICC1* est une protéine composée, dans la partie N-terminale, de 3 domaines KH et de 2 domaines KH-like capables de lier l'ADN, et d'un domaine SAM en C-terminal (REF Figure). Malgré une similarité allant de 41% à 57%, les domaines SAM de *BICC1*, *ANKS6* et *ANKS3* diffèrent dans leur potentiel d'auto polymérisation. En effet, alors que le domaine SAM de *ANKS6* ne permet pas de se polymériser avec lui-même, les domaines SAM recombinants de *BICC1* et *ANKS3* forment spontanément des homopolymères (Knight et al., 2011; Leettola et al., 2014). L'homopolymérisation via les domaines SAM a ensuite été confirmée pour la protéine *BICC1* comme un phénomène également réel *in vivo* à partir de coupe de tissus de souris (Rothé et al., 2015). Malgré cette capacité identique à l'homopolymérisation, les domaines SAM de *ANKS3* et *BICC1* restent différents principalement par leur structure en cristallographie où le domaine SAM de *BICC1* forme une structure hélicoïdale avec un motif de 6 « domaines SAM » tandis que la structure du domaine SAM de *ANKS3* est faite de 8 domaines par tour (Leettola et al., 2014; Rothé et al., 2015). Plus que de l'homopolymérisation, il a été démontré que les domaines SAM de *BICC1*, et de *ANKS3* recombinants peuvent médier *in vitro* une co polymérisation (Rothé et al., 2018). Cependant l'étude *in vivo* semble montrer que la protéine *ANKS3* entraîne plutôt la formation de large foci *BICC1* via son long domaine C terminal, suggérant que cette séquence flanquante inhibe la formation de co polymères de domaine SAM (Rothé et al.,

2018). Enfin l'association ANKS6/BICC1 a été démontrée comme indirecte et médiée via une interaction avec la protéine ANKS3 (Rothé et al., 2018). De façon très intéressante, cette interaction est d'autant plus importante en absence de traitement à la RNase suggérant l'implication de un ou plusieurs ARNs au sein de ce complexe (Stagner *et al.*, 2009).

IV.3.4.1. Modèles *in vivo* de BICC1 et mutations humaines

Le rôle de BICC1 dans les processus conduisant à la kystogenèse rénale a été étudié grâce à l'utilisation de différents modèles animaux et de mutations humaines. Alors que les mutations humaines des gènes *ANKS3* et *ANKS6* sont récessives, la situation est plus complexe pour *BICC1*. En effet, des mutations hétérozygotes de *BICC1* ont été rapportées chez des patients présentant une dysplasie rénale kystique, une mutation non-sens dans le premier domaine KH et une mutation faux-sens dans le domaine SAM, les deux conduisant à une activation anormale de la voie Wnt canonique (Kraus *et al.*, 2012). Ces mutations montrent que l'effet *BICC1* peut être à caractère dominant. Chez la souris, une mutation tronquante du gène *Bicc1* à l'état hétérozygote est suffisante pour induire un sévère phénotype kystique dans des modèles de souris *jcpk* ou CHD (Congenital Heart Disease) (Flaherty *et al.*, 1995; San Agustin *et al.*, 2016). En revanche une mutation faux-sens chez une souris *bpk*, un modèle de PKD autosomique récessive (ARPKD), est nécessaire pour entraîner des reins kystiques (Cogswell *et al.*, 2003; Flaherty *et al.*, 1995). D'autres modèles comme un modèle de Xénope déplété pour *bicc1* par injection de morpholino a été étudié et présente des défauts de latéralité et un œdème causé par des défauts de différenciation des tubes néphrotiques, sans anomalies apparentes de la ciliogénèse (Tran *et al.*, 2010). Le modèle Drosophile mutant *bicc1* présente une dégénérescence rénale kystique entraînant une réduction de la fonction rénale. Ce modèle présente comme les modèles de PKD une suractivation de la voie mTOR. L'administration de Rapamycine est capable de sauver le phénotype chez la Drosophile, suggérant un contrôle négatif de *BICC1* sur la voie mTOR (Gamberi *et al.*, 2017). La délétion ciblée de *Bicc1* a également permis de démontrer son implication dans le positionnement planaire des cils motiles du nœud embryonnaire murins qui régit l'établissement de la latéralité droite gauche.

IV.3.4.2. Fonctions de BICC1

IV.3.4.2.1. Localisation

Le phénotype observé dans les modèles animaux et chez les patients *BICC1* suggère un rôle crucial de *BICC1* dans l'homeostasie rénale et dans le fonction du cil. Récemment,

BICC1 a été localisée au cil primaire de cellules épithéliales porcines LLC-PK (Mohieldin *et al.*, 2015). BICC1 est aussi localisée au niveau du centrosome des cellules mIMCD3 en division où elle est impliquée avec OFD1 dans la stimulation de la machinerie générale de traduction (Iaconis *et al.*, 2017). Cependant, BICC1 a aussi souvent été décrite localisée au niveau des P-bodies (cf Processing bodies) ou en agrégats cytoplasmiques, pouvant être aussi bien des complexes ribonucléoprotéiques que des polymères de protéines BICC1. (Iaconis *et al.*, 2017; Maisonneuve *et al.*, 2009; Rothé *et al.*, 2018).

IV.3.4.2.2. Rôle de BICC1 dans la régulation génique

La régulation des ARNs par BICC1 a été démontrée dans plusieurs modèles et pourrait être à l'origine des phénotypes kystiques observés. En effet, BICC1 est impliquée dans la répression de la traduction des ARNs de l'adénylate cyclase 6 (AC6) et de l'inhibiteur de PKA α (PKI α) au niveau des reins de souris (Maisonneuve *et al.*, 2009; Piazzon *et al.*, 2012). Les souris invalidées pour *Bicc1* présentent une accumulation d'AMPc et d'AC6 connues pour leur rôle dans la croissance kystique dans les tubules rénaux. La protéine BICC1 est capable de lier d'un côté l'ARNm d'AC6, et de recruter le miARN antagoniste miR-125a au près de DICER, afin d'induire la répression de la traduction de AC6 (Piazzon *et al.*, 2012). De façon très similaire, BICC1 induit la répression de PKI α en recrutant le miARN miR-27a (Piazzon *et al.*, 2012). Enfin, les analyses moléculaires montrent que BICC1 régule la stabilité de l'ARN de PKD2 et sa traduction. En effet, BICC1 antagonise l'activité répressive du miARN miR-17, un miARN spécifique de l'extrémité 3'UTR de l'ARNm de PKD2. Ce rôle prépondérant dans la régulation génique via les miARNs est confirmé par le sauvetage phénotypique effectué par la réduction de l'activité du miARNs miR-17 chez le modèle de Xénope déplété pour BICC1. Bien que le mécanisme par lequel BICC1 contrôle négativement l'activité répressive de miR17 ne soit pas élucidé, il est proposé qu'elle remplace, au sein du complexe repressif médié par miR17, une protéine avec une activité de répression. Le candidat idéal de cette substitution pourrait être la protéine Argonaute-2, AGO2, connue pour son activité endonucléasique intrasèque lui permettant de dégrader des ARNs soit via la formation de miARNs ou en les dégradant directement (Tran *et al.*, 2010).

Outre sa capacité à lier l'extrémité 3'UTR des ARNs cibles via ses domaines KH, BICC1 est capable via son domaine SAM de s'homopolymériser en de large foci cytoplasmique pouvant permettre la répression traductionnelle (Rothé *et al.*, 2015). De façon intéressante, cette polymérisation de BICC1 est également nécessaire pour augmenter sa stabilité. Cette même stabilité est primordiale à la régulation des voies mTOR et Wnt

canonique (Maisonneuve et al., 2009; Rothé et al., 2015; Shillingford et al., 2012). Il est intéressant de noter, que seule la stabilité de BICC1, et donc son niveau d'expression protéique, est important dans la régulation de la voie Wnt, puisqu'un mutant incapable d'homopolymériser (délétés du domaine SAM, ou par encombrement stérique suite à la mutation *BICC1^{bpk}*) peut toujours réguler la voie Wnt de façon physiologique s'il est exprimé à un niveau adéquat (Rothé et al., 2015). Ainsi BICC1 sera capable de relier un ligand clé de la voie WNT, DVL2 à un complexe de régulation des ARNs, les processing bodies (cf [Figure 17: Mécanismes d'action des miARNs et du complexe miRISC](#)).

Figure 14: Structure et interactions d'ANKS3, ANKS6 et BICC1

V- Régulation Génique

Comme évoqué précédemment, la protéine BICC1 régule le destin post-transcriptionnel de différents gènes tels que *PKD2*, *PKIa* ou encore *AC6*. En tant que partenaire de BICC1 nous avons, dans ce manuscrit, étudié le rôle d'ANKS3 dans cette régulation post-transcriptionnelle, c'est pourquoi cette étape sera développée par la suite.

Qu'est-ce que l'expression génique finale, si ce n'est la protéine et sa fonction? ADN (acide désoxyribonucléique), transcription, ARN (acide ribonucléique), traduction, protéine, tout le monde ou presque à cet enchaînement en tête (cf [Figure 15: Régulation de l'expression génique](#)). Mais là où l'ADN apparaît comme support de l'information génétique et donc base de l'expression protéique, il contient en réalité seulement entre 20 000 et 25 000 gènes pour plus de 100 000 protéines finalement exprimées (Lander *et al.*, 2001). Le dogme « un gène, une protéine » semble bien loin de la réalité et le large répertoire de protéines présenté par chaque cellule humaine est nécessaire pour le développement, la survie et l'adaptation de cette dernière à son environnement. Les cellules d'un même organisme exhibant un patrimoine génétique commun, doivent cependant s'adapter à différents environnements, différentes fonctions divergent alors par leur transcriptome, leur protéome et leur métabolome. Pour arriver à de telles différences singulières, l'expression génique doit être finement régulée, tant sur le plan qualitatif (expression d'un transcrit plutôt qu'un autre pour un gène donné) que quantitatif (niveau d'expression global). Que se soit sur le côté qualitatif ou quantitatif, les deux sont soumis à deux paramètres complexifiant le mécanisme, le paramètre de la régulation spatiale, et le paramètre temporel. On différencie alors 3 mécanismes primordiaux, la régulation transcriptionnelle (de l'ADN au pré ARN), la régulation post transcriptionnelle (de l'ARN à la protéine), et la régulation post traductionnelle (la modulation protéique). Evidemment, certains de ces mécanismes ont plus d'importance et d'influence sur l'expression génique que d'autres, les régulations protéiques étant minoritaires comparées aux régulations exercées au niveau de l'ARN (Schwanhäusser *et al.*, 2011).

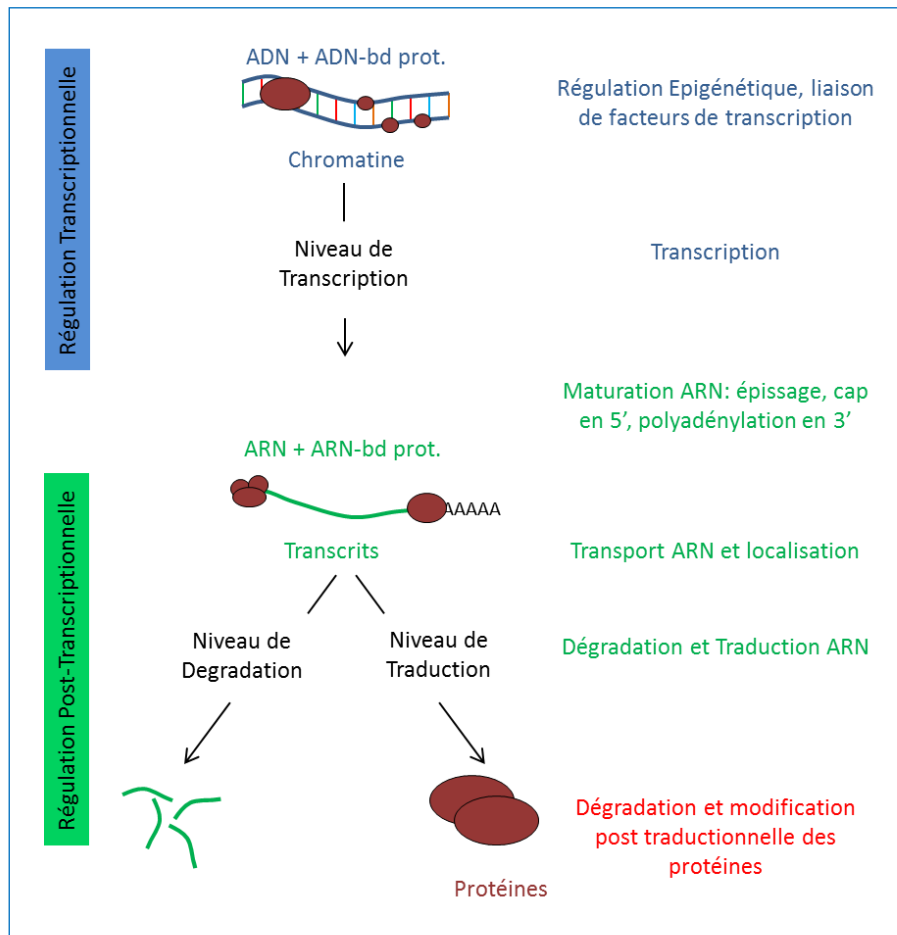


Figure 15: Régulation de l'expression génique

L'expression génique est la résultante de l'expression d'un gène d'un point de vu protéique. Ainsi l'ADN est transcrit en ARNm qui est traduit en protéine.

V.1. Les régulations post transcriptionnelles

Après leur transcription par les ARN polymérases, les ARN sont maturés par ajout d'une coiffe ou cap en 5' correspondant à l'ajout d'une guanosine méthylée en position N7 et par l'ajout en leur extrémité 3' d'une structure appelée queue polyadénylée (polyA). Ces étapes se déroulent de façons concomitantes à la transcription et peuvent s'influencer les unes les autres (Proudfoot and O'Sullivan, 2002; Proudfoot et al., 2002). Les régulations post transcriptionnelles correspondent aux régulations faites au niveau ARN. On peut les séparer en régulation opérée au niveau de l'accès à la traduction, et en régulation opérée au niveau de la stabilité et de la demi-vie des ARNs.

V.1.1. Régulation spatiale

Après sa maturation, la dernière partie du voyage de l'ARN entre son site de transcription et le cytoplasme où il sera pris en charge pour y être traduits est l'export nucléaire (cf [Figure 18: Vie des ARNm](#)). Cet export du noyau au cytoplasme se déroule via les complexes de pores nucléaires (NPC) et se déroulent sous forme de complexes messagers ribonucleoprotéiques (mRNPs). Plus qu'une simple étape dans la vie de l'ARNm, le transport à travers l'enveloppe nucléaire est aussi une étape de contrôle de la qualité de l'ARNm. Effectivement, en plus d'être inutile, l'envoi d'ARNm non maturés ou défectueux au niveau du cytoplasme pour y subir la traduction, peut être cytotoxique pour la cellule (Daguenet *et al.*, 2015). Après leur export, les ARNm non traduits peuvent être accumulés dans deux types de complexes ribonucleoprotéiques cytoplasmiques différents: les P-bodies qui contiennent la machinerie de dégradation (Anderson and Kedersha, 2006; Franks and Lykke-Andersen, 2008; Parker and Sheth, 2007) et les granules de stress qui contiennent, entre autres, les éléments de la machinerie de traduction (facteurs de traduction, polysomes ect...) (Buchan and Parker, 2009). Toutes ces différentes étapes sont sujettes à des régulations et font partie intégrante d'un processus clé dans la possible expression finale du gène (cf [Figure 18: Vie des ARNm](#)).

V.1.1.1. Processing Bodies et Granules de Stress

La protéine BICC1, a, à contrario de ANKS3, été démontré comme présente dans les GS (granules de stress) et les P-bodies (Processing bodies), des structures incontournables de la régulation spatiale de l'expression génique, par de nombreuses études protéomiques. (Hubstenberger *et al.*, 2017; Markmiller *et al.*, 2018; Youn *et al.*, 2018). Compte tenu du lien étroit existant entre les GS et les P-bodies, on peut envisager que le coassemblage de ces deux

entités coordonne différents processus en réponse au stress comme l'ajustement de l'expression ARN et protéique, la redirection des ressources énergétiques de façon à répondre à un mode de survie. Nous nous intéressons donc au lien et à la fonction qui pourrait exister entre ces complexes ribonucléoprotéiques et les protéines ANKS3 et BICC1, principalement dans la régulation génique.

V.1.1.1.1. Processing bodies

Il est commun d'admettre que les ARNm existent sous deux états au sein des cellules: un état actif de traduction et donc associés aux polysomes, et un état de traduction réprimée et alors retrouvés au sein des P-bodies. Les P-bodies sont formés de RBP (RNA binding protein) notamment des acteurs cytoplasmiques de la dégradation ARN qui servent de marqueurs spécifiques regroupées autour de molécules d'ARN (van Dijk *et al.*, 2002; Kedersha *et al.*, 2005; Ozgur *et al.*, 2010). Les GW-bodies pour « GW182-bodies » présentent beaucoup de similarités avec les P-bodies dont notamment de nombreuses protéines en commun. Presque indifférentiables morphologiquement (Liu *et al.*, 2005), la différence entre ces deux structures pourrait résider dans l'habilité préférentielle des GW-bodies à se former autour d'effecteurs de la machinerie miARN tel que GW182 (ou TNRC6) et Argonaute (Eystathiou *et al.*, 2002), cependant leur différences ne sont pas clairement prouvées, c'est pourquoi ils seront traités comme une seule et même entité dans ce chapitre. Les P-bodies sont présents dans les cellules non stressées mais leur formation est augmentée en réponse à un stress ou dans toutes autres conditions induisant l'inhibition de l'initiation de la traduction (Kedersha *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2005). Les P-bodies sont des agrégats dynamiques dont l'assemblage est dépendant et proportionnel à la quantité d'ARNm non traduits (Liu *et al.*, 2005; Pillai *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2005). En plus de ces ARNm non traduits, les P-bodies contiennent tout un arsenal de protéines impliquées dans la machinerie de dégradation de l'ARN et d'inhibition de la traduction. Parmi ces facteurs, on retrouve principalement DCP1/DCP2, les facteurs de décapage, EDC3 et le complexe LSM1-7, les facteurs réprimant la traduction et activant le décapage comme Dhh1/RCK/p54, Pat1 et Scd6/RAP55, entre 30 et 50 exonucléases dont la protéine Xrn1 et le complexe Ccr4/Pop2/Not deadenylase (Anderson and Kedersha, 2006; Eulalio *et al.*, 2007a; Parker and Sheth, 2007). Les P-bodies peuvent aussi contenir des ARNm et des protéines impliquées dans le NMD (dégradation des ARNms non sens) (Franks and Lykke-Andersen, 2008; Sheth and Parker, 2006; Shyu *et al.*, 2008). Les P-bodies des métazoaires contiennent, spécifiquement et en plus des facteurs sus cités, des protéines et des miARN impliqués dans

le mécanisme de répression génique via les miARN (Eulalio *et al.*, 2008a; Lian *et al.*, 2009). Enfin, bien que les facteurs d'initiation de la traduction et les protéines ribosomales soient généralement excluent des P-bodies, on y retrouve tout de même le facteur eIF4E associé aux ARN présents au sein des P-bodies. Par ailleurs, les P-bodies contiennent également en quantité non limitante le facteur eIF4E-T, un inhibiteur spécifique de la fonction de eIF4E (Andrei *et al.*, 2005; Ferraiuolo *et al.*, 2005). Une technique de tri de particules par fluorescence activée (FAPS) a récemment permis la purification des P-bodies et l'identification de centaines de protéines et de milliers d'ARNs. Ainsi plus de 20% des transcrits cytoplasmiques transitent à un moment via les P-bodies (Hubstenberger *et al.*, 2017). De façon intéressante la majorité de ces transcrits sont caractérisés par leur absence de queue polyA du fait d'une déadénylation comme phase d'initiation de l'assemblage de P-Bodies (Zheng *et al.*, 2008).

Il semblerait finalement qu'outre leur rôle dans la répression et la dégradation en tant que régulateur génique, les P-bodies pourraient avoir un rôle de réservoir d'ARNm non traduits afin de pourvoir la cellule en ARNm, en cas de nécessité d'adaptation rapide (Hubstenberger *et al.*, 2017) (cf [Figure 16: La désadénylation, une étape pré-requise à la formation des PBs](#) ; [Figure 18: Vie des ARNm](#)).

V.1.1.1.2. Granules de stress

Ces granules de stress (GS) aussi connues sous le nom de granules de choc thermique sont des agrégats réversibles formés d'ARNs non traduits et de ribonucléoprotéines, décrits dans des cellules de tomates en 1989 (Nover *et al.*, 1989). Il est intéressant de noter que les P-bodies et les GS, peuvent contenir à un moment *t* les mêmes espèces d'ARNm (Kedersha *et al.*, 2005), les deux compartiments se différenciant alors par l'état de l'ARNm en présence. En effet, il apparaît qu'au sein des GS, les ARNm sont polyadénylés (Kedersha *et al.*, 2000, 1999) et la présence des facteurs eIF4G et PABP suggèrent que les ARNm associés aux GS peuvent l'être à l'état circulaire. Alors que les P-Bodies sont connus pour s'assembler autour des enzymes clés de la dégradation ARN, les GS ont été décrits pour leur assemblage autour des composants de la traduction protéique. Ces dernières révélations suggèrent que les ARNm présents au niveau des GS sont inhibés d'un point de vue traductionnel mais non sujet à une dégradation immédiate, contrairement aux ARNm des P-bodies (Cougot *et al.*, 2004; Franks and Lykke-Andersen, 2007; Sheth and Parker, 2003, 2006). Ainsi, certains ARNm confinés dans les GS mais aussi dans les P-bodies peuvent sous certaines conditions se ré engager dans la traduction après leur sortie (Bhattacharyya *et al.*, 2006; Brengues *et al.*, 2005; Cougot *et*

al., 2004; Kedersha *et al.*, 2000). Initialement décrits comme de larges agrégats cytoplasmiques d'ARN messagers devenant visibles microscopiquement lorsque la synthèse protéique est inhibée en réponse à différents stress, cette définition a été mise à jour lorsque les GS ont été présentées comme contenant des complexes de préinitiation de la traduction et des protéines liant l'ARN (RNA-BP) (Kedersha *et al.*, 2000, 2002, 1999). Contrairement aux P-bodies, on y retrouve en effet les facteurs d'initiations eIF4G, eIF4A, eIF4B, la protéine de liaison poly A (PABP), eIF3, eIF2 et la sous unité ribosomale 40S (Kedersha *et al.*, 2002; Kimball *et al.*, 2003). En plus de ces protéines impliquées dans la traduction, on retrouve au sein de GS, de façon non exclusive, de nombreuses RNA-BP tel que TIA1, TIAR, FMRP, FXR1 et les G3BPs (Kedersha *et al.*, 2002, 1999; Mazroui *et al.*, 2002; Tourrière *et al.*, 2003). Les protéines TIAs et G3BPs contiennent des domaines facilitant l'agrégation et qui participe de ce fait à l'assemblage des GS (Gilks *et al.*, 2004; Tourrière *et al.*, 2003). Bien que jusqu'à présent les détails moléculaires du processus d'assemblage de GS restent assez mal connus, il demeure que certaines protéines telles qu'Ataxin-2 liant la protéine de liaison à la queue polyA (PABP) (Nonhoff *et al.*, 2007) ou que certaines modifications post-traductionnelles telles que la déphosphorylation des G3BPs (Tourrière *et al.*, 2003), ou la liaison O et N acetylglucosamine des protéines ribosomales (Ohn *et al.*, 2008), sont essentielles pour l'assemblage des GS. De façon intéressante, en réponse à un choc thermique, un stress oxydatif, une infection virale, des radiations UV ou à la privation énergétique, on observe un désassemblage des polysomes conduisant à une inhibition de l'initiation de la traduction quand les étapes d'élongation et de terminaison demeurent à des taux normaux. On notera que le rein est un organe particulièrement soumis au stress, principalement oxydatif et osmotique du fait de la pression qui s'y exerce. De fait, la régulation de l'initiation de la traduction et donc de l'expression génique y est un phénomène important. Le blocage de l'initiation est communément dû à la phosphorylation du facteur d'initiation eIF2 (Holcik and Sonenberg, 2005). Lorsque eIF2 est phosphorylé par une des 4 kinases de réponses au stress sur sa sous-unité α , eIF2 reste lié à son GDP et n'est plus capable de charger un ARNt Met. Cet arrêt d'initiation de la traduction entraîne un relargage des ARNm par les ribosomes et une accumulation des complexes de préinitiation 48S formant alors des agrégats les GS. L'utilisation de différents inhibiteurs permettant de bloquer ou désassembler les polysomes suggère que les ARNm au sein des GS ne sont pas statiques mais reste à un état d'équilibre avec les ARNm polysomiaux (Kedersha *et al.*, 2000) (Kedersha *et al.* 2000). Il a, de surcroît, été montré par photobleaching que les ARNm au sein des GS demeurent soumis à un flux

hautement dynamique (Kedersha *et al.*, 2000, 2005; Mollet *et al.*, 2008). (cf [Figure 18: Vie des ARNm](#)).

Il est de plus courant, sous l'impulsion de certains stress, d'observer un regroupement de P-bodies autour des GS, c'est par exemple le cas après traitement des cellules à l'arsenite sodium, un inhibiteur du cycle de l'acide citrique induisant un stress oxydatif (Kedersha *et al.*, 2005; Souquere *et al.*, 2009; Wilczynska *et al.*, 2005) ou encore après un stress mitochondrial au FCCP. La surexpression de composants des GS tel que G3BP2 entraîne un contact transitoire en les GS et les P-bodies (Kedersha *et al.*, 2005). L'examen par microscopie électronique a permis de montrer que suite à un stress par l'arsenite de sodium, les P-bodies restent proches des GS mais sans fusionner (Souquere *et al.*, 2009). De façon intéressante, les contacts observés entre les P-bodies et les GS peuvent être augmentés et stabilisés en variant le niveau d'expression de certaines protéines clés telles que TTP, BRF1 ou CPEB1 et Rck pour lesquelles respectivement la surexpression et l'inhibition peut même entraîner jusqu'à la fusion complète des P-bodies dans les GS (Kedersha *et al.*, 2005; Serman *et al.*, 2007; Stoecklin *et al.*, 2004; Wilczynska *et al.*, 2005). Ces exemples permettent de soutenir la thèse que les contacts P-Bodies/GS ne sont pas le fruit du hasard. Deux théories tentent d'expliquer ces rapprochements : la première tend à montrer que le rapprochement est dû à une augmentation des échanges de matériels entre les deux entités. Cette thèse est soutenue par le fait que TTP/BRF1 est capable de lier les polysomes (Franks and Lykke-Andersen, 2007) mais aussi les protéines du complexe de décapage (Fenger-Grøn *et al.*, 2005) et créerait ainsi un « pont » moléculaire entre les P-bodies et les GS. Ce « pont » moléculaire permettrait de rapidement passer de la rétention dans les granules de stress à la déadénylation et à la dégradation en cas de stress prolongé (Kedersha *et al.*, 2005). Ainsi la protéine AGO2 est également capable de se déplacer des P-bodies aux GS en réponse à un stress, mais ce déplacement requiert la liaison à un miRNA (Leung *et al.*, 2006).

La deuxième théorie soutient un possible coassemblage des deux entités dû à des facteurs communs. Par exemple, il est connu que l'assemblage et désassemblage des agrégats est une fine balance entre la disponibilité et la quantité limitante de protéines chaperones HSP de la famille HSP70.

Il apparaît que P-bodies et GS sont liés au cytosquelette de microtubules pouvant les réunir (Aizer *et al.*, 2008; Loschi *et al.*, 2009) (cf [Figure 18: Vie des ARNm](#)). Plus encore, contenu de la grande dynamique dont font preuves les GS et les PBs dans leur assemblage et désassemblage, il a été montré non seulement l'importance du cytosquelette de

microtubules dans cette dynamique mais surtout l'importance des moteurs moléculaires que sont les Kinésines et Dynéines (Johnston et al., 2002; Loschi et al., 2009; Perez-Pepe et al., 2018; Rajgor and Shanahan, 2014; Tsai et al., 2009). Ainsi un lien entre GS, PBs et cil primaire semble être possible.

Ainsi plus que de simples ports à ARNs, les P-bodies et les GS servent de plateforme de signalisation dans le cytoplasme. La séquestration de molécules de signalisation comme RACK1 et TRAF2 au sein des GS indique bel et bien un rôle des GS dans la transduction du signal (Arimoto *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2005b). Malgré leur importance, les GS ont été peu étudiées, comme le prouve la récente étude utilisant la technique de marquage de proximité (APEX) et révélant environ 150 protéines aux GS jusqu'à présent inconnues (Markmiller *et al.*, 2018). De façon surprenante, les GS ont jusqu'alors été reliés à des pathologies quasi exclusivement de type neurodégénérative. Comme 20% de la composition protéiques des GS est dépendant du type cellulaire mais aussi du type de stress induit, on peut imaginer que les GS sont impliquées dans bien plus de pathologies, nécessitant un modèle spécifique pour être démontré (Markmiller *et al.*, 2018). Bien plus que les protéines contenus dans les GS, les récentes études protéomiques et de précipitation ARN ont permis de créer des pistes de recherche quant à la fonction et la répartition spatiale des GS. Elles suggèrent l'existence d'un lien étroit entre les GS et les complexes présents au niveau des ports nucléaires et les spliceosome (Markmiller *et al.*, 2018; Youn *et al.*, 2018). Ces derniers complexes étant liés de façon très proche à la machinerie ARN leur interaction proche n'est pas étonnante. Cependant, on remarque également la présence avec insistance dans différentes études protéomiques de nombreux acteurs du complexe CCR4-NOT et de la machinerie des miARNs (miRISC) au niveau des GS. Ces données laissent penser que plus qu'une interaction physique en GS et PBs, leur fonction pourrait être redondante avec une dégradation ARNs au sein des GS.

Enfin, et de façon intéressante, une relation étroite semble établir un lien entre GS et centrosome. En effet, un certain nombre de protéines centrosomales, dont CEP85 et CEP192 ont été retrouvées interagissant avec de nombreux acteurs des GS. Mis en exergue, cette relation avec le centrosome rappelle qu'une petite partie de PBs stationnaires sont retrouvés ancrés dans la région péri-centriolaire où une accumulation de TNRC6 est également à dénoter (Aizer et al., 2008; Hubstenberger et al., 2017; Markmiller et al., 2018; Moser et al., 2011; Youn et al., 2018). On notera que cette relation GS/centrosome est en adéquation avec l'émergence d'une régulation génique péricentriolaire. En effet, de plus en plus d'acteurs de

la régulation génique tels que la machinerie de traduction, certains ARNm et autres protéines de liaisons aux ARN que nous discuterons plus tard sont retrouvés au niveau du centrosome (cf [Discussion](#)) (Barnard et al., 2005; Filippova et al., 2012; Shang et al., 2012; Jao et al., 2017).

V.1.2. Mécanismes de dégradation ciblée d'ARNm

Basé sur les nombreux travaux effectués chez *Saccharomyces cerevisiae* et chez les mammifères, deux voies générales de dégradation ont été identifiées dans les cellules eucaryotes (Mitchell and Tollervey, 2001; Tucker and Parker, 2000). Ainsi la dégradation ARN commence basiquement par un raccourcissement de la queue poly(A) par différentes déadénylases, suivi accessoirement par un décapage entraînant ensuite une dégradation par différentes exonucléases de 5' en 3' ou de 3' en 5' (Anderson and Parker, 1998; Chen *et al.*, 2001; Mukherjee *et al.*, 2002; Wang and Kiledjian, 2001). D'un autre côté, la dégradation de molécule d'ARNm individuelle peut aussi être initiée par un clivage endonucléolitique en réponse à un mécanisme lié aux miARNs ou siARNs.

V.1.2.1. Dégradation via déadénylation.

La première étape de la dégradation est la déadénylation. Jusqu'à présent 3 complexes d'enzymes ont été identifiés comme ARNm déadénylases, le complexe CCR4/POP2/NOT, le complexe Pan2p/Pan3p et la protéine PARN. Ces complexes semblent répondre préférentiellement à différents substrats ARNm. Par exemple, l'activité de CCR4p n'est pas affectée par la cap de l'ARNm mais est inhibée par la protéine liant la queue polyA PAB1P (Tucker *et al.* 2002; Viswanathan 2003). A contrario, PARN est stimulée par la cap de l'ARNm et aussi inhibée par PAB1P (Dehlin et al., 2000; Gao et al., 2000; Martínez et al., 2001). Suite à cette déadénylation, deux mécanismes différents sont possibles. Le premier est la dégradation de 3' en 5' de l'ARNm par l'exosome, un large complexe protéique contenant de nombreuses exonucléases de 3' en 5' jouant aussi des rôles dans les mécanismes de maturation d'ARN dans le noyau (Butler, 2002; Mitchell and Tollervey, 2000). Le second mécanisme pouvant suivre la déadénylation est le décapage rendant l'ARNm éligible à la dégradation de 5' en 3'. Les enzymes primordiales pour le décapage sont DCP1 et DCP2, où DCP2 est la sous unité catalytique de l'holoenzyme. Cependant, les deux sous unités ont leur importance comme le montre le blocage du processus de décapage entraîné par la perte de l'une ou l'autre des sous-unités (Beelman *et al.*, 1996; Dunckley and Parker, 1999; Dunckley *et*

al., 2001). DCP1 semble avoir pour rôle de stimuler l'activité de DCP2 qui hydrolyse la cap et entraîne le relargage du m7GDP laissant alors l'ARNm avec pour extrémité 5' un monophosphate, substrat préférentiel de l'exonucléase Xrn1p (Beelman *et al.*, 1996; van Dijk *et al.*, 2002; Lykke-Andersen, 2002; Stevens, 1980; Stevens and Maupin, 1987; Wang *et al.*, 2002). On rappellera que cette étape de déadénylation est une étape prérequis à l'assemblage de P-Bodies (Zheng *et al.*, 2008) (cf [Figure 16: La désadénylation, une étape pré-requis à la formation des PBs](#)).

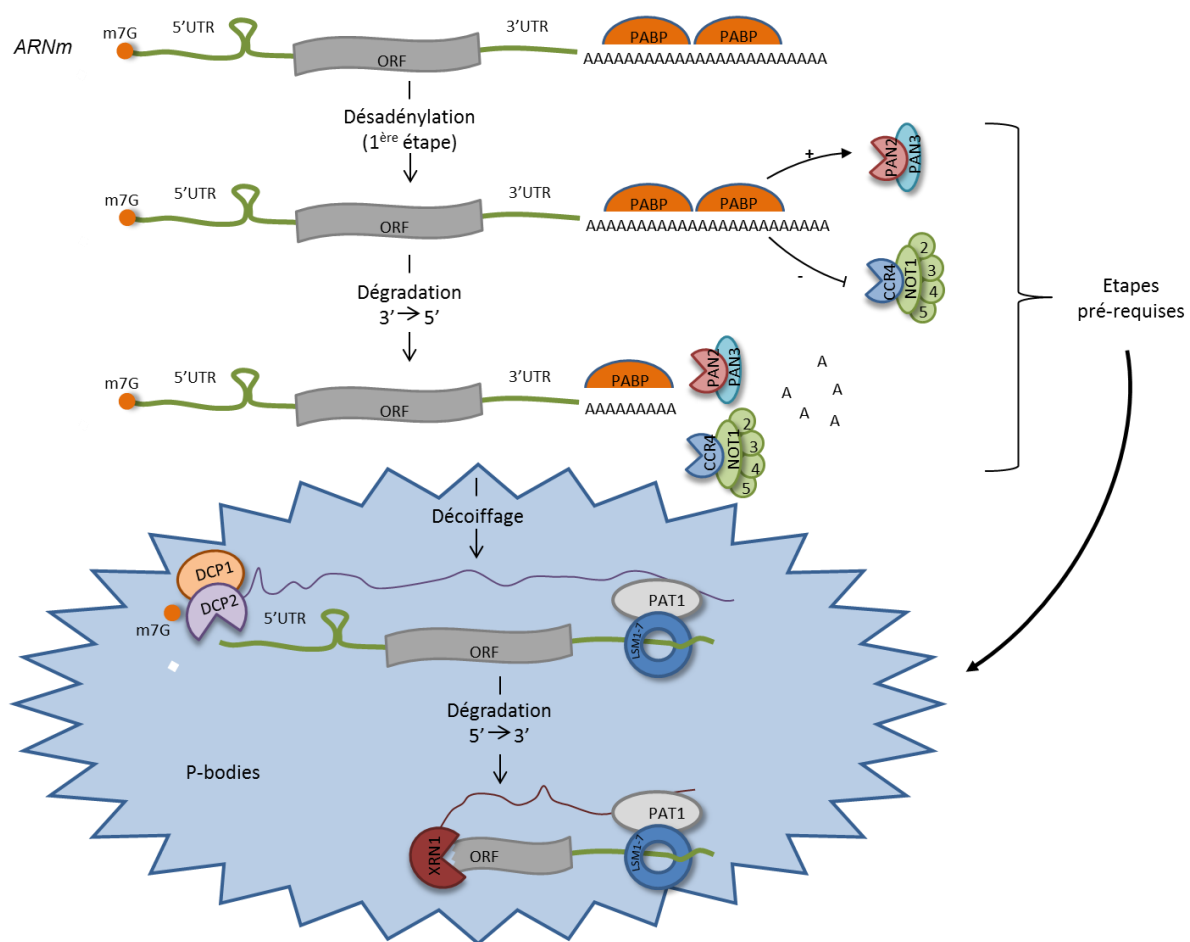


Figure 16: La désadénylation, une étape pré-requis à la formation des PBs

La désadénylation correspond à l'excision de résidus adénosine de l'extrémité 3' des ARNm. La protéine de liaison à la queue polyadénylé (PABP) exerce un rôle de régulateur positif du complexe PAN2/3 et négatif sur le complexe CCR4/NOT. La destabilisation de la PABP par le complexe PAN2/3 permet au complexe CCR4/NOT, exonucléase majoritaire de digérer les résidus adénylés. Cette étape est une étape prérequis pour la formation des PBs autour de l'ARN. Le complexe de protéines LSM1-7/PAT1 va pouvoir se lier à l'ARN désadénylé et recruter les protéines DCP1/DCP2 responsables du décoiffage de l'ARN. Les ARN seront alors sujets aux exonucléases 5' → 3'.

V.1.2.2. Voie des miARNs.

Deux types différents de petits ARNs ont émergé ces 10 dernières années comme régulateurs de la stabilité et de la traduction des ARNs: les miARNs (micro ARNs) et les petits ARNs interférents (siARNs). Il est acquis que les deux sortes de molécules interférentes sont issues du même mécanisme et entraînent la même machinerie d'inhibition, la différence résidant dans le fait que les siARNs contrairement aux miARNs étaient originellement considérés comme exogènes, la suite de cet exposé se focalisera sur les miARNs (Tomari and Zamore, 2005). Les estimations bioinformatiques permettent de souligner l'importance de ces molécules puisque le génome humain coderait plusieurs centaines de différents miARNs lesquels contrôlent approximativement jusqu'à 60% des gènes (Friedman *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 2005). Cependant, seuls quelques miARNs et leur effet sur leurs cibles ont été validés jusqu'alors. Les miARN sont des ARNs de 22 nucléotides produisant leur effet en se liant à leur ARN messagers cibles, induisant alors l'extinction ou la dégradation des ARNm. Les miRNAs sont produits initialement via une machinerie dont la protéine clé est DICER. DICER est une enzyme capable de couper de longs ARN double brins "lncRNA" en de petits ARN double brins. La production de ces miARNs joue un rôle primordial dans la régulation génique, notamment au cours du développement comme le montre la létalité embryonnaire induite par l'invalidation de DICER (Bernstein *et al.*, 2003). Les petits ARN double brins (dsRNA) issus du clivage par DICER sont ensuite séparés en deux molécules d'ARN simple brins, le brin « passager » et le brin « guide ». Pendant que le brin « passager » est dégradé, le brin « guide » est incorporé à la machinerie de régulation négative RISC (*RNA induced silencing complex*) (Gregory *et al.*, 2005). Le complexe RISC permet la liaison des miARNs à leur ARNm cibles et est ainsi responsable de l'extinction des ARN aussi connu sous le nom d'ARN interférence (RNAi) (Wang and Barr, 2005). Le complexe RISC est formé à minima d'un petit ARN et d'une protéine de la famille Argonaute (AGO) (Wilson and Doudna, 2013).

La famille Argonaute comprend 8 membres plus ou moins bien étudiés, et tient son nom du phénotype d'*Arabidopsis Thaliana* mutante pour la protéine AGO, la faisant ressembler à l'animal Argonauta Argo (sorte de pieuvre de l'ordre des octopodes) (Bohmert *et al.*, 1998). Bien que découverte chez la plante, la famille AGO est conservée chez les eucaryotes à l'exception de *Saccharomyces cerevisiae* qui semble ne pas avoir de contrôle génique via RNAi (Drinnenberg *et al.*, 2009). Tous les membres de la famille AGO présentent 2 domaines représentatifs et conservés, un domaine PAZ (pour PIWI, AGO, et Zwill) en N-

terminal et un domaine PIWI (nom issu de la drosophile PIWI) en C-terminal (Hutvagner and Simard, 2008). Le domaine PAZ est le domaine de liaison à l'ARN capable de reconnaître l'extrémité 3' des siARNs et miARNs de façon indépendante de la séquence. De ce fait, les miARNs peuvent toujours cibler leur ARNm pour le clivage ou l'inhibition de la traduction via la complémentarité des paires de bases (Tang, 2005). Le domaine PIWI, lui, est le domaine essentiel pour le clivage de l'ARN cible. Ce domaine PIWI contient un site actif formé d'une triade d'Aspartate-Aspartate-Glutamate dont les ions métalliques divalents sont nécessaires à la catalyse. Chez l'homme, ce domaine PIWI est aussi impliqué dans l'interaction protéine-protéine via la boîte PIWI qui permet entre autre l'interaction avec DICER au niveau du domaine RNaseIII (Meister *et al.*, 2004). Enfin, un domaine moins conservé est retrouvé au centre des protéines AGO et contient un motif MC, homologue au motif structurel de liaison à la coiffe retrouvé au niveau du facteur de traduction eIF4E, et capable de lier la coiffe des ARNm et donc d'en réguler la traduction (Hutvagner and Simard, 2008). Il est connu que les protéines AGO1-4 sont impliquées dans le chargement des miARN au sein du complexe RISC. La protéine la plus étudiée et dont le rôle sera développée ici est la protéine AGO2. Il s'agit d'une protéine qui se démarque des autres protéines AGO par son activité endonucléasique intrinsèque, particularité supposée être due aux séquences présentes en N-terminale ou au niveau des espaceurs entre les domaines PAZ et PIWI.

V.1.2.2.1. Régulation de la traduction

Contrairement aux hypothèses initialement proposées, il semble de plus en plus évident que la répression de la traduction d'un ARNm cible peut se faire sans qu'il n'y ait de dégradation de cet ARNm, suggérant deux mécanismes médiés par les miRNA totalement indépendant (Eulalio *et al.*, 2008b; Humphreys *et al.*, 2005; Nishihara *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2006). De plus, l'utilisation d'ARN rapporteurs sans queue polyA ou résistant à la déadénylation a permis de démontrer que la répression de la traduction peut être accomplie en l'absence de suppression de la queue polyA, nécessaire à la dégradation ARN (Chekulaeva *et al.*, 2011; Mishima *et al.*, 2012). D'un autre côté, l'utilisation d'inhibiteurs de la traduction comme la Torin1 ou la cycloheximide a démontrée que la dégradation ARN peut être opérée sans qu'il y ait régulation traductionnelle au préalable (Eulalio *et al.*, 2007b; Giraldez *et al.*, 2006; Piao *et al.*, 2010; Wakiyama *et al.*, 2007). Via RISC, et donc via la famille des protéines Argonautes, les miARNs sont capables d'entraîner la régulation ARN en inhibant la traduction (Guo *et al.*, 2010). Les mécanismes par lesquels les protéines AGO régulent l'expression génique sont soumis à différentes hypothèses sur leurs ordres

d'apparition, s'ils sont exclusifs ou successifs mais impliquent toujours soit la dégradation des ARNm soit la répression de la traduction (Arribas-Layton *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2010; Hendrickson *et al.*, 2009; Rissland *et al.*, 2011). Par ailleurs, des études de protéomiques et de transcriptomiques ont été démontré que la voie de dégradation des ARN est la voie la plus favorisée par rapport à la répression de la traduction, à hauteur de 65% jusqu'à 90% selon les types cellulaires (Baek *et al.*, 2008, 2015; Eichhorn *et al.*, 2014; Selbach *et al.*, 2008; Subtelny *et al.*, 2014). Initialement, il était supposé que la distinction entre répression de traduction et dégradation se faisait en fonction du niveau de complémentarité entre le miARNs et son ARN cible. En effet, si cette complémentarité était de 100% alors un clivage endonucéolotique était induit par AGO2, tandis qu'une complémentarité imparfaite conduisait à une "simple" répression de la traduction (Ameres and Zamore, 2013). Il a depuis été démontré, via un certains nombres de contre-exemples, qu'une complémentarité imparfaite pouvait aussi entraîner un clivage endonucléolotique, ainsi, le mécanisme de choix entre la voie de répression de traduction ou de dégradation ARN reste non élucidé (Mallory *et al.*, 2004; Yekta *et al.*, 2004). De façon intéressante, il est aussi connu que le nombre de miARNs est inversement proportionnel au niveau d'abondance de son ARNm cible (Baek *et al.*, 2008, 2015; Guo *et al.*, 2010; Hendrickson *et al.*, 2009; Selbach *et al.*, 2008).

De nombreuses études dans divers organismes ont suggérées que les miARNs sont capables d'entraîner l'inhibition de l'initiation de la traduction (Bazzini *et al.*, 2012; Braun *et al.*, 2012a, 2012b; Eichhorn *et al.*, 2014; Fabian *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2010). Bien que les mécanismes précis de la répression de la traduction via les miARNs ne restent pas totalement compris, trois modèles ont été proposés ces dernières années. Le premier modèle est celui du déplacement de la protéine de liaison à la queue poly A (PABP) par la protéine TNRC6 (Chen *et al.*, 2014; Mathys *et al.*, 2014; Meijer *et al.*, 2013; Rouya *et al.*, 2014; Waghray *et al.*, 2015). Il semble en effet que TNRC6 interagisse avec PABP (Fabian *et al.*, 2009; Huntzinger *et al.*, 2013; Jinek *et al.*, 2010) et via son interaction avec le complexe CCR4/NOT déplace PABP de la queue polyA (Zekri *et al.*, 2009) (cf [Figure 17: Mécanismes d'action des miARNs et du complexe miRISC](#)). L'effet qui en découle est la perte de la structure en boucle de l'ARN normalement due à l'interaction du facteur d'initiation eIF4G et PABP entraînant donc l'inhibition de la traduction par absence de régulation.

Le second modèle d'inhibition de la traduction via les miRNA, proche du premier sus-cité et pas nécessairement exclusif, est le recrutement d'inhibiteurs protéiques via TNRC6. Ainsi TNRC6 est capable de recruter des protéines connues pour leur impact négatif

sur la traduction telles que les déadénylases CCR4/NOT (Braun *et al.*, 2011; Chekulaeva *et al.*, 2011) ou encore la protéine CAF1 (Bawankar *et al.*, 2013; Braun *et al.*, 2011; Chekulaeva *et al.*, 2011; Cooke *et al.*, 2010) (cf [Figure 17: Mécanismes d'action des miARNs et du complexe miRISC](#))

Enfin bien que moins bien étudié et pas entièrement compris, les miARNs ont la capacité de dissocier le facteur d'initiation eIF4A de l'ARNm cible, entraînant alors l'inhibition de la liaison du ribosome (Fukao *et al.*, 2014).

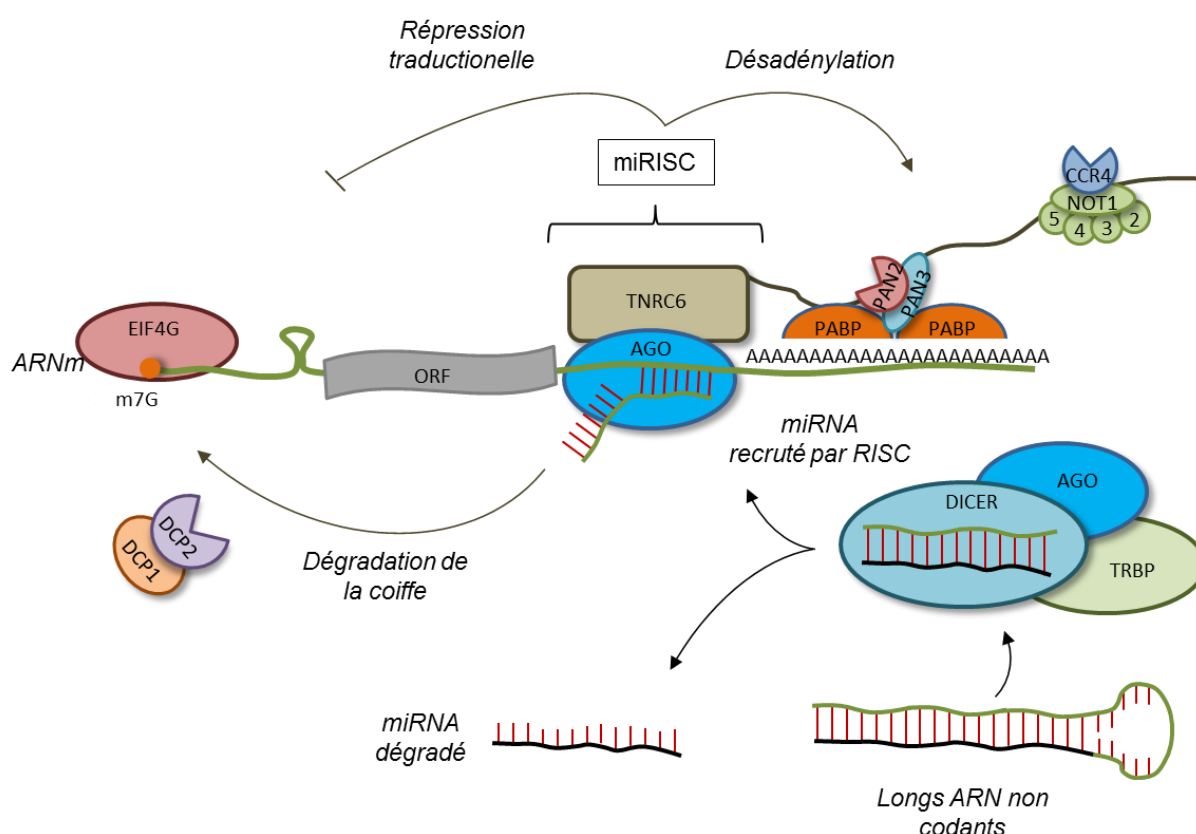


Figure 17: Mécanismes d'action des miARNs et du complexe miRISC

Les longs ARNs non codants aussi appelés pré-miARN sont coupés en ARN simple brins de 22nt (miARN) par le complexe DICER/AGO/TRBP. L'interaction par complémentarité du miARN avec son ARNm cible permet la formation du complexe miRISC, formé de AGO et TNRC6, qui agit en réprimant la traduction ou en dégradant l'ARNm cible.

V.1.2.2.2. Dégradation ARN

Outre la régulation de la traduction, les miARNs peuvent être présentés comme pouvant stimuler la déstabilisation ARN en recrutant différentes déadénylases via la protéine TNRC6 (TNRC6A-C chez les mammifères/GW182 ou Gawky chez la drosophile) (Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Fabian *et al.*, 2011; Giraldez *et al.*, 2006; REHWINKEL *et al.*,

2005). La protéine TNRC6 est capable via ses résidus Glycine et Tryptophane en N terminal (GW) d'interagir avec le domaine PIWI des protéines AGO, lui permettant alors de se lier via cet intermédiaire à l'ARNm cible (Behm-Ansmant *et al.*, 2006; El-Shami *et al.*, 2007; Lazzaretti *et al.*, 2009; Schirle and MacRae, 2012; Takimoto *et al.*, 2009; Zipprich *et al.*, 2009). TNRC6 sert de port d'ancrage et recrute différents facteurs au niveau de l'ARNm cible, notamment la PABP et deux complexes de déadénylation, CCR4-NOT et PAN2-PAN3 (Braun *et al.*, 2011; Chekulaeva *et al.*, 2011; Fabian *et al.*, 2009, 2011; Huntzinger *et al.*, 2010; Jinek *et al.*, 2010; Zekri *et al.*, 2009). On remarque que la déplétion de composants du complexe CCR4-NOT (ou la surexpression du dominant négatif de CAF1, une des deux déadénylases du complexe) affecte fortement la dégradation médiée via les miARNs, tandis que la déplétion du complexe PAN2-PAN3 entraîne un effet moindre, suggérant ainsi que le complexe CCR4-NOT est le complexe majeur de la dégradation ARN issu du processus des miARNs (Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Braun *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2009; Eulalio *et al.*, 2009; Fukaya and Tomari, 2012). Suite à cette déadénylation, les ARNm cibles peuvent subir une dégradation via des exonucléases de 3' en 5' (Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Braun *et al.*, 2012a; Eulalio *et al.*, 2007b; Lim *et al.*, 2014; REHWINKEL *et al.*, 2005).

Le complexe RISC entraîne également un décapage de l'ARNm cible en recrutant divers facteurs (Nishihara *et al.*, 2013; Nishimura *et al.*, 2015). Chez les mammifères, la sous-unité catalysant le décapage est DCP2 et les co-activateurs DCP1, RCK/p54/DDX6 et EDC4, tous co-immunoprecipitant avec les protéines de la famille AGO (Chu and Rana, 2006; Pillai *et al.*, 2005; Shih *et al.*, 2011). Le décapage aura alors pour effet la déstabilisation de l'ARNm mais également, comme expliqué précédemment, l'exposition de son extrémité 5' désormais vulnérable aux exonucléases 5'3'.

Enfin, via son activité endonucléasique intrinsèque, la protéine AGO peut couper l'ARNm cible. Ce clivage entraîne alors une dégradation de l'ARNm qui se retrouve en deux parties : une sans Cap, l'autre sans queue polyA, toutes les deux vulnérables face aux exonucléases 3'5' et 5'3' (Jung *et al.*, 2017). Ce mécanisme permet de répondre rapidement à une condition physiologique ou pathologique comme le stress et ainsi de réguler rapidement l'expression de gènes.

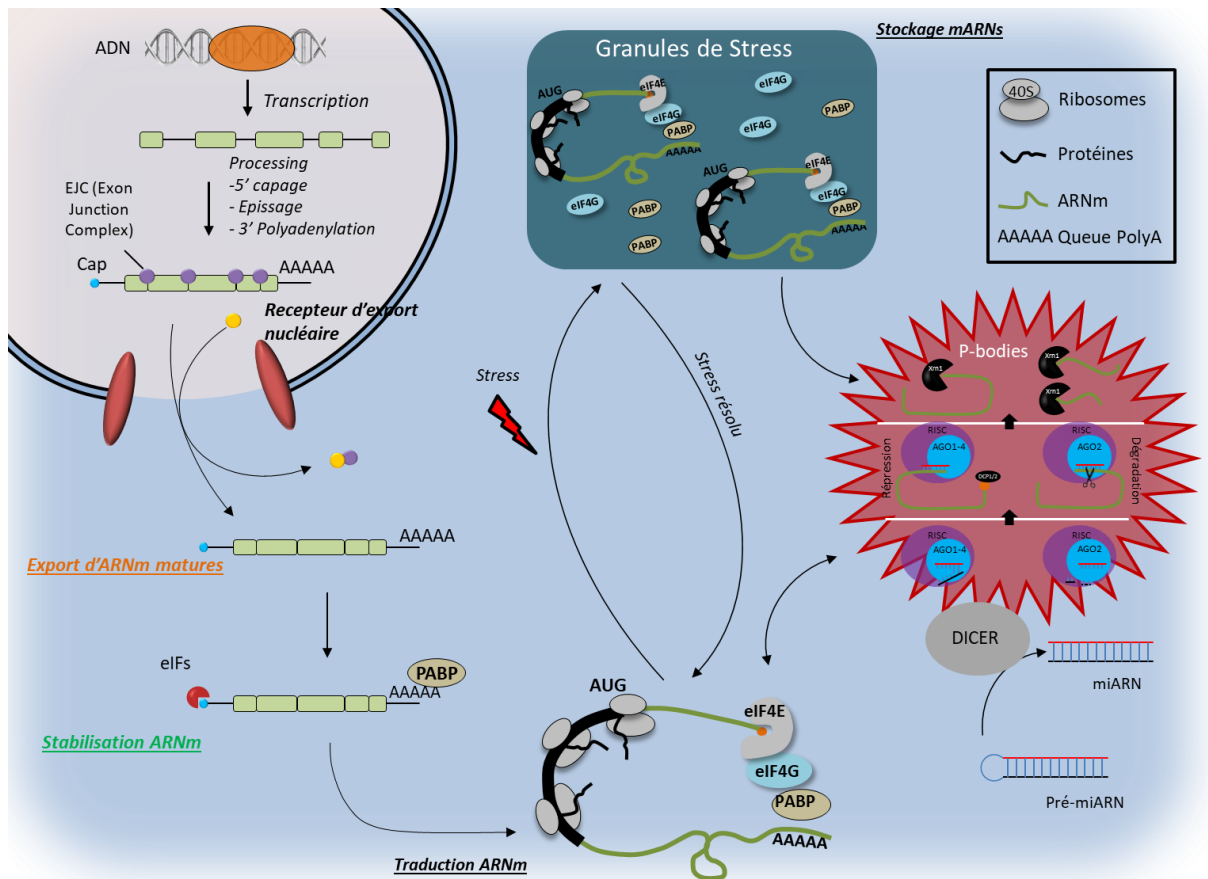


Figure 18: Vie des ARNm

La transcription produit des ARNm à partir d'une matrice ADN. Ces ARNm sont épissés puis exportés du noyau au cytoplasme ou ils sont pris en charge par la machinerie de la traduction (polysomes). Les ARNm peuvent être stockés dans les granules de stress en cas de stress subi par la cellule ou dans les P-bodies pour y être réprimés.

RESULTATS

Partie 1 : Le rôle de ANKS3 dans la régulation génique médiée par BICC1

Position du problème :

Notre groupe se focalise principalement sur la compréhension des bases moléculaires impliquées dans l'établissement des mécanismes physiopathologiques de la Néphronophtise (NPH) et des dysplasies kystiques rénale, deux causes héréditaires d'insuffisance rénale terminale chez l'enfant et le jeune adulte ou de mort fœtale dans leurs formes les plus sévères. Ces phénotypes sont souvent les manifestations rénales de syndromes appartenant au spectre des ciliopathies.

Les ciliopathies regroupent un ensemble de maladies génétiques multisystémiques caractérisées par un dysfonctionnement des cils motiles ou primaires. Les cils motiles génèrent un flux de liquide, alors que les cils primaires agissent comme des antennes vis-à-vis des signaux extracellulaires. Ainsi les cils primaires par leur fonction de plateforme de signalisation sont essentiels au développement et à l'homéostasie tissulaire. La plupart des ciliopathies sont causées par des mutations de gènes codant pour des composants ciliaires; cependant, une nouvelle classe de ciliopathies dite d'ordre secondaire apparaît, faisant référence à des mutations affectant les facteurs de transcription régulant les gènes ciliaires.

Les approches de séquençage d'exomes menées au laboratoire afin d'identifier de nouveaux gènes responsables de ciliopathies, nous ont permis d'identifier une mutation homozygote du gène *ANKS3* chez des individus présentant une NPH tardive associée à une fibrose hépatique. *ANKS3* est une protéine contenant des domaines Ankyrine (ANK) et SAM et qui interagit avec un réseau de protéines liées à la NPH, notamment *ANKS6*, *NEK8* et *NPHP1*, ainsi qu'avec *BICC1*, une protéine se liant à l'ARN et mutée dans la dysplasie kystique rénale. Ici, nous mettons en évidence l'implication du complexe *ANKS3/BICC1* dans la régulation de la stabilité des transcrits de gènes ciliaires et notamment de *NPHP1*. Ainsi, nous avons montré que en l'absence de *ANKS3* ou en présence de la forme mutée, la protéine *BICC1* recrute d'avantage les ARNm de gènes ciliaires et au complexe *RISC/AGO2*, entraînant la dégradation de ces mêmes transcrits. Cette découverte nous permet de placer le complexe *ANKS3 / BICC1* en tant que régulateur clé des transcrits majeurs liés aux ciliopathies et ainsi de mettre en exergue son rôle dans les mécanismes physiopathologique de la NPH.

ANKS3 is a master regulator of BICC1/Argonaute mediated degradation of ciliopathy-gene transcripts

Gweltas Ody^{1,2}, Rebecca Ryan^{1,2}, Valentina Grampa^{1,2}, Thierry Blisnick³, Nicolas Cagnard⁴, Charline Henry^{1,2}, Flora Silbermann^{1,2}, Gaelle Hayot^{1,2}, Olivier Alibeu⁵, Line De grande^{1,2}, Emilie Filhol^{1,2}, Jean-Marc Plazza⁴, Pauline Krug^{1,2,6}, Bertrand Knebelmann⁷, Florian Muller⁸, Philippe Bastin³, Andreas W. Sailer¹⁰, Pierre Saint-Mezard¹⁰, Cécile Jeanpierre^{1,2}, Alexandre Benmerah^{1,2}, Marion Delous^{1,2} and, Sophie Saunier^{1,2*}

¹INSERM U1163, Laboratory of Hereditary Kidney Diseases, Paris, France

²Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Paris, France

³Trypanosome Cell Biology Unit, Institut Pasteur & INSERM U1201, Paris, 75015, France

⁴Bioinformatic Platform, Paris Descartes University-Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US24/CNRS UMS3633, Paris, France

⁵Genomics Platform, Institut Imagine-Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM U1163 and INSERM US24/CNRS UMS3633, Paris, France

⁶Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Department of Pediatric Nephrology, Necker Hospital, Paris, France

⁷Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Department of Pediatric Nephrology, Necker Hospital, Paris, France

⁸Unité Imagerie et Modélisation, Institut Pasteur and CNRS UMR 3691, Paris, France

⁹Novartis Institute for Biomedical Research, Basel, Switzerland

*Correspondance: sophie.saunier@inserm.fr

Abstract

Ciliopathies are a class of multi-systemic genetic diseases characterized by ciliary dysfunction. While most ciliopathies are caused by mutations of genes encoding the structural components of cilia, a new class of secondary-order ciliopathies caused by mutations affecting transcriptional regulators of ciliary genes is being defined. ANKS3 is an ankyrin (ANK) and sterile alpha motif (SAM) domain-containing protein that interacts with a ciliopathy-related protein network (ANKS6/NEK8/NPHP1) as well as with BICC1, an RNA-binding protein involved in renal cystic diseases. Here, we show that the ANKS3/BICC1 complex is involved in a specific type of renal ciliopathy known as nephronophthisis (NPH). ANKS3 modulates BICC1-mediated regulation of ciliary gene mRNA stability. We further demonstrate that loss of ANKS3 function (including the ANKS3 mutation identified in NPH) stimulates BICC1 interaction with target mRNAs and the RISC-associated protein AGO2, thereby promoting degradation of ciliary gene transcripts. These findings suggest that the ANKS3/BICC1 complex is a key post-transcriptional regulator of ciliopathy-related gene transcripts involved in the biogenesis and function of primary cilia.

Ciliopathies are multi-systemic disorders caused by dysfunction of motile or primary cilia. Whereas motile cilia generate fluid flow, primary cilia act as cellular antennae transmitting extracellular signals essential for tissue development and homeostasis^{1,2}. Renal fibrocystic disease, notably nephronophthisis [NPHP], is a common manifestation of ciliopathy, and a frequent cause of end-stage renal disease (ESRD) in children and young adults³. Most proteins encoded by the NPHP genes are structural components of different functional subdomains of the cilium such as the transition zone (TZ) or the inversin compartment (InvsC) found at the proximal part of the axoneme and play key roles in the biogenesis or function of cilia³⁻⁵. The TZ contains nephrocystin proteins NPHP1, NPHP4 and NPHP8/RPGRIP1L and forms a molecular filter that selectively controls ciliary proteins loaded by the intraflagellar transport (IFT) machinery. NPHP2/INVS, NPHP3, NPHP9/NEK8 and NPHP16/ANKS6 constitute the InvsC, controlling the establishment of left-right asymmetry and critical ciliary signalling pathways such as the canonical Wnt and Wnt/PCP signalling^{6,7}. While mutations in the TZ genes NPHP1 and NPHP4 are mostly associated with juvenile or young adult nephronophthisis⁸, mutations in InvsC genes (NPHP2/INVS, NPHP3, NPHP9/NEK8 and NPHP16/ANKS6) have been implicated in syndromic forms of infantile NPHP or cystic kidneys, that are associated with situs inversus, cardiac malformations, and hepatic fibrocystic disease, and mutations in IFT components (TTC21B/IFT139, TRAF3IP1/IFT54, IFT172/NPHP18) found in NPHP with retinal and bone defects^{9,10}. Besides their ciliary functions, NPHP proteins also maintain cell polarity through modulation of cell junctions (NPHP1, NPHP4) and microtubule cytoskeleton dynamics (IFT54, IFT139)^{5,11}.

Recently, ANKS3 (a 656 amino acid protein with six ankyrin repeats and a sterile alpha motif [SAM] domain¹²) has been identified as a component of several NPHP protein modules¹³. While both ankyrin repeats and SAM domains mediate protein-protein interactions, SAM domains are often involved in homophilic protein interactions and therefore promote polymerization¹⁴. ANKS3 interacts with the RNA-binding protein BICC1, which controls the fate of ciliary protein transcripts by modulating the action of miRNAs, as well as the protein synthesis machinery at the centrosome via its cooperation with OFD1¹⁵⁻¹⁷. Inactivation of BICC1 in mouse, zebrafish and Drosophila models as well as BICC1 heterozygous mutations in patients, result in cystic kidney tubules, a hallmark of ciliopathies^{15,18-22}. In addition to its RNA-binding K homology domains, BICC1, like ANKS3, contains a SAM domain crucial for its polymerization and function and required for its binding with ANKS3^{18,23,25}. Besides BICC1, ANKS3 also interacts with the ciliary TZ module NPHP1-NPHP4-RPGRIP1L, the InvsC components ANKS6, NEK8, and INVS, as well as the cell cycle regulators NEK6 and NEK7^{13,24}. Thus far, only one homozygous

ANKS3 mutation has been reported, in a patient with situs inversus²⁵. However, injection of morpholinos targeting *anks3* causes renal cysts in addition to heart laterality defects in zebrafish^{13,25}. phenotypes classically associated with ciliopathy genes^{5,26}. Although the mechanism of action of ANKS3 on cilia function remains unknown, its multi-interaction ability with ciliopathy related proteins makes it a promising candidate regulator of ciliary biogenesis.

Here, we report the first case of ANKS3 mutation in a family with late onset NPHP and hepatic fibrosis. We also demonstrate that ANKS3 regulates the stability of ciliary gene transcripts (including NPHP1 mRNA, the gene most commonly mutated in juvenile NPHP patients) by modulating the interaction of BICC1 with the RISC-associated protein Argaunote-2 (AGO2). This finding thus identifies the BICC1-ANKS3 protein complex as a key regulator of cilia-related mRNA stability critical for the biogenesis and physiologic function of primary cilia.

Results

A nephronophthisis-associated ANKS3 mutation abrogates ANKS3 interaction with BICC1, NPHP1 and NEK8

Using whole exome sequencing (WES) combined with homozygosity mapping in a cohort of patients with renal ciliopathies, we identified a homozygous c.806C>T variant in exon 8 of the ANKS3 gene (NM_133450.3) segregating with the disease in a consanguineous family with 3 affected siblings exhibiting NPH with ESRD after 25 years of age and hepatic fibrosis (Supplementary Fig. 1a-f). This rare variant, not recorded in the Genome Aggregation Database (gnomAD), affects an evolutionary conserved amino acid (Supplementary Fig. 1g) and leads to a p.P269L substitution predicted to be deleterious by Polyphen-2 and scale-invariant feature transform (SIFT) algorithms (Supplementary Fig. 1f). No additional biallelic mutations were detected in any other gene within the 5.9 Mb homozygous candidate region.

We analysed the effect of the p.P269L variant on its interaction with known binding partners (Fig. 1a). After short hairpin RNA (shRNA)-mediated knock-down of the endogenous Anks3 expression in mIMCD3 cells resulting in an extinction between 65% and 80% of the protein product (Supplementary Fig. 2a), we generated cell lines reexpressing either GFP alone (hereafter, KD_GFP) or human ANKS3-GFP fusions corresponding to WT or p.P269L-mutated forms (hereafter, KD_WT or KD_P269L, respectively) (Supplementary Fig. 2a). Using these cells, we showed that the p.P269L variant reduced ANKS3 interaction with BICC1, NPHP1 and NEK8 (Fig. 1b-d) whereas it did not decrease binding to ANKS6 and INVS (Supplementary Fig. 2b,c).

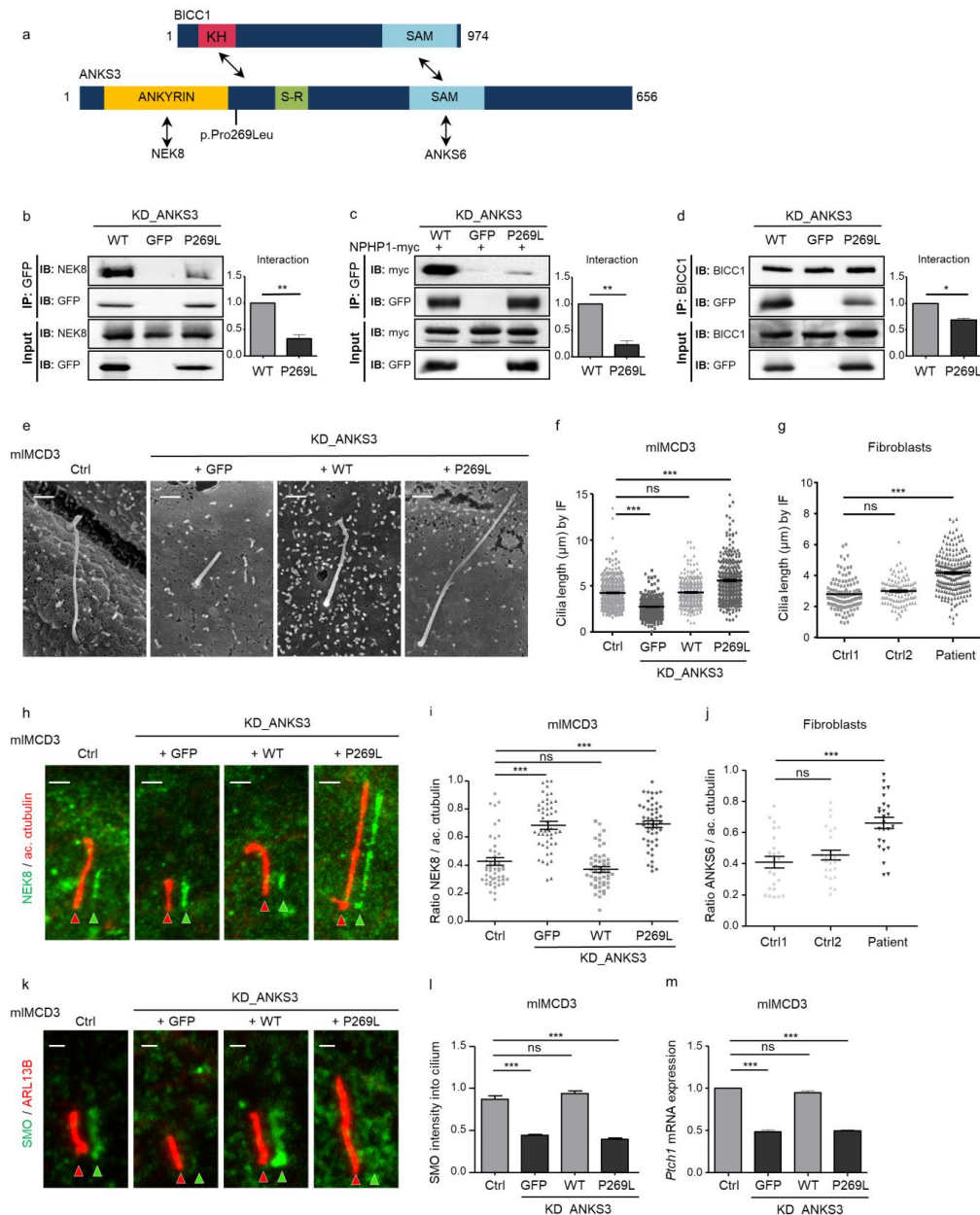


Fig. 1 | NPH-related p.P269L mutation abrogates ANKS3 interaction with BICC1, NPHP1, and NEK8 and leads to ciliary defects.

(a) Structure of the ANKS3 protein with known BICC1, NEK8 and ANKS6 interaction domains and position of the mutation p.Pro269Leu. **(b-d)** Effect of p.P269L mutation on interactions between ANKS3 and NEK8 (b), myc-tagged NPHP1 (c), and BICC1 (d). Lysates from mIMCD3 cells with knockdown of ANKS3 (KD_ANKS3) and re-expressing WT ANKS3-GFP, P269L ANKS3-GFP, or GFP alone (empty vector) were immunoprecipitated with an anti-GFP antibody. Co-immunoprecipitation of GFP-ANKS3 and its binding partners was quantified by western blot (IB) using GFP and NEK8 (b), myc (c), or BICC1 (d) antibodies. Values are the mean $\pm$ s.e.m. of 3 independent experiments; ns: non-significant, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 by t-test. **(e)** Scanning electron microscopy analysis of primary cilia in control and KD_GFP, KD_WT, and KD_P269L mIMCD3 cells. Scale bar, 1 μ m. **(f-g)** Quantification of cilia length in control, KD_GFP, KD_WT, and KD_P269L mIMCD3 cells (f) and in control and NPH patient fibroblasts (g) based on immunofluorescence (IF) analyses. Quantification was performed with ImageJ from 3 independent experiments (n > 100 cells for each experiment; ns: non-significant, ***p < 0.001 by two-way ANOVA with Dunn's post-hoc test). **(h)** Ciliary distribution of NEK8 (green) and acetylated α tubulin (red) in mIMCD3 cells stained for NEK8 (green) and acetylated α tubulin (red). Scale bar, 1 μ m. **(i, j)** Quantification of NEK8 (i) and ANKS6 (j) distribution in cilia in mIMCD3 cells and NPH patient fibroblasts, respectively. Inverse protein distribution was evaluated as the ratio of the length of NEK8 or ANKS6 staining to total cilia length (acetylated α tubulin staining). Values are the mean $\pm$ s.d. of n > 100 cells from 3 independent experiments; ns: non-significant, ***p < 0.001 by Kruskal-Wallis test. **(k)** Ciliary distribution of smoothened (SMO, green) in cilia (ARL13B, red) in Smoothened Agonist (SAG)-treated mIMCD3 cells. Scale bar, 1 μ m. **(l)** Quantification of SMO intensity in cilia. Values are the mean $\pm$ s.d. of n > 100 cells from 3 independent experiments; ns: non-significant, ***p < 0.001 by two-way ANOVA and Dunn's post-hoc test. **(m)** qPCR analysis of relative Patched1 mRNA expression in SAG-treated mIMCD3 cells. Values are the mean $\pm$ s.d. from 3 independent experiments; ns: non-significant, ***p < 0.001 by two-way ANOVA and Dunn's post-hoc test.

Overall, these data demonstrated the pathogenicity of the p.P269L variant and suggested that the loss of ANKS3 protein interaction could negatively affect various processes such as InvsC biogenesis, ciliary membrane composition and/or cell polarity (NPHP1, NEK8) and post-transcriptional gene regulation (BICC1). We thus sought to further analyse the impact of ANKS3 loss of function on each of these cellular processes.

ANKS3 controls cilia structure and function in vitro and in vivo in zebrafish

The role of ANKS3 on cilia biogenesis, structure, and function was investigated in both mIMCD3 models and NPHP patient fibroblasts. Endogenous or reexpressed WT ANKS3 were not detected within cilia (Supplementary Fig. 2e, f). In contrast, ANKS3 was localized to the basal body in control human primary fibroblasts and within apical granular structures in polarized mIMCD3 cells (Supplementary Fig. 2d-f). This result was consistent with previous data showing the localization of overexpressed GFP-tagged anks3 protein in small aggregates at the basal body region of epidermal multi-ciliated cells in *Xenopus laevis* embryos¹³. The p.P269L variant did not impair ANKS3 localization in any of the cellular models we used (Supplementary Fig. 2d-f).

Analyses of ciliogenesis by immunofluorescence (IF) and scanning electron microscopy (SEM) revealed that loss of ANKS3 function did not alter the percentage of ciliated cells (Supplementary Fig. 2g, h), but instead resulted in shorter cilia (Fig. 1e-f; Supplementary Fig. 2i). In contrast, cilia were much longer in the presence of mutant p.P269L in patient fibroblasts and KD_P269L mIMCD3 cells, as well as in the tubular cells of a kidney biopsy obtained from one of the NPH patients (Fig. 1e-g; Supplementary Fig. 2i,j). Both KD_GFP and KD_P269L mIMCD3 cells showed drastic extension of the InvsC component staining, NEK8, ANKS6 and INVS, all along the axoneme (Fig. 1h, i; Supplementary Fig. 3a-d). Similar findings were observed in NPH patient fibroblasts (Figure 1j; Supplementary Fig. 3e). The effect of the ANKS3 p.P269L mutation on cilia length is comparable to that of other NPHP-associated mutations identified in some NPHP/IFT genes²⁷, and suggests that the p.P269L variant does not result in complete loss of function (see Discussion).

To further analyse the ciliary functions of ANKS3, we examined the impact of its loss of function or mutation on the localization of key ciliary signalling proteins known to be affected in other NPHP conditions (adenylate cyclase [ACIII] for cAMP signalling, polycystin-2 [PC2] for Ca²⁺ signalling, and smoothened [Smo] for Hedgehog [Hh] signalling)²⁷⁻²⁹. Whereas ACIII localization was not affected (data not shown), PC2 was not detected in cilia of KD_GFP mIMCD3 cells and was distributed all along the cilium in KD_P269L cells (Supplementary Fig. 3f, g). Furthermore, translocation of Smo into the cilium upon activation with Smoothened Agonist (SAG) was decreased in both KD_GFP and KD_P269L cells (Fig. 1k, l). This indicated abnormal activation of Hh signalling, which

was confirmed by qRT-PCR showing a 50% decrease in Patched1 mRNA expression in KD_GFP and KD_P269L mIMCD3 cells (Fig. 1m) as well as in NPH patient fibroblasts (Supplementary Fig. 3h).

Finally, we investigated the pathogenicity of the p.P269L mutation in vivo in a TALEN-induced anks3 mutant zebrafish line (Supplementary Fig. 4a, b). As previously reported²⁵, anks3-mutant embryos had largely normal gross morphology, but exhibited laterality defects (abnormal heart looping), without any other ciliopathy-related phenotypes (Supplementary Fig. 4c-e). These defects were rescued by injection of RNA encoding human WT ANKS3 but not by p.P269L mutant ANKS3 mRNA (Supplementary Fig. 4e). These results suggested a role of ANKS3 at the Kupffer's vesicle, the transitory ciliated organ responsible for establishment of left-right asymmetry. While anks3 is expressed in Kupffer's vesicle-lining cells (Supplementary Fig. 4f), loss of anks3 function did not affect Kupffer's vesicle cilia number or length (Supplementary Fig. 4g-i). Instead ciliary motility was decreased (Supplementary Fig. 4j, k) and associated with defective Ca²⁺ signalling (Supplementary Fig. 4l, m). Hence, these results indicated that the observed laterality defects were due to either abnormal cilia beating and/or abnormal mechano-transduction, phenotypes also shown to be associated with loss of function of BICC1 or NEK8, respectively^{19,30}.

These data indicate that ANKS3 participates in ciliary structure and composition, as well as regulation of cilia-related signalling pathways such as Ca²⁺/PC2 and smoothened/Hh. Moreover, the data suggest that the ANKS3 p.P269L mutation directly affects ciliary morphology and intracellular signalling.

Loss or mutation of ANKS3 in IMCD3 cells leads to abnormal epithelial differentiation due to NPHP1 transcript instability

Since p.P269L ANKS3 failed to interact with NPHP1, a TZ protein crucial for maintenance of apico-basal polarity in renal epithelial cells,¹¹ we analysed whether ANKS3 loss of function or mutation also led to cell polarity defects. We first found that the apical marker GP135 was not detectable at the apical membrane in both KD_GFP and KD_P269L mIMCD3 cells (Fig. 2a). Then, we performed a calcium-switch assay and measured the trans-epithelial resistance (TER) during re-formation of tight junctions. KD_GFP and KD_P269L cells showed a delay in tight junction formation as monitored by decreased TER compared to control and KD_WT cells (Fig. 2b). These phenotypes were associated with a decrease in cell height (Fig. 2c), further corroborating that KD_GFP and KD_P269L cells failed to properly polarize. Coherent with alteration of polarity, fewer microvilli were visible at the apical surface of KD_GFP and KD_P269L cells by SEM and actin stress fibres also seemed disorganized (Fig. 1e, Supplementary Fig. 5a).

NPHP1 was less abundant in KD_GFP and KD_P269L mIMCD3 cells than in control cells (Fig. 2d; Supplementary Fig. 5b). To investigate the mechanism responsible for this apparent decrease of protein amount, we analysed Nphp1 mRNA levels. A 50% decrease of Nphp1 mRNA was observed in KD_GFP and KD_P269L cells (Fig. 2e). Using actinomycinD treatment to block RNA transcription, we further demonstrated that the half-life of Nphp1 mRNA was decreased in KD_GFP and KD_P269L cells (Fig. 2f). Together, these data indicated that ANKS3 increases the stability of NPHP1 transcripts.

We therefore hypothesized that the structural and functional ciliary and cellular polarity defects observed in KD_GFP and KD_P269L mIMCD3 cells could be due to decreased NPHP1 expression. We thus performed rescue experiments through stable expression of human V5-tagged NPHP1 in KD_GFP and KD_P269L cells (Fig. 2g). Overexpression of NPHP1 restored most of the phenotypes associated with loss or mutation of ANKS3, including abnormal apical localization of GP135, delayed tight junction formation, and reduced cell height in both KD_GFP and KD_P269L cells (Fig. 2h, i, Supplementary Fig. 5c), as well as the increased cilia length in P269L mIMCD3 cells (Fig. 2j). However, NPHP1 expression did not rescue shortened cilia in KD_GFP mIMCD3 cells or disorganization of InvsC (Fig. 2j, k), indicating that Nphp1 down-regulation cannot account for all the phenotypes observed upon loss of ANKS3 function.

These data indicate that most ANKS3-associated phenotypes are linked to decreased expression of NPHP1 through an uncharacterized effect of ANKS3 on NPHP1 mRNA stability. Furthermore, the expression of NPHP1-V5 led to an unexpected 30-fold increase of endogenous expression of murine Nphp1 in control and KD_WT cells, while there was no or a slight increase in KD_GFP and KD_P269L cells respectively (Fig. 2l), suggesting that NPHP1 autoregulates its transcript levels via interaction with ANKS3.

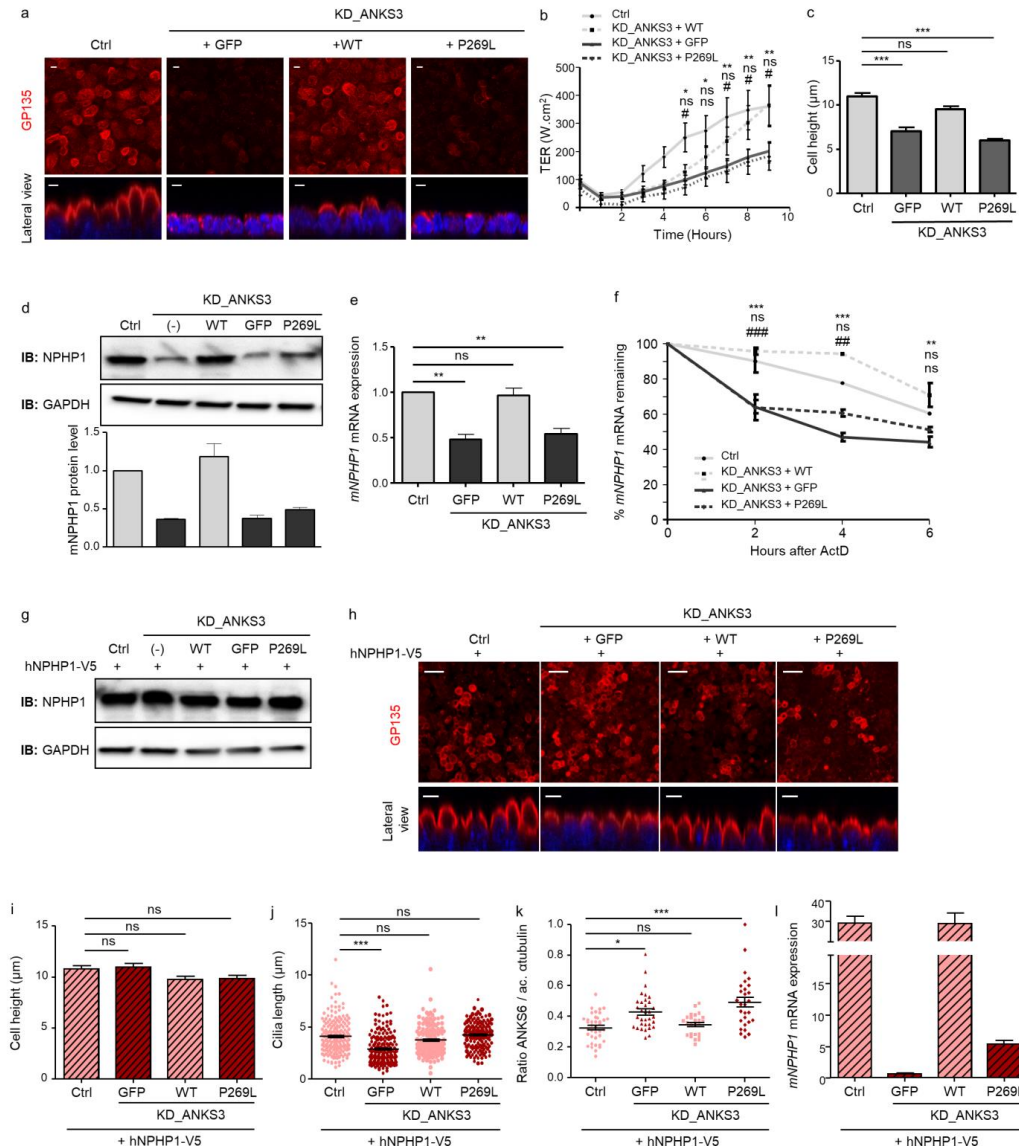


Fig. 2 | ANKS3 mutation leads to polarity defects rescued by re expression of NPHP1.

(a) Immunofluorescence analysis of the subcellular localization of the apical marker GP135 (red) in KD_GFP, KD_WT, and KD_P269L mIMCD3 cells grown for 6 h in standard medium after Ca2+ switch assay. Scale bar, 10 μ m. (b) Measurement of transepithelial resistance (TER) of KD_GFP, KD_WT, and KD_P269L mIMCD3 cells at different time points after Ca2+ switch assay. Values are the mean $\pm$ s.e.m. of 3 independent experiments; * comparison of Ctrl vs. KD_GFP; # comparison of Ctrl vs. KD_P269L; ns: non-significant, */# $p < 0.05$, **/## $p < 0.01$ by two-way ANOVA. (c) Cell height of KD_GFP, KD_WT, and KD_P269L mIMCD3 cells grown on filters was measured as the distance from the base to the top of the cells after β catenin staining (data not shown). Values are the mean $\pm$ s.d. of $n > 20$ cells from 3 independent experiments; ns: non-significant; *** $p < 0.001$, Kruskal-Wallis test. (d-e) Quantification of endogenous NPHP1 protein (d) and mRNA (e) levels. Protein quantification was normalized to a GAPDH loading control and mRNA quantification was normalized to Hprt gene expression. (f) qPCR analysis of murine NPHP1 mRNA decay kinetics after Actinomycin D (ActD) treatment. Values are the mean $\pm$ s.e.m. of 3 independent experiments; * comparison of Ctrl vs. KD_GFP; # comparison of Ctrl vs. KD_P269L; ns: non-significant, **/### $p < 0.01$, ***/#### $p < 0.001$ by two-way ANOVA. (g) Western blot analysis of NPHP1 expression in KD_GFP, KD_WT, and KD_P269L mIMCD3 cells stably expressing human NPHP1-V5 construct. (h) Immunofluorescence analysis of the subcellular localization of the apical marker GP135 (red) in KD_GFP, KD_WT, and KD_P269L mIMCD3 cells stably expressing human NPHP1-V5 and grown for 6 h in standard medium after Ca2+ switch assay. Scale bar, 10 μ m. (i) Cell height of KD_GFP, KD_WT, and KD_P269L mIMCD3 cells stably expressing human NPHP1-V5 and grown on filters was measured as the distance from the base to the top of the cells following β catenin staining (data not shown). Values are the mean $\pm$ s.d. of $n > 20$ cells from 3 independent experiments; ns: non-significant by Kruskal-Wallis test. (j) Analysis of cilia length in KD_GFP, KD_WT, and KD_P269L mIMCD3 cells stably expressing NPHP1-V5. Values are the mean $\pm$ s.e.m. of $n > 100$ cells from 3 independent experiments; ns: non-significant, *** $p < 0.001$ by one-way ANOVA. (k) Quantification of the ciliary distribution of ANKS6 in KD_GFP, KD_WT, and KD_P269L mIMCD3 cells stably expressing NPHP1-V5 as measured by the ratio of ANKS6 staining length to total cilia length (acetylated α tubulin staining). Values are the mean $\pm$ s.d. of $n > 100$ cells from 3 independent experiments; ns: non-significant, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ by Kruskal-Wallis test. (l) Relative expression of murine NPHP1 mRNA normalized to Hprt was analysed by qPCR in mIMCD3 cells in normal conditions or after re expression of hNPHP1-V5 construct (mean $\pm$ s.d. from 3 independent experiments).

ANKS3 functions with BICC1 to regulate Nphp1 transcript stability

A recent study proposed that ANKS3 negatively modulates extended homopolymerization of BICC1 and its localization into cytoplasmic bodies,³¹ from where it is believed to control the stability of target mRNAs^{15–17}. Thus, we postulated that ANKS3 might regulate Nphp1 transcript stability through interaction with BICC1, disrupted in KD_GFP or altered in KD_P269L cells (Fig. 1d). We therefore analysed the capacity of ANKS3 and BICC1 to bind Nphp1 transcripts by RNA co-immunoprecipitation (RIP) assays (see Methods). As demonstrated in Fig. 3a, Nphp1 transcripts were associated with WT ANKS3 immunoprecipitates, and to a lesser extent in the presence of P269L ANKS3. Moreover, BICC1 also bound Nphp1 transcripts (Fig. 3b) and this interaction was increased in the absence of ANKS3 or in the presence of the P269L mutant (Fig. 3b). The increased binding of Nphp1 mRNA with BICC1 in the contexts of KD_GFP or KD_P269L was inversely correlated with transcript stability, supporting the hypothesis that ANKS3 negatively regulates BICC1/Nphp1 mRNA interactions, subsequently preventing mRNA degradation.

In order to validate this hypothesis, we performed siRNA-mediated knock-down of BICC1 in KD_GFP and KD_P269L cells and observed that reduction of 70%-80% of BICC1 protein expression rescued Nphp1 mRNA and protein levels (Fig. 3c, d, e). Reduction of BICC1 expression also restored ANKS3-associated phenotypes, including epithelialization defects (apical GP135 localization and cell height) and longer cilia in the KD_P269L cells, as well as NPHP1-independent phenotypes (cilia length and InvsC organization) (Fig. 3f-j, Supplementary Fig. 5d, e). Since BICC1 knockdown also rescued NPHP1-independent phenotypes (Fig. 3h-j, Supplementary Fig. 5d, e), we hypothesized that ANKS3, through interaction with BICC1, controls the stability of other transcripts.

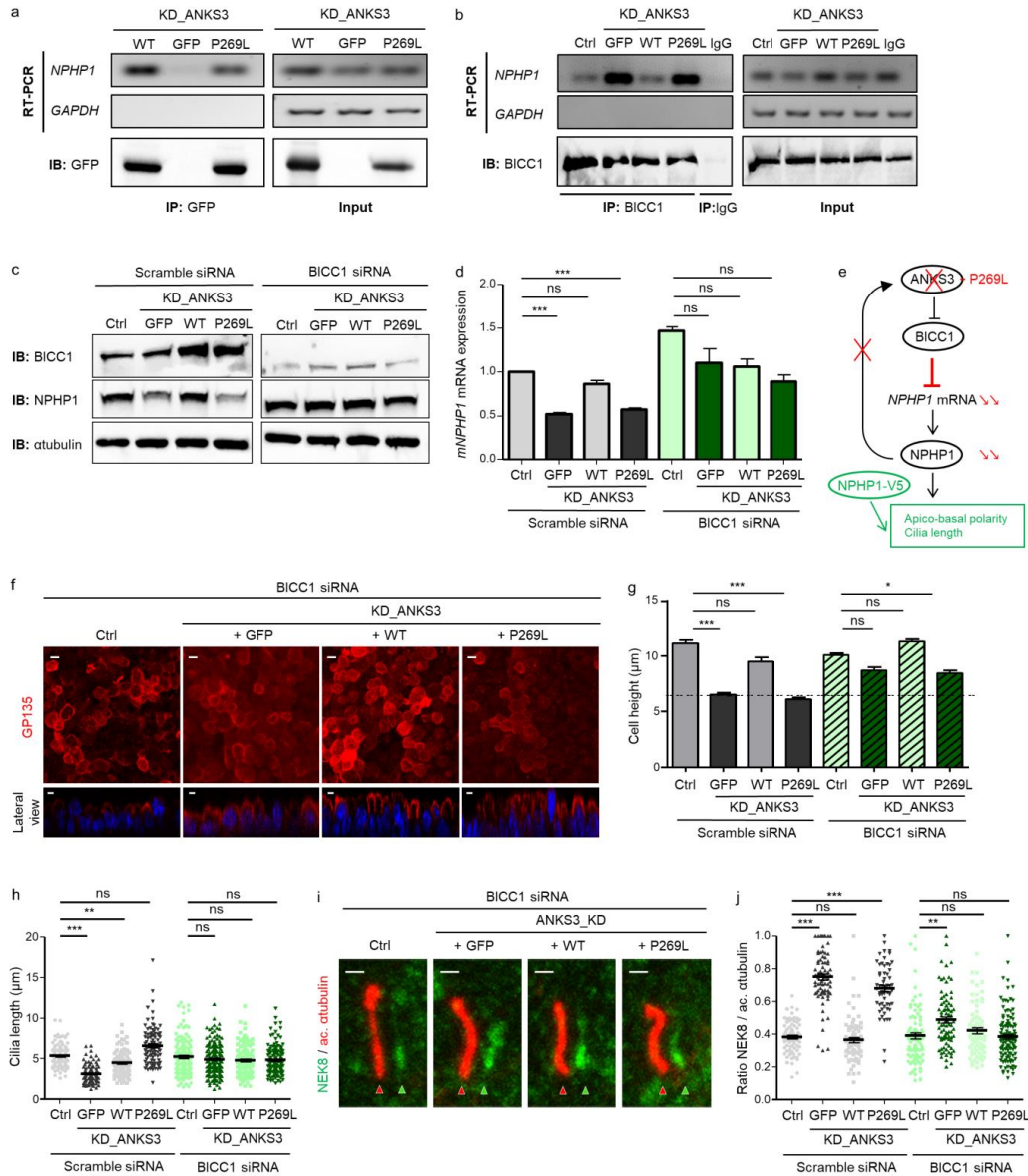


Fig. 3 | BICC1 binds NPHP1 mRNA and silencing of BICC1 rescues ANKS3 KD-associated defects.

(a-b) RNA coimmunoprecipitation assay of NPHP1 mRNA with WT and p.P269L mutated ANKS3-GFP forms (a) and endogenous BICC1 (b). RT-PCR using specific primers for murine NPHP1 and GAPDH (upper panels) and western blot using GFP (a) or BICC1 (b) antibodies (lower panels) were performed on immunoprecipitates from KD_GFP, KD_WT, and KD_P269L mIMCD3 cell lysates. (c-d) Nphp1 protein (c) and mRNA (d) levels in control, KD_GFP, KD_WT, and KD_P269L mIMCD3 cells transfected with scramble or BICC1-targeting siRNA. (c) Western blot analysis of BICC1 expression validated the targeting efficiency of BICC1 siRNA (α tubulin was used as a loading control). (d) qPCR analysis of Nphp1 expression was normalized to Hprt. Values are the mean $\pm$ s.d. from 3 independent experiments; ns: non-significant, *** p <0.001 by two-way ANOVA and Dunn's post-hoc test. (e) Schematic model of the proposed mechanism by which ANKS3 and BICC1 proteins regulate NPHP1 mRNA and protein expression which is implicated in a positive feedback loop. (f) Immunofluorescence analysis of the subcellular localization of the apical marker GP135 (red) in control, KD_GFP, KD_WT, and KD_P269L mIMCD3 cells transfected with BICC1-targeting siRNA and grown for 6 h in standard medium after Ca2+ switch assay. Scale bar, 10 μ m. (g) Cell height of control, KD_GFP, KD_WT, and KD_P269L mIMCD3 cells transfected with BICC1-targeting siRNA and grown on filters was measured as the distance from the base to the top of the cells following β -catenin staining (data not shown). Values are the mean $\pm$ s.d. of n >20 cells from 3 independent experiments; ns: non-significant, * p <0.05, *** p <0.001 by two-way ANOVA and Dunn's post-hoc test. (h) Analysis of cilia length in control, KD_GFP, KD_WT, and KD_P269L mIMCD3 cells transfected with scramble or BICC1-targeting siRNA. Values are the mean $\pm$ s.e.m. of n >100 cells from 3 independent experiments; ns: non-significant, ** p <0.01, *** p <0.001 by Kruskal-Wallis test. (i-j) Immunofluorescence (h) and quantification (i) of the ciliary distribution of NEK8 in control, KD_GFP, KD_WT, and KD_P269L mIMCD3 cells transfected with scramble or BICC1-targeting siRNA (h, NEK8, green; acetylated α tubulin, red) Scale bar, 1 μ m. (i) NEK8 distribution was quantified as the ratio of NEK8 staining length to total cilia length (acetylated α tubulin staining). Values are the mean $\pm$ s.d. of n >100 cells from 3 independent experiments; ns: non-significant, ** p <0.01, *** p <0.001 by two-way ANOVA and Dunn's post-hoc test.

ANKS3 and BICC1 are key regulators of ciliary gene expression

To get a global vision of the role of the ANKS3/BICC1 complex in mRNA regulation, we performed a comprehensive transcriptomic analysis using RNA-Seq. In comparing the expression profiles of KD_GFP and control cells, we identified 4258 deregulated genes (fold change ≥ 1.2 or ≤ 0.8 , p-value ≤ 0.05) (Fig. 4a, Supplementary Table 1), with a bias towards down-regulation (65% versus 35%). Interestingly, 906 of these deregulated genes encoded cilia-related proteins (81% of which were down-regulated). These included components of cilia assembly and transport (BBS, IFT, BB/TZ/InvsC), transcription factors (RFX3), ciliary signalling actors (Hh, Wnt and Planar Cell Polarity [PCP] pathways), and genes involved in laterality determination (Fig. 4b, Supplementary Tables 1&2). Of these 906 genes, 67 have been implicated in ciliopathies (in blue in Fig. 4b), including NPHP3, NPHP4, RPGRIP1L, NEK8, ANKS6, IFT140 in NPHP and PKD1, PKD2 and PKHD1 in polycystic kidney disease. Deregulation of these genes may thus account for the structural and functional defects observed in cilia from KD_GFP cells. Similar analysis in mutant cells revealed a lower number of deregulated ciliopathy genes than in KD_GFP cells (30 versus 67), which coincides with the distinct and more subtle effects of the p.P269L ANKS3 mutation on ciliogenesis (Supplementary Table 1).

Strikingly, knocking down BICC1 rescued the expression of 73% of the genes deregulated in KD_GFP, including 362 cilia-related genes (bold font in Fig. 4b; Supplementary Table 1). When only considering genes with a fold change ≥ 2 , we observed a significant bias towards rescue of down-regulated genes (77% versus 44%) (Fig. 4a, b; Supplementary Table 1). This result highlights the major role of ANKS3 in the protection of mRNA from BICC1-dependent degradation, as demonstrated for Nphp1.

Besides cilia-related genes, Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) and Ingenuity® Pathway analyses highlighted several significant gene ontology terms and signalling pathways relevant to NPHP, including cell migration/adhesion, Hippo, TGF β and mTOR signalling, and autophagy, inflammation and DNA repair pathways (Fig. 4b; Supplementary Tables 1&2)^{3,29,32,33}. Moreover, analysis of the subset of genes rescued by BICC1 knockdown revealed specific categories related to RNA splicing and degradation (including Cnot3 and Lsm2/3/6/7) (Supplementary Table 2), indicating that the ANKS3/BICC1 complex also controls expression of proteins involved in post-transcriptional regulation of mRNA levels.

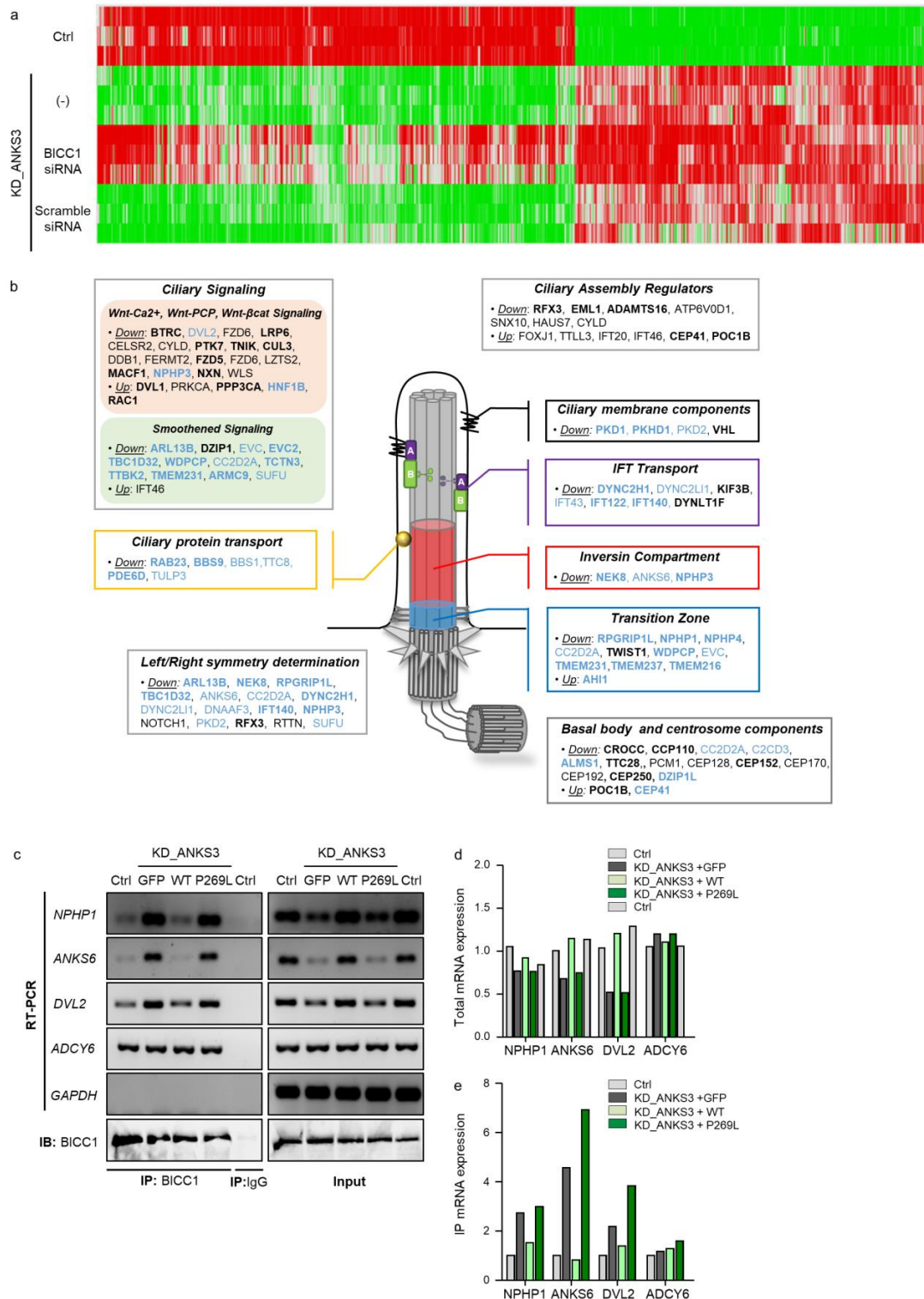


Fig. 4 | ANKS3 and BICC1 regulate post-transcriptional ciliary gene expression

(a) Heat map of RNA-Seq data from control and KD_GFP mIMCD3 cells with or without transfection of scramble or BICC1-targeting siRNA. (b) Ciliary genes dysregulated in KD_GFP mIMCD3 cells grouped by cellular function or subcellular localization. Genes are listed as either up- or down-regulated. Genes in blue are associated with specific ciliopathies. Expression of genes listed in bold font is rescued upon silencing of BICC1 expression. (c) RNA coimmunoprecipitation with BICC1 in control, KD_GFP, KD_WT, and KD_P269L mIMCD3 cells. Immunoprecipitates were subjected to RT-PCR for several specific ciliary genes; GAPDH was amplified as a negative control. Western blot with BICC1 antibody (bottom panel). (d-e) Quantification of total (d) and immunoprecipitated (e) ciliary gene mRNAs analysed in (c). Dysregulated ciliary genes in KD_GFP cells were extracted from whole transcriptomic analysis by comparison with a list of ciliary genes (established from literature (see Supplementary Table 1).

Since RNA-Seq analysis suggested that reduction of ANKS3 function decreased mRNA stability in a BICC1-dependent manner, we tested whether the stability of some transcripts deregulated in KD_GFP and KD_P269L conditions correlated with binding to BICC1. By performing semi-quantitative RT-PCR analysis on BICC1-immunoprecipitated mRNAs isolated from control, KD_GFP and KD_P269L cell lysates, we observed evidence of increased binding of BICC1 with ANKS6 and DVL2 mRNAs, two transcripts down-regulated in KD_GFP and KD_P269L conditions (Fig. 4c-e). These results imply that inhibition of mRNA binding to BICC1 is the mechanism by which ANKS3 regulates RNA stability. It is also noteworthy that neither the expression level nor BICC1 binding of ADCY6 mRNA, a known target of BICC1, were affected by ANKS3 status, thus indicating that ANKS3 co-regulates with BICC1 a specific set of mRNAs.

BICC1 regulates mRNA transcript stability by associating with AGO2

BICC1 has been shown to regulate mRNA translation repression and degradation through the RISC complex, by loading the DICER/miRNA precursor complexes onto its Adcy6/Pkia mRNA targets, which are then transferred to Argonaute 2 (AGO2)^{17,34,35}. To further explore the molecular mechanism of ANKS3/BICC1 in regulating degradation of mRNAs, we considered the role of AGO2. We found that endogenous BICC1 and AGO2 proteins interact in mIMCD3 cells (Fig. 5a) and that this interaction was enhanced in both KD_GFP and KD_P269L cells (Fig. 5a-c). This result suggests that ANKS3 limits BICC1 binding to AGO2, subsequently inhibiting degradation of Nphp1 and other targeted transcripts by the RISC complex. In favour of this hypothesis, we observed increased co-localization of both endogenous BICC1 and Nphp1 mRNA molecules (using smiFISH technique³⁶) with AGO2 in KD_GFP and KD_P269L cells (Fig. 5d-g). Finally, BICC1 was found to colocalize more frequently with DCP1a-positive processing bodies (where mRNA storage or degradation occurs) in KD_GFP cells, as well as in NPHP patient kidney biopsy samples (Fig. 5h, i; Supplementary Fig. 5f, g). Of note, we also observed that BICC1-positive bodies appeared larger in KD_GFP cells and NPHP patient tubular cells, while the number of BICC1-positive bodies was decreased (Fig. 5j, k; Supplementary Fig. 5h). These data indicate that, the absence of ANKS3 or the impaired ANKS3-BICC1 interaction induces the formation of larger BICC1 foci, increases BICC1/AGO2 interaction and then the transfer of Nphp1 and other cilia-related gene transcripts to the RISC complex for degradation.

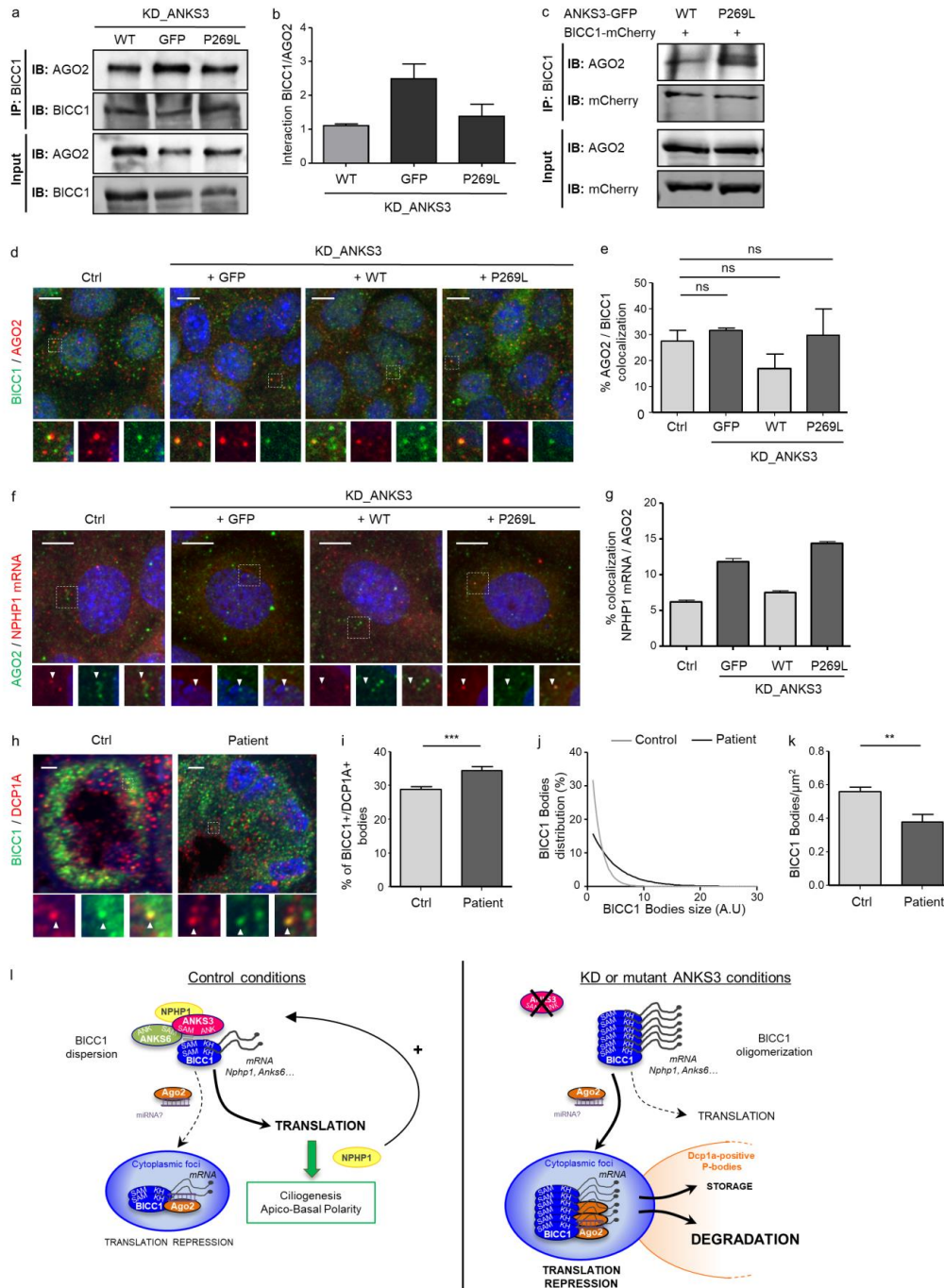


Fig. 5 | AGO2 interacts with BICC1 and colocalizes with NPHP1 mRNA

(a-b) Lysates from control, KD_GFP, KD_WT, and KD_P269L mIMCD3 cells were immunoprecipitated with BICC1 antibody. Western blots of immunoprecipitates **(a)** were performed using BICC1 and AGO2 antibodies and quantified **(b)**. **(c)** Lysates from KD_GFP, KD_WT, and KD_P269L cells co-transfected with a BICC1-mCherry construct were immunoprecipitated with mCherry antibody and western blots were performed using mCherry and AGO2 antibodies. **(d-e)** Colocalization of BICC1 and AGO2 in mIMCD3 cells was visualized by immunofluorescence staining **(d)**, BICC1, green; AGO2, red). Scale bar, 10 μ m. **(e)** Quantification of BICC1-AGO2 colocalization by colocalizer ImageJ protocol with a distance of 3 px (mean $\pm$ s.d. from 3 independent experiments, ns: non-significant; Dunn's post-hoc test). **(f-g)** Colocalization of Nphp1 mRNA and AGO2. **(f)** Detection of NPHP1 mRNA by CY3-coupled smiFISH probes (red) and AGO2 protein with anti-AGO2 antibody (green). Scale bar, 10 μ m. **(g)** Percentage of NPHP1 smiFISH spots colocalizing with an AGO2 spot (mean $\pm$ s.d. from 3 independent experiments). **(h-k)** Human kidney biopsies were stained for BICC1 (green) and the P-bodies marker DCP1A (red). Scale bar, 10 μ m. **(i)** Quantification of colocalization of BICC1 and DCP1A by colocalizer ImageJ protocol with a distance of 3 px (mean $\pm$ s.d. from 3 independent experiments, *** p <0.001, by two-way ANOVA and Dunn's post-hoc test). Distribution of sizes of BICC1 bodies **(j)** and spatial repartition **(k)** using ImageJ spot detector protocol (mean $\pm$ s.d. from 3 independent experiments, ** p <0.01 by two-way ANOVA and Dunn's post-hoc test). **(l)** Schematic model of the proposed mechanism by which ANKS3-BICC1 complexes regulate post-transcriptional ciliary gene expression.

Discussion

Ciliopathies are a complex group of genetic diseases characterized by developmental or functional disorders of multiple organ systems. Although most ciliopathies result from mutations of structural ciliary proteins, we define here a novel mechanism linked to mutation in a post-transcriptional regulator of ciliary gene expression, based on the identification of ANKS3 mutation in patients with nephronophthisis and liver cysts. The p.P269L ANKS3 mutant protein fails to interact properly with the ciliopathy-related protein network ANKS6/NEK8/NPHP1 and with BICC1, a regulator of ciliary gene mRNA expression. Mutation in ANKS3 adversely affects cilia morphology and function as well as epithelial differentiation *in vitro* and *in vivo*. By demonstrating (1) the key role of ANKS3 in regulating stability of cilia-related transcripts through modulation of BICC1 function, (2) that impairment of ANKS3/BICC1 complex activity has deleterious effects on the biogenesis and function of primary cilia, and (3) that ANKS3 mutation is a genetic cause of NPHP, we highlight ANKS3 as a novel renal ciliopathy gene and as a key regulator of a novel pathophysiological mechanism for NPHP-related ciliopathies. Thus for, we propose NPHP21 as an alias for ANKS3.

ANKS3 has been recently shown to negatively regulate BICC1 homo-polymerisation and reduce size of BICC1 foci, via formation of SAM domain dependent ANKS3-BICC1 heteropolymers³¹. In agreement with this observation we showed that in absence of ANKS3 or when ANKS3-BICC1 interaction is impaired, BICC1 forms larger foci in both mIMCD3 cells and patient kidneys, suggesting the presence of abnormally extended homo-polymers of BICC1 with enhanced ability to bind mRNA targets (Figure 5I). We also showed that this led to increased recruitment of AGO2-RISC complex directing transcripts to DCP1A-positive P-bodies, promoting their degradation. Altogether, these data highlight a new function of BICC1 in the regulation of mRNA degradation, as observed here for *Nphp1* and other transcripts. Whether the ANKS3-BICC1 complex regulates specific mRNA degradation in a miRNA-mediated mechanism, remains to be determined.

As a part of this novel mechanism of post-transcriptional regulation of key ciliary transcripts, we propose that NPHP1 may regulate its own expression, and possibly that of other NPHP genes, by interacting with ANKS3 and favouring formation of ANKS3-BICC1 hetero-oligomer complexes. This positive loop of regulation will lead to an exponential and quick adaptation to promote ciliogenesis and epithelialization. NPHP proteins would thus participate to their own expression regulation through the ANKS3-BICC1 complex, and constitute sensor of ciliary assembling and maintenance at the TZ and cell junctions. The ANKS3-BICC1-dependent mRNA regulation most probably occurs in the cytoplasmic foci close to the apical surface or cell junctions in epithelial cells but also in close proximity to

the cilia, which was previously suggested by the association of BICC1 with the centrosomal protein OFD1¹⁶.

We propose that the ciliary phenotypes observed in KD_GFP and KD_P269L ANKS3 cells can be explained mostly by deregulation of ciliary gene transcripts. However, other regulatory processes have been shown to modulate cilium formation and maintenance. Among notable signalling pathways dysregulated by loss or mutation of ANKS3, we identified the mTORC1, TGF β , Hedgehog and Wnt pathways associated with cilia regulation and metabolism as well as kidney failure^{19,37}. Moreover, protein synthesis and degradation pathways, such as the ubiquitin-proteasome system, autophagy and mTORC1 signaling are controlled by and regulate primary cilium formation and cilia-related signalling³⁸, and are deregulated in KD_GFP and KD_P269L cells (Table S2). Interestingly, Wnt, Shh and mTORC1 pathways are activated in regenerating adult kidneys^{39–42}. Therefore, adult onset of ANKS3 mutation-related renal ciliopathy may result from abnormal signalling by these "regenerative pathways" during physiologic tissue repair processes.

Even though ANKS3 loss of function and p.P269L mutation both affect cilia-related transcript stability, they generate opposite ciliary phenotypes (shorter versus longer cilia). This apparent discrepancy on cilia phenotypes has previously been observed with other NPHP proteins, including IFT components (IFT172, IFT54)^{5,27,43}, where loss-of function mutations led to shorter cilia and missense mutation lead to longer cilia in invalidated models. The late onset of the disease observed in the patients with the p.P269L ANKS3 mutation is in agreement with a hypomorphic effect of this mutation. Therefore, adult onset of ANKS3 mutation-related renal ciliopathy may result from abnormal signalling by these "regenerative pathways" during physiologic tissue repair processes. It is quite remarkable that the phenotype observed with the p.P269L ANKS3 mutation (mislocalization of Nek8 along the ciliary axoneme and increased ciliary PC2 localization) has also been observed in jck mice that harbour a missense Nek8 mutation. Laterality defects in association with renal and liver anomalies are recurrent phenotypes associated with mutation of InvsC components in both human and murine models^{10,30,44–47}. Although no laterality defect was reported in any of the siblings of the family reported here, situs inversus associated with a previously human ANKS3 mutation²⁵ as well as phenotype in zebrafish (this study) may result from deregulation of InvsC biogenesis. Nek8 kinase activity is required for PC2-dependent intracellular Ca²⁺ influx in response to flow in Kupffer's vesicle of anks3 zebrafish³⁰. In addition to this proposed mechanism, dysregulation of several cilia motility genes identified in transcriptomic analysis of KD_GFP cells may also account for the decreased cilia motility observed in the Kupffer's vesicle of anks3-mutant zebrafish, thus contributing to defective establishment of left-right asymmetry.

Finally, in addition to ciliary defects, alteration of ANKS3 led to abnormal apico-basal polarity and actin cytoskeleton organization in epithelial cells. This result is in agreement with the role of ANKS3 on NPHP1 expression the transcriptomic analyses of KD_P269L cells, which identified known regulators of RhoGTPase and of signalling pathways controlling the organization and dynamics of actin cytoskeleton. Interestingly, a recent study in *C. elegans* highlighted the function of ANKS3 and its binding partners (NEK8, NEK7, ANKS6 and INVS) in control of actin cytoskeletal organization through regulation of the RhoGTPase Cdc42 and its downstream effector ACK1⁴⁸. Moreover, NPHP1 was previously shown to interact and colocalize with ACK1 at cell-cell junctions in kidney cells⁴⁹. We can thus hypothesize that disrupting the interactions between ANKS3 and its associated proteins, as well as the lack of NPHP1 expression, affects actin cytoskeletal organization and cell contractility, both of which are well-known modulatory factors of ciliogenesis and apico-basal cell polarity⁵⁰.

In conclusion, the data presented here highlight the crucial functions of ANKS3 as a regulator of cilia-related gene expression in orchestrating the biogenesis and function of primary cilia, in addition to regulating key intracellular signalling pathways required for maintenance of epithelialisation. Dysfunction of ANKS3 may thus accounts for the degenerative pathophysiology seen in ciliopathies and organ damage observed in some of these patients.

References

1. Cardenas-Rodriguez, M. & Badano, J. L. Ciliary biology: understanding the cellular and genetic basis of human ciliopathies. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 151C, 263–280 (2009).
2. Reiter, J. F. & Leroux, M. R. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 533–547 (2017).
3. Srivastava, S., Molinari, E., Raman, S. & Sayer, J. A. Many Genes—One Disease? Genetics of Nephronophthisis (NPHP) and NPHP-Associated Disorders. *Front. Pediatr.* 5, (2018).
4. Perrault, I. et al. Mainzer-Saldino syndrome is a ciliopathy caused by IFT140 mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 90, 864–870 (2012).
5. Bizet, A. A. et al. Mutations in TRAF3IP1/IFT54 reveal a new role for IFT proteins in microtubule stabilization. *Nat. Commun.* 6, (2015).
6. Sohara, E. et al. Nek8 Regulates the Expression and Localization of Polycystin-1 and Polycystin-2. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19, 469–476 (2008).
7. Hoff, S. et al. ANKS6 is a central component of a nephronophthisis module linking NEK8 to INVS and NPHP3. *Nat. Genet.* 45, 951–956 (2013).
8. Salomon, R., Saunier, S. & Niaudet, P. Nephronophthisis. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 24, 2333–2344 (2009).
9. Tory, K. et al. Mutations of NPHP2 and NPHP3 in infantile nephronophthisis. *Kidney Int.* 75, 839–847 (2009).
10. Bergmann, C. et al. Loss of nephrocystin-3 function can cause embryonic lethality, Meckel-Gruber-like syndrome, situs inversus, and renal-hepatic-pancreatic dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 959–970 (2008).
11. Delous, M. et al. Nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are required for epithelial morphogenesis and associate with PALS1/PATJ and Par6. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4711–4723 (2009).
12. Leettola, C. N., Knight, M. J., Cascio, D., Hoffman, S. & Bowie, J. U. Characterization of the SAM domain of the PKD-related protein ANKS6 and its interaction with ANKS3. *BMC Struct. Biol.* 14, 17 (2014).
13. Yakulov, T. A. et al. Anks3 interacts with nephronophthisis proteins and is required for normal renal development. *Kidney Int.* 87, 1191–1200 (2015).
14. Qiao, F. & Bowie, J. U. The Many Faces of SAM. *Sci. Signal.* 2005, re7–re7 (2005).
15. Tran, U. et al. The RNA-binding protein bicaudal C regulates polycystin 2 in the kidney by antagonizing miR-17 activity. *Dev. Camb. Engl.* 137, 1107–1116 (2010).
16. Iaconis, D. et al. The centrosomal OFD1 protein interacts with the translation machinery and regulates the synthesis of specific targets. *Sci. Rep.* 7, (2017).

17. Piazzon, N., Maisonneuve, C., Guilleret, I., Rotman, S. & Constam, D. B. Bicc1 links the regulation of cAMP signaling in polycystic kidneys to microRNA-induced gene silencing. *J. Mol. Cell Biol.* 4, 398–408 (2012).
18. Cogswell, C. et al. Positional cloning of jcpk/bpk locus of the mouse. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 14, 242–249 (2003).
19. Maisonneuve, C. et al. Bicaudal C, a novel regulator of Dvl signaling abutting RNA-processing bodies, controls cilia orientation and leftward flow. *Dev. Camb. Engl.* 136, 3019–3030 (2009).
20. Kraus, M. R.-C. et al. Two mutations in human BICC1 resulting in Wnt pathway hyperactivity associated with cystic renal dysplasia. *Hum. Mutat.* 33, 86–90 (2012).
21. Gamberi, C., Hipfner, D. R., Trudel, M. & Lubell, W. D. Bicaudal C mutation causes myc and TOR pathway up-regulation and polycystic kidney disease-like phenotypes in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 13, (2017).
22. Bouvrette, D. J., Sittaramane, V., Heidel, J. R., Chandrasekhar, A. & Bryda, E. C. Knockdown of Bicaudal C in Zebrafish (*Danio rerio*) Causes Cystic Kidneys: A Nonmammalian Model of Polycystic Kidney Disease. *Comp. Med.* 60, 96–106 (2010).
23. Rothé, B. et al. Bicc1 Polymerization Regulates the Localization and Silencing of Bound mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 35, 3339–3353 (2015).
24. Ramachandran, H. et al. Anks3 alters the sub-cellular localization of the Nek7 kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464, 901–907 (2015).
25. Shamseldin, H. E., Yakulov, T. A., Hashem, A., Walz, G. & Alkuraya, F. S. ANKS3 is mutated in a family with autosomal recessive laterality defect. *Hum. Genet.* (2016). doi:10.1007/s00439-016-1712-4
26. Ryan, R. et al. Functional characterization of tektin-1 in motile cilia and evidence for TEK1 as a new candidate gene for motile ciliopathies. *Hum. Mol. Genet.* 27, 266–282 (2018).
27. Halbritter, J. et al. Defects in the IFT-B Component IFT172 Cause Jeune and Mainzer-Saldino Syndromes in Humans. *Am. J. Hum. Genet.* 93, 915–925 (2013).
28. Sang, L. et al. Mapping the NPHP-JBTS-MKS protein network reveals ciliopathy disease genes and pathways. *Cell* 145, 513–528 (2011).
29. Frank, V. et al. Mutations in NEK8 link multiple organ dysplasia with altered Hippo signalling and increased c-MYC expression. *Hum. Mol. Genet.* 22, 2177–2185 (2013).
30. Manning, D. K. et al. Loss of the ciliary kinase Nek8 causes left-right asymmetry defects. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 24, 100–112 (2013).
31. Rothé, B. et al. Crystal Structure of Bicc1 SAM Polymer and Mapping of Interactions between the Ciliopathy-Associated Proteins Bicc1, ANKS3, and ANKS6. *Struct. Lond. Engl.* 1993 26, 209-224.e6 (2018).

32. Grampa, V. et al. Novel NEK8 Mutations Cause Severe Syndromic Renal Cystic Dysplasia through YAP Dysregulation. *PLoS Genet.* 12, (2016).
33. Natoli, T. A. et al. Loss of GM3 synthase gene, but not sphingosine kinase 1, is protective against murine nephronophthisis-related polycystic kidney disease. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3397–3407 (2012).
34. Leung, A. K. L., Calabrese, J. M. & Sharp, P. A. Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 18125–18130 (2006).
35. Hafner, M. et al. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* 141, 129–141 (2010).
36. Tsanov, N. et al. smiFISH and FISH-quant - a flexible single RNA detection approach with super-resolution capability. *Nucleic Acids Res.* 44, e165 (2016).
37. Shillingford, J. M., Leamon, C. P., Vlahov, I. R. & Weimbs, T. Folate-conjugated rapamycin slows progression of polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 23, 1674–1681 (2012).
38. Malicki, J. J. & Johnson, C. A. The Cilium: Cellular Antenna and Central Processing Unit. *Trends Cell Biol.* 27, 126–140 (2017).
39. Lancaster, M. A. et al. Impaired Wnt-beta-catenin signaling disrupts adult renal homeostasis and leads to cystic kidney ciliopathy. *Nat. Med.* 15, 1046–1054 (2009).
40. Morton, J. P., Myant, K. B. & Sansom, O. J. A FAK-PI-3K-mTOR axis is required for Wnt-Myc driven intestinal regeneration and tumorigenesis. *Cell Cycle Georget. Tex* 10, 173–175 (2011).
41. Ashton, G. H. et al. Focal adhesion kinase is required for intestinal regeneration and tumorigenesis downstream of Wnt/c-Myc signaling. *Dev. Cell* 19, 259–269 (2010).
42. Castilho, R. M., Squarize, C. H., Chodosh, L. A., Williams, B. O. & Gutkind, J. S. mTOR mediates Wnt-induced epidermal stem cell exhaustion and aging. *Cell Stem Cell* 5, 279–289 (2009).
43. Friedland-Little, J. M. et al. A novel murine allele of Intraflagellar Transport Protein 172 causes a syndrome including VACTERL-like features with hydrocephalus. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3725–3737 (2011).
44. Czarnecki, P. G. et al. ANKS6 is the critical activator of NEK8 kinase in embryonic situs determination and organ patterning. *Nat. Commun.* 6, 6023 (2015).
45. Yokoyama, T. et al. Reversal of left-right asymmetry: a situs inversus mutation. *Science* 260, 679–682 (1993).
46. Morishima, M. et al. Situs variation and cardiovascular anomalies in the transgenic mouse insertional mutation, *inv*. *Teratology* 57, 302–309 (1998).

47. McQuinn, T. C., Miga, D. E., Mjaatvedt, C. H., Phelps, A. L. & Wessels, A. Cardiopulmonary malformations in the inv/inv mouse. *Anat. Rec.* 263, 62–71 (2001).
48. Lažetić, V., Joseph, B. B., Bernazzani, S. M. & Fay, D. S. Actin organization and endocytic trafficking are controlled by a network linking NIMA-related kinases to the CDC-42-SID-3/ACK1 pathway. *PLoS Genet.* 14, e1007313 (2018).
49. Eley, L., Moochhala, S. H., Simms, R., Hildebrandt, F. & Sayer, J. A. Nephrocystin-1 interacts directly with Ack1 and is expressed in human collecting duct. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371, 877–882 (2008).
50. Klinkert, K., Rocancourt, M., Houdusse, A. & Echard, A. Rab35 GTPase couples cell division with initiation of epithelial apico-basal polarity and lumen opening. *Nat. Commun.* 7, 11166 (2016).
51. Mollet, G. et al. Characterization of the nephrocystin/nephrocystin-4 complex and subcellular localization of nephrocystin-4 to primary cilia and centrosomes. *Hum. Mol. Genet.* 14, 645–656 (2005).
52. Liu, S. et al. A defect in a novel Nek-family kinase causes cystic kidney disease in the mouse and in zebrafish. *Dev. Camb. Engl.* 129, 5839–5846 (2002).
53. de Chaumont, F. et al. Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat. Methods* 9, 690–696 (2012).
54. Absalon, S. et al. Basal body positioning is controlled by flagellum formation in *Trypanosoma brucei*. *PloS One* 2, e437 (2007).
55. Saldanha, A. J. Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 20, 3246–3248 (2004).
56. The R Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing (2014).

Methods

Patients

Genomic DNA was isolated from peripheral blood or frozen tissues using standard procedures. The study protocol was approved by the Comité de Protection des Personnes pour la Recherche Biomédicale Ile de France; written informed consent was obtained.

Homozygosity mapping, exome sequencing, and mutation calling

Homozygosity mapping was performed using 'Human Mapping 250k Nspl' array and parametric logarithm of odds scores were calculated with MERLIN software, assuming autosomal recessive inheritance.

For whole exome sequencing, genomic DNA isolated from blood lymphocytes was subjected to exome capture using Agilent SureSelect human exome capture arrays (Life Technologies), followed by next generation sequencing on the Illumina® sequencing platform. The raw data FASTQ files were first mapped to NCBI build 37/hg19 reference genome using Burrows-Wheeler Aligner (BWA). Downstream processing was carried out with Genome Analysis Toolkit (GATK), SAMtools, and Picard Tools, following documented best practices (<http://www.broadinstitute.org/gatk/guide/topic?name=best-practices>). All variants were annotated using a software system developed by the Paris Descartes University Bioinformatics platform. The mean depth of coverage obtained was greater than x72, and >94% of the exome was covered at least x15. Different filters were applied to exclude all variants located in non-exonic regions, pseudogenes, untranslated regions, or known polymorphic variants with a frequency above 1% annotated in databases such as dbSNP, 1000 genome projects, and gnomAD, including all variants identified by in-house exome sequencing (12,426 exomes and 1,355 ciliomes). The functional consequence of missense variants was predicted using SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html), PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) and CADD/PHRED2 (<http://cadd.gs.washington.edu/>) software.

Traditional Sanger sequencing was performed using the primers Forward 5' TCA GTT TGC CGT AAG GAT TAG T 3' and Reverse 5' CTA TTC CAT TCT TGC CAA CAC 3' to validate the next generation sequencing findings and the segregation of the mutation in the family.

Human primary fibroblasts, mIMCD3 cells, and HEK293T cell culture

Control and affected patient fibroblasts were cultured in Opti-MEM supplemented with 10% foetal bovine serum, 100 U ml⁻¹ penicillin and 100 mg ml⁻¹ streptomycin (all from Life technologies). Control and NPH patient fibroblasts (1.5×10⁴ or 2.5×10⁴ cells, respectively) were plated on coverslips and grown for 2 d (low confluence) or 6 d followed by 48 h serum deprivation (high confluence) before fixation. Murine inner medullary collecting duct (mIMCD3) cells were cultured in DMEM F-12 and HEK293T cells were cultured in DMEM GlutaMaxI medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U ml⁻¹ penicillin and 100 mg ml⁻¹ streptomycin (all from Life technologies). For immunofluorescence, 2.5×10⁴ cells were plated on coverslips and grown for 5 d before fixation. For all experiments, the level of confluence was checked visually and cells were counted using Beckman Coulter instrument to ensure similarity between control and samples.

Plasmids and lentiviral infections

Anks3-knockdown was performed in mIMCD3 cells by lentiviral infection with a shRNA expressing construct cloned in Lv122-puromycin vector (Gene Copoeia EX-H2236-Lv122). Stable cell lines re-expressing WT or mutant ANKS3-GFP forms were obtained using lentiviral infection of an ANKS3-GFP construct cloned in Lv122-puromycin vector. ANKS3-GFP variants were obtained through site-directed mutagenesis using a Pfu turbo kit (Invitrogen). NPHP1-V5-rescued cell lines were obtained by lentiviral infection with a NPHP1-6A construct tagged with V551.

Short interfering RNA (siRNA) transfection

Cells were transfected with 4 µl of 2 µM scramble or BICC1-targeting siRNAs using the Lipofectamine transfection kit according to the manufacturer's instructions. Cells were collected 72 h after transfection for analysis.

Antibodies

The following antibodies were used in the study: acetylated α-tubulin (Abcam, ab24610, 1:500), α-tubulin (Abcam, ab18251, 1:500), ARL13B (Proteintech, 17711 1 AP, 1:400), Polycystin-2 (Santa Cruz, SC10376, 1:50 for immunofluorescence [IF] and 1:2,000 for western blot [WB]), NPHP1-C20 (Santa Cruz, 1:200 for IF), DCP1A (Abnova, 55802, 1:200 for IF), GP135 (R&D, AF1556, 1:200 for IF and 1:1,000 for WB), γ-tubulin (Sigma, DQ-19, 1:500), acetylated α tubulin (Sigma, 6-11-B-1, 1:10,000), ANKS3 (Sigma, HPA041409, 1:50 for IF and 1:1000 for WB), ANKS6 (Sigma, HPA008355, 1:200 for IF and 1:2,000 for WB), BICC1 (Sigma, HPA045212, 1:50 for IF and 1:1,500 for WB), γ-

tubulin (Millipore, C 20, 1:200), GAPDH (Millipore, MAB374, 1:4,000 for WB), NEK8 (gift from D. Beier⁵² 1:500), rabbit GFP (Life Technology, A11122, 1:500), chicken GFP (2B Scientific, 1020, 1:200); ODF2 (Novus H00004957-M01 1:200 for IF), NEK7 (Genetex GTX108216S 1:2,000 for WB), Smo (Abcam ab38686 1:100 for IF), AGO2 (Sigma SAB4200085 1:100 for IF and 1:1,000 for WB), and the TAG antibodies Flag (Sigma F1804 1:500 for IF and 1:5,000 for WB), Myc (Thermo Fisher MSP139P1 1:500 for IF and 1:5,000 for WB), and V5 (AbD Serotec MCA1360 1:500 for IF and 1:5,000 for WB). Rabbit NPHP1 antibody was described previously⁵¹ and used at 1:500 dilution for western blots. Highly cross-adsorbed secondary antibodies (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, AlexaFluor 555, AlexaFluor 532, and Alexa Fluor 647) were obtained from Molecular Probes (Life Technologies) and used at 1:200 dilution.

Immunofluorescence staining

Fibroblasts and mIMCD3 cells were fixed in 4% PFA in 1X PBS followed by treatment with 50 mM NH₄Cl and permeabilization with 0.2% Triton X 100 or fixed in ice-cold methanol for 5 min. Cells were then blocked with 1% skim milk or 1% BSA containing 0.1% Tween20 before incubation with primary antibody (1-3 h at room temperature or overnight at 4°C) and Alexa Fluor-conjugated secondary antibody (30 min at room temperature). Appropriate controls were performed omitting the primary antibodies. DNA was stained with DAPI or Hoechst (Life Technologies). Confocal images were obtained on LEICA SP8 microscope. Images were analysed with ImageJ. Z-stacks were acquired with identical acquisition settings (gain, offset, laser power) and all measurements of fluorescence intensity were performed on maximum intensity projection. Post-acquisition colocalization image analysis was performed using Icy software⁵³. The undecimated wavelet transforms Spot Detector plugin and the Colocalizer protocol were used to quantify the number of particles and colocalized particles, respectively.

Formalin-fixed, paraffin-embedded human tissue biopsies were sectioned (8 µm thickness) using a Leica microtome. Sections were immersed in xylene baths (5 min each) then rehydrated for 5 min in ethanol baths of decreasing concentration (100%, 95%, 70%, and 40%) and finally immersed in MilliQ water for 5 min. Dako target retrieval solution (Dako ref. S1699) was used according to the manufacturer's instructions. Slides were blocked for 45 min at 4°C by 10% normal donkey serum diluted in PBT (DPBS with 0.1% Triton X100). Primary and secondary antibodies were used as described above. Slides were mounted in adapted medium and analysed under an inverted confocal microscope (Zeiss LSM 700).

Electron microscopy

For scanning electron microscopy, cells were washed in PBS, fixed with 2.5% glutaraldehyde, and processed as reported previously⁵⁴.

Protein extraction and western blot

Cells were lysed in 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, and protein concentrations were determined using a BCA protein assay kit (ThermoScientific). 30-50 µg of protein were loaded on 8% or 10% acrylamide gels, blotted on PVDF membranes (Millipore), and incubated using the indicated antibodies. Western blots were then analysed with Bioprofil software.

Coimmunoprecipitation

Miltenyi beads: HEK293T cells were transiently transfected using the calcium phosphate method with different tagged protein constructs. After 48 h, cells were harvested in accordance with the Miltenyi Biotec beads protocol. Protein concentrations were determined using a BCA protein assay kit (ThermoScientific). Coimmunoprecipitation experiments were also performed with ANKS3-null mIMCD3 cells expressing WT ANKS3 or p.P269L mutant ANKS3.

Sepharose beads: 48 h post-transfection, cells were lysed in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Triton and lysates were incubated with rabbit or mouse isotypic control antibodies and G-protein beads (Sigma) for 1 hr at 4°C. Pre-cleared lysates (containing 1 mg of protein) were then incubated with rabbit anti-Flag (Sigma) or mouse monoclonal anti-GFP antibodies (Roche) coupled to G-protein beads for 3 h at 4°C. Beads were then washed three times with increasing amounts of NaCl (500 nM; 300 nM and 150 nM in 50 mM Tris-HCl pH 7.5), resuspended in 2X sample buffer (Sigma), and boiled for 5 min.

Calcium switch assay and TER measurement

mIMCD3 cells grown on 65 mm Transwell filters (Corning) for 7 d were subjected to Ca²⁺ switch as described by Straight et al.⁵⁴ Briefly, cells were washed with PBS containing 4 mM EGTA and calcium-free DMEM (Life Technologies) containing 4 mM EGTA was then added to the cells for 45 min to disrupt cell junctions. Cells were then washed twice with normal culture medium (DMEM/F12). TER was determined using a Millicell-ERS volt-ohm meter (Millipore) immediately after addition of normal growth medium and at the indicated time points. 6 h after Ca²⁺ switch, cells were fixed with 4% PFA and processed as described above.

Zebrafish experiments

Zebrafish were maintained at 28.5°C under standard protocols. The following transgenic lines were used: Tg(bactin:arl13b-GFP)hsc5Tg,⁵⁵ Tg(sox17:Gal4;cmlc2:GFP) (gift from M. Bagnat., Duke University, USA) and Tg(UAS:GCaMP6f; cryaa:mCherry)icm06.⁵⁶ To generate the anks3 mutant fish line, TALENs targeting exon 3 were designed and cloned into pCS2TAL3RR or pCS2TAL3DD expression vectors using Golden Gate assembly.^{57,58} RNA encoding each TALEN arms (left arm target, 5' CTG ATG TAC GCT GCT T 3'; right arm target 5' ACA TCG CTA ACC TGC TG CT 3') were synthesized using the mMMESSAGE mMACHINE kit (Ambion) and injected into one-cell stage embryos at 100 pg per embryo. Mutant alleles were identified by high-resolution melt analysis of PCR products generated with the following primers: forward, 5' GGA GAT GTG GAT TTG GAT GG 3' and reverse, 5' CTG CAA GAG GAA GTG AGC AA 3'. Genotyping of the anks3ii002 allele was performed using allele-specific primers: forward 5' TAC GCT GCT TAC ATC GGT CA 3' for the WT allele, forward 5' ACG CTG CTT ACA TAT CTG CTG 3' for the mutant allele, and reverse, 5' TGC ACA GAT CAA TTG TTC ACC 3'. For RNA rescue experiments, WT and mutated human ANKS3-GFP mRNA were synthesized using the mMMESSAGE mMACHINE kit and injected at 150 pg into one-cell stage embryos. Heart looping phenotypes were analysed using a Leica M165FC stereoscope. For whole-mount in situ hybridization, the anks3 probe was generated with the following primers: forward, 5' CGA ACA AAG GAC CGA AAC AT 3' and reverse 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT CTC AGC CTC CAG TTG GTC T 3' using T7 transcription and digoxigenin labelling. Embryos were fixed at 14 h post-fertilization (hpf) in 4% PFA and in situ hybridization was performed as previously described.⁵⁹ For whole-mount immunostaining, embryos were fixed at 14 hpf in 4% PFA, blocked in 1X PBS, 0.3% Triton, 4% BSA for 1 h at room temperature and incubated in primary antibody (acetylated α tubulin, Sigma, 6–11-B-1, 1:200) at 4°C overnight. After several washes in 1X PBS, 0.3% Triton, embryos were incubated in secondary antibody (AlexaFluor555-conjugated antibody, Molecular Probes, 1:200) for 2 h at room temperature. All images were acquired using a Zeiss LSM confocal microscope after immobilization of fixed or live embryos in 0.8% low melt agarose in glass-bottom Petri dishes (Ibidi). Z-stacks were performed to acquire the whole Kupffer's vesicle and projections were assembled and analysed using ImageJ software to determine cilia number and length, range of motion (as described previously⁵⁵), and GCaMP signal intensity.

RNA extraction and RT-PCR

Total cellular mRNA was isolated using Qiagen Extraction Kit and then treated with DNaseI. 1.5 μ g of total RNA was reverse-transcribed using Superscript II (Life Technologies). Relative expression levels of genes of interest were determined by real-

time RT-PCR using the Absolute SYBR Green ROX Mix (ABgene) and specific primers. Experiments were repeated at least 3 times and gene expression levels were normalized to GAPDH. Data were analysed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.¹¹

mRNA stability assays

mIMCD3 cells were treated with 1 μ M actinomycin D (Sigma-Aldrich) to block mRNA synthesis. Cells were harvested at various time points after actinomycin D treatment. NPHP1 and GAPDH mRNA levels were quantified by quantitative RT-PCR and mRNA half-lives were calculated from plots of mRNA levels as a function of time. We also performed the experiments in the presence of DMSO as a control.

RNA-immunoprecipitation (RIP) assay

RIP assays were performed on cell extracts from mIMCD3 control cells, mIMCD3 shANKS3 cells re expressing GFP plasmid, mIMCD3 shANKS3 cells re expressing WT ANKS3, and mIMCD3 shANKS3 re expressing P269L mutant ANKS3 with anti-GFP monoclonal antibody using the RiboCluster Profiler RIP-Assay Kit (MBL, Japan, RN1001) according to manufacturer's recommendations. Briefly, RNA-protein complexes were pulled-down with 5 μ g of mouse anti-GFP monoclonal antibody. Then, bound RNAs were recovered from RNA-protein complexes, used as templates for cDNA synthesis, and analysed by qPCR or classical PCR followed by agarose gel electrophoresis. Relative expression levels of genes of interest were determined by semi-quantitative RT-PCR (25 cycles for ADCY6 and GAPDH and 30 cycles for DVL2, ANKS6, and NPHP1) using the Green Master Mix (Promega) specific primers.

RNA Seq analysis

FASTQ files were mapped to the ENSEMBL [Human(GRCh38/hg38) / Mouse GRCm38p4] reference using Hisat2 and counted by featureCounts from the Subread R package. Read count normalisations and groups comparisons were performed by three independent and complementary methods - Deseq2, edgeR, LimmaVoom - and the results of each were compared and grouped (cf venn diagrams of results comparisons). The results were filtered at $p\text{value} \leq 0.05$ and folds 1.2/2.

Cluster analysis was performed using hierarchical clustering with the Spearman correlation similarity measure and average linkage algorithm. Heat maps were made with the R package ctc: Cluster and Tree Conversion and imaged by Java Treeview software. Functional analyses were carried out using Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen). The R project⁵⁶ for Statistical Computing [<http://www.r-project.org/>]. Ingenuity Pathways: [<http://www.ingenuity.com>] Java Treeview—extensible visualization of microarray data⁵⁵.

SmiFISH³⁶

Primary smiFISH probes and FLAPs (secondary probes, fluorescent conjugated) were produced and purchased from Integrated DNA Technologies (IDT). Primary probes were generated by high-throughput oligonucleotide synthesis in 96-well plates. To make use of low-scale synthesis (25 nmol), the total length of primary probes (transcript-binding + FLAP-binding) should not exceed 60 nucleotides. The secondary probes were conjugated to Cy3 or Cy5 via conventional 5' and 3' amino modifications.

mIMCD3 cells were fixed in 4% PFA in 1X PBS followed by incubation in ice-cold at -20°C methanol overnight. Cells were then incubated with primary antibody and smiFISH probes in hybridization buffer (overnight at 37°C). Alexa Fluor-conjugated secondary antibody were added (30 min at room temperature) and DNA was stained with DAPI or Hoechst (Life Technologies). Confocal images were obtained on LEICA SP8 microscope. Images were analysed with ImageJ.

Statistical analyses

Results are presented as means of at least 2 independent experiments with s.d. or s.e.m, Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. All hypothesis tests were two-sided and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Availability of data

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgements

We are grateful to the patients for their participation. We thank C. Wyart, A. Prendergast and M. Bagnat for providing us with the UAS:GCaMP6f and sox17:Gal4 zebrafish transgenic lines, respectively. We thank D. Stainier for supporting the generation of anks3 TALEN line. We thank A. Becker-Heck and A. Bizet for technical support. We greatly acknowledge N. Goudin and M. Garfa-Traoré (Necker cell imaging facility) for providing expert knowledge on confocal microscopy, E. Oakley, B. Linghu and F. Yang (NVS sequencing team), C. Bole-Feysot and M. Parisot (Imagine Genomic platform) and the bioinformatic Plateform (Universite Paris Descartes, Institut Imagine). We thank S. Berissi (Histology facility), the pathology department of Necker hospital, O. Pellé (Cell sorting facility), for their excellent technical assistance and LEAT (Imagine Institut). The authors are grateful to the following scientists for their support: Marie-Claire Gubler for her precious help with interpretation of kidney biopsies, B. Lelongt and H. Le Hir for providing intellectual input at various stages of the project. Finally, the authors thank C. Antignac for her precious help in manuscript correction. This research was supported by grants from

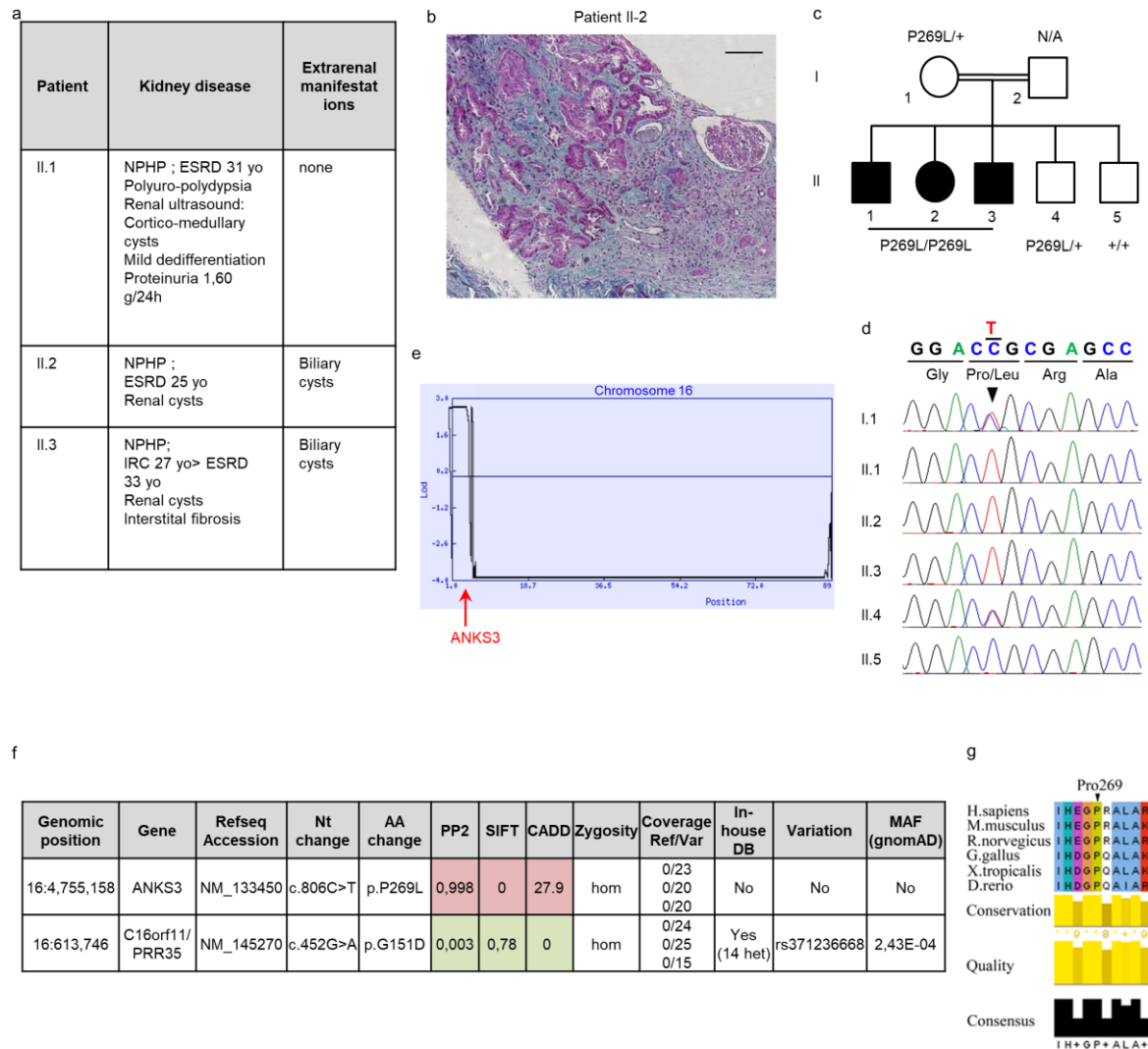
the “Agence Nationale de la Recherche” (ANR) to S.S. (2016AnBiCyst) and investments for the future program-ANR-10-IAHY-01 to S.S., the CORDDIM to G.O. (RPH14131KKA), the Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20130326532 to SS and RR) and (DEA20120624188 to P.K.), the CARIPLO foundation to V.G and the Fondation ARC (EML20110602384) for the purchase of the LEICA SP8 confocal microscope. Work at the Institut Pasteur is funded by grants from the ANR (14-CE35-0009-01) and La Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ20150734356). We are grateful to the Ultrastructural Bioimaging facilities for access to their equipment.

Author Contributions

G.O. performed cell biology and biochemical experiments with the help of R.R., V.G and F.S. G.H. and L.D performed zebrafish studies under the supervision of M. D. B.K. recruited subjects and/or provided clinical information. C.H., E.F., P.K., A.W.S, P.S-M. and S.S. performed linkage and mutational analysis. SEM microscopy was performed by G.O. and T.B., with the input of P.B. G.O, O.A, N.C., C.J. and S.S contributed to RNASeq analyses. G.O performed smFISH experiments under supervision of M. D and F.M.. A.B., M. D. and S.S. designed the experiments and supervised the analyses. G.O., C.J., A.B., M. D. and S.S. wrote the manuscript (with input from co-authors).

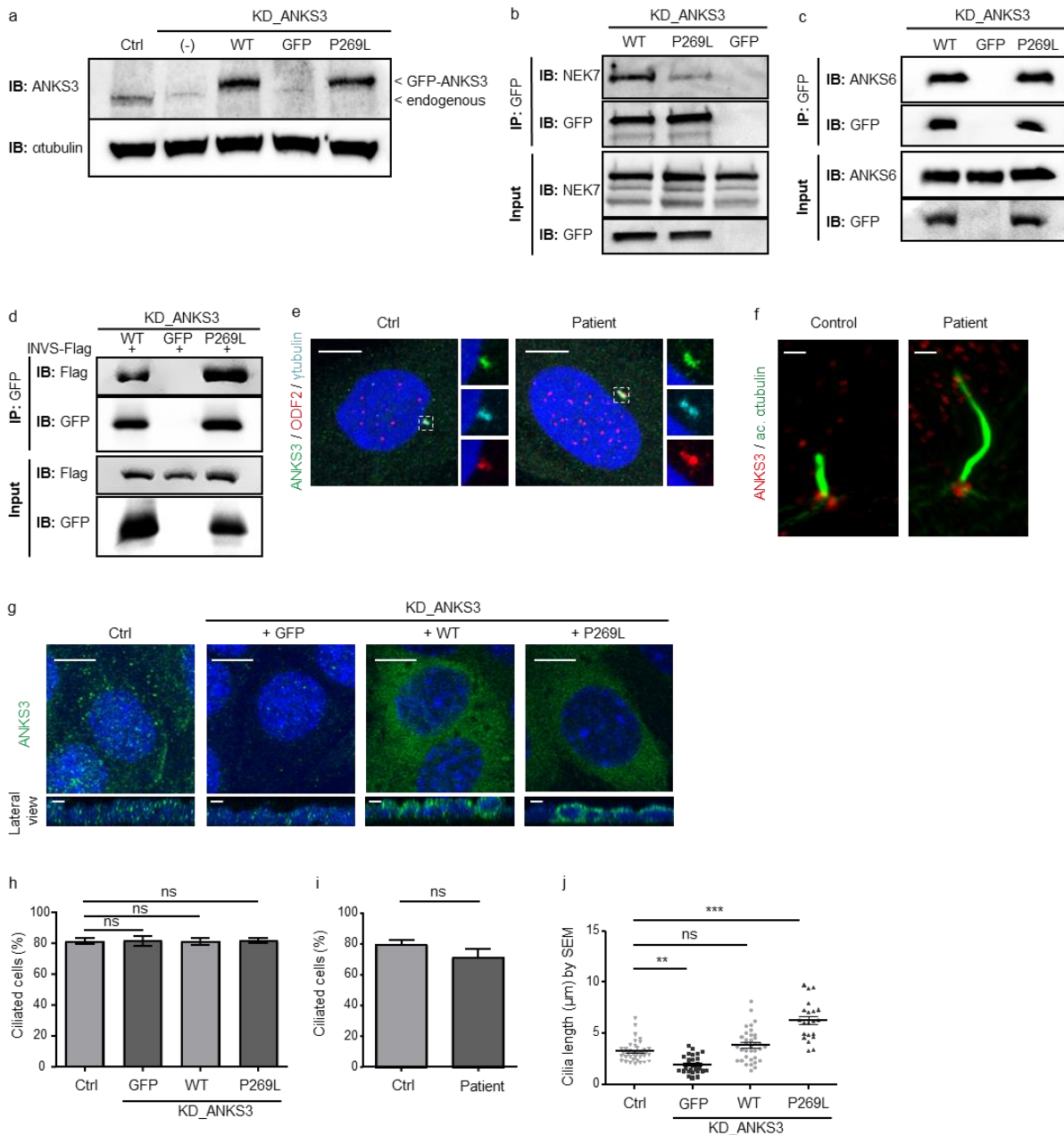
Competing Financial Interests statement

The authors declare no conflict of interest.



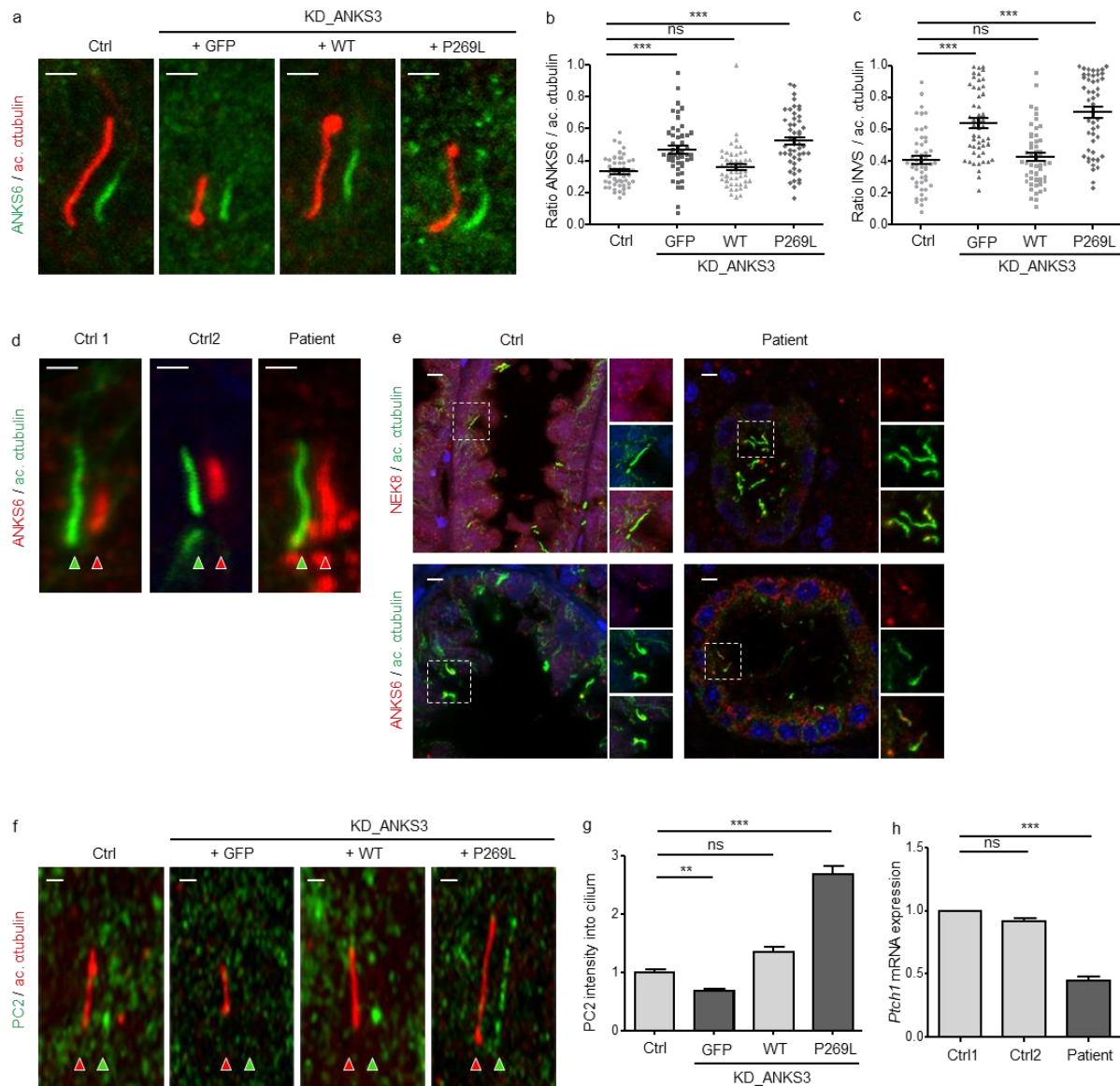
Supplementary Fig. 1 | Linkage analysis combined with whole-exome sequencing reveals ANKS3 mutation in three NPH patients from a consanguineous family

(a-g) Identification of a homozygous P269L ANKS3 mutation in a consanguineous family with three individuals presenting with late onset nephronophthisis. (a) Clinical data from the family with ANKS3 mutation. (b) H&E-stained section from a kidney biopsy from patient II.2 showing massive interstitial fibrosis (blue) and focally dilated and atrophic renal tubules. Scale bar, 100 μm. (c) Pedigree of the consanguineous family with three affected individuals presenting with late onset nephronophthisis (black). (d) Chromatograms and segregation analysis from Sanger sequencing of the c.806C>T, p.P269L variant in the affected family. (e) Linkage analysis revealed a homozygous region of 5.9 Mb on chromosome 16 from genomic position 16:113,599 (rs11248850) to 16:6,035,402 (rs2059271). A maximum logarithm of odds (LOD) score of 2.6577 was obtained at the ANKS3 locus (arrow). (f) List of variants obtained from whole exome sequencing of the 5.9 Mb homozygosity region of affected individuals after applying filtration strategy. Columns from left to right: Genomic Position of the variant in GRCh38, gene name in which the variant is detected (Gene), RefSeq accession, nucleotide (Nt) and amino acid (AA) changes, Polyphen-2 (PP2), SIFT, and CADD scores (red, predicted as causative of disease; green, predicted to be non-deleterious), Zygosity (hom, homozygous; het, heterozygous), Coverage (number of reads in which position is covered for reference [Ref] and variant alleles [Var] in the three NPH patients), variants identified in an institutional database (In House DB), variation ID in dbSNP (Variation), and allelic frequency in genome Aggregation Database (MAF gnomAD). (g) Partial protein alignment of ANKS3 showing that the predicted change in protein sequence affects an evolutionary conserved amino acid residue.

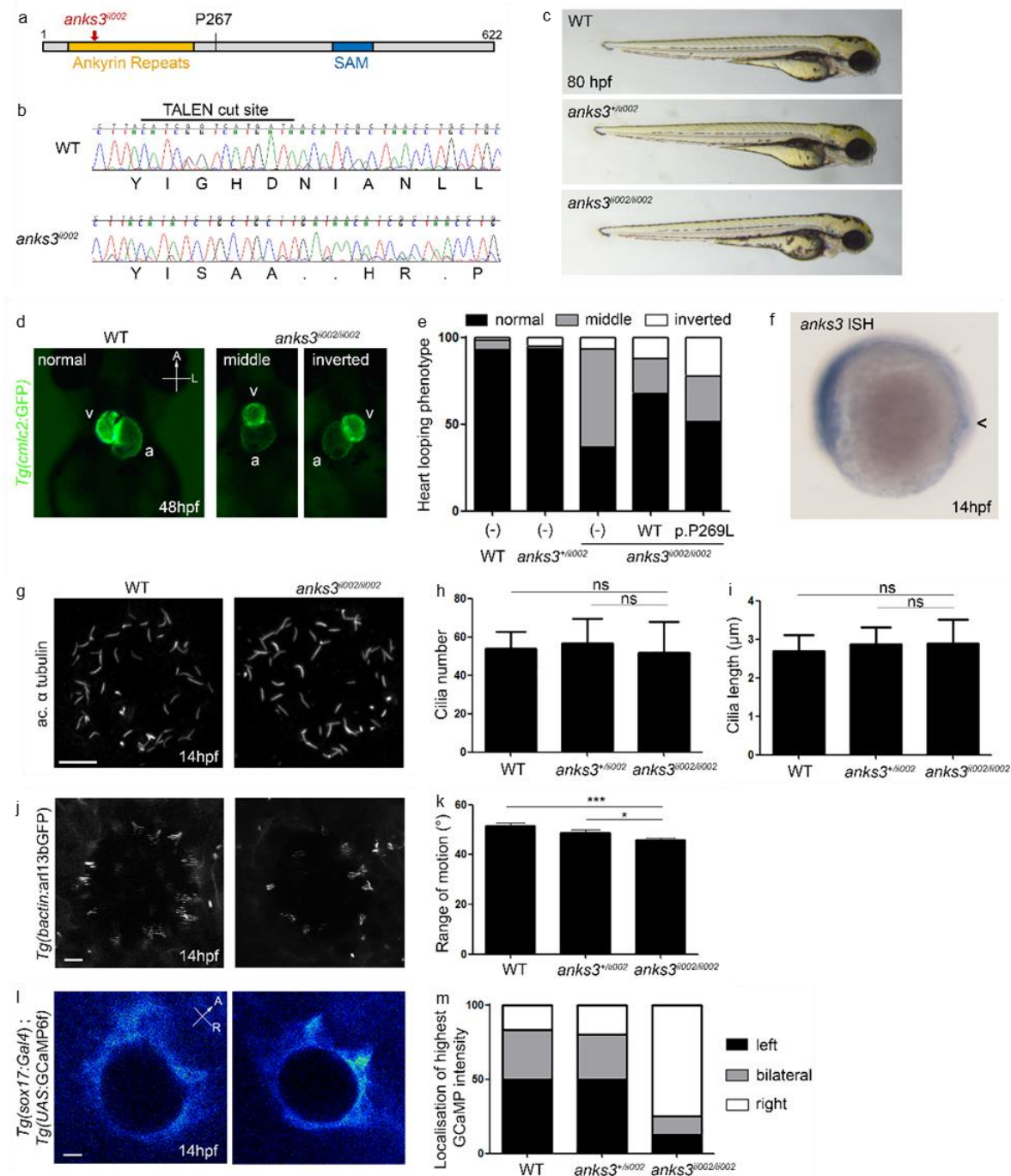


Supplementary Fig. 2 | NPH-associated p.P269L mutation does not affect subcellular localization of ANKS3

(a) Immunoblot analysis of ANKS3 expression in control and KD_ANKS3 mIMCD3 cells with or without stable re-expression of human GFP-tagged WT or p.P269L ANKS3 (α -tubulin was used as protein loading control). **(b-d)** Co-immunoprecipitation assays of ANKS3 with endogenous proteins NEK7, ANKS6, and overexpressed Flag-tagged inversin. Lysates from KD_ANKS3, WT, and KD_P269L mIMCD3 cells were immunoprecipitated with an anti-GFP antibody and immunoblots were performed using NEK7 (b), ANKS6 (c), Flag (d), or GFP antibodies. **(e-f)** Immunofluorescence analysis of ANKS3 subcellular localization in control and patient fibroblasts. Cells were grown on glass slides (e) and starved 48 h to promote ciliogenesis (f). Subcellular localization of ANKS3 (e, green; f, red) was analysed by co-staining with basal body marker ODF2 (e, red) and γ -tubulin (e, cyan) or acetylated α -tubulin (f, green). Scale bars, 1 μ m. **(g)** Immunofluorescence analysis of subcellular localization of ANKS3 (green) in control, KD_ANKS3, WT, and KD_P269L mIMCD3 cells. Cells were grown until confluence on glass slides. Scale bars, 10 μ m. **(h-i)** Quantification of ciliogenesis (% of ciliated cells) in control, KD_ANKS3, WT, and KD_P269L mIMCD3 cells (h) and NPH patient fibroblasts (i). Data are from 3 independent experiments with $n > 100$ cells; ns = non-significant by two-way ANOVA and Dunn's *post-hoc* test. **(j)** Quantification of cilia length from SEM photographs of KD_ANKS3, WT, and KD_P269L mIMCD3 cells. Data are from two independent experiments with $n > 20$ cells; ns = non-significant, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by two-way ANOVA and Dunn's *post-hoc* test.

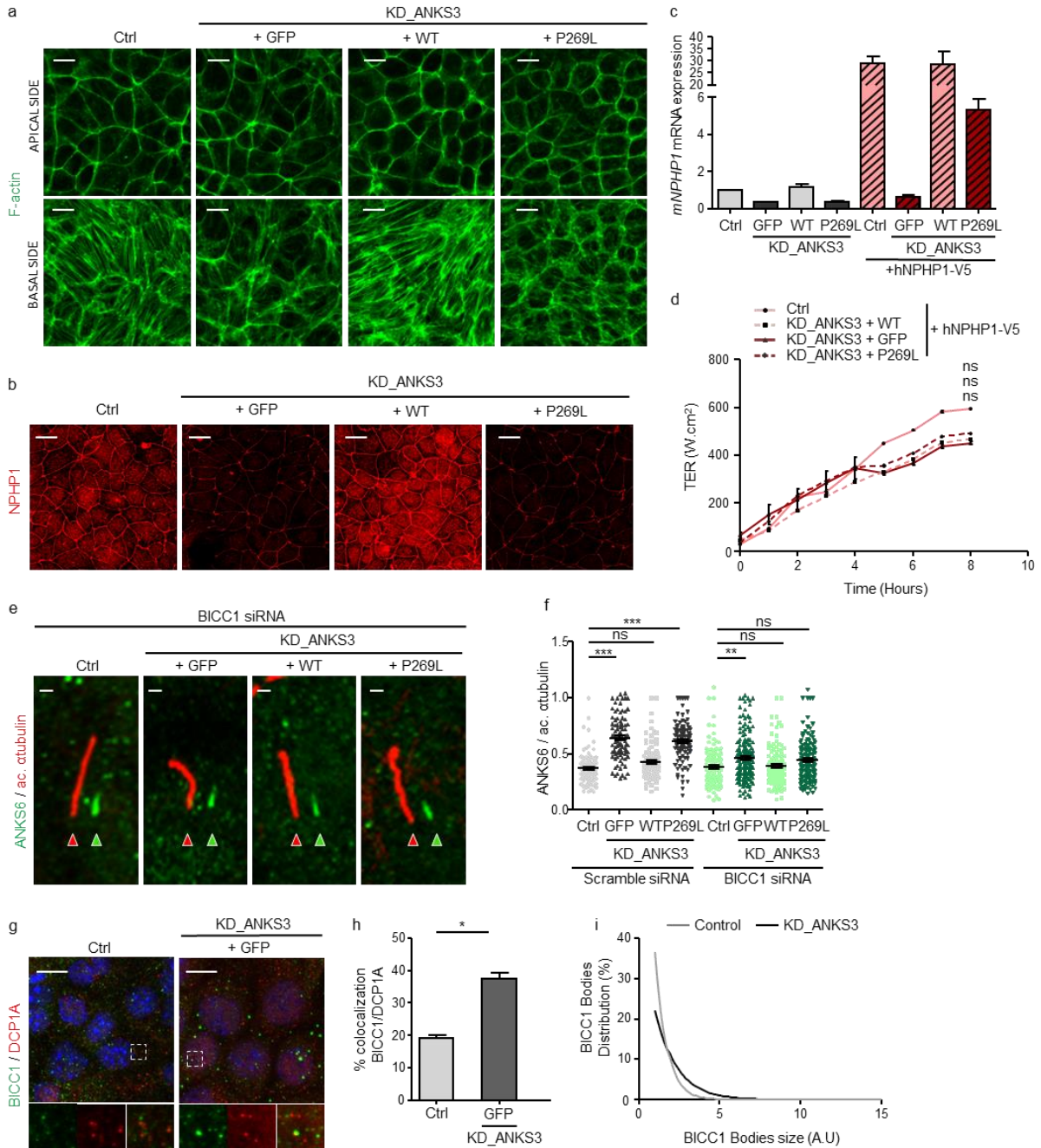


Supplementary Fig. 3 | Analysis of ciliary proteins and signalling pathways in mIMCD3 cells and patient fibroblasts.
(a-c) Ciliary distribution of ANKS6 and INVS in KD_ANKS3 mIMCD3 cells re-expressing WT-ANKS3-GFP or P269L-ANKS3-GFP constructs or GFP alone. **(a)** Cilia staining for ANKS6 (green) and acetylated α -tubulin (red). Scale bar, 1 μ m. The distributions of ANKS6 and INVS were quantified as the ratios of ANKS6 staining length **(b)** or INVS staining length **(c)** to overall cilia length (mean $\pm$ s.d. of $n > 100$ cells from 3 independent experiments, ns: non-significant, *** $p < 0.001$, Kruskal-Wallis test). **(d)** Ciliary distribution of ANKS6 in NPH patient fibroblasts stained for ANKS6 (red) and acetylated α -tubulin (green). Scale bar, 1 μ m. **(e)** Ciliary distribution of NEK8 and ANKS6 in kidney biopsies stained for NEK8 or ANKS6 (red) and acetylated α -tubulin (green). Scale bar, 5 μ m. **(f-g)** Ciliary distribution of PC2 in mIMCD3 cells stained for PC2 (green) and acetylated α -tubulin (red). Scale bar, 1 μ m. PC2 staining intensity **(f)** was quantified **(g)** inside the ciliary region of interest (mean $\pm$ s.d. of $n > 100$ cells from 3 independent experiments, ns: non-significant; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, by two-way ANOVA and Dunn's *post-hoc* test). **(h)** qPCR analysis of relative *Patched1* mRNA expression in SAG-treated control and NPH patient fibroblasts. Values are the mean $\pm$ s.d. from 3 independent experiments (ns: non-significant, *** $p < 0.001$ by two-way ANOVA and Dunn's *post-hoc* test).



Supplementary Fig. 4 | Zebrafish *anks3* mutant embryos exhibit laterality defects associated with abnormal cilia motility and Ca^{2+} signalling in Kupffer's vesicle

(a) Schema of the Anks3 protein showing the position of the TALEN-induced mutation, *anks3*ⁱ⁰⁰². **(b)** Chromatograms of the TALEN target region showing DNA sequences of WT and *anks3*ⁱ⁰⁰² mutant alleles and corresponding amino acids. *anks3*ⁱ⁰⁰² is an indel mutation (c.C246-251delCGGTCAinsATCTGCTGCT) that results in a frameshift and premature codon stop (p.Gly83Serfs86*). **(c)** Gross morphology of WT, heterozygous (htz), and *anks3*ⁱ⁰⁰² mutant embryos at 80 h post-fertilization (hpf). **(d)** Heart looping phenotype of WT and *anks3*ⁱ⁰⁰² mutant embryos at 48 hpf visualized by transgenic line *Tg(cmlc2:GFP)* labelling of the two cardiac chambers (v, ventricle; a, atrium). Ventral views, anterior at top. **(e)** Quantification of heart looping phenotype (%) in WT (n=69), htz (n=126), and *anks3*ⁱ⁰⁰² mutant (n=60) embryos with or without injection of GFP-tagged human WT (n=63) or p.P269L mutated ANKS3 (n=33). **(f)** Whole-mount *in situ* hybridization (ISH) of *anks3* showing expression at Kupffer's vesicle (arrowhead) in WT embryos 14 hpf. Lateral view, anterior at left. **(g)** Immunostaining of cilia (acetylated α -tubulin) in Kupffer's vesicle of WT and *anks3*ⁱ⁰⁰² mutant embryos 14 hpf. **(h-i)** Quantification of cilia number (h) and length (i) in WT (n=27), htz (n=49), and *anks3*ⁱ⁰⁰² mutant (n=22) embryos 14 hpf. Values are mean $\pm$ s.e.m; ns, non-significant by t-test. **(j)** Live confocal imaging of Kupffer's vesicle motile cilia in *Tg(bactin:arl13bGFP)* transgenic WT and *anks3*ⁱ⁰⁰² mutant embryos 14 hpf. Slow acquisition speed of motile cilia produces imaging artefacts, delineating the range of motion of each cilium. **(k)** Quantification of the angle defined by the range of motion of motile cilia in WT (n=17), htz (n=11), and mutant (n=10) embryos 14 hpf, as described in (j). Values are mean $\pm$ s.e.m.; ***p<0.0001, *p=0.027 by t-test. **(l)** Live imaging of cytoplasmic Ca^{2+} influx in WT and *anks3*ⁱ⁰⁰² mutant embryos 14 hpf using the calcium indicator GCaMP6f specifically expressed in Kupffer's vesicle lining cells (sox17 promoter). Dorsal views, anterior at upper left. **(m)** Quantification (%) of the localization of the highest GCaMP6f intensity in WT (n=6), htz (n=10), and *anks3*ⁱ⁰⁰² mutant (n=8) embryos 14 hpf.



Supplementary Fig. 5 | BICC1 knockdown rescues KD_ANKS3 and mutant phenotypes.

(a-b) Immunofluorescence analysis of the subcellular localization of F-actin (a, green) and NPHP1 protein (b, red) in KD_ANKS3, WT, and KD_P269L mIMCD3 cells. Scale bar, 10 μ m. (c) Relative expression of NPHP1 mRNA normalized to *Hprt* was analysed by qPCR in mIMCD3 cells in normal conditions or after re-expression of hNPHP1-V5 construct (mean $\pm$ s.d. from 3 independent experiments). (d) Measurement of transepithelial resistance (TER) of KD_ANKS3, WT, and KD_P269L mIMCD3 cells re-expressing hNPHP1-V5 construct at different time points after Ca²⁺ switch assay. Values are the mean $\pm$ s.e.m. of 3 independent experiments; no significant differences were observed between Ctrl vs. KD_ANKS3+WT+hNPHP1-V5, KD_ANKS3+GFP+hNPHP1-V5, or KD_ANKS3+P269L+hNPHP1-V5 cells by two-way ANOVA and Dunn's *post-hoc* test. (e-f) Ciliary distribution of ANKS6 (green) in mIMCD3 cells with BICC1 knockdown (e, acetylated α -tubulin, red). Scale bar, 1 μ m. (f) Distribution of ANKS6 was quantified as the ratio of ANKS6 staining length to overall cilia length (mean $\pm$ s.d. from 3 independent experiments with n>100 cells; ns: non-significant; **P<0.01, ***P<0.001, by two-way ANOVA and Dunn's *post-hoc* test). (g) Immunofluorescence colocalization of BICC1 (green) and P-bodies marker DCP1A (red) in mIMCD3 cells. Scale bar, 10 μ m. (h) Quantification of colocalization of BICC1 and DCP1A by colocalizer ImageJ protocol with a distance of 3 px (mean $\pm$ s.d. from 3 independent experiments; *** p<0.001 by two-way ANOVA and Dunn's *post-hoc* test). (i) Distribution of sizes of BICC1 bodies using ImageJ spot detector protocol.

RESULTATS

SH_ANKS3 vs CTRL Down (2781 genes)							
GOTERM_BP_DIRECT				KEGG_PATHWAY			
Term	Gene count	%	P-Value	Term	Gene count	%	P-Value
positive regulation of cell migration	60	2.3	6.90E-10	Axon guidance	38	1.4	9.60E-07
cell-cell adhesion	52	2	1.40E-07	Endocytosis	65	2.4	1.00E-06
response to hypoxia	50	1.9	1.40E-06	MAPK signaling pathway	58	2.2	8.20E-06
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	175	6.6	1.10E-05	Focal adhesion	50	1.9	8.60E-06
establishment of planar polarity	11	0.4	2.00E-05	Inositol phosphate metabolism	23	0.9	3.30E-05
endocytosis	44	1.7	4.10E-05	Hippo signaling pathway	38	1.4	4.90E-05
negative regulation of cell proliferation	78	2.9	4.20E-05	Phosphatidylinositol signaling system	27	1	1.40E-04
regulation of protein localization	22	0.8	4.90E-05	Ras signaling pathway	49	1.8	2.70E-04
vesicle-mediated transport	49	1.8	6.30E-05	PI3K-Akt signaling pathway	68	2.6	3.40E-04
cilium assembly	34	1.3	6.70E-05	FoxO signaling pathway	32	1.2	5.80E-04
positive regulation of transcription, DNA-templated	106	4	1.20E-04	Wnt signaling pathway	29	1.1	1.00E-02
Wnt signaling pathway	48	1.8	1.30E-04	TGF-beta signaling pathway	19	0.7	1.90E-02
positive regulation of apoptotic process	68	2.6	1.40E-04	Regulation of actin cytoskeleton	39	1.5	2.00E-02
response to endoplasmic reticulum stress	23	0.9	1.60E-04	Tight junction	27	1	2.70E-02
cell cycle	111	4.2	1.70E-04	mTOR signaling pathway	14	0.5	3.20E-02
actin cytoskeleton reorganization	18	0.7	1.70E-04				
regulation of Rho protein signal transduction	23	0.9	2.00E-04				
cilium morphogenesis	40	1.5	2.00E-04				
actin cytoskeleton organization	34	1.3	4.60E-04				
autophagy	34	1.3	4.60E-04				
kidney development	31	1.2	9.30E-04				
extracellular matrix organization	28	1.1	1.10E-03				
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	122	4.6	1.70E-03				
activation of GTPase activity	20	0.8	1.80E-03				
metabolic process	82	3.1	2.30E-03				
regulation of smoothened signaling pathway	9	0.3	4.40E-03				
focal adhesion assembly	9	0.3	6.10E-03				

SH ANKS3 vs CTRL Up (1477 genes)							
GOTERM_BP_DIRECT				KEGG PATHWAY			
Term	Gene count	%	P-Value	Term	Gene count	%	P-Value
translation	68	4.9	1.90E-14	Ribosome	47	3.4	2.70E-20
ribosomal small subunit biogenesis	9	0.6	7.00E-06	Oxidative phosphorylation	26	1.9	3.80E-06
regulation of cell cycle	19	1.4	1.20E-04	Metabolic pathways	106	7.6	8.60E-03
glutathione metabolic process	12	0.9	1.20E-04	FoxO signaling pathway	17	1.2	1.50E-02
rRNA processing	20	1.4	1.90E-04	TNF signaling pathway	14	1	2.80E-02
ATP synthesis coupled proton transport	8	0.6	2.90E-04	Jak-STAT signaling pathway	17	1.2	3.00E-02
apoptotic process	55	4	6.40E-04	HIF-1 signaling pathway	12	0.9	8.30E-02
ATP metabolic process	9	0.6	2.30E-03				
response to calcium ion	11	0.8	7.20E-03				
positive regulation of protein phosphorylation	21	1.5	7.60E-03				
cell-cell junction organization	6	0.4	1.30E-02				
cell proliferation	23	1.7	1.30E-02				
epithelium development	4	0.3	1.40E-02				
hepatocyte differentiation	4	0.3	2.50E-02				
inflammatory response	31	2.2	2.70E-02				
DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator	4	0.3	4.80E-02				

GOTERM_BP_DIRECT				KEGG PATHWAY			
Term	Gene count	%	P-Value	Term	Gene count	%	P-Value
positive regulation of cell migration	50	2.1	1.40E-07	Ribosome	49	2	2.40E-12
translation	76	3.2	5.60E-06	Axon guidance	35	1.5	1.90E-06
semaphorin-plexin signaling pathway	14	0.6	4.10E-05	MAPK signaling pathway	53	2.2	1.50E-05
positive regulation of apoptotic process	63	2.6	4.90E-05	PI3K-Akt signaling pathway	59	2.4	2.30E-03
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	152	6.3	5.90E-05	Focal adhesion	38	1.6	3.70E-03
ribosomal small subunit biogenesis	10	0.4	8.90E-05	Hippo signaling pathway	29	1.2	6.50E-03
establishment of planar polarity	9	0.4	3.80E-04	Wnt signaling pathway	25	1	3.00E-02
cilium assembly	29	1.2	4.40E-04				
response to hypoxia	38	1.6	7.00E-04				
actin cytoskeleton organization	30	1.2	9.80E-04				
autophagy	30	1.2	9.80E-04				
negative regulation of cell proliferation	64	2.7	1.30E-03				
cilium morphogenesis	33	1.4	2.30E-03				
maturation of SSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript	10	0.4	2.60E-03				
cell-cell adhesion	35	1.5	3.70E-03				
regulation of RNA splicing	9	0.4	1.20E-02				
negative regulation of Wnt signaling pathway	13	0.5	2.00E-02				
rRNA processing	23	1	2.30E-02				

P269L vs WT Down (2097 genes)							
GOTERM_BP_DIRECT				KEGG_PATHWAY			
Term	Gene count	%	P-Value	Term	Gene count	%	P-Value
phosphorylation	111	5.5	8.70E-11	Axon guidance	31	1.5	3.70E-06
apoptotic process	99	4.9	1.00E-08	Endocytosis	50	2.5	2.00E-05
protein ubiquitination	70	3.5	2.80E-08	MAPK signaling pathway	46	2.3	3.50E-05
endosome organization	15	0.7	5.20E-07	Phosphatidylinositol signaling system	23	1.1	1.10E-04
positive regulation of cell migration	44	2.2	6.20E-07	Focal adhesion	38	1.9	1.50E-04
regulation of transcription, DNA-templated	286	14.2	1.20E-06	FoxO signaling pathway	26	1.3	9.30E-04
transcription, DNA-templated	238	11.8	7.70E-06	Hippo signaling pathway	26	1.3	5.00E-03
regulation of GTPase activity	21	1	8.20E-06	Wnt signaling pathway	23	1.1	1.60E-02
epidermal growth factor receptor signaling pathway	16	0.8	1.20E-05	AMPK signaling pathway	21	1	1.90E-02
regulation of cell proliferation	42	2.1	6.40E-05	HIF-1 signaling pathway	18	0.9	2.10E-02
cell-cell adhesion	36	1.8	1.30E-04				
response to hypoxia	35	1.7	3.80E-04				
Wnt signaling pathway	35	1.7	2.40E-03				
regulation of Rho protein signal transduction	16	0.8	6.30E-03				
actin cytoskeleton reorganization	12	0.6	9.80E-03				

GOTERM_BP_DIRECT				KEGG_PATHWAY			
Term	Gene count	%	P-Value	Term	Gene count	%	P-Value
nucleosome assembly	36	2	1.80E-14	Ribosome	35	2	7.40E-08
DNA replication-dependent nucleosome assembly	19	1.1	2.50E-12	Cell cycle	25	1.4	1.70E-04
DNA methylation on cytosine	18	1	1.80E-11	Metabolic pathways	148	8.4	1.80E-04
positive regulation of gene expression, epigenetic	18	1	3.40E-11	Spliceosome	24	1.4	1.20E-03
cell cycle	88	5	1.30E-08				
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	125	7.1	3.10E-08				
translation	64	3.6	3.30E-08				
regulation of gene silencing	10	0.6	4.70E-08				
chromatin silencing at rDNA	19	1.1	6.70E-08				
mRNA processing	43	2.4	4.70E-04				
mRNA splicing, via spliceosome	20	1.1	8.10E-04				
cellular response to DNA damage stimulus	49	2.8	3.40E-03				
RNA splicing	31	1.8	5.60E-03				
renal system development	7	0.4	6.40E-03				
DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator	5	0.3	1.00E-02				
regulation of canonical Wnt signaling pathway	6	0.3	2.30E-02				
positive regulation of inflammatory response	10	0.6	4.90E-02				

GOTERM_BP_DIRECT				KEGG PATHWAY			
Term	Gene count	%	P-Value	Term	Gene count	%	P-Value
transcription, DNA-templated	329	12.3	1.80E-13	Ribosome	38	1.4	1.20E-05
protein transport	124	4.6	4.10E-10	Cell cycle	29	1.1	1.20E-03
cell cycle	126	4.7	1.10E-09	Phosphatidylinositol signaling system	24	0.9	1.60E-03
DNA methylation on cytosine	18	0.7	1.90E-08	Endocytosis	53	2	1.60E-03
nucleosome assembly	35	1.3	2.10E-08	FoxO signaling pathway	30	1.1	1.90E-03
chromatin silencing at rDNA	24	0.9	2.30E-08	RNA degradation	21	0.8	2.10E-03
mitotic nuclear division	66	2.5	5.80E-08	Spliceosome	29	1.1	3.40E-03
cellular response to DNA damage stimulus	88	3.3	1.70E-07	MAPK signaling pathway	46	1.7	8.30E-03
positive regulation of gene expression, epigenetic	16	0.6	1.80E-06	HIF-1 signaling pathway	21	0.8	3.10E-02
vesicle-mediated transport	51	1.9	1.90E-06				
apoptotic process	107	4	2.10E-06				
regulation of gene silencing	10	0.4	2.30E-06				
protein ubiquitination	75	2.8	2.40E-06				
cell-cell adhesion	46	1.7	4.00E-06				
endosome organization	15	0.6	6.90E-06				
mRNA processing	66	2.5	1.50E-05				
protein heterotetramerization	18	0.7	1.60E-05				
translation	78	2.9	1.60E-05				

Partie 2 : Résultats Annexes

En parallèle de cette étude menée sur le rôle d'ANKS3, une étude protéomique a été mise en place afin d'identifier de nouveaux interactants d'ANKS3 dans les cellules rénales IMCD3. Ainsi l'étude des interactants des formes sauvages et mutées d'ANKS3 ont permis de mettre en avant 324 protéines avec une interaction fiable. Au sein de ces 324 protéines, on retrouve 47 protéines (15%) pour lesquelles l'interaction est affectée par la mutation p.P269L. Ainsi cette étude a permis de retrouver les partenaires déjà identifiés d'ANKS3, tel que ANKS6, NEK8 ou BICC1, mais aussi également de nombreux partenaires de la régulation génique et de la machinerie de traduction, des P-bodies et des Granules de Stress tel que G3BP2 ou AGO2, et du remodelage du cytosquelette d'actine tel que ARHGEF2.

I- L'implication de la protéine ANKS3 dans la migration cellulaire et le remodelage du cytosquelette d'actine

Position du problème

Nous avons montré précédemment que l'absence ou la mutation d'ANKS3 entraîne des défauts de polarité apico-basale accompagnés d'un défaut d'organisation du cytosquelette d'actine dépendant de l'expression de NPHP1. Nous avons ainsi analysé si d'autres processus cellulaires dépendant du remodelage de l'actine tels que la migration et d'adhésion cellulaires pouvaient être altérés en l'absence d'ANKS3.

L'absence d'ANKS3 affecte la migration cellulaire.

En plus des défauts de polarité apico basale déjà évoqués, nous avons démontré un défaut de migration des cellules IMCD3 déplétées ou mutées pour ANKS3 (Figure 19a). En effet, la quantification de la vitesse de migration instantanée des cellules KD-ANKS3 ou reexprimant la mutation p.P269L lors d'un "woundhealing assay" montre une capacité diminuée de migration de ces cellules (Figure 19a b). De façon intéressante, la visualisation du cytosquelette d'actine lors de la migration révèle une distribution différente dans les cellules mutées par rapport aux contrôles, avec la persistance au niveau du front de migration d'un câble d'actine fortement marqué par la phalloïdine. En conditions physiologiques, ce câble doit être rompu par des cellules présents au front de migration, les cellules « leader », afin de pouvoir former les lamellipodes permettant une migration collective de l'ensemble de la couche cellulaire (Friedl and Gilmour, 2009; Nishimura et al., 2012) (Figure 19c d). Ce phénomène est observé dans les cellules contrôles et les cellules KD-ANKS3 WT (Figure 19d) alors qu'une diminution importante du nombre de cellules « leader » (Figure 19d) et une

persistance du câble d'actine au front de migration sont observées dans les cellules KD_ANKS3 et reexprimant la mutation p.P269L. Ce défaut pourrait donc expliquer l'absence de migration collective ordonnée dans ces cellules.

Le rôle d'ANKS3 dans la migration cellulaire via NPHP1.

De façon similaire aux défauts de polarité apico-basale, l'expression de la construction NPHP1-V5 dans les cellules déplétées ou mutées pour ANKS3 conduit au sauvetage phénotypique de la vitesse de migration (Figure 19e f). En revanche, la surexpression de NPHP1-V5 dans les cellules contrôles n'induit pas de vitesse accrue, voire une vitesse légèrement diminuée comparée aux cellules contrôle ne réexprimant pas NPHP-V5. Cette restauration de la vitesse de migration collective par la réexpression de NPHP1 s'accompagne également d'une restauration du nombre de cellules « leader » (Figure 19g) et de la régression de l'épais câble d'actine au niveau du front de migration (Figure 20a). Ces résultats démontrent qu'ANKS3 aurait besoin de l'expression de NPHP1 pour remodeler le cytosquelette et détruire le câble d'actine lors de la migration cellulaire des cellules tubulaires rénales.

L'étude plus approfondie de l'organisation du cytosquelette révèle que en plus de la diminution des fibres de stress formant le réseau d'actine subnucléaire (Figure 20b), on remarque également une altération des adhésions focales marquées par la paxilline, larges complexes multiprotéiques permettant la liaison des cellules à la matrice extra cellulaire (ECM) et marqués par la paxilline (Figure 20b). Il semble que le nombre et la disposition de la paxilline soit affectés dans les cellules déplétées et mutées pour ANKS3. Les adhésions focales, agissant tel un pont entre la cellule et l'ECM, régulent également l'adhésion des cellules au support. En effet, nous avons montré un défaut d'adhérence des cellules déplétées pour ANKS3 par rapport aux cellules contrôles ou cellules KD-ANKS3 WT, avec seulement 1/4 des cellules KD_ANKS3 capables d'adhérer sur collagène ou fibronectine (Figure 21a). Ce résultat a été confirmé par la mesure de l'impédance électrique via le système XCELLigence lors de l'adhésion, qui indique une impédance 4 à 5 fois moins élevée dans les cellules déplétées pour ANKS3 comparé aux contrôles (Figure 21b).

Ces résultats additionnels confirment le rôle d'ANKS3 dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine et les processus cellulaires associées, telles que la migration et l'adhésion cellulaires ainsi que la polarité apico-basale. Ils confirment également que la régulation de ces processus par ANKS3 est dépendante de l'expression de NPHP1.

Discussion

Ces résultats, en accord avec les données obtenues lors de l'étude transcriptomique des cellules déplétées pour ANKS3, confirment l'implication de cette dernière dans la régulation du cytosquelette. En effet, il est apparu que dans les cellules déplétées et reexprimant la mutation p.P269L pour ANKS3, les acteurs de voie de signalisation des Rho-GTPases sont dérégulés négativement pour la voie RhoA et positivement pour les inhibiteurs RhoGDI. Environ 20 Rho GTPases sont connus parmi lesquelles Rho, Rac et Cdc42 sont les plus étudiées (Heasman and Ridley, 2008). Les Rho-GTPases nécessitent une activation via leur liaison au GTP. Les Rho-GDi inhibent la dissociation du GDP en GTP, inactivant ainsi la voie des Rho GTPases. Une fois activées, les Rho-GTPases sont capables de se lier à différents effecteurs, parmi lesquels des protéines kinases (la protéine kinase N (PKN), les protéines de la famille MLK ou encore la kinase activée par p21 (PAK)) (Zhao and Manser, 2005) ou des protéines liant l'actine. Ces dernières agissent directement ou indirectement sur l'assemblage ou le désassemblage des filaments d'actine F. Ainsi, les Rho-GTPases contrôlent notamment l'assemblage des fibres de stress et des adhésions focales. De façon intéressante, la réexpression de NPHP1 est capable de restaurer une migration collective physiologique. Ce résultat est important à différents niveaux. Premièrement NPHP1 étant impliquée dans la régulation de PYK2 et P130CAS, acteurs régulateurs des adhésions focales (Delous *et al* 2009). Il semble alors logique de penser que la dégradation du transcrit NPHP1 dans les cellules KD-ANKS3 puisse induire des défauts de régulation des complexes focaux d'adhésion à l'origine des défauts de migration collective. On notera également l'influence de NPHP1 sur la voie des RhoGTPases. Tout d'abord, NPHP1 est connue pour son interaction avec la protéine ACK1 (Eley *et al.*, 2008), un régulateur de la RhoGTPase CDC42 impliquée dans la migration cellulaire (Lažetić *et al.*, 2018; Modzelewska *et al.*, 2006). Ensuite, des résultats du laboratoire indiquent que les mutations de *NPHP1* dans plusieurs modèles cellulaires NPHP1, affectent la voie des RhoGTPases et la modulation du cytosquelette. Comme énoncé précédemment, d'autres partenaires de la protéine ANKS3 pourrait également jouer un rôle dans ces phénotypes. Il s'agit notamment du facteur d'échange de nucléotide Guanine (GEF) des protéines Rho, ARHGEF2, qui en cas de dérégulation aurait un impact sur la signalisation de la voie des RhoGTPases (Cheng *et al.*, 2012; Graessl *et al.*, 2017; Nalbant *et al.*, 2009).

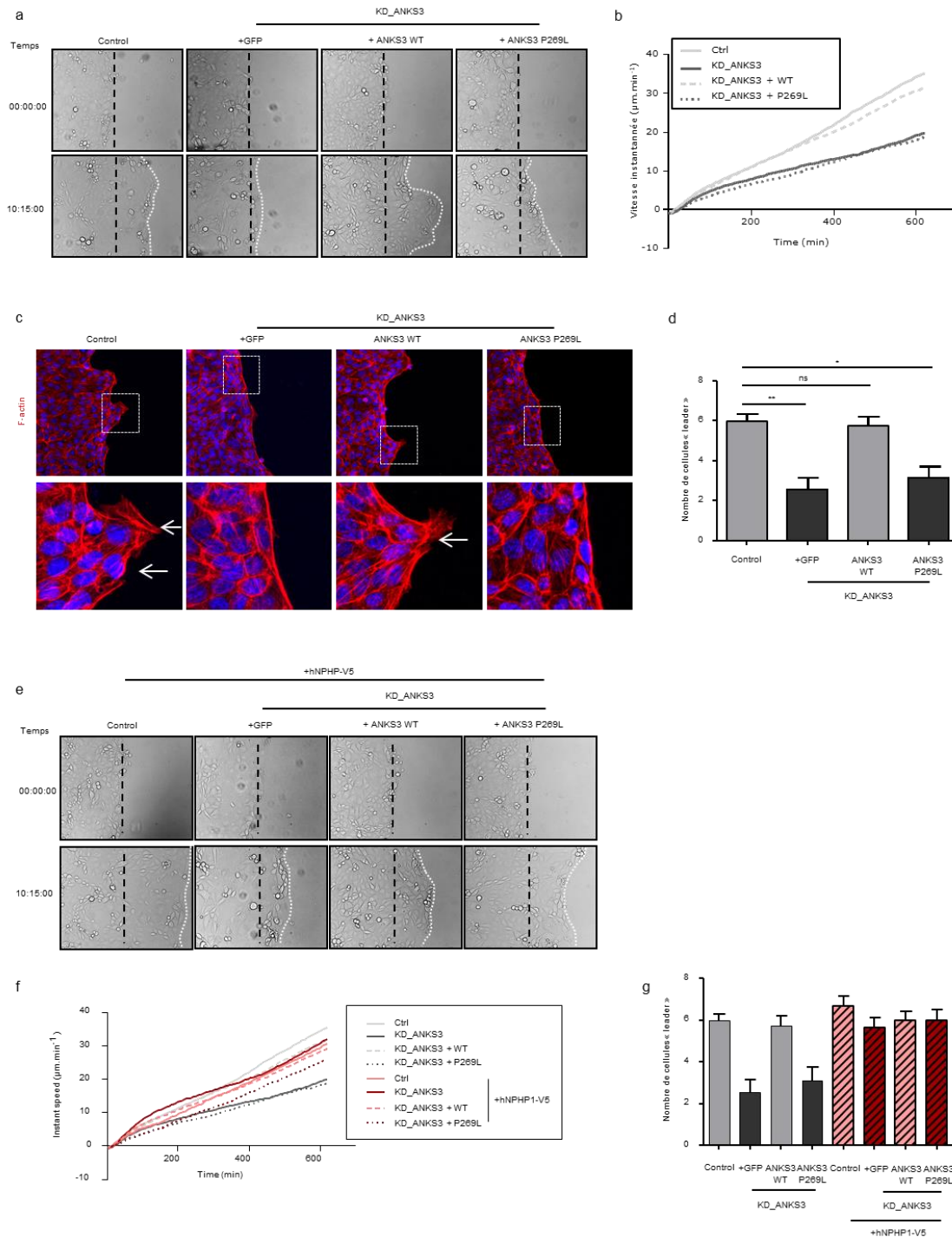


Figure 19: Implication d'ANKS3 dans la migration cellulaire

(a) La migration cellulaire collective est observée par microscopie en lumière blanche en directe. Des images représentatives sont extraites à 0h0min0s et à 10h15min00s. (b) La quantification de la vitesse de migration est réalisée sur les cellules avec l'utilisation du protocole « cell tracking » d'ImageJ. (c) Le cytosquelette d'actine durant la migration est observé par le marquage à l'aide de Phalloïdine couplée à un fluorochrome rouge. (d) Les cellules leader sont quantifiées manuellement (moyenne et déviation standard à partir de 3 expériences indépendantes NS: not-significant; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, Kruskal-Wallis test). (e) La migration cellulaire collective des cellules reexprimant la construction hNPHP1-V5 est observée par microscopie en lumière blanche en directe. Des images représentatives sont extraites à 0h0min0s et à 10h15min00s. (f) La quantification de la vitesse de migration est réalisée sur les cellules avec l'utilisation du protocole « cell tracking » d'ImageJ (g) Les cellules leader sont quantifiées manuellement (moyenne et déviation standard à partir de 3 expériences indépendantes NS: not-significant; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, Kruskal-Wallis test).

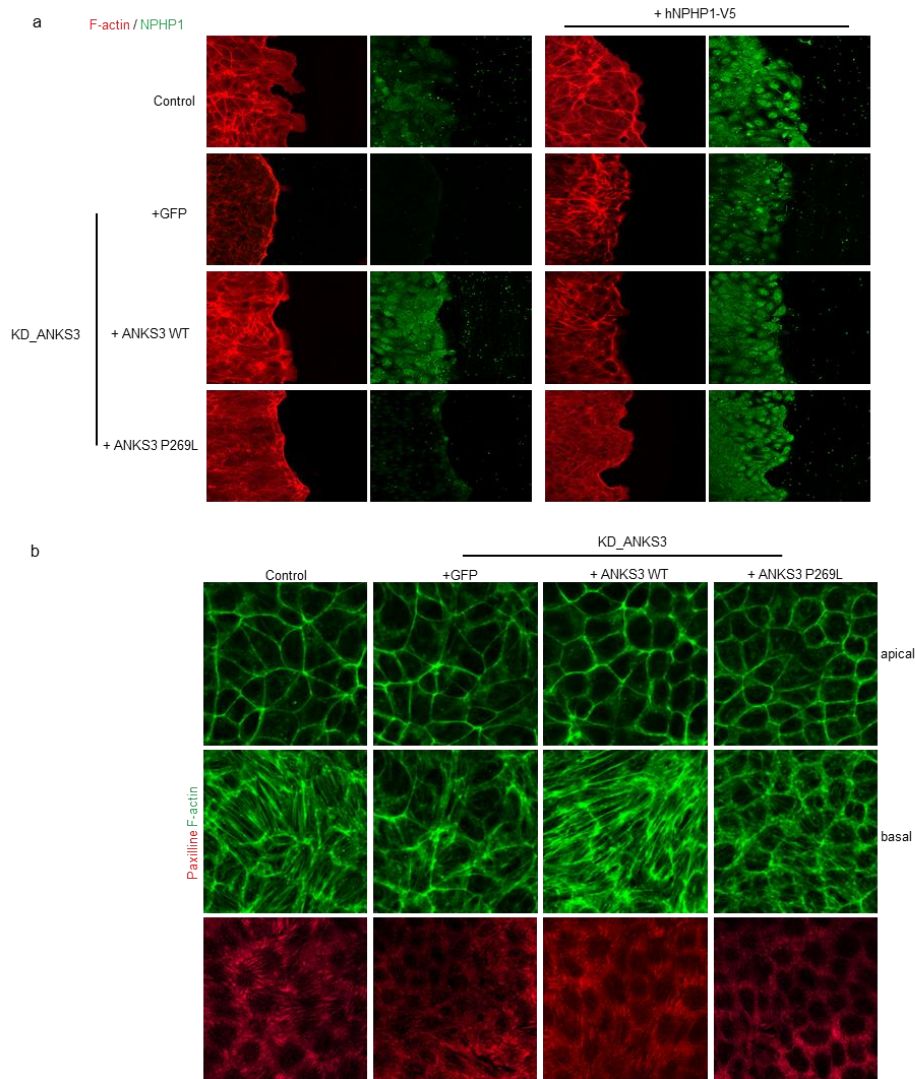


Figure 20: ANKS3 régule l'organisation du cytosquelette d'actine

(a) Le cytosquelette d'actine durant la migration est observé par le marquage à l'aide de Phalloïdine couplée à un fluorochrome rouge et NPHP1 (vert). (b) Le cytosquelette d'actine (vert) est marqué au niveau apical et basal ainsi que la paxilline (rouge).

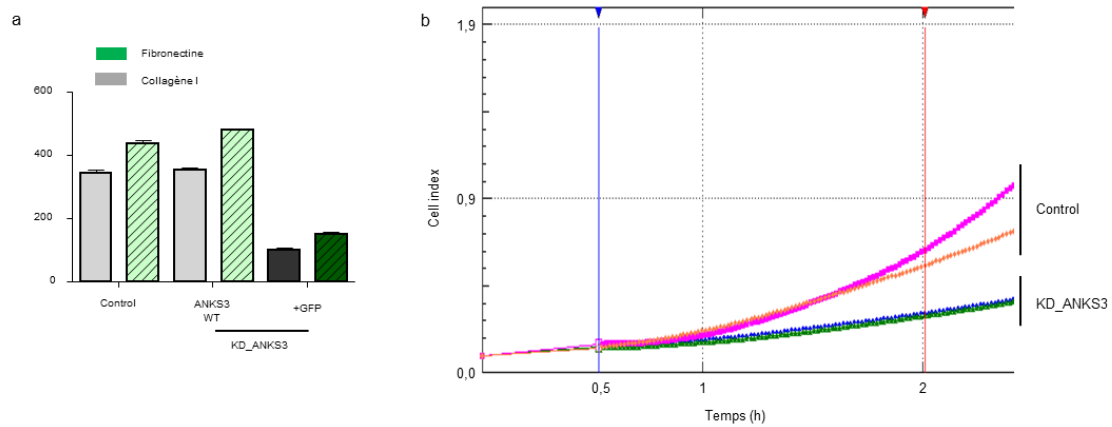


Figure 21: ANKS3 régule l'adhésion cellulaire

(a) La capacité d'adhésion des cellules mIMCD3 déplétées pour ANKS3 ou reexprimant la forme sauvage est quantifiée par le nombre de cellules adhérentes en fonction que le substrat soit le collagène I (gris) ou la fibronectine (vert). **(b)** La capacité d'adhésion des cellules mIMCD3 contrôles ou déplétées pour ANKS3 est mesurée via l'impédance électrique transmise au système XCELLigence

II- ANKS3 et Granules de Stress

Comme démontré précédemment, ANKS3 et BICC1 régulent la stabilité de nombreux transcrits ciliaires via les p-bodies et la machinerie de dégradation l'expression génique. Curieusement, l'analyse protéomique d'ANKS3 a permis d'identifier comme partenaires différents acteurs des GS (42 protéines sur les 324 interactants soit 13%), structures déjà présentées comme fonctionnellement et physiquement liées au p-bodies (Kedersha *et al.*, 2005; Souquere *et al.*, 2009; Wilczynska *et al.*, 2005). Parmi les protéines étudiées précédemment, la protéine BICC1 a été retrouvée au niveau des GS tout comme la protéine AGO2 (Markmiller *et al.*, 2018; Youn *et al.*, 2018).

Le stress thermique induit la formation de granules de stress dans les cellules mIMCD3

Différents types de stress induisent la formation de granules de façon spécifique selon le type cellulaire. La localisation des P-Bodies et la formation des GS ont été regardées dans les IMCD3 par immunofluorescence après induction d'un stress thermique. Contrairement à ce qui a été montré dans des cellules humaines immortalisées Hela (Kedersha *et al.*, 2005), en condition de stress, les p-bodies (DCP1A) sont accumulés autour des GS détectées par marquage G3BP2 (Figure 22a). Cette accumulation n'est pas affectée dans les cellules reexprimant la forme mutée de ANKS3 (Figure 22b). Cependant, le nombre de GS est diminué alors que leur taille augmente (Figure 22c d). Ceci rappelle l'effet de la mutation ANKS3 sur la formation de Bicc1 bodies, avec une diminution des Bicc1 bodies mais l'augmentation de leur taille (cf Résultats Partie1), suggérant un mécanisme d'assemblage lié. Nous avons ensuite démontré, par immunofluorescence, une co-localisation de ANKS3 avec la protéine G3BP2 dans les IMCD3 après 1h de stress thermique à 44°C (Figure 22b). Cette co-localisation n'est pas affectée par la mutation p.P269L (Figure 22b).

Discussion

Nous avons ainsi démontré que le complexe de régulation génique ANKS3/BICC1/AGO2, mis en évidence précédemment, pourrait également réguler l'expression génique en réponse au stress, du fait de l'étroite relation entre GS et p-bodies. De plus, les différences en termes de taille et de nombre de GS induites par la mutation p.P269L d'ANKS3, suggèrent que cette dernière jouerait un rôle dans l'assemblage des GS. Le rein, et par conséquent les cellules rénales étant soumis à un fort stress, notamment dû à l'inflammation lors de l'insuffisance rénale chronique ce résultat est intéressant pour la physiopathologie de la NPH (Nguyen-Khoa *et al.*, 2001).

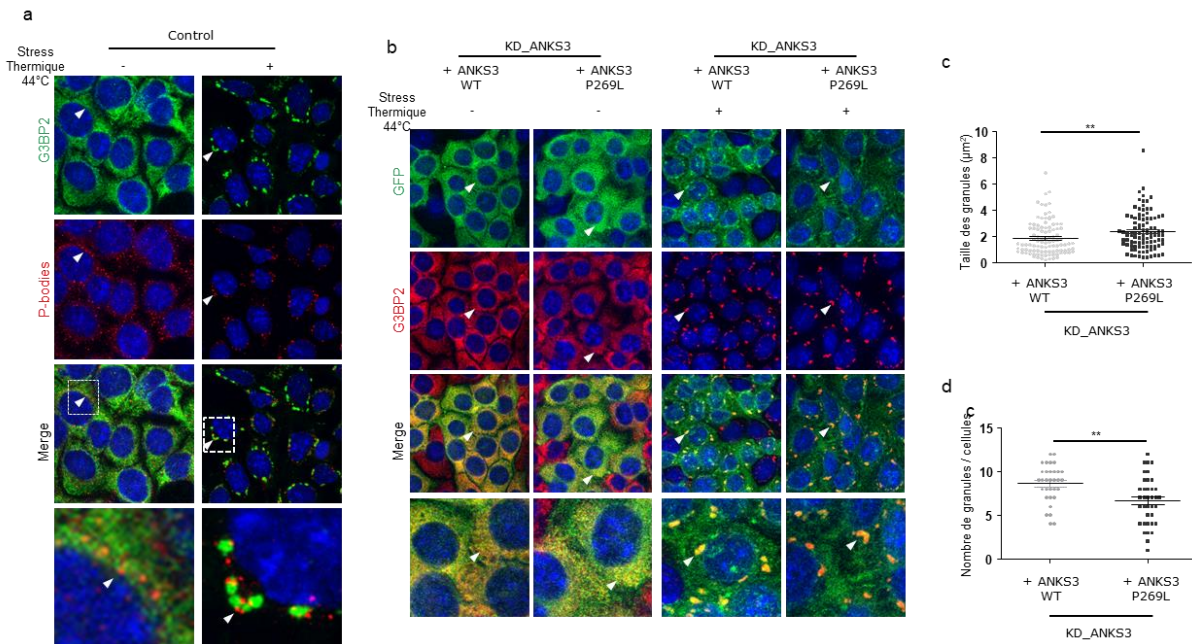


Figure 22: ANKS3 est localisée au stress granules après induction d'un stress thermique

(a) La localisation des GS et des P-bodies est visualisée dans les cellules mIMCD3 avant et après induction d'un stress thermique à 44°C pendant 1h respectivement par le marquage de G3BP2 (vert) et de DCP1A (rouge). (b) La localisation de ANKS3 aux GS est visualisée dans des cellules mIMCD3 KD_ANKS3 reexprimant la forme sauvage ou mutée avant et après induction d'un stress thermique respectivement par le marquage de G3BP2 (rouge) et de la GFP. (c) La distribution et la quantification de la taille (d) des GS est réalisée en utilisant le protocole « spot detector » du logiciel ImageJ (moyenne et déviation standard à partir de 3 expériences indépendantes)

DISCUSSION

La NPH est une néphropathie chronique, de transmission autosomique récessive, et une cause majeure d'insuffisance rénale chez l'enfant et le jeune adulte. Vingt-trois gènes responsables ont été identifiés à ce jour. Les néphrocystines (NPHP) et les IFTs, codées par ces gènes, sont localisées pour la quasi-totalité au niveau du cil primaire. Par séquençage d'exome, nous avons identifié des mutations dans le gène *ANKS3* dans une famille présentant une NPH tardive associée à une fibrose hépatique. La caractérisation fonctionnelle de la protéine ANKS3 a permis de démontrer son implication dans la régulation de la stabilité des ARNm des gènes de ciliopathies ou importants pour la régulation du cil primaire, notamment *NPHP1*, principal gène causal de NPH. Ainsi, nous avons montré qu'*ANKS3* est requis pour la biogenèse du cil, mais également pour l'établissement et le maintien de la polarité apico-basale, la régulation du cytosquelette d'actine et potentiellement les voies de proteostasis nécessaires à l'intégrité de l'épithélium rénal.

Un nouveau mécanisme à l'origine de ciliopathies

La régulation des ARNms est, comme déjà évoqué, un processus très finement régulé (cf [Figure 18: Vie des ARNm](#)). Suivant leur destination, les ARNms peuvent être séquestrés et écartés des ribosomes ou au contraire leur traduction peut être activée en facilitant leur prise en charge par les polysomes. La ciliogenèse est un autre processus finement régulé autant pour son assemblage que pour son désassemblage au cours de la vie cellulaire ([Figure 8: Régulation de la ciliogenèse par le cycle cellulaire](#)). Le cil primaire doit en effet être capable de s'adapter et de répondre à différentes conditions. Ainsi un stress induira une rapide resorption du cil primaire (Prodromou *et al.*, 2012), tandis que le cil sera maintenu pour le contrôle du cycle cellulaire et de l'activité proliférative de la cellule. Il semble alors logique que la fine et rapide adaptation dont doit faire preuve le cil primaire nécessite une réponse de l'expression génique toute aussi fine et rapide. Cette régulation devant s'effectuer à la fois de façon temporelle et spatiale, nous discuterons ces deux aspects dans le cadre du mécanisme faisant intervenir ANKS3.

Le premier mécanisme de régulation des gènes ciliaires est le mécanisme déjà évoqué de la régulation par les facteurs de transcriptions de types RFX et Foxj1. De manière générale, ces facteurs possédant des cibles communes et d'autres spécifiques peuvent collaborer afin de permettre la formation des cils et donc son renouvellement au cours du cycle cellulaire (cf [Figure 8: Régulation de la ciliogenèse par le cycle cellulaire](#)). Cependant, comment ce

mécanisme permet-il une régulation rapide en réponse aux différents signaux environnementaux subis par la cellule ?

Pour une réponse et une adaptation rapide, cette régulation nécessitant la transcription, l'export des ARNs et leur prise en charge par la machinerie de traduction avant l'expression génique finale, ne semble pas le meilleur modèle possible (cf [Figure 15: Régulation de l'expression génique](#)). Ainsi, une régulation traductionnelle au plus proche du cil primaire offrirait une réponse plus rapide aux différentes contraintes environnementales auxquelles la cellule doit faire face. C'est pourquoi l'hypothèse d'une régulation au niveau du centrosome est apparue, validée par la présence de la machinerie traductionnelle au niveau de ce dernier (Barnard *et al.*, 2005; Filippova *et al.*, 2012; Shang *et al.*, 2012). Effectivement, différentes protéines, présentes au centrosome, jouent un rôle dans la traduction. C'est le cas de la protéine GLE1, un régulateur des protéines ATPases à domaine « DEAD-BOX », impliquée dans l'export et la traduction des ARNm (Jao *et al.*, 2017). GLE1 est supposée participer à la traduction de la péricentrine (PCNT), un composant essentiel du centrosome/corps basal puisqu'elle sert de port d'ancrage au complexe de nucléation des microtubules et aux autres protéines centrosomales (Anitha *et al.*, 2008; Huang-Doran *et al.*, 2011; Unal *et al.*, 2014). L'absence de PCNT rend les centrosomes immatures, arrête le cycle cellulaire au niveau du point de contrôle G2/M, mène à des défauts de séparation de chromosome conduisant à l'aneuploïdie et la mort cellulaire (Salemi *et al.*, 2013; Unal *et al.*, 2014). La PCNT doit être ajoutée au centrosome durant les phases G2/M du cycle cellulaire afin d'achever la maturation de celui-ci en corps basal. Cette phase dure en moyenne 15 minutes, temps durant lequel la PCNT doit donc être synthétisée et transportée au centrosome/corps basal. Cependant, la capacité maximale de la machinerie de traduction est de 3,5 acides aminés synthétisés par seconde (pour un ribosome tous les 30 à 40 nucléotides). La PCNT étant une protéine de grande taille (3321 acides aminés), il faut donc 15 min pour traduire l'ARNm en protéine. Il semble donc nécessaire que la PCNT soit synthétisée au plus près du centrosome/corps basal. C'est pour cela que l'ARNm de la PCNT est retrouvé au niveau du centrosome/corps basal, lié aux ribosomes (Jao *et al.*, 2017). La régulation du processus d'expression génique étant primordiale et liée à la machinerie mise en place par la cellule, il n'est pas étonnant qu'une régulation puisse prendre place au niveau du centrosome. Ainsi la protéine OFD1, une protéine associée au centrosome/corps basal, joue un rôle critique dans la formation du cil primaire (Bimonte *et al.*, 2011; Ferrante *et al.*, 2006; Giorgio *et al.*, 2007; Singla *et al.*, 2010). Cette protéine est capable d'interagir avec le PIC et le

facteur d'initiation eIF4F au niveau du centrosome/corps basal afin de réguler la machinerie de traduction. OFD1 y contrôle l'expression spécifique d'ARNm impliqués dans le développement et la fonction du rein. Pour ce faire, OFD1 interagit et contrôle la localisation de BICC1 au centrosome/corps basal. Ainsi, BICC1 et OFD1 agissent de concert en facilitant la liaison d'ARNm cibles à la machinerie de traduction et notamment à eIF4E (Iaconis *et al.*, 2017).

Ainsi, BICC1 apparaît comme pouvant être à la fois un régulateur positif de la traduction protéique, mais aussi comme nous l'avons démontré un régulateur négatif de l'expression génique, potentiellement via son action faisant intervenir les miARNs (Park *et al.*, 2016; Rothé *et al.*, 2015).

Récemment, l'implication de la machinerie miARNs dans la régulation de la différenciation des cellules multiciliées a été mise en évidence (cf [Figure 17: Mécanismes d'action des miARNs et du complexe miRISC](#)) (Cibois *et al.*, 2015; Marcet *et al.*, 2011a, 2011b). Plus encore, l'implication de cette machinerie a été démontrée comme indispensable pour l'assemblage du réseau d'actine apicale, pré-requis à l'ancrage des corps basaux (Chevalier *et al.*, 2015; Mercey *et al.*, 2016). On peut penser que la machinerie traductionnelle présente au centrosome, nécessite une régulation spécifique pour répondre aux contraintes imposées à la régulation des gènes ciliaires. Ainsi, on peut alors poser l'hypothèse qu'à l'image des cellules multiciliées utilisant la machinerie miARNs, le complexe ANKS3/BICC1 nécessite également la machinerie miARN pour exercer son rôle dans la régulation des gènes ciliaires dans les cellules épithéliales polarisées.

Parallèlement, lors de la ciliogenèse et de l'épithélialisation, l'expression du gène *NPHP1* (et des autres NPHP tels que *NPHP4*, *NEK8*, ect...) est positivement régulée et maintenue dans les cellules tubulaires rénales polarisées (Delous *et al.*, 2009, données non publiées). On imagine donc que les transcrits de ces gènes et particulièrement de *NPHP1* nécessitent d'être stabilisés. Ainsi la protéine NPHP1 traduite en plus grande quantité devrait se retrouver liée au complexe ANKS3-BICC1 formant alors le complexe ANKS3-BICC1-NPHP1. Ce complexe inhiberait alors la régulation négative de BICC1 sur la stabilité des transcrits du gène *NPHP1* mise à jour dans cette étude. Ainsi, une boucle de contrôle positif se créerait, les ARNs de *NPHP1* stabilisés permettant la production de NPHP1, qui une fois complexée à BICC1 via ANKS3, inhiberait la dégradation des transcrits du gène *NPHP1* par la protéine BICC1. Ainsi, le mécanisme de régulation post-transcriptionnelle dépendant de ANKS3 et BICC1 que nous avons démontré, impliquerait également les

produits de gènes ciliaires eux-même par leur interaction avec ANKS3 et BICC1. De cette façon, l'expression des gènes ciliaires et des gènes de l'épithélialisation serait augmentée de façon exponentielle lors de la mise en place, du maintien du cil et de la polarité apico-basale.

Enfin, il semble qu'un large panel de gènes soit régulé par ANKS3, 81% des gènes ciliaires étant négativement dérégulés en absence d'ANKS3. Cependant, la régulation de ces gènes n'est probablement pas directe pour la plupart et pourrait être une régulation secondaire à la perte d'expression d'autres gènes régulateurs. En effet, la dérégulation du facteur de transcription ciliaire RFX3, sous l'influence d'ANKS3, induit logiquement la dérégulation de ses gènes cibles. En conséquence, la régulation « directe » de gènes ciliaires par ANKS3 est masquée par la dérégulation indirecte via les facteurs de transcription. Ainsi, la réexpression de l'expression physiologique de RFX3 dans les cellules déplétées pour ANKS3 permettrait de s'affranchir de ce biais, et par conséquence de connaître le spectre précis des gènes directement régulés par ANKS3/BICC1. Ici RFX3 est un exemple, bien d'autres transcrits sont dérégulés en absence d'ANKS3 et pourrait renforcer l'impact du mécanisme que l'on observe, notamment les régulateurs de l'actine, de l'homéostasie protéique (métabolisme, mTOR, autophagie) comme nous l'avons déjà vu.

Afin de définir les ARNs directement régulés par ANKS3 et BICC1, nous avons effectué par RIPSeq l'analyse du transcriptome se liant à ces protéines. Nous avons ainsi mis en évidence l'interaction de 2761 ARNs, dont la majorité (2/3) présentait une expression diminuée en l'absence d'ANKS3. Pour analyser plus encore ce mécanisme et les ARNs directement régulés par le complexe ANKS3/BICC1, des expériences de CLIP-Seq sur les protéines BICC1 et ANKS3 séparément devraient être menées.

Corrélations génotype-phénotype de la mutation p.P269L

L'expression de la forme mutée d'ANKS3, p.P269L, dans les cellules déplétées, ne permet pas de compenser les phénotypes ciliaires (les défauts de la voie HH et la perte d'intégrité du CI) et non ciliaires (perte de polarité apico-basale et défauts de migration cellulaire), démontrant sans aucun doute l'effet pathogène de cette mutation (cf [résultats parties 1 et 2](#)). Toutefois, l'effet de la mutation P269L sur la ciliogenèse est moins sévère que l'extinction du gène (KD_ANKS3), suggérant un effet hypomorphe. Cette variabilité peut s'expliquer par le fait que la protéine mutée n'entraîne pas une perte totale de fonction, et est toujours capable d'interagir partiellement avec certains partenaires protéiques. En effet, les défauts de ciliogenèse induits par la mutation P269L (cils plus longs) sont moins sévères que ceux dus à l'absence d'ANKS3 (cils plus courts) (cf [Figure 23: Effet hypomorphe de la mutation p.P269L](#)). De plus, alors que la protéine PC2 est totalement absente des cils raccourcis des cellules KD-ANKS3, une accumulation de PC2 le long du cil est observée dans les cellules reexprimant la mutation p.P269L. Toutefois, la présence accrue de la protéine PC2 ne veut pas nécessairement dire que la protéine est active, ou bien son accumulation au cil pourrait avoir un effet « gain de fonction » qui pourrait être plus délétère que l'absence de PC2 (Ma et al., 2013).

Par ailleurs, l'analyse du profil d'expression des gènes ciliaires par RNAseq montre une dérégulation moindre des gènes ciliaires (81% par la déplétion vs 59% par la mutation) (cf [résultats partie 1](#)). De façon intéressante, beaucoup de gènes codant des protéines de la TZ, tels que ALMS1, RPGRIP1L, TCNT3, TMEM216, TMEM231, TMEM237, EVC2 ou encore WPCP, sont dérégulés de façon significative dans les cellules ANKS3_KD alors que leur expression n'est pas modifiée dans les cellules reexprimant la mutation p.P269L. Une dérégulation moindre des gènes ciliaires peut expliquer la différence d'effet sur la ciliogenèse entre la version mutée d'ANKS3 et la perte de protéine. Ainsi l'assemblage du cil primaire n'étant pas atteint aussi sévèrement, les cils primaires peuvent présenter une signalisation résiduelle (ex : PC2 est toujours localisée au cil alors qu'elle est absente des cils des cellules KD_ANKS3). En revanche, la longueur accrue des cils observée dans les cellules reexprimant la mutation p.P269L d'ANKS3 ainsi que dans d'autres modèles de néphronophtise (mutations *IFT172*, *IFT54*) pourrait être une conséquence des défauts de polarité apico-basale et de désorganisation du cytosquelette d'actine et de microtubules cytoplasmiques. En effet, la perte de rigidité cellulaire entraînerait une diminution de la force

de tension membranaire qui favoriserait la croissance des microtubules ciliaires (Pitaval *et al.*, 2010).

Cette même analyse transcriptomique confirme la dérégulation de la voie HH déjà présentée (cf [résultat partie 1](#)), mais révèle également une dérégulation d'autres voies possiblement dépendantes du cil telles que les voies WNT, Hippo ou mTOR. Ainsi, une altération de ces voies primordiales pour le développement des organes est connue pour causer des phénotypes de ciliopathies. En effet, les mutations des gènes des différents modules du cil primaire ont été montrées comme influençant la signalisation de la voie HH (cf La voie Hedgehog). Les défauts de la voie WNT canonique, pouvant être secondaires aux défauts de la voie HH (Chang and Serra, 2013), conduisent à des phénotypes de reins kystiques (Lancaster and Gleeson, 2009; Osborn *et al.*, 2014). La voie Hippo a d'ores et déjà été démontrée dérégulée dans de nombreuses ciliopathies rénales kystiques, notamment dans le cas de mutations de *NEK8* (Grampa *et al.*, 2016; Habbig *et al.*, 2011b, 2012; Happé *et al.*, 2011a). Enfin, des altérations de la voie mTOR ont été retrouvées dans les PKD (Ibraghimov-Beskrovnaya and Natoli, 2011; Liu *et al.*, 2018). De manière générale, les mêmes voies de signalisation apparaissent dérégulées dans les cellules déplétées pour ANKS3 que dans les reexprimant la mutation p.P269L. En revanche, certaines voies de signalisation sont dérégulées de façon plus significative dans les cellules invalidées pour ANKS3, alors qu'elles ne varient que peu dans les cellules reexprimant la mutation p.P269L. C'est le cas des voies mTOR (p.value $3,2 \cdot 10^{-2}$), TGF β (p.value $1,9 \cdot 10^{-2}$), TNF (p.value $2,8 \cdot 10^{-2}$) et de la voie du stress HIF-1 (p.value $8,3 \cdot 10^{-2}$). Ceci confirmerait un effet plus modéré de la mutation p.P269L par rapport à une perte totale de fonction de la protéine. On notera en revanche que la voie AMPK est uniquement dérégulée dans les cellules reexprimant la mutation p.P269L (p.value $1,9 \cdot 10^{-2}$), indiquant une régulation spécifique de la mutation P269L par rapport à la déplétion du gène et ainsi un possible effet « gain de fonction ».

Cependant, les phénotypes de ciliopathies associés à une dérégulation dans ces voies de signalisation sont des défauts développementaux très sévères à l'opposé des phénotypes tardifs observés chez les patients porteurs de la mutation p.P269L d'ANKS3. Une seule mutation faux-sens homozygote a été rapportée chez l'homme avant notre étude. L'effet pathogène de la mutation p.H147N, localisée au niveau des domaines ANK de ANKS3, semble plus sévère, causant chez une patient de 4 ans un *situs inversus*, des atteintes cardiaques associées à une hypoplasie du corps calleux et une atrophie diffuse du cerveau. Ce phénotype plus précoce correspondant à des défauts développementaux distinct du

phénotype observé chez les patients porteurs de la mutation p.P269L, pourrait s'expliquer par la localisation de la mutation p.H147N dans le domaine Ankyrine de la protéine, domaine crucial pour son interaction avec les protéines telles que NEK8 (Shamseldin et al., 2016). Ce patient ne présente ni phénotype rénal, ni phénotype hépatique, cependant ceux-ci peuvent apparaître de façon plus tardive, le patient n'étant âgé que de 4 ans.

Les patients rapportés avec des mutations de *NEK8* présentent des phénotypes bien plus sévères que les patients *ANKS3* (Haider *et al.*, 1998; Otto *et al.*, 2003, Grampa *et al.*, 2016). Il existe une hétérogénéité phénotypique associée aux mutations du gène *NEK8*. En effet, nous avons montré que la perte de fonction de *NEK8* entraînait un phénotype ciliaire sévère et une prolifération accrue chez des fœtus avec rein kystiques, *situs inversus* et atteinte hépatique. En revanche, des mutations faux-sens préservent leur interaction avec les composants de la voie Hippo et aboutissent à un phénotype différentiel et une mutation « gain de fonction », alors qu'une autre mutation faux-sens retrouvée dans une NPH infantile n'avait pas d'effet sur cette voie (Grampa *et al.*, 2016) (cf [Annexe](#)). De façon intéressante, la mutation p.P269L d'*ANKS3* conduit à des défauts ciliaires rappelant les défauts ciliaires induit par la mutation p.G488V de *NEK8* identifiée dans la souris jck (Smith *et al.*, 2006), avec une délocalisation de la protéine *NEK8* le long du cil primaire et une augmentation de PC2 au cil (Sohara *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2013). Cette mutation jck altère l'activité kinase de la protéine *NEK8*. Bien que non étudiée, on peut penser que la délocalisation de *NEK8* dans les cils des souris jck puisse affecter l'intégrité du compartiment Inversine. Cependant, la mutation p.G488V ou une mutation affectant la capacité kinase de *NEK8* n'ont jamais été rapportées à ce jour chez un patient. On peut donc penser que cette mutation présente un effet plus modérée qu'une mutation entraînant la perte de fonction totale de la protéine et donc des phénotypes plus proches de ceux des patients *ANKS3*. De façon intéressante, la phosphorylation d'*ANKS6* par *NEK8* a déjà été démontrée (Czarnecki *et al.*, 2015). Cette phosphorylation est requise pour la translocation d'*ANKS6* depuis le cil primaire vers le cytoplasme de la cellule (Nakajima *et al.*, 2018). On peut imaginer que l'hypo-phosphorylation d'*ANKS6* entraîne son accumulation dans le cil primaire et donc la dérégulation du compartiment Inversine. La mutation p.P269L d'*ANKS3* phénocopiant les phénotypes des cellules jck, et cette mutation affectant l'interaction *ANKS3-NEK8* on peut penser qu'elle affecte la capacité de phosphorylation de *NEK8*. Ainsi, *ANKS6* est accumulée dans le cil primaire, désorganisant l'intégrité du compartiment Inversine.

Par ailleurs, par analyse d'exome, nous avons identifié une mutation faux-sens p.T84R homozygote dans le KH domaine de BICC1 (cf [Figure 14: Structure et interactions d'ANKS3, ANKS6 et BICC1](#)). A ce jour, aucune mutation récessive de BICC1 n'a été décrite. De façon intéressante, cette mutation a été identifiée par analyse d'exome dans une famille présentant un phénotype similaire à ANKS3, à savoir une NPH de forme tardive caractérisée par une fibrose interstitielle massive et une fibrose hépatique. Le domaine KH de BICC1 permet sa liaison aux mRNA, mais est également impliqué dans l'interaction de BICC1 avec le complexe ANKS3/ANKS6 (Rothé, 2018). On peut spéculer que l'effet pathogène de la mutation serait dû à la diminution de BICC1 avec ses partenaires, perturbant ainsi la régulation des ARNs. Ainsi, nous avons démontré que cette mutation affectait l'interaction de BICC1 avec ANKS6 (résultat Rebecca Ryan), pouvant déstabiliser le complexe formé par ANKS3/BICC1/ANKS6. Les conséquences de cette déstabilisation pourraient être similaires à une déstabilisation du complexe par la mutation P269L d'ANKS3, provoquant un recrutement anormal de BICC1 au complexe AGO2-Risc.

Enfin, on notera qu'aucune autre mutation biallélique d'ANKS3 ou de BICC1 n'a jamais été publiée et que la recherche de telles mutations au sein de notre cohorte n'a pas été plus fructueuse (>500 patients NPH isolées ou syndromiques dont la cause génétique n'est pas connue). On notera que les seules mutations de BICC1 identifiées chez l'homme sont des variants hétérozygotes entraînant une maladie rénale kystique sévère affectant l'activation de la voie WNT (Kraus et al., 2012). On peut toutefois penser, compte tenu de l'effet de ces deux protéines dans la régulation post-transcriptionnelle, que les mutations homozygotes tronquantes ou perte totale de fonction soient extrêmement délétaires. Bien qu'aucune mutation biallélique additionnelle du gène ANKS3 n'a pu être identifiée, nous avons mis en évidence un grand nombre de variants hétérozygotes de ANKS3 dans la cohorte de ciliopathie rénale. Ces variants, dont certains sont prédits pour être pathogènes (stop, faux-sens, mutations d'épissage) ne sont pas présents ou très rarement dans la population contrôle. Certains sont associés à des mutations bialléliques dans d'autres gènes de ciliopathies. Des études statistiques afin de confirmer un enrichissement de ces variants ANKS3 dans les patients NPH versus des individus contrôles ou des ciliopathies sans atteintes rénales sont en cours. La présence de ces variants hétérozygotes dans la cohorte de ciliopathie rénale et le rôle d'ANKS3 comme régulateur de la stabilité des transcrits des gènes NPHP, suggère qu'en association avec d'autres mutations de gènes ciliaires, ANKS3 pourrait être un gène modificateur dans les ciliopathies.

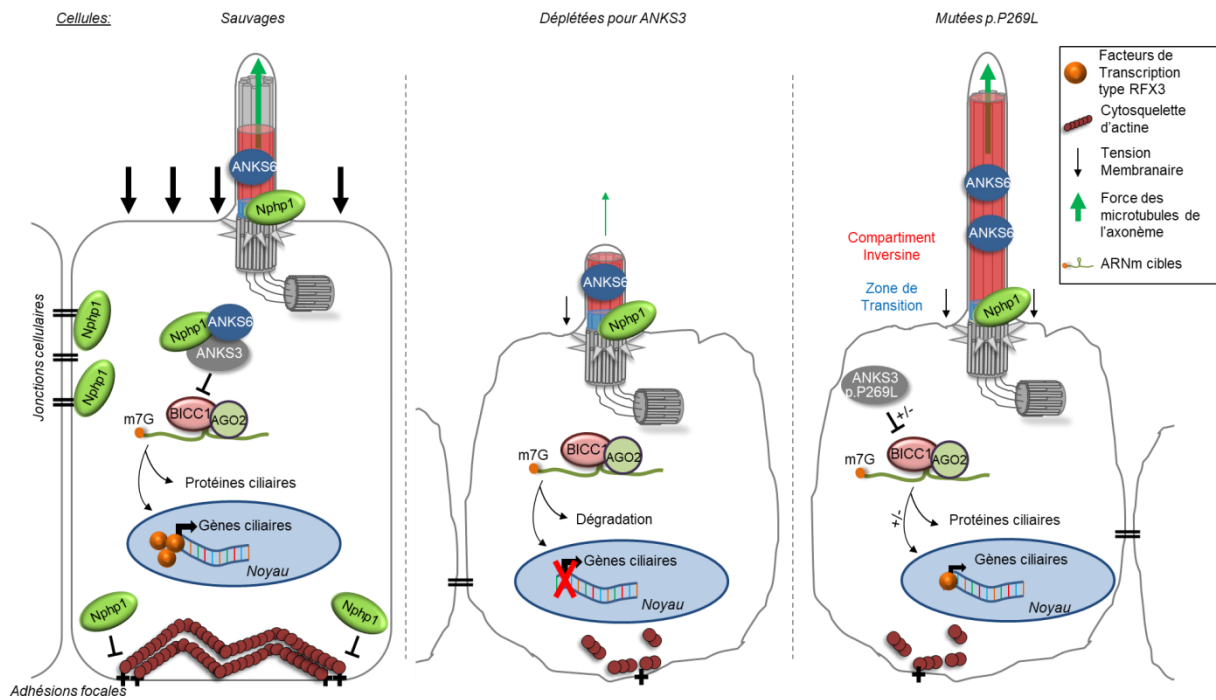


Figure 23: Effet hypomorphe de la mutation p.P269L

Dans les cellules sauvages, ANKS3 contrôle de concert avec BICC1 l'expression de protéines ciliaires ou régulatrices de protéines ciliaires telles que les FT RFX3, RFX2 ou Foxj1 mais aussi régulatrice du cytosquelette. L'absence d'ANKS3 dans les cellules déplétées conduit à la dégradation de la majorité de ces protéines influant négativement sur la ciliogénèse. La mutation p.P269L entraîne un effet plus modéré que la perte d'ANKS3 sur la régulation génique. La force induite par la croissance des microtubules de l'axonème du cil primaire est plus forte que la tension membranaire, plus lâche due aux défauts de cytosquelette, et induit une longueur de cil accrue.

Le stress dans les ciliopathies

L'analyse transcriptomique des cellules déplétées pour ANKS3 ou exprimant la mutation p.P269L a permis de mettre en évidence de nombreuses voies de signalisation altérées. Outre les voies déjà connues pour leur rôle au niveau du cil primaire, la signalisation via le facteur eIF2, en réponse au stress fait partie des voies majoritairement dérégulées (p-value $5.01 \cdot 10^{-19}$). Compte tenu de la forte proportion de gènes de ciliopathies dérégulés (81%) et des indices déjà connus de la littérature faisant état notamment de l'interaction de la protéine ciliaire ANKS6 avec HIF1a (Hoff, et al. 2016), facteur de transcription en réponse à l'hypoxie, nous nous sommes interrogé sur une possible relation entre le cil primaire et la réponse au stress.

Déjà introduit précédemment, les GS et les PBs sont deux entités fonctionnelles étroitement liées. En effet, les PBs autant que les GS sont des structures extrêmement dynamiques leur permettant de répondre à leurs fonctions de régulation génique de façon fine. Des moteurs moléculaires tels que la kinésine et la dynéine, déjà connues comme impliquées dans le transport intraflagellaire, sont nécessaires à la formation et au rapprochement des agrégats (Perez-Pepe et al., 2018; Prevo et al., 2017). Ainsi, la dynéine nécessaire au transport intraflagellaire rétrograde permet la formation des GS quand la kinésine, nécessaire au transport intraflagellaire antérograde permet sa dissociation. De façon intéressante, la dynamique entre cil primaire et GS semble donc opposée. En effet, quand le cil primaire se forme, la kinésine (KIF3B / KIF5B) inhibe la formation des GS et vice versa. De plus, l'accumulation de protéines des GS au niveau du centrosome telles que TNRC6 ou les protéines de la machinerie de traduction, renforce l'hypothèse d'un possible lien entre cil primaire et GS (Iaconis et al., 2017; Moser et al., 2011). Ainsi, en plus du lien fonctionnel, il est intéressant de se demander si les constituants du cil primaire ne sont pas nécessaires à la formation des GS. Ainsi, on peut imaginer l'importance de la déstabilisation des protéines au cil pour former ces GS, donnant naissance à un lien structural entre les deux entités.

Au niveau du rein, un fort stress cellulaire est présent au niveau physiologique notamment dû à la forte osmolarité du milieu environnant. Le fait que le stress cellulaire soit reconnu comme impliqué dans le développement de maladies rénales, indique que la gestion du stress cellulaire est particulièrement importante dans ce tissu. En effet, la voie des MAPK est la voie majoritaire de réponses au stress cellulaire. Les protéines p38 et JNK (c-Jun amino terminal kinase) sont les deux SAPK (stress activated protein kinase) majoritaires. Ces

protéines sont activées par un large spectre de stimuli allant des cytokines pro-inflammatoires à l'hyperglycémie en passant par les ROS et le stress osmotique (Liu *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2007). Le stress peut entraîner à terme différentes réponses dont notamment l'induction de l'apoptose, de la différenciation, de la prolifération, de l'inflammation et de la fibrose (Hui *et al.*, 2007; Tournier *et al.*, 2000; Venuprasad *et al.*, 2006). De façon intéressante, il existe une forte corrélation entre l'insuffisance rénale et le nombre de cellules tubulaires, glomérulaires et interstitielle positives pour l'activation de p38, le nombre de cellules positives reflétant la sévérité des lésions (Sakai *et al.*, 2002, 2005; Stambe *et al.*, 2004). Ceci indique que l'activation de p38 et donc le stress pourrait avoir un rôle important dans la pathogénicité des maladies rénales. En effet, de nombreux inhibiteurs de p38 et JNK ont déjà prouvé leur efficacité dans la diminution de la protéinurie, de l'inflammation, de la fibrose et dans la restauration de la fonction rénale notamment face à la sténose artérielle rénale ou les glomérulonéphrites (Furuichi *et al.*, 2002; Iwata *et al.*, 2003; Sheryanna *et al.*, 2007; Stambe *et al.*, 2003; Wada *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007).

De façon intéressante, quand la formation de GS est reliée à une inhibition de l'apoptose cellulaire en supprimant l'activation de la voie de MAPK répondant au stress, l'activation de p38 entraîne la localisation de différentes protéines aux GS (Arimoto *et al.*, 2008). L'activation de p38 active les protéines kinases Mnk1/2 capables alors de phosphoryler hnRNP1, favorisant sa liaison à l'ARN et leur localisation aux granules de stress (Guil *et al.*, 2006). Encore une fois, l'étude transcriptomique que nous avons menée sur les cellules déplétées pour ANKS3 a mis en évidence une activation anormalement élevée de la voie des MAPK à l'état basal, suggérant une réponse au stress affectée dans ce modèle.

Sous conditions hypoxiques, la voie de l'EGFR induit une phosphorylation d'AGO2 diminuant son affinité pour la liaison à DICER et donc la production de miARNs (Shen *et al.*, 2013). De plus, l'induction de la voie des MAPK et principalement de p38 entraîne la phosphorylation de AGO2 au niveau de la sérine 387, tandis qu'un stress osmotique entraîne son hydroxylation au niveau de la proline 700, induisant dans les deux cas la localisation d'AGO2 au niveau des GS (Qi *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2008). Ces modifications et adaptations tendent à démontrer que l'activation de cascades de réponses au stress induit une translocation d'AGO2 au niveau des GS et donc l'atténuation de la machinerie classique de régulation par les miARNs. Cependant, il a été démontré que la déplétion de l'activité globale des miARNs présente un effet limité du moins d'un point de vue phénotypique chez *C.elegans* (Alvarez-Saavedra and Horvitz, 2010). De façon intéressante, chez les mammifères,

l'absence ciblée de miARNs n'entraînent pas de phénotype drastique en condition normale mais conduisent à une létalité précoce ou à une aggravation des défauts développementaux en conditions de stress (Miska *et al.*, 2007; van Rooij *et al.*, 2007). Il semble donc que la régulation génique classique par les miARNs est réprimée via la translocation d'AGO2 dans les GS où une autre régulation via les miARNs spécifique au stress est alors mise en place.

Principalement étudiée en contexte pathologique, la réponse aux protéines malformées (UPR) résultante d'un stress du réticulum endoplasmique, induit l'activation de la voie des MAPK JNK et p38 (Hung *et al.*, 2004; Li and Holbrook, 2004; Verma and Datta, 2010). Ainsi le stress cellulaire et sa réponse se retrouve au cœur de nombreuses maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires ou encore le diabète (Minamino and Kitakaze, 2010). Hormis ces maladies chroniques, le stress cellulaire est démontré comme prépondérant dans différentes neuropathies et particulièrement dans la neurodégénération. L'exemple type étant la sclérose amyotrophique latérale (ALS) où le stress cellulaire induit la mort des motoneurones (Atkin *et al.*, 2008). En effet, les protéines de réponse au stress du réticulum incluant la protéine Perk, mais aussi la phosphorylation du facteur de traduction eIF2, induite en réponse au stress cellulaire, modulent la progression de la maladie dans différents modèles animaux (Rajesh *et al.*, 2015; Saxena *et al.*, 2009).

Pour résumer, nous savons que ANKS3 joue un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de gènes ciliaires, notamment *NPHP1*, via *BICC1* et des acteurs majeurs de la voie des miARNs tel qu'AGO2 (cf [résultats partie 1](#)). La mutation p.P269L, affecte non seulement ce nouveau mécanisme de régulation mais aussi possiblement la formation des GS (Résultats partie II). De façon intéressante, l'étude transcriptomique que nous avons menée sur les cellules déplétées ou mutées pour ANKS3 a démontré une dérégulation des voies MAPK et p38 à l'état basal. Compte-tenu du fait que les patients mutés pour ANKS3 présentent une forme relativement tardive de la NPH que l'on pourrait assimiler à une néphropathie dégénérative, le rôle d'ANKS3 dans la régulation de la réponse au stress peut se discuter. Effectivement, la NPH est caractérisée par une fibrose massive qui est un phénomène chronique s'installant progressivement. On peut ajouter le fait que les patients mutés pour ANKS3 présentent également une fibrose hépatique. Bien que pas réellement démontré, un lien a déjà été suggéré entre NPH et stress cellulaire via JNK, qui interagit avec MAPKBP1, également impliquée dans des NPH tardives (Koyano *et al.*, 1999; Macia *et al.*, 2017; Wasserman *et al.*, 2010). La localisation de MAPKBP1 au niveau des GS permet de penser que cette régulation serait opérée via ces agrégats (Cohen-Katsenelson *et al.*, 2013).

Enfin, à la vue des gènes dérégulés par l'absence d'ANKS3 et du possible lien que nous évoquions entre les GS/PB et le cil primaire, nous pourrions envisager l'implication des voies de réponse au stress dans de nombreuses ciliopathies.

L'apparition de la fibrose au sein de la NPH est un phénomène complexe

La fibrose rénale est une des principales caractéristiques de la NPH et retrouvée dans de nombreuses formes de NPH tardives (Salomon *et al.*, 2009). La fibrose rénale se caractérise par une synthèse excessive et un défaut de remodelage des collagènes I et III, composants majoritaires de la matrice extracellulaire (ECM). Ces collagènes sont synthétisés par les myofibroblastes, des cellules dérivées des fibroblastes de l'interstitium. Bien qu'il n'y ait pas d'évidence que la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) des cellules tubulaires puissent être à l'origine des myofibroblastes dans les maladies rénales, les cellules tubulaires pourraient favoriser l'établissement de la fibrose rénale en sécrétant des cytokines profibrotiques et pro-inflammatoires qui seraient captées par les cellules présentes dans l'interstitium.

L'ensemble de ces données suggère que même si l'EMT des cellules tubulaires n'est pas directement impliquée, leur dédifférenciation partielle pourrait participer aux mécanismes d'apparition de la fibrose rénale dans la NPH (Meran and Steadman, 2011). Cette dédifférenciation entraînerait une sécrétion anormale de cytokines profibrotiques, activant les cellules mésenchymateuses présentes dans l'interstitium (fibroblastes...). Les NPHP/IFT s'exprimant également au niveau des fibroblastes, ces derniers pourraient envoyer des signaux exacerbant la dédifférenciation des cellules tubulaires. En réponse à ces signaux, les cellules tubulaires et les fibroblastes produiraient en excès des composés de l'ECM ou de la membrane basale (Gabasa *et al.*, 2017; Kendall and Feghali-Bostwick, 2014; Meran and Steadman, 2011)

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de l'apparition de la fibrose rénale interstitielle, ou hépatique, chez les patients mutés pour le gène *ANKS3*. Dans un premier temps, la perte des jonctions serrées et adhérentes conduisant à la perte de polarité apico-basale observées dans les cellules déplétées et réexprimant la mutation p.P269L d'*ANKS3* peut être une explication. La perte de composants des jonctions serrées telles que *MALS3* ou *PALS1* chez la souris entraîne un phénotype similaire à la NPH avec l'apparition de kystes rénaux mais surtout d'une fibrose rénale (Olsen *et al.*, 2007). De plus, l'instabilité engendrée au niveau des jonctions cellulaires entraîne la dissociation de la β et la δ caténine de l'E-cadhérine induisant alors les voies pro-prolifératives de HH et WNT canonique (Pugacheva *et al.*, 2006). De même, la voie du TGF- β induit la phosphorylation de PAR6, un élément des jonctions serrées, qui entraîne la dissociation des jonctions et facilite la transition épithélio-mésenchymateuse (Böttinger, 2007; Ozdamar *et al.*, 2005). Un tel mécanisme reste à

démontrer au sein du tissu rénal des patients atteints de NPH, mais il est d'ores et déjà connu que la protéine NPHP1 est impliquée dans la formation des jonctions serrées et interagit avec les protéines PAR6 et PALS1 (Delous et al., 2009b). La réexpression de la protéine NPHP1 restaure le phénotype de défaut de polarité apico-basal et de migration des cellules déplétées pour ANKS3. De ce fait, on peut penser que les défauts de jonctions serrées observés dans ANKS3, et dus à l'instabilité de NPHP1, pourraient être à l'origine d'une perte de différenciation des cellules tubulaires conduisant aux lésions tubulo-interstitielles observées chez les patients.

Un autre mécanisme pouvant être associée à l'apparition d'une fibrose rénale ou hépatique est l'inflammation. En effet, les analyses transcriptomiques révèlent une augmentation des voies régulant l'inflammation dans les cellules déplétées pour ANKS3 (cf [résultats partie 1](#)). De façon intéressante, un autre partenaire de ANKS3, la kinase NIMA NEK7, a été décrite comme interagissant et régulant l'activation de la protéine NLRP3, membre de l'inflammasome (He et al., 2016). L'inflammasome est un complexe protéique intracellulaire conduisant à l'activation des caspases inflammatoires telles que la caspase-1 et le relargage d'IL-1 β (Martinon et al., 2002). Ainsi l'activation de l'inflammasome via NLRP3 induit des phénomènes inflammatoires tels que l'apparition de la fibrose (Cassel et al., 2008; Gasse et al., 2007, 2009; Wree et al., 2017). NEK7 est nécessaire à l'activation de NLRP3 induisant alors l'activation de la caspase-1 et le relargage d'IL-1 β . Nous avons montré que la mutation p.P269L d'ANKS3 réduit l'interaction avec la protéine NEK7 (cf [résultats partie 1](#)). L'interaction d'ANKS3 étant requise pour la localisation de NEK7 au noyau (Ramachandran et al., 2015), nous pouvons envisager qu'une perturbation de la localisation de NEK7 dans les cellules mutées ou invalidées pour ANKS3, entraînerait une accumulation anormale de NEK7 dans le cytoplasme qui serait alors plus enclin à activer la protéine pro-inflammatoire NLRP3. Une dérégulation de l'inflammation dans les tissus tels que le rein ou le foie pourrait alors favoriser l'apparition de fibrose chez les patients mutés pour ANKS3.

CONCLUSION

En conclusion les résultats obtenus au cours de cette thèse qui a porté sur l'étude fonctionnelle de la protéine ANKS3 et notamment au niveau de la régulation génique ont permis de mettre en évidence de potentiels nouveaux mécanismes physiopathologiques au sein des ciliopathies. La recherche de nouvelles mutations affectant des patients atteints de néphronophtise et plus largement de ciliopathies est indispensable pour en améliorer le diagnostic mais aussi pour comprendre les mécanismes physiopathologiques mis en jeu et donc en déduire des cibles thérapeutiques potentielles.

Les ciliopathies étant un ensemble d'affections dû à des défauts du cil primaire, les chercheurs ont principalement étudié les gènes codant des protéines connues pour leur localisation à minima partiellement ciliaire. Cependant, l'étude de différents processus cellulaires comme l'adhésion, la migration ou encore l'établissement de la polarité apico-basale laisse émerger depuis plusieurs années le rôle extra ciliaire des protéines et notamment des NPHP (Delous *et al.*, 2009). Face à l'étendue des défauts cellulaires et des phénotypes induits par les mutations, il n'a pas été étonnant de retrouver parmi ces gènes de ciliopathies des facteurs de transcriptions (Baas *et al.*, 2006; Bonnafé *et al.*, 2004 ; Didon *et al.*, 2013).

Ce travail nous a permis de démontrer l'importance d'une autre protéine non-ciliaire, ANKS3, dans la régulation post-transcriptionnelle de nombreux gènes ciliaires reconnus pour leur rôle dans les ciliopathies tels que *NPHP1*, *NEK8* ou encore *NPHP3*.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdollah, S., Macías-Silva, M., Tsukazaki, T., Hayashi, H., Attisano, L., and Wrana, J.L. (1997). TbetaRI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *J. Biol. Chem.* 272, 27678–27685.
- Abdul-Majeed, S., and Nauli, S.M. (2011). Dopamine receptor type-5 in the primary cilia has a dual chemo- and mechano-sensory role. *Hypertension* 58, 325–331.
- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16, 3797–3804.
- Abeyta, A., Castella, M., Jacquemont, C., and Taniguchi, T. (2017). NEK8 regulates DNA damage-induced RAD51 foci formation and replication fork protection. *Cell Cycle* 16, 335–347.
- Absalon, S., Blisnick, T., Kohl, L., Toutirais, G., Doré, G., Julkowska, D., Tavenet, A., and Bastin, P. (2008). Intraflagellar transport and functional analysis of genes required for flagellum formation in trypanosomes. *Mol. Biol. Cell* 19, 929–944.
- Adler, P.N. (2002). Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Dev. Cell* 2, 525–535.
- 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.
- Afzelius, B.A. (1976). A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* 193, 317–319.
- Aguilera, A., Rivera, M., Gallego, N., Nogueira, J., and Ortuno, J. (1997). Sonographic appearance of the juvenile nephronophthisis-cystic renal medulla complex. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 12, 625–626.
- Airik, R., Schueler, M., Airik, M., Cho, J., Ulanowicz, K.A., Porath, J.D., Hurd, T.W., Bekker-Jensen, S., Schrøder, J.M., Andersen, J.S., et al. (2016). SDCCAG8 Interacts with RAB Effector Proteins RABEP2 and ERC1 and Is Required for Hedgehog Signaling. *PLoS ONE* 11.
- Ait-Lounis, A., Baas, D., Barras, E., Benadiba, C., Charollais, A., Nlend Nlend, R., Liègeois, D., Meda, P., Durand, B., and Reith, W. (2007). Novel function of the ciliogenic transcription factor RFX3 in development of the endocrine pancreas. *Diabetes* 56, 950–959.
- Aizer, A., Brody, Y., Ler, L.W., Sonenberg, N., Singer, R.H., and Shav-Tal, Y. (2008). The dynamics of mammalian P body transport, assembly, and disassembly in vivo. *Mol. Biol. Cell* 19, 4154–4166.
- Alvarez-Saavedra, E., and Horvitz, H.R. (2010). Many families of *Caenorhabditis elegans* microRNAs are not essential for development or viability. *Curr. Biol. CB* 20, 367–373.
- Ameres, S.L., and Zamore, P.D. (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 475–488.
- Anders, R.A., Arline, S.L., Doré, J.J., and Leof, E.B. (1997). Distinct endocytic responses of heteromeric and homomeric transforming growth factor beta receptors. *Mol. Biol. Cell* 8, 2133–2143.
- Anders, R.A., Doré, J.J., Arline, S.L., Garamszegi, N., and Leof, E.B. (1998). Differential requirement for type I and type II transforming growth factor beta receptor kinase activity in ligand-mediated receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.* 273, 23118–23125.

Anderson, J.S., and Parker, R.P. (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* 17, 1497–1506.

Anderson, P., and Kedersha, N. (2006). RNA granules. *J. Cell Biol.* 172, 803–808.

Andrei, M.A., Ingelfinger, D., Heintzmann, R., Achsel, T., Rivera-Pomar, R., and Lührmann, R. (2005). A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA N. Y.* N 11, 717–727.

Anitha, A., Nakamura, K., Yamada, K., Iwayama, Y., Toyota, T., Takei, N., Iwata, Y., Suzuki, K., Sekine, Y., Matsuzaki, H., et al. (2008). Gene and expression analyses reveal enhanced expression of pericentrin 2 (PCNT2) in bipolar disorder. *Biol. Psychiatry* 63, 678–685.

Ansley, S.J., Badano, J.L., Blacque, O.E., Hill, J., Hoskins, B.E., Leitch, C.C., Kim, J.C., Ross, A.J., Eichers, E.R., Teslovich, T.M., et al. (2003). Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 425, 628–633.

Arimoto, K., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S., Saito, H., and Takekawa, M. (2008). Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nat. Cell Biol.* 10, 1324–1332.

Armour, E.A., Carson, R.P., and Ess, K.C. (2012). Cystogenesis and elongated primary cilia in Tsc1-deficient distal convoluted tubules. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 303, F584–592.

Arribas-Layton, M., Wu, D., Lykke-Andersen, J., and Song, H. (2013). Structural and functional control of the eukaryotic mRNA decapping machinery. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 580–589.

Arts, H.H., Doherty, D., van Beersum, S.E.C., Parisi, M.A., Letteboer, S.J.F., Gorden, N.T., Peters, T.A., Märker, T., Voesenek, K., Kartono, A., et al. (2007). Mutations in the gene encoding the basal body protein RPGRIP1L, a nephrocystin-4 interactor, cause Joubert syndrome. *Nat. Genet.* 39, 882–888.

Arts, H.H., Bongers, E.M.H.F., Mans, D.A., van Beersum, S.E.C., Oud, M.M., Bolat, E., Spruijt, L., Cornelissen, E.A.M., Schuurs-Hoeijmakers, J.H.M., de Leeuw, N., et al. (2011). C14ORF179 encoding IFT43 is mutated in Sensenbrenner syndrome. *J. Med. Genet.* 48, 390–395.

Asante, D., Stevenson, N.L., and Stephens, D.J. (2014). Subunit composition of the human cytoplasmic dynein-2 complex. *J. Cell Sci.* 127, 4774–4787.

Atkin, J.D., Farg, M.A., Walker, A.K., McLean, C., Tomas, D., and Horne, M.K. (2008). Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 30, 400–407.

Attanasio, M., Uhlenhaut, N.H., Sousa, V.H., O'Toole, J.F., Otto, E., Anlag, K., Klugmann, C., Treier, A.-C., Helou, J., Sayer, J.A., et al. (2007). Loss of GLIS2 causes nephronophthisis in humans and mice by increased apoptosis and fibrosis. *Nat. Genet.* 39, 1018–1024.

Austin-Tse, C., Halbritter, J., Zariwala, M.A., Gilberti, R.M., Gee, H.Y., Hellman, N., Pathak, N., Liu, Y., Panizzi, J.R., Patel-King, R.S., et al. (2013). Zebrafish Ciliopathy Screen Plus Human Mutational Analysis Identifies C21orf59 and CCDC65 Defects as Causing Primary Ciliary Dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* 93, 672–686.

Awata, J., Takada, S., Standley, C., Lechtreck, 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.

Axelrod, J.D. (2001). Unipolar membrane association of Dishevelled mediates Frizzled planar cell polarity signaling. *Genes Dev.* **15**, 1182–1187.

Aza-Blanc, P., Ramírez-Weber, F.A., Laget, M.P., Schwartz, C., and Kornberg, T.B. (1997). Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* **89**, 1043–1053.

Baala, L., Audollent, S., Martinovic, J., Ozilou, C., Babron, M.-C., Sivanandamoorthy, S., Saunier, S., Salomon, R., Gonzales, M., Rattenberry, E., et al. (2007a). Pleiotropic effects of CEP290 (NPHP6) mutations extend to Meckel syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 170–179.

Baala, L., Romano, S., Khaddour, R., Saunier, S., Smith, U.M., Audollent, S., Ozilou, C., Faivre, L., Laurent, N., Foliguet, B., et al. (2007b). The Meckel-Gruber syndrome gene, MKS3, is mutated in Joubert syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **80**, 186–194.

Baas, D., Meiniel, A., Benadiba, C., Bonnafe, E., Meiniel, O., Reith, W., and Durand, B. (2006). A deficiency in RFX3 causes hydrocephalus associated with abnormal differentiation of ependymal cells. *Eur. J. Neurosci.* **24**, 1020–1030.

Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P., and Bartel, D.P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **455**, 64–71.

Baek, S., Cho, K.J., Ju, H.-L., Moon, H., Choi, S.H., Chung, S.I., Park, J.Y., Choi, K.H., Kim, D.Y., Ahn, S.H., et al. (2015). Analysis of miRNA expression patterns in human and mouse hepatocellular carcinoma cells. *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* **45**, 1331–1340.

Bakey, Z., Bihoreau, M.-T., Piedagnel, R., Delestré, L., Arnould, C., de Villiers, A. d’Hotman, Devuyt, O., Hoffmann, S., Ronco, P., Gauguier, D., et al. (2015). The SAM domain of ANKS6 has different interacting partners and mutations can induce different cystic phenotypes. *Kidney Int.* **88**, 299–310.

Balaskas, N., Ribeiro, A., Panovska, J., Dessaud, E., Sasai, N., Page, K.M., Briscoe, J., and Ribes, V. (2012). Gene regulatory logic for reading the Sonic Hedgehog signaling gradient in the vertebrate neural tube. *Cell* **148**, 273–284.

Bangs, F., Antonio, N., Thongnuek, P., Welten, M., Davey, M.G., Briscoe, J., and Tickle, C. (2011). Generation of mice with functional inactivation of talpid3, a gene first identified in chicken. *Dev. Camb. Engl.* **138**, 3261–3272.

Barakat, A.J., Arianas, P., Glick, A.D., and Butler, M.G. (1990). Focal sclerosing glomerulonephritis in a child with Laurence-Moon-Biedl syndrome. *Child Nephrol. Urol.* **10**, 109–111.

Barnard, D.C., Cao, Q., and Richter, J.D. (2005). Differential phosphorylation controls Maskin association with eukaryotic translation initiation factor 4E and localization on the mitotic apparatus. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7605–7615.

BARNES, B.G. (1961). Ciliated secretory cells in the pars distalis of the mouse hypophysis. *J. Ultrastruct. Res.* **5**, 453–467.

Baron, M.K., Boeckers, T.M., Vaida, B., Faham, S., Gingery, M., Sawaya, M.R., Salyer, D., Gundelfinger, E.D., and Bowie, J.U. (2006). An architectural framework that may lie at the core of the postsynaptic density. *Science* 311, 531–535.

Barr, M.M., and Sternberg, P.W. (1999). A polycystic kidney-disease gene homologue required for male mating behaviour in *C. elegans*. *Nature* 401, 386–389.

Barr, M.M., DeModena, J., Braun, D., Nguyen, C.Q., Hall, D.H., and Sternberg, P.W. (2001). The *Caenorhabditis elegans* autosomal dominant polycystic kidney disease gene homologs *lov-1* and *pkd-2* act in the same pathway. *Curr. Biol. CB* 11, 1341–1346.

Bartek, J., and Lukas, J. (2003). DNA repair: Damage alert. *Nature* 421, 486–488.

Barzi, M., Berenguer, J., Menendez, A., Alvarez-Rodriguez, R., and Pons, S. (2010). Sonic-hedgehog-mediated proliferation requires the localization of PKA to the cilium base. *J. Cell Sci.* 123, 62–69.

Bataille, S., Demoulin, N., Devuyt, O., Audrézet, M.-P., Dahan, K., Godin, M., Fontès, M., Pirson, Y., and Burtey, S. (2011). Association of PKD2 (polycystin 2) mutations with left-right laterality defects. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 58, 456–460.

Bawankar, P., Loh, B., Wohlbold, L., Schmidt, S., and Izaurralde, E. (2013). NOT10 and C2orf29/NOT11 form a conserved module of the CCR4-NOT complex that docks onto the NOT1 N-terminal domain. *RNA Biol.* 10, 228–244.

Bazzi, H., and Anderson, K.V. (2014). Acentriolar mitosis activates a p53-dependent apoptosis pathway in the mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E1491-1500.

Bazzini, A.A., Lee, M.T., and Giraldez, A.J. (2012). Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science* 336, 233–237.

Beales, P.L., Elcioglu, N., Woolf, A.S., Parker, D., and Flinter, F.A. (1999). New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J. Med. Genet.* 36, 437–446.

Beales, P.L., Bland, E., Tobin, J.L., Bacchelli, C., Tuysuz, B., Hill, J., Rix, S., Pearson, C.G., Kai, M., Hartley, J., et al. (2007). IFT80, which encodes a conserved intraflagellar transport protein, is mutated in Jeune asphyxiating thoracic dystrophy. *Nat. Genet.* 39, 727–729.

Beals, R.K., and Weleber, R.G. (2007). Conorenal dysplasia: a syndrome of cone-shaped epiphysis, renal disease in childhood, retinitis pigmentosa and abnormality of the proximal femur. *Am. J. Med. Genet. A.* 143A, 2444–2447.

Beckers, A., Alten, L., Viebahn, C., Andre, P., and Gossler, A. (2007). The mouse homeobox gene *Noto* regulates node morphogenesis, notochordal ciliogenesis, and left right patterning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 15765–15770.

Beelman, C.A., Stevens, A., Caponigro, G., LaGrande, T.E., Hatfield, L., Fortner, D.M., and Parker, R. (1996). An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. *Nature* 382, 642–646.

Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., and Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* 20, 1885–1898.

Behrens, J., Jerchow, B.A., Würtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kühl, M., Wedlich, D., and Birchmeier, W. (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 280, 596–599.

Benmerah, A. (2014). [The ciliary pocket: a rendezvous between the centrosome and vesicular trafficking]. *Médecine Sci. MS* 30, 962–967.

Benzing, T., Gerke, P., Höpker, K., Hildebrandt, F., Kim, E., and Walz, G. (2001). Nephrocystin interacts with Pyk2, p130(Cas), and tensin and triggers phosphorylation of Pyk2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9784–9789.

Berbari, N.F., O'Connor, A.K., Haycraft, C.J., and Yoder, B.K. (2009). The primary cilium as a complex signaling center. *Curr. Biol. CB* 19, R526–535.

Bergmann, C. (2015). ARPKD and early manifestations of ADPKD: the original polycystic kidney disease and phenocopies. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 30, 15–30.

Bergmann, C., Fliegauf, M., Brüchle, N.O., Frank, V., Olbrich, H., Kirschner, J., Schermer, B., Schmedding, I., Kispert, A., Kränzlin, B., et al. (2008). Loss of nephrocystin-3 function can cause embryonic lethality, Meckel-Gruber-like syndrome, situs inversus, and renal-hepatic-pancreatic dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 959–970.

Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V., and Hannon, G.J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nat. Genet.* 35, 215–217.

Besharse, J.C., and Hollyfield, J.G. (1979). Turnover of mouse photoreceptor outer segments in constant light and darkness. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 18, 1019–1024.

Besharse, J.C., Hollyfield, J.G., and Rayborn, M.E. (1977). Turnover of rod photoreceptor outer segments. II. Membrane addition and loss in relationship to light. *J. Cell Biol.* 75, 507–527.

Besschetnova, T.Y., Kolpakova-Hart, E., Guan, Y., Zhou, J., Olsen, B.R., and Shah, J.V. (2010). Identification of signaling pathways regulating primary cilium length and flow-mediated adaptation. *Curr. Biol. CB* 20, 182–187.

Bettencourt-Dias, M., and Glover, D.M. (2007). Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 451–463.

Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., and Filipowicz, W. (2006). Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 71, 513–521.

Bhunja, A., Domadia, P.N., Mohanram, H., and Bhattacharjya, S. (2009). NMR structural studies of the Ste11 SAM domain in the dodecyl phosphocholine micelle. *Proteins* 74, 328–343.

Bimonte, S., De Angelis, A., Quagliata, L., Giusti, F., Tammara, R., Dallai, R., Ascenzi, M.-G., Diez-Roux, G., and Franco, B. (2011). *Odf1* is required in limb bud patterning and endochondral bone development. *Dev. Biol.* 349, 179–191.

Bishop, G.A., Berbari, N.F., Lewis, J., and Mykityn, K. (2007). Type III adenylyl cyclase localizes to primary cilia throughout the adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 505, 562–571.

- Bizet, A.A., Becker-Heck, A., Ryan, R., Weber, K., Filhol, E., Krug, P., Halbritter, J., Delous, M., Lasbennes, M.-C., Linghu, B., et al. (2015). Mutations in TRAF3IP1/IFT54 reveal a new role for IFT proteins in microtubule stabilization. *Nat. Commun.* 6.
- Blacque, O.E., Reardon, M.J., Li, C., McCarthy, J., Mahjoub, M.R., Ansley, S.J., Badano, J.L., Mah, A.K., Beales, P.L., Davidson, W.S., et al. (2004). Loss of *C. elegans* BBS-7 and BBS-8 protein function results in cilia defects and compromised intraflagellar transport. *Genes Dev.* 18, 1630–1642.
- Blanchon, S., Legendre, M., Copin, B., Duquesnoy, P., Montantin, G., Kott, E., Dastot, F., Jeanson, L., Cachanado, M., Rousseau, A., et al. (2012). Delineation of CCDC39/CCDC40 mutation spectrum and associated phenotypes in primary ciliary dyskinesia. *J. Med. Genet.* 49, 410–416.
- Blatt, E.N., Yan, X.H., Wuerrfel, M.K., Hamilos, D.L., and Brody, S.L. (1999). Forkhead transcription factor HFH-4 expression is temporally related to ciliogenesis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21, 168–176.
- Blowey, D.L., Querfeld, U., Geary, D., Warady, B.A., and Alon, U. (1996). Ultrasound findings in juvenile nephronophthisis. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 10, 22–24.
- Boehlke, C., Kotsis, F., Patel, V., Braeg, S., Voelker, H., Bredt, S., Beyer, T., Janusch, H., Hamann, C., Gödel, M., et al. (2010). Primary cilia regulate mTORC1 activity and cell size through Lkb1. *Nat. Cell Biol.* 12, 1115–1122.
- Boehm, U., Bouloux, P.-M., Dattani, M.T., de Roux, N., Dodé, C., Dunkel, L., Dwyer, A.A., Giacobini, P., Hardelin, J.-P., Juul, A., et al. (2015). Expert consensus document: European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism--pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 547–564.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., and Benning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J.* 17, 170–180.
- Boichis, H., Passwell, J., David, R., and Miller, H. (1973). Congenital hepatic fibrosis and nephronophthisis. A family study. *Q. J. Med.* 42, 221–233.
- Bollée, G., Fakhouri, F., Karras, A., Noël, L.-H., Salomon, R., Servais, A., Lesavre, P., Morinière, V., Antignac, C., and Hummel, A. (2006). Nephronophthisis related to homozygous NPHP1 gene deletion as a cause of chronic renal failure in adults. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21, 2660–2663.
- Bonnafe, E., Touka, M., AitLounis, A., Baas, D., Barras, E., Ucla, C., Moreau, A., Flamant, F., Dubruille, R., Couble, P., et al. (2004). The transcription factor RFX3 directs nodal cilium development and left-right asymmetry specification. *Mol. Cell. Biol.* 24, 4417–4427.
- Boon, M., Jorissen, M., Proesmans, M., and De Boeck, K. (2013). Primary ciliary dyskinesia, an orphan disease. *Eur. J. Pediatr.* 172, 151–162.
- Böttinger, E.P. (2007). TGF-beta in renal injury and disease. *Semin. Nephrol.* 27, 309–320.
- Botzenhart, E.M., Bartalini, G., Blair, E., Brady, A.F., Elmslie, F., Chong, K.L., Christy, K., Torres-Martinez, W., Danesino, C., Deardorff, M.A., et al. (2007). Townes-Brocks syndrome: twenty novel SALL1 mutations in sporadic and familial cases and refinement of the SALL1 hot spot region. *Hum. Mutat.* 28, 204–205.

Bozal-Basterra, L., Martín-Ruíz, I., Pirone, L., Liang, Y., Sigurðsson, J.O., Gonzalez-Santamarta, M., Giordano, I., Gabicagogeascoa, E., de Luca, A., Rodríguez, J.A., et al. (2018). Truncated SALL1 Impedes Primary Cilia Function in Townes-Brocks Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **102**, 249–265.

Braun, J.E., Huntzinger, E., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2011). GW182 Proteins Directly Recruit Cytoplasmic Deadenylation Complexes to miRNA Targets. *Mol. Cell* **44**, 120–133.

Braun, J.E., Truffault, V., Boland, A., Huntzinger, E., Chang, C.-T., Haas, G., Weichenrieder, O., Coles, M., and Izaurralde, E. (2012a). A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1324.

Braun, J.E., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2012b). A Molecular Link between miRISCs and Deadenylation Provides New Insight into the Mechanism of Gene Silencing by MicroRNAs. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**.

Brazelton, W.J., Amundsen, C.D., Silflow, C.D., and Lefebvre, P.A. (2001). The bld1 mutation identifies the Chlamydomonas osm-6 homolog as a gene required for flagellar assembly. *Curr. Biol. CB* **11**, 1591–1594.

Bredrup, C., Saunier, S., Oud, M.M., Fiskerstrand, T., Hoischen, A., Brackman, D., Leh, S.M., Midtbø, M., Filhol, E., Bole-Feyssot, C., et al. (2011). Ciliopathies with skeletal anomalies and renal insufficiency due to mutations in the IFT-A gene WDR19. *Am. J. Hum. Genet.* **89**, 634–643.

Bregues, M., Teixeira, D., and Parker, R. (2005). Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* **310**, 486–489.

Breslow, D.K., Koslover, E.F., Seydel, F., Spakowitz, A.J., and Nachury, M.V. (2013). An in vitro assay for entry into cilia reveals unique properties of the soluble diffusion barrier. *J Cell Biol* **203**, 129–147.

Brody, S.L., Yan, X.H., Wuerffel, M.K., Song, S.K., and Shapiro, S.D. (2000). Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **23**, 45–51.

Bruel, A.-L., Franco, B., Duffourd, Y., Thevenon, J., Jegou, L., Lopez, E., Deleuze, J.-F., Doummar, D., Giles, R.H., Johnson, C.A., et al. (2017). 15 years of research on Oral-Facial-Digital syndromes: from 1 to 16 causal genes. *J. Med. Genet.* **54**, 371–380.

Buchan, J.R., and Parker, R. (2009). Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol. Cell* **36**, 932–941.

Bukanov, N.O., Smith, L.A., Klinger, K.W., Ledbetter, S.R., and Ibraghimov-Beskrovnaya, O. (2006). Long-lasting arrest of murine polycystic kidney disease with CDK inhibitor roscovitine. *Nature* **444**, 949–952.

Burcklé, C., Gaudé, H.-M., Vesque, C., Silbermann, F., Salomon, R., Jeanpierre, C., Antignac, C., Saunier, S., and Schneider-Maunoury, S. (2011). Control of the Wnt pathways by nephrocystin-4 is required for morphogenesis of the zebrafish pronephros. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 2611–2627.

Burghoorn, J., Piasecki, B.P., Crona, F., Phirke, P., Jeppsson, K.E., and Swoboda, P. (2012). The in vivo dissection of direct RFX-target gene promoters in *C. elegans* reveals a novel cis-regulatory element, the C-box. *Dev. Biol.* **368**, 415–426.

Burke, R., and Basler, K. (1997). Hedgehog signaling in *Drosophila* eye and limb development - conserved machinery, divergent roles? *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 55–61.

- Büscher, R., Büscher, A.K., Weber, S., Mohr, J., Hegen, B., Vester, U., and Hoyer, P.F. (2014). Clinical manifestations of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD): kidney-related and non-kidney-related phenotypes. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* **29**, 1915–1925.
- Butler, J.S. (2002). The yin and yang of the exosome. *Trends Cell Biol.* **12**, 90–96.
- Calvert, P.D., Schiesser, W.E., and Pugh, E.N. (2010). Diffusion of a soluble protein, photoactivatable GFP, through a sensory cilium. *J. Gen. Physiol.* **135**, 173–196.
- Campbell, E.P., Quigley, I.K., and Kintner, C. (2016). Foxn4 promotes gene expression required for the formation of multiple motile cilia. *Development* **143**, 4654–4664.
- Cano, D.A., Murcia, N.S., Pazour, G.J., and Hebrok, M. (2004). Orpk mouse model of polycystic kidney disease reveals essential role of primary cilia in pancreatic tissue organization. *Dev. Camb. Engl.* **131**, 3457–3467.
- Cantani, A., Bamonte, G., Ceccoli, D., Biribicchi, G., and Farinella, F. (1986). Familial juvenile nephronophthisis. A review and differential diagnosis. *Clin. Pediatr. (Phila.)* **25**, 90–95.
- Cantù, C., Valenta, T., Hausmann, G., Vilain, N., Aguet, M., and Basler, K. (2013). The Pygo2-H3K4me2/3 interaction is dispensable for mouse development and Wnt signaling-dependent transcription. *Dev. Camb. Engl.* **140**, 2377–2386.
- Cantù, C., Zimmerli, D., Hausmann, G., Valenta, T., Moor, A., Aguet, M., and Basler, K. (2014). Pax6-dependent, but β -catenin-independent, function of Bcl9 proteins in mouse lens development. *Genes Dev.* **28**, 1879–1884.
- Cantù, C., Pagella, P., Shajiei, T.D., Zimmerli, D., Valenta, T., Hausmann, G., Basler, K., and Mitsiadis, T.A. (2017). A cytoplasmic role of Wnt/ β -catenin transcriptional cofactors Bcl9, Bcl9l, and Pygopus in tooth enamel formation. *Sci. Signal.* **10**.
- Cao, J., Shen, Y., Zhu, L., Xu, Y., Zhou, Y., Wu, Z., Li, Y., Yan, X., and Zhu, X. (2012). miR-129-3p controls cilia assembly by regulating CP110 and actin dynamics. *Nat. Cell Biol.* **14**, 697–706.
- Cassel, S.L., Eisenbarth, S.C., Iyer, S.S., Sadler, J.J., Colegio, O.R., Tephly, L.A., Carter, A.B., Rothman, P.B., Flavell, R.A., and Sutterwala, F.S. (2008). The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 9035–9040.
- Castori, M., Valente, E.M., Donati, M.A., Salvi, S., Fazzi, E., Procopio, E., Galluccio, T., Emma, F., Dallapiccola, B., Bertini, E., et al. (2005). NPHP1 gene deletion is a rare cause of Joubert syndrome related disorders. *J. Med. Genet.* **42**, e9.
- de Celis, J.F., and Barrio, R. (2009). Regulation and function of Spalt proteins during animal development. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 1385–1398.
- 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, C.-F., and Serra, R. (2013). Ift88 regulates Hedgehog signaling, Sfrp5 expression, and β -catenin activity in post-natal growth plate. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **31**, 350–356.

- 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.
- Chekulaeva, M., Mathys, H., Zipprich, J.T., Attig, J., Colic, M., Parker, R., and Filipowicz, W. (2011). miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4–NOT through conserved W-containing motifs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18.
- Chen, C.Y., Gherzi, R., Ong, S.E., Chan, E.L., Raijmakers, R., Pruijn, G.J., Stoecklin, G., Moroni, C., Mann, M., and Karin, M. (2001). AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, 451–464.
- Chen, C.-Y.A., Zheng, D., Xia, Z., and Shyu, A.-B. (2009). Ago-TNRC6 complex triggers microRNA-mediated mRNA decay by promoting biphasic deadenylation followed by decapping. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 1160–1166.
- Chen, Y., Boland, A., Kuzuoğlu-Öztürk, D., Bawankar, P., Loh, B., Chang, C.-T., Weichenrieder, O., and Izaurralde, E. (2014). A DDX6-CNOT1 complex and W-binding pockets in CNOT9 reveal direct links between miRNA target recognition and silencing. *Mol. Cell* 54, 737–750.
- Cheng, I.K.C., Tsang, B.C.K., Lai, K.P., Ching, A.K.K., Chan, A.W.H., To, K.-F., Lai, P.B.S., and Wong, N. (2012). GEF-H1 over-expression in hepatocellular carcinoma promotes cell motility via activation of RhoA signalling. *J. Pathol.* 228, 575–585.
- Chevalier, B., Adamiok, A., Mercey, O., Revinski, D.R., Zaragosi, L.-E., Pasini, A., Kodjabachian, L., Barbry, P., and Marcet, B. (2015). miR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways. *Nat. Commun.* 6, 8386.
- Chien, Y.-H., Srinivasan, S., Keller, R., and Kintner, C. (2018). Mechanical Strain Determines Cilia Length, Motility, and Planar Position in the Left-Right Organizer. *Dev. Cell* 45, 316–330.e4.
- Chih, B., Liu, P., Chinn, Y., Chalouni, C., Komuves, L.G., Hass, P.E., Sandoval, W., and Peterson, A.S. (2012). A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain. *Nat. Cell Biol.* 14, 61–72.
- Choi, H.J.C., Lin, J.-R., Vannier, J.-B., Slaats, G.G., Kile, A.C., Paulsen, R.D., Manning, D.K., Beier, D.R., Giles, R.H., Boulton, S.J., et al. (2013). NEK8 links the ATR-regulated replication stress response and S phase CDK activity to renal ciliopathies. *Mol. Cell* 51, 423–439.
- Choksi, S.P., Lauter, G., Swoboda, P., and Roy, S. (2014). Switching on cilia: transcriptional networks regulating ciliogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 141, 1427–1441.
- Chu, C., and Rana, T.M. (2006). Translation Repression in Human Cells by MicroRNA-Induced Gene Silencing Requires RCK/p54. *PLOS Biol.* 4, e210.
- Cibois, M., Luxardi, G., Chevalier, B., Thomé, V., Mercey, O., Zaragosi, L.-E., Barbry, P., Pasini, A., Marcet, B., and Kodjabachian, L. (2015). BMP signalling controls the construction of vertebrate mucociliary epithelia. *Dev. Camb. Engl.* 142, 2352–2363.
- Cimprich, K.A., and Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 616–627.

- Clement, C.A., Kristensen, S.G., Møllgård, K., Pazour, G.J., Yoder, B.K., Larsen, L.A., and Christensen, S.T. (2009). The primary cilium coordinates early cardiogenesis and hedgehog signaling in cardiomyocyte differentiation. *J. Cell Sci.* 122, 3070–3082.
- Clement, C.A., Ajbro, K.D., Koefoed, K., Vestergaard, M.L., Veland, I.R., Henriques de Jesus, M.P.R., Pedersen, L.B., Benmerah, A., Andersen, C.Y., Larsen, L.A., et al. (2013). TGF- β signaling is associated with endocytosis at the pocket region of the primary cilium. *Cell Rep.* 3, 1806–1814.
- Cogan, G. (1945). Idiopathic ulcerative colitis. *Tufts Med. J.* 13, 7–11.
- Cogswell, C., Price, S.J., Hou, X., Guay-Woodford, L.M., Flaherty, L., and Bryda, E.C. (2003). Positional cloning of jcpk/bpk locus of the mouse. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 14, 242–249.
- Cohen-Katsenelson, K., Wasserman, T., Darlyuk-Saadon, I., Rabner, A., Glaser, F., and Aronheim, A. (2013). Identification and analysis of a novel dimerization domain shared by various members of c-Jun N-terminal kinase (JNK) scaffold proteins. *J. Biol. Chem.* 288, 7294–7304.
- Cong, E.H., Bizet, A.A., Boyer, O., Woerner, S., Gribouval, O., Filhol, E., Arrondel, C., Thomas, S., Silbermann, F., Canaud, G., et al. (2014). A Homozygous Missense Mutation in the Ciliary Gene TTC21B Causes Familial FSGS. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 25, 2435–2443.
- Contreras, Espinoza (1960). Discussion clinica y anatomopatologica de enfermos que presentaron un problema dignostico.
- Cooke, A., Prigge, A., and Wickens, M. (2010). Translational repression by deadenylases. *J. Biol. Chem.* 285, 28506–28513.
- Cooper, A.F., Yu, K.P., Brueckner, M., Brailey, L.L., Johnson, L., McGrath, J.M., and Bale, A.E. (2005). Cardiac and CNS defects in a mouse with targeted disruption of suppressor of fused. *Dev. Camb. Engl.* 132, 4407–4417.
- Corbit, K.C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A.R., Stainier, D.Y.R., and Reiter, J.F. (2005). Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 437, 1018–1021.
- Corbit, K.C., Shyer, A.E., Dowdle, W.E., Gaulden, J., Singla, V., Chen, M.-H., Chuang, P.-T., and Reiter, J.F. (2008). Kif3a constrains beta-catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms. *Nat. Cell Biol.* 10, 70–76.
- Cortellino, S., Wang, C., Wang, B., Bassi, M.R., Caretti, E., Champeval, D., Calmont, A., Jarnik, M., Burch, J., Zaret, K.S., et al. (2009). Defective ciliogenesis, embryonic lethality and severe impairment of the Sonic Hedgehog pathway caused by inactivation of the mouse complex A intraflagellar transport gene *Ift122/Wdr10*, partially overlapping with the DNA repair gene *Med1/Mbd4*. *Dev. Biol.* 325, 225–237.
- Cougot, N., Babajko, S., and Séraphin, B. (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J. Cell Biol.* 165, 31–40.
- Craige, B., Tsao, C.-C., Diener, D.R., Hou, Y., Lehtreck, 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.

- Cruz, C., Ribes, V., Kutejova, E., Cayuso, J., Lawson, V., Norris, D., Stevens, J., Davey, M., Blight, K., Bangs, F., et al. (2010). Foxj1 regulates floor plate cilia architecture and modifies the response of cells to sonic hedgehog signalling. *Dev. Camb. Engl.* *137*, 4271–4282.
- Czarnecki, P.G., and Steinman, T.I. (2013). Polycystic kidney disease: new horizons and therapeutic frontiers. *Minerva Urol. E Nefrol. Ital. J. Urol. Nephrol.* *65*, 61–68.
- Czarnecki, P.G., Gabriel, G.C., Manning, D.K., Sergeev, M., Lemke, K., Klena, N.T., Liu, X., Chen, Y., Li, Y., San Agustin, J.T., et al. (2015). ANKS6 is the critical activator of NEK8 kinase in embryonic situs determination and organ patterning. *Nat. Commun.* *6*, 6023.
- Daguenet, E., Dujardin, G., and Valcárcel, J. (2015). The pathogenicity of splicing defects: mechanistic insights into pre-mRNA processing inform novel therapeutic approaches. *EMBO Rep.* *16*, 1640–1655.
- Dai, P., Akimaru, H., Tanaka, Y., Maekawa, T., Nakafuku, M., and Ishii, S. (1999). Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J. Biol. Chem.* *274*, 8143–8152.
- Daly, O.M., Gaboriau, D., Karakaya, K., King, S., Dantas, T.J., Lalor, P., Dockery, P., Krämer, A., and Morrison, C.G. (2016). CEP164-null cells generated by genome editing show a ciliation defect with intact DNA repair capacity. *J. Cell Sci.* *129*, 1769–1774.
- Damerla, R.R., Cui, C., Gabriel, G.C., Liu, X., Craige, B., Gibbs, B.C., Francis, R., Li, Y., Chatterjee, B., San Agustin, J.T., et al. (2015). Novel Jbts17 mutant mouse model of Joubert syndrome with cilia transition zone defects and cerebellar and other ciliopathy related anomalies. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 3994–4005.
- Davenport, J.R., Watts, A.J., Roper, V.C., Croyle, M.J., van Groen, T., Wyss, J.M., Nagy, T.R., Kesterson, R.A., and Yoder, B.K. (2007). Disruption of intraflagellar transport in adult mice leads to obesity and slow-onset cystic kidney disease. *Curr. Biol. CB* *17*, 1586–1594.
- Davis, E.E., Zhang, Q., Liu, Q., Diplas, B.H., Davey, L.M., Hartley, J., Stoetzel, C., Szymanska, K., Ramaswami, G., Logan, C.V., et al. (2011). TTC21B contributes both causal and modifying alleles across the ciliopathy spectrum. *Nat. Genet.* *43*, 189–196.
- Dawe, H.R., Smith, U.M., Cullinane, A.R., Gerrelli, D., Cox, P., Badano, J.L., Blair-Reid, S., Sriram, N., Katsanis, N., Attie-Bitach, T., et al. (2007). The Meckel-Gruber Syndrome proteins MKS1 and meckelin interact and are required for primary cilium formation. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 173–186.
- De Souza, C.P., Osmani, A.H., Wu, L.P., Spotts, J.L., and Osmani, S.A. (2000). Mitotic histone H3 phosphorylation by the NIMA kinase in *Aspergillus nidulans*. *Cell* *102*, 293–302.
- 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.
- DeCaen, P.G., Delling, M., Vien, T.N., and Clapham, D.E. (2013). Direct recording and molecular identification of the calcium channel of primary cilia. *Nature* *504*, 315–318.
- Defer, N., Best-Belpomme, M., and Hanoune, J. (2000). Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* *279*, F400–F416.
- Dehlin, E., Wormington, M., Körner, C.G., and Wahle, E. (2000). Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J.* *19*, 1079–1086.

- Delaval, B., Bright, A., Lawson, N.D., and Doxsey, S. (2011). The cilia protein IFT88 is required for spindle orientation in mitosis. *Nat. Cell Biol.* **13**, 461–468.
- Delestré, L., Bakey, Z., Prado, C., Hoffmann, S., Bihoreau, M.-T., Lelongt, B., and Gauguier, D. (2015). ANKS3 Co-Localises with ANKS6 in Mouse Renal Cilia and Is Associated with Vasopressin Signaling and Apoptosis In Vivo in Mice. *PLoS ONE* **10**.
- Delezoide, A.L., Benoist-Lasselin, C., Legeai-Mallet, L., Le Merrer, M., Munnich, A., Vekemans, M., and Bonaventure, J. (1998). Spatio-temporal expression of FGFR 1, 2 and 3 genes during human embryo-fetal ossification. *Mech. Dev.* **77**, 19–30.
- Delling, M., Indzhykulian, A.A., Liu, X., Li, Y., Xie, T., Corey, D.P., and Clapham, D.E. (2016). Primary cilia are not calcium-responsive mechanosensors. *Nature* **531**, 656–660.
- Delous, M., Baala, L., Salomon, R., Laclef, C., Vierkotten, J., Tory, K., Golzio, C., Lacoste, T., Besse, L., Ozilou, C., et al. (2007). The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. *Nat. Genet.* **39**, 875–881.
- Delous, M., Hellman, N.E., Gaudé, H.-M., Silbermann, F., Le Bivic, A., Salomon, R., Antignac, C., and Saunier, S. (2009a). Nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are required for epithelial morphogenesis and associate with PALS1/PATJ and Par6. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4711–4723.
- Delous, M., Hellman, N.E., Gaudé, H.-M., Silbermann, F., Le Bivic, A., Salomon, R., Antignac, C., and Saunier, S. (2009b). Nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are required for epithelial morphogenesis and associate with PALS1/PATJ and Par6. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4711–4723.
- Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577–584.
- Dessaud, E., Yang, L.L., Hill, K., Cox, B., Ulloa, F., Ribeiro, A., Mynett, A., Novitch, B.G., and Briscoe, J. (2007). Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature* **450**, 717–720.
- Dessaud, E., McMahon, A.P., and Briscoe, J. (2008). Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Dev. Camb. Engl.* **135**, 2489–2503.
- Di Guglielmo, G.M., Le Roy, C., Goodfellow, A.F., and Wrana, J.L. (2003). Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat. Cell Biol.* **5**, 410–421.
- Di Rocco, M., Picco, P., Arslanian, A., Restagno, G., Perfumo, F., Buoncompagni, A., Gattorno, M., and Borrone, C. (1997). Retinitis pigmentosa, hypopituitarism, nephronophthisis, and mild skeletal dysplasia (RHYNS): a new syndrome? *Am. J. Med. Genet.* **73**, 1–4.
- Didon, L., Zwick, R.K., Chao, I.W., Walters, M.S., Wang, R., Hackett, N.R., and Crystal, R.G. (2013). RFX3 modulation of FOXJ1 regulation of cilia genes in the human airway epithelium. *Respir. Res.* **14**, 70.
- van Dijk, E., Cougot, N., Meyer, S., Babajko, S., Wahle, E., and Séraphin, B. (2002). Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J.* **21**, 6915–6924.

- Doherty, D., Parisi, M.A., Finn, L.S., Gunay-Aygun, M., Al-Mateen, M., Bates, D., Clericuzio, C., Demir, H., Dorschner, M., van Essen, A.J., et al. (2010). Mutations in 3 genes (MKS3, CC2D2A and RPGRIP1L) cause COACH syndrome (Joubert syndrome with congenital hepatic fibrosis). *J. Med. Genet.* 47, 8–21.
- Domire, J.S., Green, J.A., Lee, K.G., Johnson, A.D., Askwith, C.C., and Mykityn, K. (2011). Dopamine receptor 1 localizes to neuronal cilia in a dynamic process that requires the Bardet-Biedl syndrome proteins. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 68, 2951–2960.
- Donaldson, J.C., Dempsey, P.J., Reddy, S., Bouton, A.H., Coffey, R.J., and Hanks, S.K. (2000). Crk-associated substrate p130(Cas) interacts with nephrocystin and both proteins localize to cell-cell contacts of polarized epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 256, 168–178.
- Douziech, M., Sahmi, M., Laberge, G., and Therrien, M. (2006). A KSR/CNK complex mediated by HYP, a novel SAM domain-containing protein, regulates RAS-dependent RAF activation in *Drosophila*. *Genes Dev.* 20, 807–819.
- Dowdle, W.E., Robinson, J.F., Kneist, A., Sirerol-Piquer, M.S., Frints, S.G.M., Corbit, K.C., Zaghloul, N.A., Zaghloul, N.A., van Lijnschoten, G., Mulders, L., et al. (2011). Disruption of a ciliary B9 protein complex causes Meckel syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 89, 94–110.
- Drinnenberg, I.A., Weinberg, D.E., Xie, K.T., Mower, J.P., Wolfe, K.H., Fink, G.R., and Bartel, D.P. (2009). RNAi in budding yeast. *Science* 326, 544–550.
- Du, J., Cai, X., Yao, J., Ding, X., Wu, Q., Pei, S., Jiang, K., Zhang, Y., Wang, W., Shi, Y., et al. (2008). The mitotic checkpoint kinase NEK2A regulates kinetochore microtubule attachment stability. *Oncogene* 27, 4107–4114.
- Dunckley, T., and Parker, R. (1999). The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *EMBO J.* 18, 5411–5422.
- Dunckley, T., Tucker, M., and Parker, R. (2001). Two related proteins, Edc1p and Edc2p, stimulate mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 157, 27–37.
- Duran, I., Taylor, S.P., Zhang, W., Martin, J., Qureshi, F., Jacques, S.M., Wallerstein, R., Lachman, R.S., Nickerson, D.A., Bamshad, M., et al. (2017). Mutations in IFT-A satellite core component genes IFT43 and IFT121 produce short rib polydactyly syndrome with distinctive campomelia. *Cilia* 6, 7.
- Durand, B., Kobr, M., Reith, W., and Mach, B. (1994). Functional complementation of major histocompatibility complex class II regulatory mutants by the purified X-box-binding protein RFX. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6839–6847.
- Edgar, B.A. (2006). From cell structure to transcription: Hippo forges a new path. *Cell* 124, 267–273.
- Efimenko, E., Blacque, O.E., Ou, G., Haycraft, C.J., Yoder, B.K., Scholey, J.M., Leroux, M.R., and Swoboda, P. (2006). *Caenorhabditis elegans* DYF-2, an orthologue of human WDR19, is a component of the intraflagellar transport machinery in sensory cilia. *Mol. Biol. Cell* 17, 4801–4811.
- Egorova, A.D., Khedoe, P.P.S.J., Goumans, M.-J.T.H., Yoder, B.K., Nauli, S.M., ten Dijke, P., Poelmann, R.E., and Hierck, B.P. (2011). Lack of primary cilia primes shear-induced endothelial-to-mesenchymal transition. *Circ. Res.* 108, 1093–1101.

- Eichhorn, P.J.A., Rodón, L., González-Juncà, A., Dirac, A., Gili, M., Martínez-Sáez, E., Aura, C., Barba, I., Peg, V., Prat, A., et al. (2012). USP15 stabilizes TGF- β receptor I and promotes oncogenesis through the activation of TGF- β signaling in glioblastoma. *Nat. Med.* **18**, 429–435.
- Eichhorn, S.W., Guo, H., McGeary, S.E., Rodriguez-Mias, R.A., Shin, C., Baek, D., Hsu, S.-H., Ghoshal, K., Villén, J., and Bartel, D.P. (2014). mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Mol. Cell* **56**, 104–115.
- El Zein, L., Ait-Lounis, A., Morlé, L., Thomas, J., Chhin, B., Spassky, N., Reith, W., and Durand, B. (2009). RFX3 governs growth and beating efficiency of motile cilia in mouse and controls the expression of genes involved in human ciliopathies. *J. Cell Sci.* **122**, 3180–3189.
- Eley, L., Moolchala, S.H., Simms, R., Hildebrandt, F., and Sayer, J.A. (2008). Nephrocystin-1 interacts directly with Ack1 and is expressed in human collecting duct. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **371**, 877–882.
- El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun, L., Picart, C., Vega, D., Hakimi, M.-A., Jacobsen, S.E., Cooke, R., and Lagrange, T. (2007). Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev.* **21**, 2539–2544.
- Emery, P., Strubin, M., Hofmann, K., Bucher, P., Mach, B., and Reith, W. (1996a). A consensus motif in the RFX DNA binding domain and binding domain mutants with altered specificity. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4486–4494.
- Emery, P., Durand, B., Mach, B., and Reith, W. (1996b). RFX proteins, a novel family of DNA binding proteins conserved in the eukaryotic kingdom. *Nucleic Acids Res.* **24**, 803–807.
- Ericson, J., Briscoe, J., Rashbass, P., van Heyningen, V., and Jessell, T.M. (1997). Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **62**, 451–466.
- Escudier, E., Duquesnoy, P., Papon, J.F., and Amselem, S. (2009). Ciliary defects and genetics of primary ciliary dyskinesia. *Paediatr. Respir. Rev.* **10**, 51–54.
- Essner, J.J., Amack, J.D., Nyholm, M.K., Harris, E.B., and Yost, H.J. (2005). Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Dev. Camb. Engl.* **132**, 1247–1260.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., and Izaurralde, E. (2007a). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 9.
- Eulalio, A., Rehwinkel, J., Stricker, M., Huntzinger, E., Yang, S.-F., Doerks, T., Dörner, S., Bork, P., Boutros, M., and Izaurralde, E. (2007b). Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev.* **21**, 2558–2570.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008a). GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 346–353.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008b). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* **132**, 9–14.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2009). Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* **15**, 21–32.

- Eystathiou, T., Chan, E.K.L., Tenenbaum, S.A., Keene, J.D., Griffith, K., and Fritzler, M.J. (2002). A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1338–1351.
- Ezratty, E.J., Stokes, N., Chai, S., Shah, A.S., Williams, S.E., and Fuchs, E. (2011). A role for the primary cilium in Notch signaling and epidermal differentiation during skin development. *Cell* **145**, 1129–1141.
- Fabian, M.R., Mathonnet, G., Sundermeier, T., Mathys, H., Zipprich, J.T., Svitkin, Y.V., Rivas, F., Jinek, M., Wohlschlegel, J., Doudna, J.A., et al. (2009). Mammalian miRNA RISC Recruits CAF1 and PABP to Affect PABP-Dependent Deadenylation. *Mol. Cell* **35**, 868–880.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 351–379.
- Fabian, M.R., Svitkin, Y.V., and Sonenberg, N. (2011). An Efficient System for Let-7 MicroRNA and GW182 Protein-Mediated Deadenylation In Vitro. In *Argonaute Proteins*, (Humana Press), pp. 207–217.
- 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.
- Fan, S., Hurd, T.W., Liu, C.-J., Straight, S.W., Weimbs, T., Hurd, E.A., Domino, S.E., and Margolis, B. (2004). Polarity proteins control ciliogenesis via kinesin motor interactions. *Curr. Biol. CB* **14**, 1451–1461.
- Farina, F., Gaillard, J., Guérin, C., Couté, Y., Sillibourne, J., Blanchoin, L., and Théry, M. (2016). The centrosome is an actin-organizing centre. *Nat. Cell Biol.* **18**, 65–75.
- Fenger-Grøn, M., Fillman, C., Norrild, B., and Lykke-Andersen, J. (2005). Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. *Mol. Cell* **20**, 905–915.
- Ferraiuolo, M.A., Basak, S., Dostie, J., Murray, E.L., Schoenberg, D.R., and Sonenberg, N. (2005). A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *J. Cell Biol.* **170**, 913–924.
- 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.
- Feske, S., Okamura, H., Hogan, P.G., and Rao, A. (2003). Ca²⁺/calcineurin signalling in cells of the immune system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 1117–1132.
- Filippova, N., Yang, X., King, P., and Nabors, L.B. (2012). Phosphoregulation of the RNA-binding protein Hu antigen R (HuR) by Cdk5 affects centrosome function. *J. Biol. Chem.* **287**, 32277–32287.
- Fill, M., and Copello, J.A. (2002). Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol. Rev.* **82**, 893–922.
- Finetti, F., Paccani, S.R., Riparbelli, M.G., Giacomello, E., Perinetti, G., Pazour, G.J., Rosenbaum, J.L., and Baldari, C.T. (2009). Intraflagellar transport is required for polarized recycling of the TCR/CD3 complex to the immune synapse. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1332–1339.

- Fischer, E., Legue, E., Doyen, A., Nato, F., Nicolas, J.-F., Torres, V., Yaniv, M., and Pontoglio, M. (2006). Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Nat. Genet.* *38*, 21–23.
- Flaherty, L., Bryda, E.C., Collins, D., Rudofsky, U., and Montgomery, J.C. (1995). New mouse model for polycystic kidney disease with both recessive and dominant gene effects. *Kidney Int.* *47*, 552–558.
- Fliegauf, M., and Omran, H. (2006). Novel tools to unravel molecular mechanisms in cilia-related disorders. *Trends Genet.* *TIG 22*, 241–245.
- Fliegauf, M., Horvath, J., von Schnakenburg, C., Olbrich, H., Müller, D., Thumfart, J., Schermer, B., Pazour, G.J., Neumann, H.P.H., Zentgraf, H., et al. (2006). Nephrocystin specifically localizes to the transition zone of renal and respiratory cilia and photoreceptor connecting cilia. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *17*, 2424–2433.
- Follit, J.A., Tuft, R.A., Fogarty, K.E., and Pazour, G.J. (2006). The intraflagellar transport protein IFT20 is associated with the Golgi complex and is required for cilia assembly. *Mol. Biol. Cell* *17*, 3781–3792.
- Follit, J.A., Xu, F., Keady, B.T., and Pazour, G.J. (2009). Characterization of mouse IFT complex B. *Cell Motil. Cytoskeleton* *66*, 457–468.
- Forbes, A.J., Nakano, Y., Taylor, A.M., and Ingham, P.W. (1993). Genetic analysis of hedgehog signalling in the *Drosophila* embryo. *Dev. Camb. Engl. Suppl.* 115–124.
- Fouquet, J.P., Edde, B., Kann, M.L., Wolff, A., Desbruyeres, E., and Denoulet, P. (1994). Differential distribution of glutamylated tubulin during spermatogenesis in mammalian testis. *Cell Motil. Cytoskeleton* *27*, 49–58.
- Frank, V., den Hollander, A.I., Brüche, N.O., Zonneveld, M.N., Nürnberg, G., Becker, C., Du Bois, G., Kendziorra, H., Roosing, S., Senderek, J., et al. (2008). Mutations of the CEP290 gene encoding a centrosomal protein cause Meckel-Gruber syndrome. *Hum. Mutat.* *29*, 45–52.
- Frank, V., Habbig, S., Bartram, M.P., Eisenberger, T., Veenstra-Knol, H.E., Decker, C., Boorsma, R.A.C., Göbel, H., Nürnberg, G., Griessmann, A., et al. (2013). Mutations in NEK8 link multiple organ dysplasia with altered Hippo signalling and increased c-MYC expression. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 2177–2185.
- Franks, T.M., and Lykke-Andersen, J. (2007). TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements. *Genes Dev.* *21*, 719–735.
- Franks, T.M., and Lykke-Andersen, J. (2008). The control of mRNA decapping and P-body formation. *Mol. Cell* *32*, 605–615.
- Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 445–457.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* *19*, 92–105.
- Fry, A.E., Klingenberg, C., Matthes, J., Heimdal, K., Hennekam, R.C.M., and Pilz, D.T. (2009). Connective tissue involvement in two patients with features of cranioectodermal dysplasia. *Am. J. Med. Genet. A.* *149A*, 2212–2215.

- Fujiwara, M., Ishihara, T., and Katsura, I. (1999). A novel WD40 protein, CHE-2, acts cell-autonomously in the formation of *C. elegans* sensory cilia. *Dev. Camb. Engl.* 126, 4839–4848.
- Fukao, A., Mishima, Y., Takizawa, N., Oka, S., Imataka, H., Pelletier, J., Sonenberg, N., Thoma, C., and Fujiwara, T. (2014). MicroRNAs trigger dissociation of eIF4A1 and eIF4AII from target mRNAs in humans. *Mol. Cell* 56, 79–89.
- Fukaya, T., and Tomari, Y. (2012). MicroRNAs Mediate Gene Silencing via Multiple Different Pathways in *Drosophila*. *Mol. Cell* 48, 825–836.
- Fukui, H., Shiba, D., Asakawa, K., Kawakami, K., and Yokoyama, T. (2012). The ciliary protein Nek8/Nphp9 acts downstream of Inv/Nphp2 during pronephros morphogenesis and left-right establishment in zebrafish. *FEBS Lett.* 586, 2273–2279.
- Fung, B.K., Hurley, J.B., and Stryer, L. (1981). Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 152–156.
- Furuichi, S., Hashimoto, S., Gon, Y., Matsumoto, K., and Horie, T. (2002). p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase regulate interleukin-8 and RANTES production in hyperosmolarity stimulated human bronchial epithelial cells. *Respirol. Carlton Vic* 7, 193–200.
- Gabasa, M., Duch, P., Jorba, I., Giménez, A., Lugo, R., Pavelescu, I., Rodríguez-Pascual, F., Molina-Molina, M., Xaubet, A., Pereda, J., et al. (2017). Epithelial contribution to the profibrotic stiff microenvironment and myofibroblast population in lung fibrosis. *Mol. Biol. Cell* 28, 3741–3755.
- Gagnadoux, M.F., Bacri, J.L., Broyer, M., and Habib, R. (1989). Infantile chronic tubulo-interstitial nephritis with cortical microcysts: variant of nephronophthisis or new disease entity? *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 3, 50–55.
- Gajiwala, K.S., Chen, H., Cornille, F., Roques, B.P., Reith, W., Mach, B., and Burley, S.K. (2000). Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding. *Nature* 403, 916–921.
- Gamberi, C., Hipfner, D.R., Trudel, M., and Lubell, W.D. (2017). Bicaudal C mutation causes myc and TOR pathway up-regulation and polycystic kidney disease-like phenotypes in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 13.
- Gao, M., Fritz, D.T., Ford, L.P., and Wilusz, J. (2000). Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro. *Mol. Cell* 5, 479–488.
- Garcia-Gonzalo, F.R., Corbit, K.C., Sirerol-Piquer, M.S., Ramaswami, G., Otto, E.A., Noriega, T.R., Seol, A.D., Robinson, J.F., Bennett, C.L., Josifova, D.J., et al. (2011). A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nat. Genet.* 43, 776–784.
- Gasse, P., Mary, C., Guenon, I., Noulin, N., Charron, S., Schnyder-Candrian, S., Schnyder, B., Akira, S., Quesniaux, V.F.J., Lagente, V., et al. (2007). IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* 117, 3786–3799.
- Gasse, P., Riteau, N., Charron, S., Girre, S., Fick, L., Pétrilli, V., Tschopp, J., Lagente, V., Quesniaux, V.F.J., Ryffel, B., et al. (2009). Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179, 903–913.

- Gencer, S., Oleinik, N., Kim, J., Panneer Selvam, S., De Palma, R., Dany, M., Nganga, R., Thomas, R.J., Senkal, C.E., Howe, P.H., et al. (2017). TGF- β receptor I/II trafficking and signaling at primary cilia are inhibited by ceramide to attenuate cell migration and tumor metastasis. *Sci. Signal.* *10*.
- Georges, B., Cosyns, J.P., Dahan, K., Snyers, B., Carlier, B., Loute, G., and Pirson, Y. (2000). Late-onset renal failure in Senior-Loken syndrome. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* *36*, 1271–1275.
- Gerdes, J.M., Liu, Y., Zaghloul, N.A., Leitch, C.C., Lawson, S.S., Kato, M., Beachy, P.A., Beales, P.L., DeMartino, G.N., Fisher, S., et al. (2007). Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response. *Nat. Genet.* *39*, 1350–1360.
- Gerhardt, C., Lier, J.M., Burmühl, S., Struchtrup, A., Deutschmann, K., Vetter, M., Leu, T., Reeg, S., Grune, T., and Rütther, U. (2015). The transition zone protein Rpgrip1l regulates proteasomal activity at the primary cilium. *J. Cell Biol.* *210*, 115–133.
- Ghossoub, R., Molla-Herman, A., Bastin, P., and Benmerah, A. (2011). The ciliary pocket: a once-forgotten membrane domain at the base of cilia. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* *103*, 131–144.
- Ghossoub, R., Hu, Q., Failler, M., Rouyez, M.-C., Spitzbarth, B., Mostowy, S., Wolfrum, U., Saunier, S., Cossart, P., Jamesnelson, W., et al. (2013). Septins 2, 7 and 9 and MAP4 colocalize along the axoneme in the primary cilium and control ciliary length. *J. Cell Sci.* *126*, 2583–2594.
- Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H.G., and Veltman, J.A. (2012). Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *20*, 490–497.
- Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L.M., and Anderson, P. (2004). Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol. Biol. Cell* *15*, 5383–5398.
- Gilula, N.B., and Satir, P. (1972). The ciliary necklace. A ciliary membrane specialization. *J. Cell Biol.* *53*, 494–509.
- 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.
- Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A.J., and Schier, A.F. (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* *312*, 75–79.
- Girard, M., Bizet, A.A., Lachaux, A., Gonzales, E., Filhol, E., Collardeau-Frachon, S., Jeanpierre, C., Henry, C., Fabre, M., Viremouneix, L., et al. (2016). DCDC2 Mutations Cause Neonatal Sclerosing Cholangitis. *Hum. Mutat.*
- Gleeson, J.G., Keeler, L.C., Parisi, M.A., Marsh, S.E., Chance, P.F., Glass, I.A., Graham Jr, J.M., Maria, B.L., Barkovich, A.J., and Dobyns, W.B. (2004). Molar tooth sign of the midbrain-hindbrain junction: occurrence in multiple distinct syndromes. *Am. J. Med. Genet. A.* *125A*, 125–134; discussion 117.
- Graessl, M., Koch, J., Calderon, A., Kamps, D., Banerjee, S., Mazel, T., Schulze, N., Jungkurth, J.K., Patwardhan, R., Solouk, D., et al. (2017). An excitable Rho GTPase signaling network generates dynamic subcellular contraction patterns. *J. Cell Biol.* *216*, 4271–4285.

- Grallert, A., and Hagan, I.M. (2002). Schizosaccharomyces pombe NIMA-related kinase, Fin1, regulates spindle formation and an affinity of Polo for the SPB. *EMBO J.* **21**, 3096–3107.
- Grallert, A., Krapp, A., Bagley, S., Simanis, V., and Hagan, I.M. (2004). Recruitment of NIMA kinase shows that maturation of the S. pombe spindle-pole body occurs over consecutive cell cycles and reveals a role for NIMA in modulating SIN activity. *Genes Dev.* **18**, 1007–1021.
- Grampa, V., Delous, M., Zaidan, M., Ody, G., Thomas, S., Elkhartoufi, N., Filhol, E., Niel, O., Silbermann, F., Lebreton, C., et al. (2016). Novel NEK8 Mutations Cause Severe Syndromic Renal Cystic Dysplasia through YAP Dysregulation. *PLoS Genet.* **12**.
- Graser, S., Stierhof, Y.-D., and Nigg, E.A. (2007). Cep68 and Cep215 (Cdk5rap2) are required for centrosome cohesion. *J. Cell Sci.* **120**, 4321–4331.
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* **123**, 631–640.
- Gresh, L., Fischer, E., Reimann, A., Tanguy, M., Garbay, S., Shao, X., Hiesberger, T., Fiette, L., Igarashi, P., Yaniv, M., et al. (2004). A transcriptional network in polycystic kidney disease. *EMBO J.* **23**, 1657–1668.
- Gromley, A., Jurczyk, A., Sillibourne, J., Halilovic, E., Mogensen, M., Groisman, I., Blomberg, M., and Doxsey, S. (2003). A novel human protein of the maternal centriole is required for the final stages of cytokinesis and entry into S phase. *J. Cell Biol.* **161**, 535–545.
- 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., Chrétien, D., Marco, S., and Tassin, A.-M. (2010). Procentriole assembly revealed by cryo-electron tomography. *EMBO J.* **29**, 1565–1572.
- Guil, S., Long, J.C., and Cáceres, J.F. (2006). hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5744–5758.
- GUNAY-AYGUN, M. (2009). Liver and Kidney Disease in Ciliopathies. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* **151C**, 296–306.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Bartel, D.P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**, 835–840.
- Gupta, S., Handa, K.K., Kasliwal, R.R., and Bajpai, P. (2013). A case of Kartagener's syndrome: Importance of early diagnosis and treatment. *Indian J. Hum. Genet.* **19**, 266–269.
- Gusmano, R., Ghiggeri, G.M., and Caridi, G. (1998). Nephronophthisis-medullary cystic disease: clinical and genetic aspects. *J. Nephrol.* **11**, 224–228.
- Habas, R., Kato, Y., and He, X. (2001). Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell* **107**, 843–854.
- Habbig, S., Bartram, M.P., Müller, R.U., Schwarz, R., Andriopoulos, N., Chen, S., Sägmüller, J.G., Hoehne, M., Burst, V., Liebau, M.C., et al. (2011a). NPHP4, a cilia-associated protein, negatively regulates the Hippo pathway. *J. Cell Biol.* **193**, 633–642.

- Habbig, S., Bartram, M.P., Müller, R.U., Schwarz, R., Andriopoulos, N., Chen, S., Sägmüller, J.G., Hoehne, M., Burst, V., Liebau, M.C., et al. (2011b). NPHP4, a cilia-associated protein, negatively regulates the Hippo pathway. *J. Cell Biol.* **193**, 633–642.
- Habbig, S., Bartram, M.P., Sägmüller, J.G., Griessmann, A., Franke, M., Müller, R.-U., Schwarz, R., Hoehne, M., Bergmann, C., Tessmer, C., et al. (2012). The ciliopathy disease protein NPHP9 promotes nuclear delivery and activation of the oncogenic transcriptional regulator TAZ. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 5528–5538.
- Hackett, B.P., Brody, S.L., Liang, M., Zeitl, I.D., Bruns, L.A., and Gitlin, J.D. (1995). Primary structure of hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 and characterization of gene expression in the developing respiratory and reproductive epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 4249–4253.
- Haider, N.B., Carmi, R., Shalev, H., Sheffield, V.C., and Landau, D. (1998). A Bedouin kindred with infantile nephronophthisis demonstrates linkage to chromosome 9 by homozygosity mapping. *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 1404–1410.
- Halbritter, J., Bizet, A.A., Schmidts, M., Porath, J.D., Braun, D.A., Gee, H.Y., McInerney-Leo, A.M., Krug, P., Filhol, E., Davis, E.E., et al. (2013a). Defects in the IFT-B Component IFT172 Cause Jeune and Mainzer-Saldino Syndromes in Humans. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 915–925.
- Halbritter, J., Porath, J.D., Diaz, K.A., Braun, D.A., Kohl, S., Chaki, M., Allen, S.J., Soliman, N.A., Hildebrandt, F., Otto, E.A., et al. (2013b). Identification of 99 novel mutations in a worldwide cohort of 1,056 patients with a nephronophthisis-related ciliopathy. *Hum. Genet.* **132**, 865–884.
- Happé, H., van der Wal, A.M., Leonhard, W.N., Kunnen, S.J., Breuning, M.H., de Heer, E., and Peters, D.J.M. (2011a). Altered Hippo signalling in polycystic kidney disease. *J. Pathol.* **224**, 133–142.
- Happé, H., de Heer, E., and Peters, D.J.M. (2011b). Polycystic kidney disease: the complexity of planar cell polarity and signaling during tissue regeneration and cyst formation. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**, 1249–1255.
- Harada, B.T., Knight, M.J., Imai, S.-I., Qiao, F., Ramachander, R., Sawaya, M.R., Gingery, M., Sakane, F., and Bowie, J.U. (2008). Regulation of enzyme localization by polymerization: polymer formation by the SAM domain of diacylglycerol kinase delta1. *Struct. Lond. Engl.* **16**, 380–387.
- Hart, M.J., de los Santos, R., Albert, I.N., Rubinfeld, B., and Polakis, P. (1998). Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr. Biol. CB* **8**, 573–581.
- Hartman, T.R., Liu, D., Zilfou, J.T., Robb, V., Morrison, T., Watnick, T., and Henske, E.P. (2009). The tuberous sclerosis proteins regulate formation of the primary cilium via a rapamycin-insensitive and polycystin 1-independent pathway. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 151–163.
- Hartong, D.T., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (2006). Retinitis pigmentosa. *The Lancet* **368**, 1795–1809.
- Haycraft, C.J., Schafer, J.C., Zhang, Q., Taulman, P.D., and Yoder, B.K. (2003). Identification of CHE-13, a novel intraflagellar transport protein required for cilia formation. *Exp. Cell Res.* **284**, 251–263.
- Haycraft, C.J., Banizs, B., Aydin-Son, Y., Zhang, Q., Michaud, E.J., and Yoder, B.K. (2005). Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet.* **1**, e53.

He, C., and Klionsky, D.J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43, 67–93.

He, Y., Zeng, M.Y., Yang, D., Motro, B., and Núñez, G. (2016). NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* 530, 354–357.

Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 690–701.

Hellman, N.E., Liu, Y., Merkel, E., Austin, C., Le Corre, S., Beier, D.R., Sun, Z., Sharma, N., Yoder, B.K., and Drummond, I.A. (2010). The zebrafish *foxj1a* transcription factor regulates cilia function in response to injury and epithelial stretch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 18499–18504.

Hendrickson, D.G., Hogan, D.J., McCullough, H.L., Myers, J.W., Herschlag, D., Ferrell, J.E., and Brown, P.O. (2009). Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS Biol.* 7, e1000238.

Hernandez-Hernandez, V., Pravincumar, P., Diaz-Font, A., May-Simera, H., Jenkins, D., Knight, M., and Beales, P.L. (2013). Bardet-Biedl syndrome proteins control the cilia length through regulation of actin polymerization. *Hum. Mol. Genet.* 22, 3858–3868.

Hiesberger, T., Shao, X., Gourley, E., Reimann, A., Pontoglio, M., and Igarashi, P. (2005). Role of the hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) C-terminal domain in *Pkhd1* (ARPKD) gene transcription and renal cystogenesis. *J. Biol. Chem.* 280, 10578–10586.

Hildebrandt, F., and Zhou, W. (2007). Nephronophthisis-associated ciliopathies. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 18, 1855–1871.

Hildebrandt, F., Waldherr, R., Kutt, R., and Brandis, M. (1992). The nephronophthisis complex: clinical and genetic aspects. *Clin. Investig.* 70, 802–808.

Hildebrandt, F., Strahm, B., Nothwang, H.G., Gretz, N., Schnieders, B., Singh-Sawhney, I., Kutt, R., Vollmer, M., and Brandis, M. (1997a). Molecular genetic identification of families with juvenile nephronophthisis type 1: rate of progression to renal failure. APN Study Group. Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie. *Kidney Int.* 51, 261–269.

Hildebrandt, F., Otto, E., Rensing, C., Nothwang, H.G., Vollmer, M., Adolphs, J., Hanusch, H., and Brandis, M. (1997b). A novel gene encoding an SH3 domain protein is mutated in nephronophthisis type 1. *Nat. Genet.* 17, 149–153.

Hilgendorf, K.I., Johnson, C.T., and Jackson, P.K. (2016). The primary cilium as a cellular receiver: organizing ciliary GPCR signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 39, 84–92.

Hocevar, B.A., Smine, A., Xu, X.X., and Howe, P.H. (2001). The adaptor molecule Disabled-2 links the transforming growth factor beta receptors to the Smad pathway. *EMBO J.* 20, 2789–2801.

Hoefele, J., Wolf, M.T.F., O'Toole, J.F., Otto, E.A., Schultheiss, U., Dêschenes, G., Attanasio, M., Utsch, B., Antignac, C., and Hildebrandt, F. (2007). Evidence of oligogenic inheritance in nephronophthisis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 18, 2789–2795.

Hoefele, J., Nayir, A., Chaki, M., Imm, A., Allen, S.J., Otto, E.A., and Hildebrandt, F. (2011). Pseudodominant inheritance of nephronophthisis caused by a homozygous NPHP1 deletion. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 26, 967–971.

- Hoff, S., Halbritter, J., Epting, D., Frank, V., Nguyen, T.-M.T., van Reeuwijk, J., Boehlke, C., Schell, C., Yasunaga, T., Helmstädter, M., et al. (2013). ANKS6 is a central component of a nephronophthisis module linking NEK8 to INVS and NPHP3. *Nat. Genet.* *45*, 951–956.
- Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* *17*, 2205–2232.
- Holcik, M., and Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 318–327.
- Holland, P.M., Milne, A., Garka, K., Johnson, R.S., Willis, C., Sims, J.E., Rauch, C.T., Bird, T.A., and Virca, G.D. (2002). Purification, cloning, and characterization of Nek8, a novel NIMA-related kinase, and its candidate substrate Bicd2. *J. Biol. Chem.* *277*, 16229–16240.
- Hollyfield, J.G., Besharse, J.C., and Rayborn, M.E. (1977). Turnover of rod photoreceptor outer segments. I. Membrane addition and loss in relationship to temperature. *J. Cell Biol.* *75*, 490–506.
- Holmfeldt, P., Sellin, M.E., and Gullberg, M. (2009). Predominant regulators of tubulin monomer-polymer partitioning and their implication for cell polarization. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *66*, 3263–3276.
- Hong, D.-H., Pawlyk, B., Sokolov, M., Strissel, K.J., Yang, J., Tulloch, B., Wright, A.F., Arshavsky, V.Y., and Li, T. (2003). RPGR isoforms in photoreceptor connecting cilia and the transitional zone of motile cilia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *44*, 2413–2421.
- Hoover, A.N., Wynkoop, A., Zeng, H., Jia, J., Niswander, L.A., and Liu, A. (2008). C2cd3 is required for cilia formation and Hedgehog signaling in mouse. *Dev. Camb. Engl.* *135*, 4049–4058.
- Hossain, Z., Ali, S.M., Ko, H.L., Xu, J., Ng, C.P., Guo, K., Qi, Z., Ponniah, S., Hong, W., and Hunziker, W. (2007). Glomerulocystic kidney disease in mice with a targeted inactivation of Wwtr1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 1631–1636.
- Housset, C. (2005). [Cystic liver diseases. Genetics and cell biology]. *Gastroentérologie Clin. Biol.* *29*, 861–869.
- Hsia, Y.E., Bratu, M., and Herbordt, A. (1971). Genetics of the Meckel syndrome (dysencephalia splanchnocystica). *Pediatrics* *48*, 237–247.
- Hu, Q., and Nelson, W.J. (2011). Ciliary diffusion barrier: the gatekeeper for the primary cilium compartment. *Cytoskelet. Hoboken NJ* *68*, 313–324.
- Hu, Q., Milenkovic, L., Jin, H., Scott, M.P., Nachury, M.V., Spiliotis, E.T., and Nelson, W.J. (2010). A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. *Science* *329*, 436–439.
- Huang, K., Diener, D.R., and Rosenbaum, J.L. (2009). The ubiquitin conjugation system is involved in the disassembly of cilia and flagella. *J. Cell Biol.* *186*, 601–613.
- 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. (2011a). 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.

- Huang, T., Xie, Z., Wang, J., Li, M., Jing, N., and Li, L. (2011b). Nuclear factor of activated T cells (NFAT) proteins repress canonical Wnt signaling via its interaction with Dishevelled (Dvl) protein and participate in regulating neural progenitor cell proliferation and differentiation. *J. Biol. Chem.* *286*, 37399–37405.
- Huang-Doran, I., Bicknell, L.S., Finucane, F.M., Rocha, N., Porter, K.M., Tung, Y.C.L., Szekeres, F., Krook, A., Nolan, J.J., O'Driscoll, M., et al. (2011). Genetic defects in human pericentrin are associated with severe insulin resistance and diabetes. *Diabetes* *60*, 925–935.
- Huangfu, D., and Anderson, K.V. (2005). Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 11325–11330.
- Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A.S., Murcia, N.S., Niswander, L., and Anderson, K.V. (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* *426*, 83–87.
- Huber, C., Wu, S., Kim, A.S., Sigaudy, S., Sarukhanov, A., Serre, V., Baujat, G., Le Quan Sang, K.-H., Rimoin, D.L., Cohn, D.H., et al. (2013). WDR34 mutations that cause short-rib polydactyly syndrome type III/severe asphyxiating thoracic dysplasia reveal a role for the NF- κ B pathway in cilia. *Am. J. Hum. Genet.* *93*, 926–931.
- Hubstenberger, A., Courel, M., Bénard, M., Souquere, S., Ernoult-Lange, M., Chouaib, R., Yi, Z., Morlot, J.-B., Munier, A., Fradet, M., et al. (2017). P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons. *Mol. Cell* *68*, 144–157.e5.
- Hughes, J., Ward, C.J., Peral, B., Aspinwall, R., Clark, K., San Millán, J.L., Gamble, V., and Harris, P.C. (1995). The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat. Genet.* *10*, 151–160.
- Hui, L., Bakiri, L., Mairhorfer, A., Schweifer, N., Haslinger, C., Kenner, L., Komnenovic, V., Scheuch, H., Beug, H., and Wagner, E.F. (2007). p38 α suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. *Nat. Genet.* *39*, 741–749.
- Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I.K., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 16961–16966.
- Hung, J.-H., Su, I.-J., Lei, H.-Y., Wang, H.-C., Lin, W.-C., Chang, W.-T., Huang, W., Chang, W.-C., Chang, Y.-S., Chen, C.-C., et al. (2004). Endoplasmic reticulum stress stimulates the expression of cyclooxygenase-2 through activation of NF- κ B and pp38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* *279*, 46384–46392.
- Huntzinger, E., Braun, J.E., Heimstädt, S., Zekri, L., and Izaurralde, E. (2010). Two PABPC1-binding sites in GW182 proteins promote miRNA-mediated gene silencing. *EMBO J.* *29*, 4146–4160.
- Huntzinger, E., Kuzuoğlu-Öztürk, D., Braun, J.E., Eulalio, A., Wohlbold, L., and Izaurralde, E. (2013). The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets. *Nucleic Acids Res.* *41*, 978–994.
- Hurd, T.W., Otto, E.A., Mishima, E., Gee, H.Y., Inoue, H., Inazu, M., Yamada, H., Halbritter, J., Seki, G., Konishi, M., et al. (2013). Mutation of the Mg²⁺ transporter SLC41A1 results in a nephronophthisis-like phenotype. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *24*, 967–977.

- Hutchins, B.I., Li, L., and Kalil, K. (2011). Wnt/calcium signaling mediates axon growth and guidance in the developing corpus callosum. *Dev. Neurobiol.* *71*, 269–283.
- Hutvagner, G., and Simard, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 22–32.
- Iaconis, D., Monti, M., Renda, M., van Koppen, A., Tammara, R., Chiaravalli, M., Cozzolino, F., Pignata, P., Crina, C., Pucci, P., et al. (2017). The centrosomal OFD1 protein interacts with the translation machinery and regulates the synthesis of specific targets. *Sci. Rep.* *7*.
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., and Natoli, T.A. (2011). mTOR signaling in polycystic kidney disease. *Trends Mol. Med.* *17*, 625–633.
- Igarashi, P., Shao, X., McNally, B.T., and Hiesberger, T. (2005). Roles of HNF-1beta in kidney development and congenital cystic diseases. *Kidney Int.* *68*, 1944–1947.
- Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S., and Kikuchi, A. (1998). Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J.* *17*, 1371–1384.
- Ikushima, H., and Miyazono, K. (2011). Biology of transforming growth factor- β signaling. *Curr. Pharm. Biotechnol.* *12*, 2099–2107.
- Ingham, P.W. (1998). Transducing Hedgehog: the story so far. *EMBO J.* *17*, 3505–3511.
- Ingham, P.W., and McMahon, A.P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* *15*, 3059–3087.
- Iomini, C., Babaev-Khaimov, V., Sassaroli, M., and Piperno, G. (2001). Protein particles in *Chlamydomonas* flagella undergo a transport cycle consisting of four phases. *J. Cell Biol.* *153*, 13–24.
- Iomini, C., Tejada, K., Mo, W., Vaananen, H., and Piperno, G. (2004). Primary cilia of human endothelial cells disassemble under laminar shear stress. *J. Cell Biol.* *164*, 811–817.
- Iomini, C., Li, L., Esparza, J.M., and Dutcher, S.K. (2009). Retrograde intraflagellar transport mutants identify complex A proteins with multiple genetic interactions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* *183*, 885–896.
- Irigoín, F., and Badano, J.L. (2011). Keeping the balance between proliferation and differentiation: the primary cilium. *Curr. Genomics* *12*, 285–297.
- Ishitani, T., Kishida, S., Hyodo-Miura, J., Ueno, N., Yasuda, J., Waterman, M., Shibuya, H., Moon, R.T., Ninomiya-Tsuji, J., and Matsumoto, K. (2003). The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 131–139.
- Iwata, Y., Wada, T., Furuichi, K., Sakai, N., Matsushima, K., Yokoyama, H., and Kobayashi, K. (2003). p38 Mitogen-activated protein kinase contributes to autoimmune renal injury in MRL-Fas lpr mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* *JASN* *14*, 57–67.
- Izawa, I., Goto, H., Kasahara, K., and Inagaki, M. (2015). Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle. *Cilia* *4*, 12.

- Jansen, M., Ten Klooster, J.P., Offerhaus, G.J., and Clevers, H. (2009). LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism. *Physiol. Rev.* **89**, 777–798.
- Jao, L.-E., Akef, A., and Wenthe, S.R. (2017). A role for Gle1, a regulator of DEAD-box RNA helicases, at centrosomes and basal bodies. *Mol. Biol. Cell* **28**, 120–127.
- Jauregui, A.R., Nguyen, K.C.Q., Hall, D.H., and Barr, M.M. (2008). The *Caenorhabditis elegans* nephrocystins act as global modifiers of cilium structure. *J. Cell Biol.* **180**, 973–988.
- Jensen, V.L., Li, C., Bowie, R.V., Clarke, L., Mohan, S., Blacque, O.E., and Leroux, M.R. (2015). Formation of the transition zone by Mks5/Rpgrip1L establishes a ciliary zone of exclusion (CIZE) that compartmentalises ciliary signalling proteins and controls PIP2 ciliary abundance. *EMBO J.* **34**, 2537–2556.
- Jeune, M., Beraud, C., and Carron, R. (1955). [Asphyxiating thoracic dystrophy with familial characteristics]. *Arch. Fr. Pédiatrie* **12**, 886–891.
- Jin, D., Ni, T.T., Sun, J., Wan, H., Amack, J.D., Yu, G., Fleming, J., Chiang, C., Li, W., Papierniak, A., et al. (2014a). Prostaglandin signalling regulates ciliogenesis by modulating intraflagellar transport. *Nat. Cell Biol.* **16**, 841–851.
- Jin, G., Lee, S.-W., Zhang, X., Cai, Z., Gao, Y., Chou, P.-C., Rezaeian, A.H., Han, F., Wang, C.-Y., Yao, J.-C., et al. (2015). Skp2-Mediated RagA Ubiquitination Elicits a Negative Feedback to Prevent Amino-Acid-Dependent mTORC1 Hyperactivation by Recruiting GATOR1. *Mol. Cell* **58**, 989–1000.
- Jin, H., White, S.R., Shida, T., Schulz, S., Aguiar, M., Gygi, S.P., Bazan, J.F., and Nachury, M.V. (2010). The conserved Bardet-Biedl syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia. *Cell* **141**, 1208–1219.
- Jin, X., Mohieldin, A.M., Muntean, B.S., Green, J.A., Shah, J.V., Mykytyn, K., and Nauli, S.M. (2014b). Cilioplasm is a cellular compartment for calcium signaling in response to mechanical and chemical stimuli. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **71**, 2165–2178.
- Jinek, M., Fabian, M.R., Coyle, S.M., Sonenberg, N., and Doudna, J.A. (2010). Structural insights into the human GW182-PABC interaction in microRNA-mediated deadenylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 238–240.
- Johnson, P.E., and Donaldson, L.W. (2006). RNA recognition by the Vts1p SAM domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 177–178.
- Johnson, K., Grawe, F., Grzeschik, N., and Knust, E. (2002). *Drosophila* crumbs is required to inhibit light-induced photoreceptor degeneration. *Curr. Biol. CB* **12**, 1675–1680.
- Johnston, J.A., Illing, M.E., and Kopito, R.R. (2002). Cytoplasmic dynein/dynactin mediates the assembly of aggresomes. *Cell Motil. Cytoskeleton* **53**, 26–38.
- Jonassen, J.A., SanAgustin, J., Baker, S.P., and Pazour, G.J. (2012). Disruption of IFT complex A causes cystic kidneys without mitotic spindle misorientation. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **23**, 641–651.
- 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.

Joubert, M., Eisenring, J.J., and Andermann, F. (1968). Familial dysgenesis of the vermis: a syndrome of hyperventilation, abnormal eye movements and retardation. *Neurology* 18, 302–303.

Jung, E., Seong, Y., Jeon, B., Song, H., and Kwon, Y.-S. (2017). Global analysis of AGO2-bound RNAs reveals that miRNAs induce cleavage of target RNAs with limited complementarity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1860, 1148–1158.

Justice, R.W., Zilian, O., Woods, D.F., Noll, M., and Bryant, P.J. (1995). The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev.* 9, 534–546.

Kaimori, J., Nagasawa, Y., Menezes, L.F., Garcia-Gonzalez, M.A., Deng, J., Imai, E., Onuchic, L.F., Guay-Woodford, L.M., and Germino, G.G. (2007). Polyductin undergoes notch-like processing and regulated release from primary cilia. *Hum. Mol. Genet.* 16, 942–956.

Kang, G.M., Han, Y.M., Ko, H.W., Kim, J., Oh, B.C., Kwon, I., and Kim, M.-S. (2015). Leptin Elongates Hypothalamic Neuronal Cilia via Transcriptional Regulation and Actin Destabilization. *J. Biol. Chem.* 290, 18146–18155.

Karner, C.M., Chirumamilla, R., Aoki, S., Igarashi, P., Wallingford, J.B., and Carroll, T.J. (2009). Wnt9b signaling regulates planar cell polarity and kidney tubule morphogenesis. *Nat. Genet.* 41, 793–799.

Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., and Wrana, J.L. (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol. Cell* 6, 1365–1375.

Kawakami, Y., Raya, A., Raya, R.M., Rodríguez-Esteban, C., and Izpisua Belmonte, J.C. (2005). Retinoic acid signalling links left-right asymmetric patterning and bilaterally symmetric somitogenesis in the zebrafish embryo. *Nature* 435, 165–171.

Ke, Y.-N., and Yang, W.-X. (2014). Primary cilium: an elaborate structure that blocks cell division? *Gene* 547, 175–185.

Kedersha, N., Cho, M.R., Li, W., Yacono, P.W., Chen, S., Gilks, N., Golan, D.E., and Anderson, P. (2000). Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 151, 1257–1268.

Kedersha, N., Chen, S., Gilks, N., Li, W., Miller, I.J., Stahl, J., and Anderson, P. (2002). Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol. Biol. Cell* 13, 195–210.

Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E., and Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* 169, 871–884.

Kedersha, N.L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., and Anderson, P. (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 147, 1431–1442.

Keller, R., Davidson, L., Edlund, A., Elul, T., Ezin, M., Shook, D., and Skoglund, P. (2000). Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355, 897–922.

- Kellogg, D.R., Moritz, M., and Alberts, B.M. (1994). The centrosome and cellular organization. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 639–674.
- Kendall, R.T., and Feghali-Bostwick, C.A. (2014). Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front. Pharmacol.* 5.
- Khaminets, A., Behl, C., and Dikic, I. (2016). Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends Cell Biol.* 26, 6–16.
- Kiefer, S.M., McDill, B.W., Yang, J., and Rauchman, M. (2002). Murine Sall1 represses transcription by recruiting a histone deacetylase complex. *J. Biol. Chem.* 277, 14869–14876.
- Kim, S.H. (2015). Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism and Kallmann Syndrome: Past, Present, and Future. *Endocrinol. Metab. Seoul Korea* 30, 456–466.
- Kim, C.A., Phillips, M.L., Kim, W., Gingery, M., Tran, H.H., Robinson, M.A., Faham, S., and Bowie, J.U. (2001). Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression. *EMBO J.* 20, 4173–4182.
- Kim, C.A., Sawaya, M.R., Cascio, D., Kim, W., and Bowie, J.U. (2005a). Structural organization of a Sex-comb-on-midleg/polyhomeotic copolymer. *J. Biol. Chem.* 280, 27769–27775.
- Kim, H.-G., Ahn, J.-W., Kurth, I., Ullmann, R., Kim, H.-T., Kulharya, A., Ha, K.-S., Itokawa, Y., Meliciani, I., Wenzel, W., et al. (2010a). WDR11, a WD protein that interacts with transcription factor EMX1, is mutated in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 465–479.
- Kim, J., Krishnaswami, S.R., and Gleeson, J.G. (2008). CEP290 interacts with the centriolar satellite component PCM-1 and is required for Rab8 localization to the primary cilium. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3796–3805.
- Kim, J., Lee, J.E., Heynen-Genel, S., Suyama, E., Ono, K., Lee, K., Ideker, T., Aza-Blanc, P., and Gleeson, J.G. (2010b). Functional genomic screen for modulators of ciliogenesis and cilium length. *Nature* 464, 1048–1051.
- Kim, J., Jo, H., Hong, H., Kim, M.H., Kim, J.M., Lee, J.-K., Heo, W.D., and Kim, J. (2015a). Actin remodelling factors control ciliogenesis by regulating YAP/TAZ activity and vesicle trafficking. *Nat. Commun.* 6, 6781.
- Kim, J.H., Ki, S.M., Joung, J.-G., Scott, E., Heynen-Genel, S., Aza-Blanc, P., Kwon, C.H., Kim, J., Gleeson, J.G., and Lee, J.E. (2016a). Genome-wide screen identifies novel machineries required for both ciliogenesis and cell cycle arrest upon serum starvation. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 1307–1318.
- Kim, M., Kim, M., Lee, M.-S., Kim, C.-H., and Lim, D.-S. (2014). The MST1/2-SAV1 complex of the Hippo pathway promotes ciliogenesis. *Nat. Commun.* 5, 5370.
- Kim, S., Lee, K., and Rhee, K. (2007). NEK7 is a centrosomal kinase critical for microtubule nucleation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 56–62.
- Kim, S., Zaghloul, N.A., Bubenshchikova, E., Oh, E.C., Rankin, S., Katsanis, N., Obara, T., and Tsiokas, L. (2011). Nde1-mediated inhibition of ciliogenesis affects cell cycle re-entry. *Nat. Cell Biol.* 13, 351–360.

- Kim, S., Lee, K., Choi, J.-H., Ringstad, N., and Dynlacht, B.D. (2015b). Nek2 activation of Kif24 ensures cilium disassembly during the cell cycle. *Nat. Commun.* 6, 8087.
- Kim, S., Nie, H., Nesin, V., Tran, U., Outeda, P., Bai, C.-X., Keeling, J., Maskey, D., Watnick, T., Wessely, O., et al. (2016b). The polycystin complex mediates Wnt/Ca(2+) signalling. *Nat. Cell Biol.* 18, 752–764.
- Kim, W.J., Back, S.H., Kim, V., Ryu, I., and Jang, S.K. (2005b). Sequestration of TRAF2 into stress granules interrupts tumor necrosis factor signaling under stress conditions. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2450–2462.
- Kim, Y.-J., Osborn, D.P., Lee, J.-Y., Araki, M., Araki, K., Mohun, T., Käsäkoski, J., Brandstack, N., Kim, H.-T., Miralles, F., et al. (2018). WDR11-mediated Hedgehog signalling defects underlie a new ciliopathy related to Kallmann syndrome. *EMBO Rep.* 19, 269–289.
- Kimball, S.R., Horetsky, R.L., Ron, D., Jefferson, L.S., and Harding, H.P. (2003). Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284, C273–284.
- Kiprilov, E.N., Awan, A., Desprat, R., Velho, M., Clement, C.A., Byskov, A.G., Andersen, C.Y., Satir, P., Bouhassira, E.E., Christensen, S.T., et al. (2008). Human embryonic stem cells in culture possess primary cilia with hedgehog signaling machinery. *J. Cell Biol.* 180, 897–904.
- Kishimoto, N., Cao, Y., Park, A., and Sun, Z. (2008). Cystic kidney gene seahorse regulates cilia-mediated processes and Wnt pathways. *Dev. Cell* 14, 954–961.
- Klink, B.U., Zent, E., Juneja, P., Kuhlee, A., Raunser, S., and Wittinghofer, A. (2017). A recombinant BBSome core complex and how it interacts with ciliary cargo. *ELife* 6.
- Knight, M.J., Leettola, C., Gingery, M., Li, H., and Bowie, J.U. (2011). A human sterile alpha motif domain polymerizome. *Protein Sci.* 20, 1697–1706.
- Knight, T., Schaefer, C., Krasa, H., Oberdhan, D., Chapman, A., and Perrone, R.D. (2015). Medical resource utilization and costs associated with autosomal dominant polycystic kidney disease in the USA: a retrospective matched cohort analysis of private insurer data. *Clin. Outcomes Res. CEOR* 7, 123–132.
- 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.
- Kohlhase, J., Wischermann, A., Reichenbach, H., Froster, U., and Engel, W. (1998). Mutations in the SALL1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome. *Nat. Genet.* 18, 81–83.
- Kohli, P., Höhne, M., Jüngst, C., Bertsch, S., Ebert, L.K., Schauss, A.C., Benzing, T., Rinschen, M.M., and Schermer, B. (2017). The ciliary membrane-associated proteome reveals actin-binding proteins as key components of cilia. *EMBO Rep.* 18, 1521–1535.
- Kolisek, M., Launay, P., Beck, A., Sponder, G., Serafini, N., Brenkus, M., Froschauer, E.M., Martens, H., Fleig, A., and Schweigel, M. (2008). SLC41A1 is a novel mammalian Mg²⁺ carrier. *J. Biol. Chem.* 283, 16235–16247.
- König, J., Kranz, B., König, S., Schlingmann, K.P., Titieni, A., Tönshoff, B., Habbig, S., Pape, L., Häffner, K., Hansen, M., et al. (2017). Phenotypic Spectrum of Children with Nephronophthisis and Related Ciliopathies. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 12, 1974–1983.

- Kotsis, F., Nitschke, R., Doerken, M., Walz, G., and Kuehn, E.W. (2008). Flow modulates centriole movements in tubular epithelial cells. *Pflugers Arch.* 456, 1025–1035.
- Koyano, S., Ito, M., Takamatsu, N., Shiba, T., Yamamoto, K., and Yoshioka, K. (1999). A novel Jun N-terminal kinase (JNK)-binding protein that enhances the activation of JNK by MEK kinase 1 and TGF-beta-activated kinase 1. *FEBS Lett.* 457, 385–388.
- Kozminski, K.G., Johnson, K.A., Forscher, P., and Rosenbaum, J.L. (1993). A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5519–5523.
- 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.
- Kramps, T., Peter, O., Brunner, E., Nellen, D., Froesch, B., Chatterjee, S., Murone, M., Züllig, S., and Basler, K. (2002). Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell* 109, 47–60.
- Kraus, M.R.-C., Clauin, S., Pfister, Y., Di Maïo, M., Ulinski, T., Constam, D., Bellanné-Chantelot, C., and Grapin-Botton, A. (2012). Two mutations in human BICC1 resulting in Wnt pathway hyperactivity associated with cystic renal dysplasia. *Hum. Mutat.* 33, 86–90.
- Kreiling, J.A., Prabhat, Williams, G., and Creton, R. (2007). Analysis of Kupffer's vesicle in zebrafish embryos using a cave automated virtual environment. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 236, 1963–1969.
- Krien, M.J., Bugg, S.J., Palatsides, M., Asouline, G., Morimyo, M., and O'Connell, M.J. (1998). A NIMA homologue promotes chromatin condensation in fission yeast. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 7), 967–976.
- von Kries, J.P., Winbeck, G., Asbrand, C., Schwarz-Romond, T., Sochnikova, N., Dell'Oro, A., Behrens, J., and Birchmeier, W. (2000). Hot spots in beta-catenin for interactions with LEF-1, conductin and APC. *Nat. Struct. Biol.* 7, 800–807.
- Kühl, M., Sheldahl, L.C., Malbon, C.C., and Moon, R.T. (2000). Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J. Biol. Chem.* 275, 12701–12711.
- Kulaga, H.M., Leitch, C.C., Eichers, E.R., Badano, J.L., Lesemann, A., Hoskins, B.E., Lupski, J.R., Beales, P.L., Reed, R.R., and Katsanis, N. (2004). Loss of BBS proteins causes anosmia in humans and defects in olfactory cilia structure and function in the mouse. *Nat. Genet.* 36, 994–998.
- Kumar, R., Kotapalli, V., Naz, A., Gowrishankar, S., Rao, S., Pollack, J.R., and Bashyam, M.D. (2018). XPNPEP3 is a novel transcriptional target of canonical Wnt/ β -catenin signaling. *Genes. Chromosomes Cancer* 57, 304–310.
- Kuo, L.J., and Yang, L.-X. (2008). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *Vivo Athens Greece* 22, 305–309.
- Lafrance-Vanasse, J., Williams, G.J., and Tainer, J.A. (2015). Envisioning the dynamics and flexibility of Mre11-Rad50-Nbs1 complex to decipher its roles in DNA replication and repair. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 117, 182–193.
- Lamarche, B.J., Orazio, N.I., and Weitzman, M.D. (2010). The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Lett.* 584, 3682–3695.

- Lancaster, M.A., and Gleeson, J.G. (2009). The primary cilium as a cellular signaling center: lessons from disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *19*, 220–229.
- Lancaster, M.A., Louie, C.M., Silhavy, J.L., Sintasath, L., Decambre, M., Nigam, S.K., Willert, K., and Gleeson, J.G. (2009). Impaired Wnt-beta-catenin signaling disrupts adult renal homeostasis and leads to cystic kidney ciliopathy. *Nat. Med.* *15*, 1046–1054.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* *409*, 860–921.
- Lange, B.M., and Gull, K. (1995). A molecular marker for centriole maturation in the mammalian cell cycle. *J. Cell Biol.* *130*, 919–927.
- Lanoix, J., D'Agati, V., Szabolcs, M., and Trudel, M. (1996). Dysregulation of cellular proliferation and apoptosis mediates human autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Oncogene* *13*, 1153–1160.
- Larson, R.S., Rudloff, M.A., Liapis, H., Manes, J.L., Davila, R., and Kissane, J. (1995). The Ivemark syndrome: prenatal diagnosis of an uncommon cystic renal lesion with heterogeneous associations. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* *9*, 594–598.
- Laurençon, A., Dubruille, R., Efimenko, E., Grenier, G., Bissett, R., Cortier, E., Rolland, V., Swoboda, P., and Durand, B. (2007). Identification of novel regulatory factor X (RFX) target genes by comparative genomics in *Drosophila* species. *Genome Biol.* *8*, R195.
- Lažetić, V., Joseph, B.B., Bernazzani, S.M., and Fay, D.S. (2018). Actin organization and endocytic trafficking are controlled by a network linking NIMA-related kinases to the CDC-42-SID-3/ACK1 pathway. *PLoS Genet.* *14*, e1007313.
- Lazzaretti, D., Tournier, I., and Izaurralde, E. (2009). The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins. *RNA* *15*, 1059–1066.
- Le Merrer, M., Rousseau, F., Legeai-Mallet, L., Landais, J.C., Pelet, A., Bonaventure, J., Sanak, M., Weissenbach, J., Stoll, C., and Munnich, A. (1994). A gene for achondroplasia-hypochondroplasia maps to chromosome 4p. *Nat. Genet.* *6*, 318–321.
- Lee, S., and Weatherbee, S.D. (2010). Synergistic interaction between ciliary genes reflects the importance of mutational load in ciliopathies. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *21*, 724–726.
- Lee, J., Platt, K.A., Censullo, P., and Ruiz i Altaba, A. (1997). Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Dev. Camb. Engl.* *124*, 2537–2552.
- Leettola, C.N., Knight, M.J., Cascio, D., Hoffman, S., and Bowie, J.U. (2014). Characterization of the SAM domain of the PKD-related protein ANKS6 and its interaction with ANKS3. *BMC Struct. Biol.* *14*, 17.
- Leitch, C.C., Zaghloul, N.A., Davis, E.E., Stoetzel, C., Diaz-Font, A., Rix, S., Alfadhel, M., Al-Fadhel, M., Lewis, R.A., Eyaid, W., et al. (2008). Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat. Genet.* *40*, 443–448.

- Lemullois, M., Gounon, P., and Sandoz, D. (1987). Relationships between cytokeratin filaments and centriolar derivatives during ciliogenesis in the quail oviduct. *Biol. Cell* 61, 39–49.
- Leone, M., Cellitti, J., and Pellicchia, M. (2008). NMR studies of a heterotypic Sam-Sam domain association: the interaction between the lipid phosphatase Ship2 and the EphA2 receptor. *Biochemistry (Mosc.)* 47, 12721–12728.
- Leung, A.K.L., Calabrese, J.M., and Sharp, P.A. (2006). Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 18125–18130.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20.
- L'Hernault, S.W., and Rosenbaum, J.L. (1985). Reversal of the posttranslational modification on *Chlamydomonas* flagellar alpha-tubulin occurs during flagellar resorption. *J. Cell Biol.* 100, 457–462.
- Li, J., and Holbrook, N.J. (2004). Elevated gadd153/chop expression and enhanced c-Jun N-terminal protein kinase activation sensitizes aged cells to ER stress. *Exp. Gerontol.* 39, 735–744.
- Li, A., Saito, M., Chuang, J.-Z., Tseng, Y.-Y., Dedesma, C., Tomizawa, K., Kaitsuka, T., and Sung, C.-H. (2011). Ciliary transition zone activation of phosphorylated Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase entry and fate of neural progenitors. *Nat. Cell Biol.* 13, 402–411.
- Li, J., Mahajan, A., and Tsai, M.-D. (2006). Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 15168–15178.
- Li, J., D'Angiolella, V., Seeley, E.S., Kim, S., Kobayashi, T., Fu, W., Campos, E.I., Pagano, M., and Dynlacht, B.D. (2013). USP33 regulates centrosome biogenesis via deubiquitination of the centriolar protein CP110. *Nature* 495, 255–259.
- Lian, S.L., Li, S., Abadal, G.X., Pauley, B.A., Fritzler, M.J., and Chan, E.K.L. (2009). The C-terminal half of human Ago2 binds to multiple GW-rich regions of GW182 and requires GW182 to mediate silencing. *RNA N. Y. N* 15, 804–813.
- Liebau, M.C., Höpker, K., Müller, R.U., Schmedding, I., Zank, S., Schairer, B., Fabretti, F., Höhne, M., Bartram, M.P., Däfinger, C., et al. (2011). Nephrocystin-4 regulates Pyk2-induced tyrosine phosphorylation of nephrocystin-1 to control targeting to monocilia. *J. Biol. Chem.* 286, 14237–14245.
- 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.
- Lim, J., Ha, M., Chang, H., Kwon, S.C., Simanshu, D.K., Patel, D.J., and Kim, V.N. (2014). Uridylation by TUT4 and TUT7 Marks mRNA for Degradation. *Cell* 159, 1365–1376.
- Lin, F., Hiesberger, T., Cordes, K., Sinclair, A.M., Goldstein, L.S.B., Somlo, S., and Igarashi, P. (2003). Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5286–5291.
- Lin, S., Baye, L.M., Westfall, T.A., and Slusarski, D.C. (2010). Wnt5b-Ryk pathway provides directional signals to regulate gastrulation movement. *J. Cell Biol.* 190, 263–278.

- Lin, Y.-C., Niewiadomski, P., Lin, B., Nakamura, H., Phua, S.C., Jiao, J., Levchenko, A., Inoue, T., Rohatgi, R., and Inoue, T. (2013). Chemically inducible diffusion trap at cilia reveals molecular sieve-like barrier. *Nat. Chem. Biol.* 9, 437–443.
- Linder, J.U. (2006). Class III adenylyl cyclases: molecular mechanisms of catalysis and regulation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 1736–1751.
- Lindmo, K., Brech, A., Finley, K.D., Gaumer, S., Contamine, D., Rusten, T.E., and Stenmark, H. (2008). The PI 3-kinase regulator Vps15 is required for autophagic clearance of protein aggregates. *Autophagy* 4, 500–506.
- Lindstrand, A., Davis, E.E., Carvalho, C.M.B., Pehlivan, D., Willer, J.R., Tsai, I.-C., Ramanathan, S., Zuppan, C., Sabo, A., Muzny, D., et al. (2014). Recurrent CNVs and SNVs at the NPHP1 locus contribute pathogenic alleles to Bardet-Biedl syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 94, 745–754.
- Ling, L., and Goeddel, D.V. (2000). MIP-T3, a novel protein linking tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 to the microtubule network. *J. Biol. Chem.* 275, 23852–23860.
- Liu, J., Rivas, F.V., Wohlschlegel, J., Yates, J.R., Parker, R., and Hannon, G.J. (2005). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat. Cell Biol.* 7, 1261–1266.
- Liu, J., Chang, F., Li, F., Fu, H., Wang, J., Zhang, S., Zhao, J., and Yin, D. (2015). Palmitate promotes autophagy and apoptosis through ROS-dependent JNK and p38 MAPK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463, 262–267.
- Liu, Y., Pejchinovski, M., Wang, X., Fu, X., Castelletti, D., Watnick, T.J., Arcaro, A., Siwy, J., Mullen, W., Mischak, H., et al. (2018). Dual mTOR/PI3K inhibition limits PI3K-dependent pathways activated upon mTOR inhibition in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Sci. Rep.* 8, 5584.
- Liu, Y.P., Tsai, I.-C., Morleo, M., Oh, E.C., Leitch, C.C., Massa, F., Lee, B.-H., Parker, D.S., Finley, D., Zaghoul, N.A., et al. (2014). Ciliopathy proteins regulate paracrine signaling by modulating proteasomal degradation of mediators. *J. Clin. Invest.* 124, 2059–2070.
- Loken, A.C., Hanssen, O., Halvorsen, S., and Jolster, N.J. (1961). Hereditary renal dysplasia and blindness. *Acta Paediatr.* 50, 177–184.
- Loschi, M., Leishman, C.C., Berardone, N., and Boccaccio, G.L. (2009). Dynein and kinesin regulate stress-granule and P-body dynamics. *J. Cell Sci.* 122, 3973–3982.
- Louie, C.M., Caridi, G., Lopes, V.S., Brancati, F., Kispert, A., Lancaster, M.A., Schlossman, A.M., Otto, E.A., Leitges, M., Gröne, H.-J., et al. (2010). AHI1 is required for photoreceptor outer segment development and is a modifier for retinal degeneration in nephronophthisis. *Nat. Genet.* 42, 175–180.
- Louie, R.K., Bahmanyar, S., Siemers, K.A., Votin, V., Chang, P., Stearns, T., Nelson, W.J., and Barth, A.I.M. (2004). Adenomatous polyposis coli and EB1 localize in close proximity of the mother centriole and EB1 is a functional component of centrosomes. *J. Cell Sci.* 117, 1117–1128.
- 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/EHD3-dependent ciliary vesicle formation. *Nat. Cell Biol.* 17, 228–240.
- Lykke-Andersen, J. (2002). Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Mol. Cell. Biol.* 22, 8114–8121.

- Ma, M., Tian, X., Igarashi, P., Pazour, G.J., and Somlo, S. (2013). Loss of cilia suppresses cyst growth in genetic models of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat. Genet.* **45**, 1004–1012.
- Machuca, E., Benoit, G., and Antignac, C. (2009). Genetics of nephrotic syndrome: connecting molecular genetics to podocyte physiology. *Hum. Mol. Genet.* **18**, R185–194.
- Macia, M.S., Halbritter, J., Delous, M., Bredrup, C., Gutter, A., Filhol, E., Mellgren, A.E.C., Leh, S., Bizet, A., Braun, D.A., et al. (2017). Mutations in MAPKBP1 Cause Juvenile or Late-Onset Cilia-Independent Nephronophthisis. *Am. J. Hum. Genet.* **100**, 323–333.
- Mahjoub, M.R., and Stearns, T. (2012). Supernumerary centrosomes nucleate extra cilia and compromise primary cilium signaling. *Curr. Biol.* **22**, 1628–1634.
- Mahuzier, A., Gaudé, H.-M., Grampa, V., Anselme, I., Silbermann, F., Leroux-Berger, M., Delacour, D., Ezan, J., Montcouquiol, M., Saunier, S., et al. (2012). Dishevelled stabilization by the ciliopathy protein Rpgrip1l is essential for planar cell polarity. *J. Cell Biol.* **198**, 927–940.
- Mainzer, F., Saldino, R.M., Ozonoff, M.B., and Minagi, H. (1970). Familial nephropathy associated with retinitis pigmentosa, cerebellar ataxia and skeletal abnormalities. *Am. J. Med.* **49**, 556–562.
- Maisonneuve, C., Guilleret, I., Vick, P., Weber, T., Andre, P., Beyer, T., Blum, M., and Constam, D.B. (2009). Bicaudal C, a novel regulator of Dvl signaling abutting RNA-processing bodies, controls cilia orientation and leftward flow. *Dev. Camb. Engl.* **136**, 3019–3030.
- Makita, R., Uchijima, Y., Nishiyama, K., Amano, T., Chen, Q., Takeuchi, T., Mitani, A., Nagase, T., Yatomi, Y., Aburatani, H., et al. (2008). Multiple renal cysts, urinary concentration defects, and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **294**, F542–553.
- Mallory, A.C., Reinhart, B.J., Jones-Rhoades, M.W., Tang, G., Zamore, P.D., Barton, M.K., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *EMBO J.* **23**, 3356–3364.
- Mandt, T., Song, Y., Scharenberg, A.M., and Sahni, J. (2011). SLC41A1 Mg(2+) transport is regulated via Mg(2+)-dependent endosomal recycling through its N-terminal cytoplasmic domain. *Biochem. J.* **439**, 129–139.
- Manning, D.K., Sergeev, M., van Heesbeen, R.G., Wong, M.D., Oh, J.-H., Liu, Y., Henkelman, R.M., Drummond, I., Shah, J.V., and Beier, D.R. (2013). Loss of the ciliary kinase Nek8 causes left-right asymmetry defects. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **24**, 100–112.
- Marcet, B., Chevalier, B., Luxardi, G., Coraux, C., Zaragosi, L.-E., Cibois, M., Robbe-Sermesant, K., Jolly, T., Cardinaud, B., Moreilhon, C., et al. (2011a). Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat. Cell Biol.* **13**, 693–699.
- Marcet, B., Chevalier, B., Coraux, C., Kodjabachian, L., and Barbry, P. (2011b). MicroRNA-based silencing of Delta/Notch signaling promotes multiple cilia formation. *Cell Cycle Georget. Tex* **10**, 2858–2864.
- Marigo, V., Johnson, R.L., Vortkamp, A., and Tabin, C.J. (1996). Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Dev. Biol.* **180**, 273–283.

Markmiller, S., Soltanieh, S., Server, K.L., Mak, R., Jin, W., Fang, M.Y., Luo, E.-C., Krach, F., Yang, D., Sen, A., et al. (2018). Context-Dependent and Disease-Specific Diversity in Protein Interactions within Stress Granules. *Cell* 172, 590-604.e13.

Marshall, W.F., and Rosenbaum, J.L. (2001). Intraflagellar transport balances continuous turnover of outer doublet microtubules: implications for flagellar length control. *J. Cell Biol.* 155, 405–414.

Marszalek, J.R., Ruiz-Lozano, P., Roberts, E., Chien, K.R., and Goldstein, L.S. (1999). Situs inversus and embryonic ciliary morphogenesis defects in mouse mutants lacking the KIF3A subunit of kinesin-II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5043–5048.

Martin, L., Kaci, N., Estibals, V., Goudin, N., Garfa-Traore, M., Benoist-Lasselin, C., Dambroise, E., and Legeai-Mallet, L. (2018). Constitutively-active FGFR3 disrupts primary cilium length and IFT20 trafficking in various chondrocyte models of achondroplasia. *Hum. Mol. Genet.* 27, 1–13.

Martínez, J., Ren, Y.G., Nilsson, P., Ehrenberg, M., and Virtanen, A. (2001). The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation. *J. Biol. Chem.* 276, 27923–27929.

Martín-Hernández, E., García-Silva, M.T., Vara, J., Campos, Y., Cabello, A., Muley, R., Del Hoyo, P., Martín, M.A., and Arenas, J. (2005). Renal pathology in children with mitochondrial diseases. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 20, 1299–1305.

Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell* 10, 417–426.

Massagué, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753–791.

Massagué, J., Seoane, J., and Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19, 2783–2810.

Masyuk, A.I., Masyuk, T.V., and LaRusso, N.F. (2008). Cholangiocyte primary cilia in liver health and disease. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 237, 2007–2012.

Mathys, H., Basquin, J., Ozgur, S., Czarnocki-Cieciura, M., Bonneau, F., Aartse, A., Dziembowski, A., Nowotny, M., Conti, E., and Filipowicz, W. (2014). Structural and Biochemical Insights to the Role of the CCR4-NOT Complex and DDX6 ATPase in MicroRNA Repression. *Mol. Cell* 54, 751–765.

May, S.R., Ashique, A.M., Karlen, M., Wang, B., Shen, Y., Zarbalis, K., Reiter, J., Ericson, J., and Peterson, A.S. (2005). Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli. *Dev. Biol.* 287, 378–389.

Mazroui, R., Huot, M.-E., Tremblay, S., Filion, C., Labelle, Y., and Khandjian, E.W. (2002). Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum. Mol. Genet.* 11, 3007–3017.

McEwen, D.P., Jenkins, P.M., and Martens, J.R. (2008). Olfactory cilia: our direct neuronal connection to the external world. *Curr. Top. Dev. Biol.* 85, 333–370.

McInerney-Leo, A.M., Schmidts, M., Cortés, C.R., Leo, P.J., Gener, B., Courtney, A.D., Gardiner, B., Harris, J.A., Lu, Y., Marshall, M., et al. (2013). Short-rib polydactyly and Jeune syndromes are caused by mutations in WDR60. *Am. J. Hum. Genet.* 93, 515–523.

- McIntyre, J.C., Davis, E.E., Joiner, A., Williams, C.L., Tsai, I.-C., Jenkins, P.M., McEwen, D.P., Zhang, L., Escobado, J., Thomas, S., et al. (2012). Gene therapy rescues cilia defects and restores olfactory function in a mammalian ciliopathy model. *Nat. Med.* *18*, 1423–1428.
- McQuinn, T.C., Miga, D.E., Mjaatvedt, C.H., Phelps, A.L., and Wessels, A. (2001). Cardiopulmonary malformations in the *inv/inv* mouse. *Anat. Rec.* *263*, 62–71.
- Meijer, H.A., Kong, Y.W., Lu, W.T., Wilczynska, A., Spriggs, R.V., Robinson, S.W., Godfrey, J.D., Willis, A.E., and Bushell, M. (2013). Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science* *340*, 82–85.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* *15*, 185–197.
- Meran, S., and Steadman, R. (2011). Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int. J. Exp. Pathol.* *92*, 158–167.
- Mercey, O., Kodjabachian, L., Barbry, P., and Marcet, B. (2016). MicroRNAs as key regulators of GTPase-mediated apical actin reorganization in multiciliated epithelia. *Small GTPases* *7*, 54–58.
- Mick, D.U., Rodrigues, R.B., Leib, R.D., Adams, C.M., Chien, A.S., Gygi, S.P., and Nachury, M.V. (2015). Proteomics of Primary Cilia by Proximity Labeling. *Dev. Cell* *35*, 497–512.
- Minamino, T., and Kitakaze, M. (2010). ER stress in cardiovascular disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *48*, 1105–1110.
- Mishima, Y., Fukao, A., Kishimoto, T., Sakamoto, H., Fujiwara, T., and Inoue, K. (2012). Translational inhibition by deadenylation-independent mechanisms is central to microRNA-mediated silencing in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 1104–1109.
- Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Abbott, A.L., Lau, N.C., Hellman, A.B., McGonagle, S.M., Bartel, D.P., Ambros, V.R., and Horvitz, H.R. (2007). Most *Caenorhabditis elegans* microRNAs are individually not essential for development or viability. *PLoS Genet.* *3*, e215.
- Mitchell, P., and Tollervey, D. (2000). mRNA stability in eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *10*, 193–198.
- Mitchell, P., and Tollervey, D. (2001). mRNA turnover. *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*, 320–325.
- Mochizuki, T., Wu, G., Hayashi, T., Xenophontos, S.L., Veldhuisen, B., Saris, J.J., Reynolds, D.M., Cai, Y., Gabow, P.A., Pierides, A., et al. (1996). PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* *272*, 1339–1342.
- Mochizuki, T., Saijoh, Y., Tsuchiya, K., Shirayoshi, Y., Takai, S., Taya, C., Yonekawa, H., Yamada, K., Nihei, H., Nakatsuji, N., et al. (1998). Cloning of *inv*, a gene that controls left/right asymmetry and kidney development. *Nature* *395*, 177–181.
- Modzelewska, K., Newman, L.P., Desai, R., and Keely, P.J. (2006). Ack1 mediates Cdc42-dependent cell migration and signaling to p130Cas. *J. Biol. Chem.* *281*, 37527–37535.
- Moeller, H.B., Fuglsang, C.H., Pedersen, C.N., and Fenton, R.A. (2018). Basolateral cholesterol depletion alters Aquaporin-2 post-translational modifications and disrupts apical plasma membrane targeting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *495*, 157–162.

- 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.
- Mohieldin, A.M., Haymour, H.S., Lo, S.T., AbouAlaiwi, W.A., Atkinson, K.F., Ward, C.J., Gao, M., Wessely, O., and Nauli, S.M. (2015). Protein composition and movements of membrane swellings associated with primary cilia. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **72**, 2415–2429.
- Mollet, G., Salomon, R., Gribouval, O., Silbermann, F., Bacq, D., Landthaler, G., Milford, D., Nayir, A., Rizzoni, G., Antignac, C., et al. (2002). The gene mutated in juvenile nephronophthisis type 4 encodes a novel protein that interacts with nephrocystin. *Nat. Genet.* **32**, 300–305.
- Mollet, G., Silbermann, F., Delous, M., Salomon, R., Antignac, C., and Saunier, S. (2005). Characterization of the nephrocystin/nephrocystin-4 complex and subcellular localization of nephrocystin-4 to primary cilia and centrosomes. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 645–656.
- Mollet, S., Cougot, N., Wilczynska, A., Dautry, F., Kress, M., Bertrand, E., and Weil, D. (2008). Translationally repressed mRNA transiently cycles through stress granules during stress. *Mol. Biol. Cell* **19**, 4469–4479.
- Moniz, L.S., and Stambolic, V. (2011). Nek10 mediates G2/M cell cycle arrest and MEK autoactivation in response to UV irradiation. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 30–42.
- Moore, B.S., Stepanchick, A.N., Tewson, P.H., Hartle, C.M., Zhang, J., Quinn, A.M., Hughes, T.E., and Mirshahi, T. (2016). Cilia have high cAMP levels that are inhibited by Sonic Hedgehog-regulated calcium dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 13069–13074.
- Morga, B., and Bastin, P. (2013). Getting to the heart of intraflagellar transport using Trypanosoma and Chlamydomonas models: the strength is in their differences. *Cilia* **2**, 16.
- Morgan, D., Eley, L., Sayer, J., Strachan, T., Yates, L.M., Craighead, A.S., and Goodship, J.A. (2002). Expression analyses and interaction with the anaphase promoting complex protein Apc2 suggest a role for inversin in primary cilia and involvement in the cell cycle. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 3345–3350.
- Morin-Kensicki, E.M., Boone, B.N., Howell, M., Stonebraker, J.R., Teed, J., Alb, J.G., Magnuson, T.R., O’Neal, W., and Milgram, S.L. (2006). Defects in yolk sac vasculogenesis, chorioallantoic fusion, and embryonic axis elongation in mice with targeted disruption of Yap65. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 77–87.
- Morris, R.L., and Scholey, J.M. (1997). Heterotrimeric kinesin-II is required for the assembly of motile 9+2 ciliary axonemes on sea urchin embryos. *J. Cell Biol.* **138**, 1009–1022.
- Morris, J.A., Kandpal, G., Ma, L., and Austin, C.P. (2003). DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) is a centrosome-associated protein that interacts with MAP1A, MIPT3, ATF4/5 and NUDEL: regulation and loss of interaction with mutation. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1591–1608.
- Mosavi, L.K., Cammett, T.J., Desrosiers, D.C., and Peng, Z.-Y. (2004). The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **13**, 1435–1448.
- Moser, J.J., Fritzler, M.J., and Rattner, J.B. (2011). Repression of GW/P body components and the RNAi microprocessor impacts primary ciliogenesis in human astrocytes. *BMC Cell Biol.* **12**, 37.
- Mosimann, C., Hausmann, G., and Basler, K. (2006). Parafibromin/Hyrax activates Wnt/Wg target gene transcription by direct association with beta-catenin/Armadillo. *Cell* **125**, 327–341.

- Moudgil, A., Bagga, A., Kamil, E.S., Rimoin, D.L., Lachman, R.S., Cohen, A.H., and Jordan, S.C. (1998). Nephronophthisis associated with Ellis-van Creveld syndrome. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* *12*, 20–22.
- Mourão, A., Nager, A.R., Nachury, M.V., and Lorentzen, E. (2014). Structural basis for membrane targeting of the BBSome by ARL6. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *21*, 1035–1041.
- Mukherjee, D., Gao, M., O'Connor, J.P., Raijmakers, R., Pruijn, G., Lutz, C.S., and Wilusz, J. (2002). The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.* *21*, 165–174.
- Mukherjee, S., Jansen, V., Jikeli, J.F., Hamzeh, H., Alvarez, L., Dombrowski, M., Balbach, M., Strünker, T., Seifert, R., Kaupp, U.B., et al. (2016). A novel biosensor to study cAMP dynamics in cilia and flagella. *ELife* *5*.
- Mukhopadhyay, S., Lu, Y., Qin, H., Lanjuin, A., Shaham, S., and Sengupta, P. (2007). Distinct IFT mechanisms contribute to the generation of ciliary structural diversity in *C. elegans*. *EMBO J.* *26*, 2966–2980.
- Mukhopadhyay, S., Lu, Y., Shaham, S., and Sengupta, P. (2008). Sensory signaling-dependent remodeling of olfactory cilia architecture in *C. elegans*. *Dev. Cell* *14*, 762–774.
- Mukhopadhyay, S., Wen, X., Ratti, N., Loktev, A., Rangell, L., Scales, S.J., and Jackson, P.K. (2013). The ciliary G-protein-coupled receptor Gpr161 negatively regulates the Sonic hedgehog pathway via cAMP signaling. *Cell* *152*, 210–223.
- Murcia, N.S., Richards, W.G., Yoder, B.K., Mucenski, M.L., Dunlap, J.R., and Woychik, R.P. (2000). The Oak Ridge Polycystic Kidney (*orpk*) disease gene is required for left-right axis determination. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 2347–2355.
- Mykytyn, K., Mullins, R.F., Andrews, M., Chiang, A.P., Swiderski, R.E., Yang, B., Braun, T., Casavant, T., Stone, E.M., and Sheffield, V.C. (2004). Bardet-Biedl syndrome type 4 (BBS4)-null mice implicate Bbs4 in flagella formation but not global cilia assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 8664–8669.
- 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.
- Nagao, S., Morita, M., Kugita, M., Yoshihara, D., Yamaguchi, T., Kurahashi, H., Calvet, J.P., and Wallace, D.P. (2010). Polycystic kidney disease in Han:SPRD Cy rats is associated with elevated expression and mislocalization of SamCystin. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *299*, F1078–1086.
- Nager, A.R., Goldstein, J.S., Herranz-Pérez, V., Portran, D., Ye, F., Garcia-Verdugo, J.M., and Nachury, M.V. (2017). An Actin Network Dispatches Ciliary GPCRs into Extracellular Vesicles to Modulate Signaling. *Cell* *168*, 252–263.e14.
- Najafi, M., Maza, N.A., and Calvert, P.D. (2012). Steric volume exclusion sets soluble protein concentrations in photoreceptor sensory cilia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 203–208.
- 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.

- Nakajima, Y., Kiyonari, H., Mukumoto, Y., and Yokoyama, T. (2018). The Inv compartment of renal cilia is an intraciliary signal activating center to phosphorylate ANKS6. *Kidney Int.*
- Nakao, A., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., Kawabata, M., Ishisaki, A., Oeda, E., Tamaki, K., Hanai, J., Heldin, C.H., Miyazono, K., et al. (1997). TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J.* *16*, 5353–5362.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., and Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 458–467.
- 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. CB* *17*, 2169–2174.
- Nalbant, P., Chang, Y.-C., Birkenfeld, J., Chang, Z.-F., and Bokoch, G.M. (2009). Guanine nucleotide exchange factor-H1 regulates cell migration via localized activation of RhoA at the leading edge. *Mol. Biol. Cell* *20*, 4070–4082.
- Nauli, S.M., Alenghat, F.J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A.E.H., Lu, W., Brown, E.M., Quinn, S.J., et al. (2003). Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat. Genet.* *33*, 129–137.
- Nauli, S.M., Kawanabe, Y., Kaminski, J.J., Pearce, W.J., Ingber, D.E., and Zhou, J. (2008). Endothelial cilia are fluid shear sensors that regulate calcium signaling and nitric oxide production through polycystin-1. *Circulation* *117*, 1161–1171.
- Neugebauer, J.M., Amack, J.D., Peterson, A.G., Bisgrove, B.W., and Yost, H.J. (2009). FGF signalling during embryo development regulates cilia length in diverse epithelia. *Nature* *458*, 651–654.
- Nguyen-Khoa, T., Massy, Z.A., De Bandt, J.P., Kebede, M., Salama, L., Lambrey, G., Witko-Sarsat, V., Drüeke, T.B., Lacour, B., and Thévenin, M. (2001). Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* *16*, 335–340.
- Niaudet, P. (1998). Mitochondrial disorders and the kidney. *Arch. Dis. Child.* *78*, 387–390.
- Nielsen, S.K., Møllgård, K., Clement, C.A., Veland, I.R., Awan, A., Yoder, B.K., Novak, I., and Christensen, S.T. (2008). Characterization of primary cilia and Hedgehog signaling during development of the human pancreas and in human pancreatic duct cancer cell lines. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *237*, 2039–2052.
- Nishihara, T., Zekri, L., Braun, J.E., and Izaurralde, E. (2013). miRISC recruits decapping factors to miRNA targets to enhance their degradation. *Nucleic Acids Res.* *41*, 8692–8705.
- Nishimura, T., Padamsi, Z., Fakim, H., Milette, S., Dunham, W.H., Gingras, A.-C., and Fabian, M.R. (2015). The eIF4E-Binding Protein 4E-T Is a Component of the mRNA Decay Machinery that Bridges the 5' and 3' Termini of Target mRNAs. *Cell Rep.* *11*, 1425–1436.
- Nishimura, Y., Applegate, K., Davidson, M.W., Danuser, G., and Waterman, C.M. (2012). Automated screening of microtubule growth dynamics identifies MARK2 as a regulator of leading edge microtubules downstream of Rac1 in migrating cells. *PloS One* *7*, e41413.
- Nishio, S., Tian, X., Gallagher, A.R., Yu, Z., Patel, V., Igarashi, P., and Somlo, S. (2010). Loss of oriented cell division does not initiate cyst formation. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *21*, 295–302.

- Noda, K., Kitami, M., Kitami, K., Kaku, M., and Komatsu, Y. (2016). Canonical and noncanonical intraflagellar transport regulates craniofacial skeletal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E2589-2597.
- 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.
- Nonhoff, U., Ralser, M., Welzel, F., Piccini, I., Balzereit, D., Yaspo, M.-L., Lehrach, H., and Krobitsch, S. (2007). Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules. *Mol. Biol. Cell* *18*, 1385–1396.
- Norris, D.P. (2012). Cilia, calcium and the basis of left-right asymmetry. *BMC Biol.* *10*, 102.
- Nover, L., Scharf, K.D., and Neumann, D. (1989). Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 1298–1308.
- Nürnberg, J., Bacallao, R.L., and Phillips, C.L. (2002). Inversin forms a complex with catenins and N-cadherin in polarized epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* *13*, 3096–3106.
- Nürnberg, J., Kribben, A., Opazo Saez, A., Heusch, G., Philipp, T., and Phillips, C.L. (2004). The *Invs* gene encodes a microtubule-associated protein. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *15*, 1700–1710.
- Nüsslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* *287*, 795–801.
- Nygaard, M.B., Almstrup, K., Lindbæk, L., Christensen, S.T., and Svingen, T. (2015). Cell context-specific expression of primary cilia in the human testis and ciliary coordination of Hedgehog signalling in mouse Leydig cells. *Sci. Rep.* *5*, 10364.
- Ocbina, P.J.R., and Anderson, K.V. (2008). Intraflagellar transport, cilia, and mammalian Hedgehog signaling: analysis in mouse embryonic fibroblasts. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *237*, 2030–2038.
- Ocbina, P.J.R., Tuson, M., and Anderson, K.V. (2009). Primary Cilia Are Not Required for Normal Canonical Wnt Signaling in the Mouse Embryo. *PLoS ONE* *4*.
- O’Connell, M.J., Krien, M.J.E., and Hunter, T. (2003). Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol.* *13*, 221–228.
- 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 Devoted Mol. Cell. Mech.* *19*, 927–940.
- O’Dea, D., Parfrey, P.S., Harnett, J.D., Hefferton, D., Cramer, B.C., and Green, J. (1996). The importance of renal impairment in the natural history of Bardet-Biedl syndrome. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* *27*, 776–783.
- Ohn, T., Kedersha, N., Hickman, T., Tisdale, S., and Anderson, P. (2008). A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1224–1231.

- Okabe, N., Xu, B., and Burdine, R.D. (2008). Fluid dynamics in zebrafish Kupffer's vesicle. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 237, 3602–3612.
- Olbrich, H., Häffner, K., Kispert, A., Völkel, A., Volz, A., Sasmaz, G., Reinhardt, R., Hennig, S., Lehrach, H., Konietzko, N., et al. (2002). Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. *Nat. Genet.* 30, 143–144.
- Olbrich, H., Fliegauf, M., Hoefele, J., Kispert, A., Otto, E., Volz, A., Wolf, M.T., Sasmaz, G., Trauer, U., Reinhardt, R., et al. (2003). Mutations in a novel gene, NPHP3, cause adolescent nephronophthisis, tapeto-retinal degeneration and hepatic fibrosis. *Nat. Genet.* 34, 455–459.
- Olsen, O., Funke, L., Long, J., Fukata, M., Kazuta, T., Trinidad, J.C., Moore, K.A., Misawa, H., Welling, P.A., Burlingame, A.L., et al. (2007). Renal defects associated with improper polarization of the CRB and DLG polarity complexes in MALS-3 knockout mice. *J. Cell Biol.* 179, 151–164.
- Omori, Y., and Malicki, J. (2006). oko meduzy and related crumbs genes are determinants of apical cell features in the vertebrate embryo. *Curr. Biol. CB* 16, 945–957.
- Omran, H., Fernandez, C., Jung, M., Häffner, K., Fargier, B., Villaquiran, A., Waldherr, R., Gretz, N., Brandis, M., Rüschemdorf, F., et al. (2000). Identification of a new gene locus for adolescent nephronophthisis, on chromosome 3q22 in a large Venezuelan pedigree. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 118–127.
- O'regan, L., Blot, J., and Fry, A.M. (2007). Mitotic regulation by NIMA-related kinases. *Cell Div.* 2, 25.
- Ornitz, D.M., and Legeai-Mallet, L. (2017). Achondroplasia: Development, pathogenesis, and therapy. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 246, 291–309.
- Ornitz, D.M., and Marie, P.J. (2015). Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes Dev.* 29, 1463–1486.
- Osborn, D.P.S., Roccasecca, R.M., McMurray, F., Hernandez-Hernandez, V., Mukherjee, S., Barroso, I., Stemple, D., Cox, R., Beales, P.L., and Christou-Savina, S. (2014). Loss of FTO antagonises Wnt signaling and leads to developmental defects associated with ciliopathies. *PLoS One* 9, e87662.
- O'Toole, J.F., Liu, Y., Davis, E.E., Westlake, C.J., Attanasio, M., Otto, E.A., Seelow, D., Nurnberg, G., Becker, C., Nuutinen, M., et al. (2010). Individuals with mutations in XPNPEP3, which encodes a mitochondrial protein, develop a nephronophthisis-like nephropathy. *J. Clin. Invest.* 120, 791–802.
- Otto, E.A., Schermer, B., Obara, T., O'Toole, J.F., Hiller, K.S., Mueller, A.M., Ruf, R.G., Hoefele, J., Beekmann, F., Landau, D., et al. (2003). Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nat. Genet.* 34, 413–420.
- Otto, E.A., Loeys, B., Khanna, H., Hellemans, J., Sudbrak, R., Fan, S., Muerb, U., O'Toole, J.F., Helou, J., Attanasio, M., et al. (2005). Nephrocystin-5, a ciliary IQ domain protein, is mutated in Senior-Loken syndrome and interacts with RPGR and calmodulin. *Nat. Genet.* 37, 282–288.
- Otto, E.A., Trapp, M.L., Schultheiss, U.T., Helou, J., Quarmby, L.M., and Hildebrandt, F. (2008a). NEK8 Mutations Affect Ciliary and Centrosomal Localization and May Cause Nephronophthisis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 19, 587–592.

- Otto, E.A., Helou, J., Allen, S.J., O'Toole, J.F., Wise, E.L., Ashraf, S., Attanasio, M., Zhou, W., Wolf, M.T.F., and Hildebrandt, F. (2008b). Mutation analysis in nephronophthisis using a combined approach of homozygosity mapping, CEL I endonuclease cleavage, and direct sequencing. *Hum. Mutat.* **29**, 418–426.
- Otto, E.A., Tory, K., Attanasio, M., Zhou, W., Chaki, M., Paruchuri, Y., Wise, E.L., Wolf, M.T.F., Utsch, B., Becker, C., et al. (2009). Hypomorphic mutations in meckelin (MKS3/TMEM67) cause nephronophthisis with liver fibrosis (NPHP11). *J. Med. Genet.* **46**, 663–670.
- Otto, E.A., Hurd, T.W., Airik, R., Chaki, M., Zhou, W., Stoetzel, C., Patil, S.B., Levy, S., Ghosh, A.K., Murga-Zamalloa, C.A., et al. (2010). Candidate exome capture identifies mutation of SDCCAG8 as the cause of a retinal-renal ciliopathy. *Nat. Genet.* **42**, 840–850.
- Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.-R., Zhang, Y., and Wrana, J.L. (2005). Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* **307**, 1603–1609.
- Ozgur, S., Chekulaeva, M., and Stoecklin, G. (2010). Human Pat1b connects deadenylation with mRNA decapping and controls the assembly of processing bodies. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 4308–4323.
- Paintrand, M., Moudjou, M., Delacroix, H., and Bornens, M. (1992). Centrosome organization and centriole architecture: their sensitivity to divalent cations. *J. Struct. Biol.* **108**, 107–128.
- Palmer, K.J., MacCarthy-Morrogh, L., Smyllie, N., and Stephens, D.J. (2011). A role for Tctex-1 (DYNLT1) in controlling primary cilium length. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 865–871.
- Pampliega, O., Orhon, I., Patel, B., Sridhar, S., Díaz-Carretero, A., Beau, I., Codogno, P., Satir, B.H., Satir, P., and Cuervo, A.M. (2013). Functional interaction between autophagy and ciliogenesis. *Nature* **502**, 194–200.
- Pan, D. (2007). Hippo signaling in organ size control. *Genes Dev.* **21**, 886–897.
- Pan, J., and Snell, W. (2007). The primary cilium: keeper of the key to cell division. *Cell* **129**, 1255–1257.
- Pan, J., You, Y., Huang, T., and Brody, S.L. (2007). RhoA-mediated apical actin enrichment is required for ciliogenesis and promoted by Foxj1. *J. Cell Sci.* **120**, 1868–1876.
- Paoletti, A., Moudjou, M., Paintrand, M., Salisbury, J.L., and Bornens, M. (1996). Most of centrin in animal cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. *J. Cell Sci.* **109** (Pt 13), 3089–3102.
- Parisi, M.A., and Dobyns, W.B. (2003). Human malformations of the midbrain and hindbrain: review and proposed classification scheme. *Mol. Genet. Metab.* **80**, 36–53.
- Park, J., and Rhee, K. (2013). NEK2 phosphorylation antagonizes the microtubule stabilizing activity of centrobilin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **431**, 302–308.
- Park, S., Blaser, S., Marchal, M.A., Houston, D.W., and Sheets, M.D. (2016). A gradient of maternal Bicaudal-C controls vertebrate embryogenesis via translational repression of mRNAs encoding cell fate regulators. *Dev. Camb. Engl.* **143**, 864–871.

- Park, T.J., Haigo, S.L., and Wallingford, J.B. (2006). Ciliogenesis defects in embryos lacking inturned or fuzzy function are associated with failure of planar cell polarity and Hedgehog signaling. *Nat. Genet.* **38**, 303–311.
- 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.
- Parker, R., and Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol. Cell* **25**, 635–646.
- Patel, V., Li, L., Cobo-Stark, P., Shao, X., Somlo, S., Lin, F., and Igarashi, P. (2008). Acute kidney injury and aberrant planar cell polarity induce cyst formation in mice lacking renal cilia. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1578–1590.
- Paul, B.M., Consugar, M.B., Ryan Lee, M., Sundsbak, J.L., Heyer, C.M., Rossetti, S., Kubly, V.J., Hopp, K., Torres, V.E., Coto, E., et al. (2014). Evidence of a third ADPKD locus is not supported by re-analysis of designated PKD3 families. *Kidney Int.* **85**, 383–392.
- Pazour, G.J., Dickert, B.L., Vucica, Y., Seeley, E.S., Rosenbaum, J.L., Witman, G.B., and Cole, D.G. (2000). Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *J. Cell Biol.* **151**, 709–718.
- Pazour, G.J., Baker, S.A., Deane, J.A., Cole, D.G., Dickert, B.L., Rosenbaum, J.L., Witman, G.B., and Besharse, J.C. (2002). The intraflagellar transport protein, IFT88, is essential for vertebrate photoreceptor assembly and maintenance. *J. Cell Biol.* **157**, 103–113.
- Pedersen, L.B., and Rosenbaum, J.L. (2008). Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling. *Curr. Top. Dev. Biol.* **85**, 23–61.
- Peel, N., Stevens, N.R., Basto, R., and Raff, J.W. (2007). Overexpressing centriole-replication proteins in vivo induces centriole overduplication and de novo formation. *Curr. Biol. CB* **17**, 834–843.
- Pennarun, G., Escudier, E., Chapelin, C., Bridoux, A.M., Cacheux, V., Roger, G., Clément, A., Goossens, M., Amselem, S., and Duriez, B. (1999). Loss-of-function mutations in a human gene related to Chlamydomonas reinhardtii dynein IC78 result in primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 1508–1519.
- Pennarun, G., Chapelin, C., Escudier, E., Bridoux, A.M., Dastot, F., Cacheux, V., Goossens, M., Amselem, S., and Duriez, B. (2000). The human dynein intermediate chain 2 gene (DNAI2): cloning, mapping, expression pattern, and evaluation as a candidate for primary ciliary dyskinesia. *Hum. Genet.* **107**, 642–649.
- Peränen, J. (2011). Rab8 GTPase as a regulator of cell shape. *Cytoskelet. Hoboken NJ* **68**, 527–539.
- Perez-Pepe, M., Fernández-Alvarez, A.J., and Boccaccio, G.L. (2018). Life and Work of Stress Granules and Processing Bodies: New Insights into Their Formation and Function. *Biochemistry (Mosc.)*.
- Perkins, L.A., Hedgecock, E.M., Thomson, J.N., and Culotti, J.G. (1986). Mutant sensory cilia in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **117**, 456–487.

- Perrault, I., Saunier, S., Hanein, S., Filhol, E., Bizet, A.A., Collins, F., Salih, M.A.M., Gerber, S., Delphin, N., Bigot, K., et al. (2012). Mainzer-Saldino syndrome is a ciliopathy caused by IFT140 mutations. *Am. J. Hum. Genet.* *90*, 864–870.
- Philipp, M., and Caron, M.G. (2009). Hedgehog signaling: is Smo a G protein-coupled receptor? *Curr. Biol.* *19*, R125–127.
- Piao, X., Zhang, X., Wu, L., and Belasco, J.G. (2010). CCR4-NOT Deadens mRNA Associated with RNA-Induced Silencing Complexes in Human Cells. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 1486–1494.
- Piazzon, N., Maisonneuve, C., Guilleret, I., Rotman, S., and Constam, D.B. (2012). Bicc1 links the regulation of cAMP signaling in polycystic kidneys to microRNA-induced gene silencing. *J. Mol. Cell Biol.* *4*, 398–408.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of Translational Initiation by Let-7 MicroRNA in Human Cells. *Science* *309*, 1573–1576.
- Piontek, K., Menezes, L.F., Garcia-Gonzalez, M.A., Huso, D.L., and Germino, G.G. (2007). A critical developmental switch defines the kinetics of kidney cyst formation after loss of Pkd1. *Nat. Med.* *13*, 1490–1495.
- Piperno, G., and Mead, K. (1997). Transport of a novel complex in the cytoplasmic matrix of *Chlamydomonas* flagella. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 4457–4462.
- Pistor, K., Olbing, H., and Schäfer, K. (1985). Children with chronic renal failure in the Federal Republic of Germany: I. Epidemiology, modes of treatment, survival. *Arbeits- gemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie. Clin. Nephrol.* *23*, 272–277.
- Pitaval, A., Tseng, Q., Bornens, M., and Théry, M. (2010). Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle-arrested cells. *J. Cell Biol.* *191*, 303–312.
- Plessmann, U., and Weber, K. (1997). Mammalian sperm tubulin: an exceptionally large number of variants based on several posttranslational modifications. *J. Protein Chem.* *16*, 385–390.
- Pletz, N., Medack, A., Rieß, E.M., Yang, K., Kazerouni, Z.B., Hüber, D., and Hoyer-Fender, S. (2013). Transcriptional activation of Odf2/Cenexin by cell cycle arrest and the stress activated signaling pathway (JNK pathway). *Biochim. Biophys. Acta* *1833*, 1338–1346.
- Porath, B., Gainullin, V.G., Cornec-Le Gall, E., Dillinger, E.K., Heyer, C.M., Hopp, K., Edwards, M.E., Madsen, C.D., Mauritz, S.R., Banks, C.J., et al. (2016). Mutations in GANAB, Encoding the Glucosidase II α Subunit, Cause Autosomal-Dominant Polycystic Kidney and Liver Disease. *Am. J. Hum. Genet.* *98*, 1193–1207.
- Potter, D.E., Holliday, M.A., Piel, C.F., Feduska, N.J., Belzer, F.O., and Salvatierra, O. (1980). Treatment of end-stage renal disease in children: a 15-year experience. *Kidney Int.* *18*, 103–109.
- Powell, C.M., and Michaelis, R.C. (1999). Townes-Brocks syndrome. *J. Med. Genet.* *36*, 89–93.
- Praetorius, H.A., and Spring, K.R. (2003). The renal cell primary cilium functions as a flow sensor. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* *12*, 517–520.

Praetorius, H.A., Praetorius, J., Nielsen, S., Frokiaer, J., and Spring, K.R. (2004). Beta1-integrins in the primary cilium of MDCK cells potentiate fibronectin-induced Ca²⁺ signaling. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 287, F969-978.

Praetorius, J., Backlund, P., Yergey, A.L., and Spring, K.R. (2001). Specific lectin binding to beta1 integrin and fibronectin on the apical membrane of madin-darby canine kidney cells. *J. Membr. Biol.* 184, 273–281.

Prevo, B., Scholey, J.M., and Peterman, E.J.G. (2017). Intraflagellar transport: mechanisms of motor action, cooperation, and cargo delivery. *FEBS J.* 284, 2905–2931.

Prodromou, N.V., Thompson, C.L., Osborn, D.P.S., Cogger, K.F., Ashworth, R., Knight, M.M., Beales, P.L., and Chapple, J.P. (2012). Heat shock induces rapid resorption of primary cilia. *J. Cell Sci.* 125, 4297–4305.

Proudfoot, N., and O’Sullivan, J. (2002). Polyadenylation: a tail of two complexes. *Curr. Biol. CB* 12, R855-857.

Proudfoot, N.J., Furger, A., and Dye, M.J. (2002). Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108, 501–512.

Pugacheva, E.N., Roegiers, F., and Golemis, E.A. (2006). Interdependence of cell attachment and cell cycle signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 507–515.

Pugacheva, E.N., Jablonski, S.A., Hartman, T.R., Henske, E.P., and Golemis, E.A. (2007). HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell* 129, 1351–1363.

Qi, H.H., Ongusaha, P.P., Myllyharju, J., Cheng, D., Pakkanen, O., Shi, Y., Lee, S.W., Peng, J., and Shi, Y. (2008). Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability. *Nature* 455, 421–424.

Qiao, F., and Bowie, J.U. (2005). The Many Faces of SAM. *Sci. Signal.* 2005, re7–re7.

Qiao, F., Song, H., Kim, C.A., Sawaya, M.R., Hunter, J.B., Gingery, M., Rebay, I., Courey, A.J., and Bowie, J.U. (2004). Derepression by depolymerization; structural insights into the regulation of Yan by Mae. *Cell* 118, 163–173.

Qiao, F., Harada, B., Song, H., Whitelegge, J., Courey, A.J., and Bowie, J.U. (2006). Mae inhibits Pointed-P2 transcriptional activity by blocking its MAPK docking site. *EMBO J.* 25, 70–79.

Qin, H., Wang, Z., Diener, D., and Rosenbaum, J. (2007). Intraflagellar transport protein 27 is a small G protein involved in cell-cycle control. *Curr. Biol. CB* 17, 193–202.

Quarmby, L.M., and Mahjoub, M.R. (2005). Caught Nek-ing: cilia and centrioles. *J. Cell Sci.* 118, 5161–5169.

Rajakulendran, T., Sahmi, M., Kurinov, I., Tyers, M., Therrien, M., and Sicheri, F. (2008). CNK and HYP form a discrete dimer by their SAM domains to mediate RAF kinase signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2836–2841.

Rajesh, K., Krishnamoorthy, J., Kazimierczak, U., Tenkerian, C., Papadakis, A.I., Wang, S., Huang, S., and Koromilas, A.E. (2015). Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α at serine 51 determines the cell fate decisions of Akt in response to oxidative stress. *Cell Death Dis.* 6, e1591.

Rajgor, D., and Shanahan, C.M. (2014). RNA granules and cytoskeletal links. *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 1206–1210.

Ramachander, R., Kim, C.A., Phillips, M.L., Mackereth, C.D., Thanos, C.D., McIntosh, L.P., and Bowie, J.U. (2002). Oligomerization-dependent association of the SAM domains from *Schizosaccharomyces pombe* Byr2 and Ste4. *J. Biol. Chem.* **277**, 39585–39593.

Ramachandran, H., Engel, C., Müller, B., Dengjel, J., Walz, G., and Yakulov, T.A. (2015). Anks3 alters the sub-cellular localization of the Nek7 kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **464**, 901–907.

Reginensi, A., Scott, R.P., Gregorieff, A., Bagherie-Lachidan, M., Chung, C., Lim, D.-S., Pawson, T., Wrana, J., and McNeill, H. (2013). Yap- and Cdc42-dependent nephrogenesis and morphogenesis during mouse kidney development. *PLoS Genet.* **9**, e1003380.

REHWINKEL, J., BEHM-ANSMANT, I., GATFIELD, D., and IZAURRALDE, E. (2005). A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA* **11**, 1640–1647.

Rein, K., and Stracker, T.H. (2014). The MRE11 complex: an important source of stress relief. *Exp. Cell Res.* **329**, 162–169.

Reith, W., Herrero-Sanchez, C., Kobr, M., Silacci, P., Berte, C., Barras, E., Fey, S., and Mach, B. (1990). MHC class II regulatory factor RFX has a novel DNA-binding domain and a functionally independent dimerization domain. *Genes Dev.* **4**, 1528–1540.

Reith, W., UCLA, C., Barras, E., Gaud, A., Durand, B., Herrero-Sanchez, C., Kobr, M., and Mach, B. (1994). RFX1, a transactivator of hepatitis B virus enhancer I, belongs to a novel family of homodimeric and heterodimeric DNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1230–1244.

Riella, C., Czarnecki, P.G., and Steinman, T.I. (2014). Therapeutic advances in the treatment of polycystic kidney disease. *Nephron Clin. Pract.* **128**, 297–302.

Riobo, N.A., Saucy, B., Dilizio, C., and Manning, D.R. (2006a). Activation of heterotrimeric G proteins by Smoothened. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 12607–12612.

Riobo, N.A., Lu, K., and Emerson, C.P. (2006b). Hedgehog signal transduction: signal integration and cross talk in development and cancer. *Cell Cycle Georget. Tex* **5**, 1612–1615.

Rissland, O.S., Hong, S.-J., and Bartel, D.P. (2011). MicroRNA destabilization enables dynamic regulation of the miR-16 family in response to cell-cycle changes. *Mol. Cell* **43**, 993–1004.

Roberson, E.C., Dowdle, W.E., Ozanturk, A., Garcia-Gonzalo, F.R., Li, C., Halbritter, J., Elkhartoufi, N., Porath, J.D., Cope, H., Ashley-Koch, A., et al. (2015). TMEM231, mutated in orofacioidigital and Meckel syndromes, organizes the ciliary transition zone. *J. Cell Biol.* **209**, 129–142.

Robert, A., Margall-Ducos, G., Guidotti, J.-E., Brégerie, O., Celati, C., Bréchet, C., and Desdouets, C. (2007). The intraflagellar transport component IFT88/polaris is a centrosomal protein regulating G1-S transition in non-ciliated cells. *J. Cell Sci.* **120**, 628–637.

Rohatgi, R., Milenkovic, L., and Scott, M.P. (2007). Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* **317**, 372–376.

- Roncaglia, P., van Dam, T.J.P., Christie, K.R., Nacheva, L., Toedt, G., Huynen, M.A., Huntley, R.P., Gibson, T.J., and Lomax, J. (2017). The Gene Ontology of eukaryotic cilia and flagella. *Cilia* 6, 10.
- van Rooij, E., Sutherland, L.B., Qi, X., Richardson, J.A., Hill, J., and Olson, E.N. (2007). Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 316, 575–579.
- Roosing, S., Hofree, M., Kim, S., Scott, E., Copeland, B., Romani, M., Silhavy, J.L., Rosti, R.O., Schroth, J., Mazza, T., et al. (2015). Functional genome-wide siRNA screen identifies KIAA0586 as mutated in Joubert syndrome. *ELife* 4, e06602.
- Rosenbaum, J.L., and Child, F.M. (1967). Flagellar regeneration in protozoan flagellates. *J. Cell Biol.* 34, 345–364.
- Ross, A.J., May-Simera, H., Eichers, E.R., Kai, M., Hill, J., Jagger, D.J., Leitch, C.C., Chapple, J.P., Munro, P.M., Fisher, S., et al. (2005). Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat. Genet.* 37, 1135–1140.
- Rothé, B., Leal-Esteban, L., Bernet, F., Urfer, S., Doerr, N., Weimbs, T., Iwaszkiewicz, J., and Constam, D.B. (2015). Bicc1 Polymerization Regulates the Localization and Silencing of Bound mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 35, 3339–3353.
- Rothé, B., Leettola, C.N., Leal-Esteban, L., Cascio, D., Fortier, S., Isenschmid, M., Bowie, J.U., and Constam, D.B. (2018). Crystal Structure of Bicc1 SAM Polymer and Mapping of Interactions between the Ciliopathy-Associated Proteins Bicc1, ANKS3, and ANKS6. *Struct. Lond. Engl.* 1993 26, 209–224.e6.
- Rouya, C., Siddiqui, N., Morita, M., Duchaine, T.F., Fabian, M.R., and Sonenberg, N. (2014). Human DDX6 effects miRNA-mediated gene silencing via direct binding to CNOT1. *RNA N. Y. N* 20, 1398–1409.
- Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Müller, O., Chamberlain, S.H., Masiarz, F.R., Munemitsu, S., and Polakis, P. (1993). Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 262, 1731–1734.
- Sakai, N., Wada, T., Furuichi, K., Iwata, Y., Yoshimoto, K., Kitagawa, K., Kokubo, S., Kobayashi, M., Takeda, S., Kida, H., et al. (2002). p38 MAPK phosphorylation and NF-kappa B activation in human crescentic glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 17, 998–1004.
- Sakai, N., Wada, T., Furuichi, K., Iwata, Y., Yoshimoto, K., Kitagawa, K., Kokubo, S., Kobayashi, M., Hara, A., Yamahana, J., et al. (2005). Involvement of extracellular signal-regulated kinase and p38 in human diabetic nephropathy. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 45, 54–65.
- Sakanaka, C., Weiss, J.B., and Williams, L.T. (1998). Bridging of beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta by axin and inhibition of beta-catenin-mediated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3020–3023.
- Salemi, M., Barone, C., Romano, C., Salluzzo, R., Caraci, F., Cantarella, R.A., Salluzzo, M.G., Drago, F., Romano, C., and Bosco, P. (2013). Pericentrin expression in Down's syndrome. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 34, 2023–2025.
- Salomon, R., Saunier, S., and Niaudet, P. (2009). Nephronophthisis. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 24, 2333–2344.

- San Agustin, J.T., Klena, N., Granath, K., Panigrahy, A., Stewart, E., Devine, W., Strittmatter, L., Jonassen, J.A., Liu, X., Lo, C.W., et al. (2016). Genetic link between renal birth defects and congenital heart disease. *Nat. Commun.* 7, 11103.
- Sang, L., Miller, J.J., Corbit, K.C., Giles, R.H., Brauer, M.J., Otto, E.A., Baye, L.M., Wen, X., Scales, S.J., Kwong, M., et al. (2011a). Mapping the NPHP-JBTS-MKS protein network reveals ciliopathy disease genes and pathways. *Cell* 145, 513–528.
- Sang, L., Miller, J.J., Corbit, K.C., Giles, R.H., Brauer, M.J., Otto, E.A., Baye, L.M., Wen, X., Scales, S.J., Kwong, M., et al. (2011b). Mapping the NPHP-JBTS-MKS protein network reveals ciliopathy disease genes and pathways. *Cell* 145, 513–528.
- Saraiva, J.M., and Baraitser, M. (1992). Joubert syndrome: a review. *Am. J. Med. Genet.* 43, 726–731.
- Sarpal, R., Todi, S.V., Sivan-Loukianova, E., Shirolikar, S., Subramanian, N., Raff, E.C., Erickson, J.W., Ray, K., and Eberl, D.F. (2003). Drosophila KAP interacts with the kinesin II motor subunit KLP64D to assemble chordotonal sensory cilia, but not sperm tails. *Curr. Biol. CB* 13, 1687–1696.
- Satran, D., Pierpont, M.E., and Dobyns, W.B. (1999). Cerebello-oculo-renal syndromes including Arima, Senior-Löken and COACH syndromes: more than just variants of Joubert syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 86, 459–469.
- Saunier, S., Calado, J., Heilig, R., Silbermann, F., Benessy, F., Morin, G., Konrad, M., Broyer, M., Gubler, M.C., Weissenbach, J., et al. (1997). A novel gene that encodes a protein with a putative src homology 3 domain is a candidate gene for familial juvenile nephronophthisis. *Hum. Mol. Genet.* 6, 2317–2323.
- Saxena, S., Cabuy, E., and Caroni, P. (2009). A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat. Neurosci.* 12, 627–636.
- Sayer, J.A., Otto, E.A., O'Toole, J.F., Nurnberg, G., Kennedy, M.A., Becker, C., Hennies, H.C., Helou, J., Attanasio, M., Fausett, B.V., et al. (2006). The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4. *Nat. Genet.* 38, 674–681.
- Schaefer, E., Zaloszczyk, A., Lauer, J., Durand, M., Stutzmann, F., Perdomo-Trujillo, Y., Redin, C., Bennouna Greene, V., Toutain, A., Perrin, L., et al. (2011). Mutations in SDCCAG8/NPHP10 Cause Bardet-Biedl Syndrome and Are Associated with Penetrant Renal Disease and Absent Polydactyly. *Mol. Syndromol.* 1, 273–281.
- Schäfer, T., Pütz, M., Lienkamp, S., Ganner, A., Bergbreiter, A., Ramachandran, H., Gieloff, V., Gerner, M., Mattonet, C., Czarnecki, P.G., et al. (2008). Genetic and physical interaction between the NPHP5 and NPHP6 gene products. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3655–3662.
- Schermer, B., Höpker, K., Omran, H., Ghenoïu, C., Fliegau, M., Fekete, A., Horvath, J., Köttgen, M., Hackl, M., Zschiedrich, S., et al. (2005). Phosphorylation by casein kinase 2 induces PACS-1 binding of nephrocystin and targeting to cilia. *EMBO J.* 24, 4415–4424.
- Schirle, N.T., and MacRae, I.J. (2012). The Crystal Structure of Human Argonaute2. *Science* 336, 1037–1040.
- Schmidt, K.N., Kuhns, S., Neuner, A., Hub, B., Zentgraf, H., and Pereira, G. (2012). Cep164 mediates vesicular docking to the mother centriole during early steps of ciliogenesis. *J. Cell Biol.* 199, 1083–1101.

- Scholey, J.M., Ou, G., Snow, J., and Gunnarson, A. (2004). Intraflagellar transport motors in *Caenorhabditis elegans* neurons. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 682–684.
- Schou, K.B., Pedersen, L.B., and Christensen, S.T. (2015). Ins and outs of GPCR signaling in primary cilia. *EMBO Rep.* 16, 1099–1113.
- Schueler, M., Braun, D.A., Chandrasekar, G., Gee, H.Y., Klasson, T.D., Halbritter, J., Bieder, A., Porath, J.D., Airik, R., Zhou, W., et al. (2015). DCDC2 Mutations Cause a Renal-Hepatic Ciliopathy by Disrupting Wnt Signaling. *Am. J. Hum. Genet.* 96, 81.
- Schultz, S.J., Fry, A.M., Sütterlin, C., Ried, T., and Nigg, E.A. (1994). Cell cycle-dependent expression of Nek2, a novel human protein kinase related to the NIMA mitotic regulator of *Aspergillus nidulans*. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 5, 625–635.
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., and Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337–342.
- Schwartz, E.A., Leonard, M.L., Bizios, R., and Bowser, S.S. (1997). Analysis and modeling of the primary cilium bending response to fluid shear. *Am. J. Physiol.* 272, F132–138.
- Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., and Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455, 58–63.
- Senior, B., Friedmann, A.I., and Braudo, J.L. (1961). Juvenile familial nephropathy with tapetoretinal degeneration. A new oculorenal dystrophy. *Am. J. Ophthalmol.* 52, 625–633.
- Sensenbrenner, J.A., Dorst, J.P., and Owens, R.P. (1975). New syndrome of skeletal, dental and hair anomalies. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 11, 372–379.
- Seo, S., Zhang, Q., Bugge, K., Breslow, D.K., Searby, C.C., Nachury, M.V., and Sheffield, V.C. (2011). A novel protein LZTFL1 regulates ciliary trafficking of the BBSome and Smoothened. *PLoS Genet.* 7, e1002358.
- Serluca, F.C., Xu, B., Okabe, N., Baker, K., Lin, S.-Y., Sullivan-Brown, J., Konieczkowski, D.J., Jaffe, K.M., Bradner, J.M., Fishman, M.C., et al. (2009). Mutations in zebrafish leucine-rich repeat-containing six-like affect cilia motility and result in pronephric cysts, but have variable effects on left-right patterning. *Dev. Camb. Engl.* 136, 1621–1631.
- Serman, A., Le Roy, F., Aigueperse, C., Kress, M., Dautry, F., and Weil, D. (2007). GW body disassembly triggered by siRNAs independently of their silencing activity. *Nucleic Acids Res.* 35, 4715–4727.
- Shamseldin, H.E., Yakulov, T.A., Hashem, A., Walz, G., and Alkuraya, F.S. (2016). ANKS3 is mutated in a family with autosomal recessive laterality defect. *Hum. Genet.*
- Shang, Z.-F., Yu, L., Li, B., Tu, W.-Z., Wang, Y., Liu, X.-D., Guan, H., Huang, B., Rang, W.-Q., and Zhou, P.-K. (2012). 4E-BP1 participates in maintaining spindle integrity and genomic stability via interacting with PLK1. *Cell Cycle Georget. Tex* 11, 3463–3471.
- Sheldahl, L.C., Park, M., Malbon, C.C., and Moon, R.T. (1999). Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr. Biol. CB* 9, 695–698.

- Shen, J., Xia, W., Khotskaya, Y.B., Huo, L., Nakanishi, K., Lim, S.-O., Du, Y., Wang, Y., Chang, W.-C., Chen, C.-H., et al. (2013). EGFR modulates microRNA maturation in response to hypoxia through phosphorylation of AGO2. *Nature* 497, 383–387.
- Sheryanna, A., Bhargal, G., McDaid, J., Smith, J., Manning, A., Foxwell, B.M.J., Feldmann, M., Cook, H.T., Pusey, C.D., and Tam, F.W.K. (2007). Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase is effective in the treatment of experimental crescentic glomerulonephritis and suppresses monocyte chemoattractant protein-1 but not IL-1 β or IL-6. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 18, 1167–1179.
- Sheth, U., and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300, 805–808.
- Sheth, U., and Parker, R. (2006). Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell* 125, 1095–1109.
- Shiba, D., Yamaoka, Y., Hagiwara, H., Takamatsu, T., Hamada, H., and Yokoyama, T. (2009). Localization of Inv in a distinctive intraciliary compartment requires the C-terminal ninein-homolog-containing region. *J. Cell Sci.* 122, 44–54.
- Shiba, D., Manning, D.K., Koga, H., Beier, D.R., and Yokoyama, T. (2010). Inv acts as a molecular anchor for Nphp3 and Nek8 in the proximal segment of primary cilia. *Cytoskeleton* 67, 112–119.
- Shih, J.D., Waks, Z., Kedersha, N., and Silver, P.A. (2011). Visualization of single mRNAs reveals temporal association of proteins with microRNA-regulated mRNA. *Nucleic Acids Res.* 39, 7740–7749.
- Shillingford, J.M., Leamon, C.P., Vlahov, I.R., and Weimbs, T. (2012). Folate-conjugated rapamycin slows progression of polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 23, 1674–1681.
- Shyu, A.-B., Wilkinson, M.F., and van Hoof, A. (2008). Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *EMBO J.* 27, 471–481.
- Sigg, M.A., Menchen, T., Lee, C., Johnson, J., Jungnickel, M.K., Choksi, S.P., Garcia, G., Busengdal, H., Dougherty, G.W., Pennekamp, P., et al. (2017). Evolutionary Proteomics Uncovers Ancient Associations of Cilia with Signaling Pathways. *Dev. Cell* 43, 744-762.e11.
- Signor, D., Wedaman, K.P., Orozco, J.T., Dwyer, N.D., Bargmann, C.I., Rose, L.S., and Scholey, J.M. (1999). Role of a class DHC1b dynein in retrograde transport of IFT motors and IFT raft particles along cilia, but not dendrites, in chemosensory neurons of living *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 147, 519–530.
- Silflow, C.D., and Lefebvre, P.A. (2001). Assembly and motility of eukaryotic cilia and flagella. Lessons from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 127, 1500–1507.
- Simons, M., and Mlodzik, M. (2008). Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annu. Rev. Genet.* 42, 517–540.
- Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Krönig, C., Schermer, B., Benzing, T., Cabello, O.A., Jenny, A., et al. (2005). Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat. Genet.* 37, 537–543.
- Singh, J., Wen, X., and Scales, S.J. (2015). The Orphan G Protein-coupled Receptor Gpr175 (Tpra40) Enhances Hedgehog Signaling by Modulating cAMP Levels. *J. Biol. Chem.* 290, 29663–29675.

- Singla, V., and Reiter, J.F. (2006). The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* 313, 629–633.
- 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.
- Sivasubramaniam, S., Sun, X., Pan, Y.-R., Wang, S., and Lee, E.Y.-H.P. (2008). Cep164 is a mediator protein required for the maintenance of genomic stability through modulation of MDC1, RPA, and CHK1. *Genes Dev.* 22, 587–600.
- Slusarski, D.C., Yang-Snyder, J., Busa, W.B., and Moon, R.T. (1997). Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A. *Dev. Biol.* 182, 114–120.
- Smith, L.A., Bukanov, N.O., Husson, H., Russo, R.J., Barry, T.C., Taylor, A.L., Beier, D.R., and Ibraghimov-Beskrovnya, O. (2006). Development of polycystic kidney disease in juvenile cystic kidney mice: insights into pathogenesis, ciliary abnormalities, and common features with human disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 17, 2821–2831.
- Snoek, R., van Setten, J., Keating, B.J., Israni, A.K., Jacobson, P.A., Oetting, W.S., Matas, A.J., Mannon, R.B., Zhang, Z., Zhang, W., et al. (2018). NPHP1 (Nephrocystin-1) Gene Deletions Cause Adult-Onset ESRD. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*.
- Sohara, E., Luo, Y., Zhang, J., Manning, D.K., Beier, D.R., and Zhou, J. (2008). Nek8 Regulates the Expression and Localization of Polycystin-1 and Polycystin-2. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19, 469–476.
- Song, L., and Dentler, W.L. (2001). Flagellar protein dynamics in *Chlamydomonas*. *J. Biol. Chem.* 276, 29754–29763.
- Song, Z., Zhang, X., Jia, S., Yelick, P.C., and Zhao, C. (2016). Zebrafish as a Model for Human Ciliopathies. *J. Genet. Genomics Yi Chuan Xue Bao* 43, 107–120.
- Sonomura, K., Okigaki, M., Kimura, T., Matsuoka, E., Shiotsu, Y., Adachi, T., Kado, H., Ishida, R., Kusaba, T., Matsubara, H., et al. (2012). The kinase Pyk2 is involved in renal fibrosis by means of mechanical stretch-induced growth factor expression in renal tubules. *Kidney Int.* 81, 449–457.
- 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.
- Souquere, S., Mollet, S., Kress, M., Dautry, F., Pierron, G., and Weil, D. (2009). Unravelling the ultrastructure of stress granules and associated P-bodies in human cells. *J. Cell Sci.* 122, 3619–3626.
- Spiliotis, E.T., Hunt, S.J., Hu, Q., Kinoshita, M., and Nelson, W.J. (2008). Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules. *J. Cell Biol.* 180, 295–303.
- Srivastava, S., Molinari, E., Raman, S., and Sayer, J.A. (2018). Many Genes—One Disease? Genetics of Nephronophthisis (NPHP) and NPHP-Associated Disorders. *Front. Pediatr.* 5.
- Stagner, E.E., Bouvrette, D.J., Cheng, J., and Bryda, E.C. (2009). The polycystic kidney disease-related proteins Bicc1 and SamCystin interact. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383, 16–21.

- Stambe, C., Atkins, R.C., Hill, P.A., and Nikolic-Paterson, D.J. (2003). Activation and cellular localization of the p38 and JNK MAPK pathways in rat crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* *64*, 2121–2132.
- Stambe, C., Atkins, R.C., Tesch, G.H., Masaki, T., Schreiner, G.F., and Nikolic-Paterson, D.J. (2004). The role of p38alpha mitogen-activated protein kinase activation in renal fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* *JASN 15*, 370–379.
- Stapleton, D., Balan, I., Pawson, T., and Sicheri, F. (1999). The crystal structure of an Eph receptor SAM domain reveals a mechanism for modular dimerization. *Nat. Struct. Biol.* *6*, 44–49.
- Stasio, E.A.D., Mueller, K.P., Bauer, R.J., Hurlburt, A.J., Bice, S.A., Scholtz, S.L., Phirke, P., Sugiaman-Trapman, D., Stinson, L.A., Olson, H.B., et al. (2018). An Expanded Role for the RFX Transcription Factor DAF-19, with Dual Functions in Ciliated and Nonciliated Neurons. *Genetics* *208*, 1083–1097.
- Stephens, R.E. (1992). Tubulin in sea urchin embryonic cilia: post-translational modifications during regeneration. *J. Cell Sci.* *101 (Pt 4)*, 837–845.
- Stephens, R.E. (1997). Synthesis and turnover of embryonic sea urchin ciliary proteins during selective inhibition of tubulin synthesis and assembly. *Mol. Biol. Cell* *8*, 2187–2198.
- Stevens, A. (1980). An mRNA decapping enzyme from ribosomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *96*, 1150–1155.
- Stevens, A., and Maupin, M.K. (1987). A 5'----3' exoribonuclease of human placental nuclei: purification and substrate specificity. *Nucleic Acids Res.* *15*, 695–708.
- Stoecklin, G., Stubbs, T., Kedersha, N., Wax, S., Rigby, W.F.C., Blackwell, T.K., and Anderson, P. (2004). MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *EMBO J.* *23*, 1313–1324.
- Stoetzel, C., Bär, S., De Craene, J.-O., Scheidecker, S., Etard, C., Chicher, J., Reck, J.R., Perrault, I., Geoffroy, V., Chennen, K., et al. (2016). A mutation in VPS15 (PIK3R4) causes a ciliopathy and affects IFT20 release from the cis-Golgi. *Nat. Commun.* *7*, 13586.
- Stottmann, R.W., Tran, P.V., Turbe-Doan, A., and Beier, D.R. (2009). Ttc21b is required to restrict sonic hedgehog activity in the developing mouse forebrain. *Dev. Biol.* *335*, 166–178.
- Strutt, D.I. (2001). Asymmetric localization of frizzled and the establishment of cell polarity in the *Drosophila* wing. *Mol. Cell* *7*, 367–375.
- Strutt, D.I., Weber, U., and Mlodzik, M. (1997). The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling. *Nature* *387*, 292–295.
- Stubbs, J.L., Oishi, I., Izpisua Belmonte, J.C., and Kintner, C. (2008). The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Nat. Genet.* *40*, 1454–1460.
- Su, L.K., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1993). Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* *262*, 1734–1737.
- Su, S., Phua, S.C., DeRose, R., Chiba, S., Narita, K., Kalugin, P.N., Katada, T., Kontani, K., Takeda, S., and Inoue, T. (2013). Genetically encoded calcium indicator illuminates calcium dynamics in primary cilia. *Nat. Methods* *10*, 1105–1107.

- Su, X., Driscoll, K., Yao, G., Raed, A., Wu, M., Beales, P.L., and Zhou, J. (2014). Bardet-Biedl syndrome proteins 1 and 3 regulate the ciliary trafficking of polycystic kidney disease 1 protein. *Hum. Mol. Genet.* 23, 5441–5451.
- Subtelny, A.O., Eichhorn, S.W., Chen, G.R., Sive, H., and Bartel, D.P. (2014). Poly(A)-tail profiling reveals an embryonic switch in translational control. *Nature* 508, 66–71.
- Suizu, F., Hirata, N., Kimura, K., Edamura, T., Tanaka, T., Ishigaki, S., Donia, T., Noguchi, H., Iwanaga, T., and Noguchi, M. (2016). Phosphorylation-dependent Akt-Inversin interaction at the basal body of primary cilia. *EMBO J.* 35, 1346–1363.
- Summerfield, J.A., Nagafuchi, Y., Sherlock, S., Cadafalch, J., and Scheuer, P.J. (1986). Hepatobiliary fibropolycystic diseases. A clinical and histological review of 51 patients. *J. Hepatol.* 2, 141–156.
- Supatto, W., Fraser, S.E., and Vermot, J. (2008). An all-optical approach for probing microscopic flows in living embryos. *Biophys. J.* 95, L29–31.
- Svärd, J., Heby-Henricson, K., Henricson, K.H., Persson-Lek, M., Rozell, B., Lauth, M., Bergström, A., Ericson, J., Toftgård, R., and Teglund, S. (2006). Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Dev. Cell* 10, 187–197.
- Swoboda, P., Adler, H.T., and Thomas, J.H. (2000). The RFX-type transcription factor DAF-19 regulates sensory neuron cilium formation in *C. elegans*. *Mol. Cell* 5, 411–421.
- Takimoto, K., Wakiyama, M., and Yokoyama, S. (2009). Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression. *RNA* 15, 1078–1089.
- Tammachote, R., Hommerding, C.J., Sinderson, R.M., Miller, C.A., Czarnecki, P.G., Leightner, A.C., Salisbury, J.L., Ward, C.J., Torres, V.E., Gattone, V.H., 2nd, et al. (2009). Ciliary and centrosomal defects associated with mutation and depletion of the Meckel syndrome genes MKS1 and MKS3. *Hum. Mol. Genet.* 18, 3311–3323.
- Tan, P.L., Barr, T., Inglis, P.N., Mitsuma, N., Huang, S.M., Garcia-Gonzalez, M.A., Bradley, B.A., Coforio, S., Albrecht, P.J., Watnick, T., et al. (2007). Loss of Bardet Biedl syndrome proteins causes defects in peripheral sensory innervation and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 17524–17529.
- Tang, G. (2005). siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem. Sci.* 30, 106–114.
- 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.
- Tanriverdi, H.A., Hendrik, H.J., Ertan, K., and Schmidt, W. (2002). Meckel Gruber syndrome: a first trimester diagnosis of a recurrent case. *Eur. J. Ultrasound Off. J. Eur. Fed. Soc. Ultrasound Med. Biol.* 15, 69–72.
- Taschner, M., and Lorentzen, E. (2016). The Intraflagellar Transport Machinery. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*

- Taskiran, E.Z., Korkmaz, E., Gucer, S., Kosukcu, C., Kaymaz, F., Koyunlar, C., Bryda, E.C., Chaki, M., Lu, D., Vadnagara, K., et al. (2014). Mutations in ANKS6 Cause a Nephronophthisis-Like Phenotype with ESRD. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*.
- 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.
- Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A., Brengues, M., and Parker, R. (2005). Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA N. Y. N* 11, 371–382.
- Thiel, C., Kessler, K., Giessler, A., Dimmler, A., Shalev, S.A., von der Haar, S., Zenker, M., Zahnleiter, D., Stöss, H., Beinder, E., et al. (2011). NEK1 mutations cause short-rib polydactyly syndrome type majewski. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 106–114.
- Tian, Y., Kolb, R., Hong, J.-H., Carroll, J., Li, D., You, J., Bronson, R., Yaffe, M.B., Zhou, J., and Benjamin, T. (2007). TAZ promotes PC2 degradation through a SCFbeta-Trcp E3 ligase complex. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6383–6395.
- Tollenaere, M.A.X., Mailand, N., and Bekker-Jensen, S. (2015). Centriolar satellites: key mediators of centrosome functions. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 72, 11–23.
- Tomari, Y., and Zamore, P.D. (2005). MicroRNA biogenesis: drosha can't cut it without a partner. *Curr. Biol. CB* 15, R61–64.
- Toriyama, M., Lee, C., Taylor, S.P., Duran, I., Cohn, D.H., Bruel, A.-L., Tabler, J.M., Drew, K., Kelly, M.R., Kim, S., et al. (2016). The ciliopathy-associated CPLANE proteins direct basal body recruitment of intraflagellar transport machinery. *Nat. Genet.* 48, 648–656.
- Torres, M.A., Yang-Snyder, J.A., Purcell, S.M., DeMarais, A.A., McGrew, L.L., and Moon, R.T. (1996). Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J. Cell Biol.* 133, 1123–1137.
- Tory, K., Lacoste, T., Burglen, L., Morinière, V., Boddaert, N., Macher, M.-A., Llanas, B., Nivet, H., Bensman, A., Niaudet, P., et al. (2007). High NPHP1 and NPHP6 mutation rate in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis: potential epistatic effect of NPHP6 and AHI1 mutations in patients with NPHP1 mutations. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 18, 1566–1575.
- Tory, K., Rousset-Rouvière, C., Gubler, M.-C., Morinière, V., Pawtowski, A., Becker, C., Guyot, C., Gié, S., Frishberg, Y., Nivet, H., et al. (2009). Mutations of NPHP2 and NPHP3 in infantile nephronophthisis. *Kidney Int.* 75, 839–847.
- Tournier, C., Hess, P., Yang, D.D., Xu, J., Turner, T.K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S.N., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288, 870–874.
- Tourrière, H., Chebli, K., Zekri, L., Courselaud, B., Blanchard, J.M., Bertrand, E., and Tazi, J. (2003). The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J. Cell Biol.* 160, 823–831.
- Tran, P.V., Haycraft, C.J., Besschetnova, T.Y., Turbe-Doan, A., Stottmann, R.W., Herron, B.J., Chesebro, A.L., Qiu, H., Scherz, P.J., Shah, J.V., et al. (2008a). THM1 negatively modulates mouse sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia. *Nat. Genet.* 40, 403–410.

- Tran, P.V., Haycraft, C.J., Besschetnova, T.Y., Turbe-Doan, A., Stottmann, R.W., Herron, B.J., Chesebro, A.L., Qiu, H., Scherz, P.J., Shah, J.V., et al. (2008b). THM1 negatively modulates mouse sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia. *Nat. Genet.* **40**, 403–410.
- Tran, U., Zakin, L., Schweickert, A., Agrawal, R., Döger, R., Blum, M., De Robertis, E.M., and Wessely, O. (2010). The RNA-binding protein bicaudal C regulates polycystin 2 in the kidney by antagonizing miR-17 activity. *Dev. Camb. Engl.* **137**, 1107–1116.
- Tree, D.R.P., Shulman, J.M., Rousset, R., Scott, M.P., Gubb, D., and Axelrod, J.D. (2002). Prickle mediates feedback amplification to generate asymmetric planar cell polarity signaling. *Cell* **109**, 371–381.
- Tsai, N.-P., Tsui, Y.-C., and Wei, L.-N. (2009). Dynein motor contributes to stress granule dynamics in primary neurons. *Neuroscience* **159**, 647–656.
- Tsang, W.Y., and Dynlacht, B.D. (2013). CP110 and its network of partners coordinately regulate cilia assembly. *Cilia* **2**, 9.
- Tsao, C.-C., and Gorovsky, M.A. (2008). Different effects of Tetrahymena IFT172 domains on anterograde and retrograde intraflagellar transport. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1450–1461.
- Tsimaratos, M., Sarles, J., Sigaudy, S., and Philip, N. (1998). Renal and retinal involvement in the Sensenbrenner syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **77**, 337.
- Tucker, M., and Parker, R. (2000). Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 571–595.
- Tuson, M., He, M., and Anderson, K.V. (2011). Protein kinase A acts at the basal body of the primary cilium to prevent Gli2 activation and ventralization of the mouse neural tube. *Dev. Camb. Engl.* **138**, 4921–4930.
- Unal, S., Alanay, Y., Cetin, M., Boduroglu, K., Utine, E., Cormier-Daire, V., Huber, C., Ozsurekci, Y., Kilic, E., Simsek Kiper, O.P., et al. (2014). Striking hematological abnormalities in patients with microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type II (MOPD II): a potential role of pericentrin in hematopoiesis. *Pediatr. Blood Cancer* **61**, 302–305.
- Upadhyay, V.S., Muntean, B.S., Kathem, S.H., Hwang, J.J., Aboualaiwi, W.A., and Nauli, S.M. (2014). Roles of dopamine receptor on chemosensory and mechanosensory primary cilia in renal epithelial cells. *Front. Physiol.* **5**, 72.
- Valente, E.M., Marsh, S.E., Castori, M., Dixon-Salazar, T., Bertini, E., Al-Gazali, L., Messer, J., Barbot, C., Woods, C.G., Boltshauser, E., et al. (2005). Distinguishing the four genetic causes of Jouberts syndrome-related disorders. *Ann. Neurol.* **57**, 513–519.
- Valente, E.M., Silhavy, J.L., Brancati, F., Barrano, G., Krishnaswami, S.R., Castori, M., Lancaster, M.A., Boltshauser, E., Boccone, L., Al-Gazali, L., et al. (2006). Mutations in CEP290, which encodes a centrosomal protein, cause pleiotropic forms of Joubert syndrome. *Nat. Genet.* **38**, 623–625.
- Valente, E.M., Dallapiccola, B., and Bertini, E. (2013). Joubert syndrome and related disorders. *Handb. Clin. Neurol.* **113**, 1879–1888.

- Varelas, X., Samavarchi-Tehrani, P., Narimatsu, M., Weiss, A., Cockburn, K., Larsen, B.G., Rossant, J., and Wrana, J.L. (2010). The Crumbs Complex Couples Cell Density Sensing to Hippo-Dependent Control of the TGF- β -SMAD Pathway. *Dev. Cell* 19, 831–844.
- Venuprasad, K., Elly, C., Gao, M., Salek-Ardakani, S., Harada, Y., Luo, J.-L., Yang, C., Croft, M., Inoue, K., Karin, M., et al. (2006). Convergence of Itch-induced ubiquitination with MEKK1-JNK signaling in Th2 tolerance and airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 116, 1117–1126.
- Verloes, A., and Lambotte, C. (1989). Further delineation of a syndrome of cerebellar vermis hypo/aplasia, oligophrenia, congenital ataxia, coloboma, and hepatic fibrosis. *Am. J. Med. Genet.* 32, 227–232.
- Verma, G., and Datta, M. (2010). IL-1 β induces ER stress in a JNK dependent manner that determines cell death in human pancreatic epithelial MIA PaCa-2 cells. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 15, 864–876.
- Vieillard, J., Jerber, J., and Durand, B. (2014). [Transcriptional control of ciliary genes]. *Med. Sci. MS* 30, 968–975.
- Vij, S., Rink, J.C., Ho, H.K., Babu, D., Eitel, M., Narasimhan, V., Tikku, V., Westbrook, J., Schierwater, B., and Roy, S. (2012). Evolutionarily ancient association of the FoxJ1 transcription factor with the motile ciliogenic program. *PLoS Genet.* 8, e1003019.
- Volinia, S., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., MacDougall, L.K., Stein, R., Zvelebil, M.J., Domin, J., Panaretou, C., and Waterfield, M.D. (1995). A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. *EMBO J.* 14, 3339–3348.
- de Vries, J., Yntema, J.L., van Die, C.E., Crama, N., Cornelissen, E. a. M., and Hamel, B.C.J. (2010). Jeune syndrome: description of 13 cases and a proposal for follow-up protocol. *Eur. J. Pediatr.* 169, 77–88.
- Vuolo, L., Herrera, A., Torroba, B., Menendez, A., and Pons, S. (2015). Ciliary adenylyl cyclases control the Hedgehog pathway. *J. Cell Sci.* 128, 2928–2937.
- Wada, T., Nakagawa, K., Watanabe, T., Nishitai, G., Seo, J., Kishimoto, H., Kitagawa, D., Sasaki, T., Penninger, J.M., Nishina, H., et al. (2001). Impaired synergistic activation of stress-activated protein kinase SAPK/JNK in mouse embryonic stem cells lacking SEK1/MKK4: different contribution of SEK2/MKK7 isoforms to the synergistic activation. *J. Biol. Chem.* 276, 30892–30897.
- Waghray, S., Williams, C., Coon, J.J., and Wickens, M. (2015). *Xenopus* CAF1 requires NOT1-mediated interaction with 4E-T to repress translation in vivo. *RNA N. Y. N* 21, 1335–1345.
- Wakiyama, M., Takimoto, K., Ohara, O., and Yokoyama, S. (2007). Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev.* 21, 1857–1862.
- Walczak-Sztulpa, J., Eggenschwiler, J., Osborn, D., Brown, D.A., Emma, F., Klingenberg, C., Hennekam, R.C., Torre, G., Garshasbi, M., Tzschach, A., et al. (2010). Cranioectodermal Dysplasia, Sensenbrenner Syndrome, Is a Ciliopathy Caused by Mutations in the IFT122 Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 949–956.
- Walentek, P., Beyer, T., Thumberger, T., Schweickert, A., and Blum, M. (2012). ATP4a is required for Wnt-dependent Foxj1 expression and leftward flow in *Xenopus* left-right development. *Cell Rep.* 1, 516–527.

- Wallingford, J.B., Rowning, B.A., Vogeli, K.M., Rothbacher, U., Fraser, S.E., and Harland, R.M. (2000). Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *Nature* *405*, 81–85.
- Wang, J., and Barr, M.M. (2005). RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Enzymol.* *392*, 36–55.
- Wang, Z., and Kiledjian, M. (2001). Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* *107*, 751–762.
- Wang, B., Fallon, J.F., and Beachy, P.A. (2000). Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* *100*, 423–434.
- Wang, B., Zhang, Y., Dong, H., Gong, S., Wei, B., Luo, M., Wang, H., Wu, X., Liu, W., Xu, X., et al. (2018). Loss of Tctn3 causes neuronal apoptosis and neural tube defects in mice. *Cell Death Dis.* *9*.
- Wang, H., Lee, Y., and Malbon, C.C. (2004). PDE6 is an effector for the Wnt/Ca²⁺/cGMP-signalling pathway in development. *Biochem. Soc. Trans.* *32*, 792–796.
- Wang, Y., Zeigler, M.M., Lam, G.K., Hunter, M.G., Eubank, T.D., Khramtsov, V.V., Tridandapani, S., Sen, C.K., and Marsh, C.B. (2007). The role of the NADPH oxidase complex, p38 MAPK, and Akt in regulating human monocyte/macrophage survival. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *36*, 68–77.
- Wang, Z., Jiao, X., Carr-Schmid, A., and Kiledjian, M. (2002). The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 12663–12668.
- Wang, Z., Phan, T., and Storm, D.R. (2011). The type 3 adenylyl cyclase is required for novel object learning and extinction of contextual memory: role of cAMP signaling in primary cilia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 5557–5561.
- Warburton-Pitt, S.R.F., Silva, M., Nguyen, K.C.Q., Hall, D.H., and Barr, M.M. (2014). The nphp-2 and arl-13 Genetic Modules Interact to Regulate Ciliogenesis and Ciliary Microtubule Patterning in *C. elegans*. *PLoS Genet.* *10*.
- Wasserman, T., Katsenelson, K., Daniliuc, S., Hasin, T., Choder, M., and Aronheim, A. (2010). A novel c-Jun N-terminal kinase (JNK)-binding protein WDR62 is recruited to stress granules and mediates a nonclassical JNK activation. *Mol. Biol. Cell* *21*, 117–130.
- Watanabe, D., Saijoh, Y., Nonaka, S., Sasaki, G., Ikawa, Y., Yokoyama, T., and Hamada, H. (2003). The left-right determinant Inversin is a component of node monocilia and other 9+0 cilia. *Dev. Camb. Engl.* *130*, 1725–1734.
- 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.
- Weihbrecht, K., Goar, W.A., Pak, T., Garrison, J.E., DeLuca, A.P., Stone, E.M., Scheetz, T.E., and Sheffield, V.C. (2017). Keeping an Eye on Bardet-Biedl Syndrome: A Comprehensive Review of the Role of Bardet-Biedl Syndrome Genes in the Eye. *Med. Res. Arch.* *5*.

- Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol. Rev.* *85*, 1159–1204.
- Wettschureck, N., Moers, A., Wallenwein, B., Parlow, A.F., Maser-Gluth, C., and Offermanns, S. (2005). Loss of Gq/11 family G proteins in the nervous system causes pituitary somatotroph hypoplasia and dwarfism in mice. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 1942–1948.
- Wheway, G., Schmidts, M., Mans, D.A., Szymanska, K., Nguyen, T.-M.T., Racher, H., Phelps, I.G., Toedt, G., Kennedy, J., Wunderlich, K.A., et al. (2015). An siRNA-based functional genomics screen for the identification of regulators of ciliogenesis and ciliopathy genes. *Nat. Cell Biol.* *17*, 1074–1087.
- White, M.C., and Quarmby, L.M. (2008). The NIMA-family kinase, Nek1 affects the stability of centrosomes and ciliogenesis. *BMC Cell Biol.* *9*, 29.
- Wilczynska, A., Aigueperse, C., Kress, M., Dautry, F., and Weil, D. (2005). The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J. Cell Sci.* *118*, 981–992.
- Williams, C.L., Li, C., Kida, K., Inglis, P.N., Mohan, S., Semenec, L., Bialas, N.J., Stupay, R.M., Chen, N., Blacque, O.E., et al. (2011). MKS and NPHP modules cooperate to establish basal body/transition zone membrane associations and ciliary gate function during ciliogenesis. *J. Cell Biol.* *192*, 1023–1041.
- Wilson, R.C., and Doudna, J.A. (2013). Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu. Rev. Biophys.* *42*, 217–239.
- Winkelbauer, M.E., Schafer, J.C., Haycraft, C.J., Swoboda, P., and Yoder, B.K. (2005). The *C. elegans* homologs of nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are cilia transition zone proteins involved in chemosensory perception. *J. Cell Sci.* *118*, 5575–5587.
- Wodarczyk, C., Distefano, G., Rowe, I., Gaetani, M., Bricoli, B., Muorah, M., Spitaleri, A., Mannella, V., Ricchiuto, P., Pema, M., et al. (2010). Nephrocystin-1 forms a complex with polycystin-1 via a polyproline motif/SH3 domain interaction and regulates the apoptotic response in mammals. *PloS One* *5*, e12719.
- Wolf, M.T.F. (2015). Nephronophthisis and related syndromes. *Curr. Opin. Pediatr.* *27*, 201.
- Wolf, M.T.F., Saunier, S., O'Toole, J.F., Wanner, N., Groshong, T., Attanasio, M., Salomon, R., Stallmach, T., Sayer, J.A., Waldherr, R., et al. (2007). Mutational analysis of the RPGRIP1L gene in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis. *Kidney Int.* *72*, 1520–1526.
- Woo, D. (1995). Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *N. Engl. J. Med.* *333*, 18–25.
- Wree, A., McGeough, M.D., Inzaugarat, M.E., Eguchi, A., Schuster, S., Johnson, C.D., Peña, C.A., Geisler, L.J., Papouchado, B.G., Hoffman, H.M., et al. (2017). NLRP3 inflammasome driven liver injury and fibrosis: Roles of IL-17 and TNF in mice. *Hepatology*. Baltimore, Md.
- Wu, C., So, J., Davis-Dusenbery, B.N., Qi, H.H., Bloch, D.B., Shi, Y., Lagna, G., and Hata, A. (2011). Hypoxia potentiates microRNA-mediated gene silencing through posttranslational modification of Argonaute2. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 4760–4774.
- Wu, L., Osmani, S.A., and Mirabito, P.M. (1998). A role for NIMA in the nuclear localization of cyclin B in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Biol.* *141*, 1575–1587.

- Wu, L., Fan, J., and Belasco, J.G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 4034–4039.
- Xia, L., Hai, B., Gao, Y., Burnette, D., Thazhath, R., Duan, J., Bré, M.H., Levilliers, N., Gorovsky, M.A., and Gaertig, J. (2000). Polyglycylation of tubulin is essential and affects cell motility and division in *Tetrahymena thermophila*. *J. Cell Biol.* *149*, 1097–1106.
- Xia, Y., Wang, J., Liu, T.-J., Yung, W.K.A., Hunter, T., and Lu, Z. (2007). c-Jun downregulation by HDAC3-dependent transcriptional repression promotes osmotic stress-induced cell apoptosis. *Mol. Cell* *25*, 219–232.
- Xu, C., Shmukler, B.E., Nishimura, K., Kaczmarek, E., Rossetti, S., Harris, P.C., Wandering-Ness, A., Bacallao, R.L., and Alper, S.L. (2009). Attenuated, flow-induced ATP release contributes to absence of flow-sensitive, purinergic Ca^{2+} signaling in human ADPKD cyst epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *296*, F1464–1476.
- Xu, S., Robbins, D., Frost, J., Dang, A., Lange-Carter, C., and Cobb, M.H. (1995). MEKK1 phosphorylates MEK1 and MEK2 but does not cause activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 6808–6812.
- 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.
- Yakulov, T.A., Yasunaga, T., Ramachandran, H., Engel, C., Müller, B., Hoff, S., Dengjel, J., Lienkamp, S.S., and Walz, G. (2015a). Anks3 interacts with nephronophthisis proteins and is required for normal renal development. *Kidney Int.* *87*, 1191–1200.
- Yakulov, T.A., Yasunaga, T., Ramachandran, H., Engel, C., Müller, B., Hoff, S., Dengjel, J., Lienkamp, S.S., and Walz, G. (2015b). Anks3 interacts with nephronophthisis proteins and is required for normal renal development. *Kidney Int.* *87*, 1191–1200.
- 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., 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.
- Yang, T.T., Su, J., Wang, W.-J., Craige, B., Witman, G.B., Tsou, M.-F.B., and Liao, J.-C. (2015). Superresolution Pattern Recognition Reveals the Architectural Map of the Ciliary Transition Zone. *Sci. Rep.* *5*, 14096.
- 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, F., Nager, A.R., and Nachury, M.V. (2018). BBSome trains remove activated GPCRs from cilia by enabling passage through the transition zone. *J. Cell Biol.*
- 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**.
- Yekta, S., Shih, I.-H., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* **304**, 594–596.
- Yoshida, S., Shiratori, H., Kuo, I.Y., Kawasumi, A., Shinohara, K., Nonaka, S., Asai, Y., Sasaki, G., Belo, J.A., Sasaki, H., et al. (2012). Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2. *Science* **338**, 226–231.
- Youn, J.-Y., Dunham, W.H., Hong, S.J., Knight, J.D.R., Bashkurov, M., Chen, G.I., Bagci, H., Rathod, B., MacLeod, G., Eng, S.W.M., et al. (2018). High-Density Proximity Mapping Reveals the Subcellular Organization of mRNA-Associated Granules and Bodies. *Mol. Cell* **69**, 517–532.e11.
- Yu, C., Ye, S., Sun, H., Liu, Y., Gao, L., Shen, C., Chen, S., and Zeng, S. (2009a). PXR-mediated transcriptional activation of CYP3A4 by cryptotanshinone and tanshinone IIA. *Chem. Biol. Interact.* **177**, 58–64.
- Yu, J., Carroll, T.J., Rajagopal, J., Kobayashi, A., Ren, Q., and McMahon, A.P. (2009b). A Wnt7b-dependent pathway regulates the orientation of epithelial cell division and establishes the cortico-medullary axis of the mammalian kidney. *Dev. Camb. Engl.* **136**, 161–171.
- Yu, X., Ng, C.P., Habacher, H., and Roy, S. (2008). Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. *Nat. Genet.* **40**, 1445–1453.
- Yuan, S., Li, J., Diener, D.R., Choma, M.A., Rosenbaum, J.L., and Sun, Z. (2012). Target-of-rapamycin complex 1 (Torc1) signaling modulates cilia size and function through protein synthesis regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 2021–2026.
- Zariwala, M.A., Leigh, M.W., Ceppa, F., Kennedy, M.P., Noone, P.G., Carson, J.L., Hazucha, M.J., Lori, A., Horvath, J., Olbrich, H., et al. (2006). Mutations of DNAI1 in primary ciliary dyskinesia: evidence of founder effect in a common mutation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **174**, 858–866.
- Zekri, L., Huntzinger, E., Heimstädt, S., and Izaurralde, E. (2009). The Silencing Domain of GW182 Interacts with PABPC1 To Promote Translational Repression and Degradation of MicroRNA Targets and Is Required for Target Release. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 6220–6231.
- Zeng, L., Fagotto, F., Zhang, T., Hsu, W., Vasicek, T.J., Perry, W.L., Lee, J.J., Tilghman, S.M., Gumbiner, B.M., and Costantini, F. (1997). The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell* **90**, 181–192.
- Zeng, Y., Sankala, H., Zhang, X., and Graves, P.R. (2008). Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *Biochem. J.* **413**, 429–436.
- Zeqiraj, E., Filippi, B.M., Deak, M., Alessi, D.R., and van Aalten, D.M.F. (2009). Structure of the LKB1-STRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. *Science* **326**, 1707–1711.
- Zerres, K., and Ortiz Bröchle, N. (2012). [Cystic kidney diseases]. *Internist* **53**, 419–421, 423–425, 427–428.
- Zhang, H., Su, B., Liu, X., Xiao, H., Ding, J., and Yao, Y. (2017). Mutations in TTC21B cause different phenotypes in two childhood cases in China. *Nephrol. Carlton Vic.*

- Zhang, P., Smith-Nguyen, E.V., Keshwani, M.M., Deal, M.S., Kornev, A.P., and Taylor, S.S. (2012a). Structure and allostery of the PKA RIIB tetrameric holoenzyme. *Science* 335, 712–716.
- Zhang, Q., Nishimura, D., Seo, S., Vogel, T., Morgan, D.A., Searby, C., Bugge, K., Stone, E.M., Rahmouni, K., and Sheffield, V.C. (2011). Bardet-Biedl syndrome 3 (Bbs3) knockout mouse model reveals common BBS-associated phenotypes and Bbs3 unique phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 20678–20683.
- Zhang, Q., Yu, D., Seo, S., Stone, E.M., and Sheffield, V.C. (2012b). Intrinsic protein-protein interaction-mediated and chaperonin-assisted sequential assembly of stable bardet-biedl syndrome protein complex, the BBSome. *J. Biol. Chem.* 287, 20625–20635.
- Zhang, X., Zheng, B., Gu, C., Fu, J., and Wen, J. (2012c). TGF- β 1 downregulates AT1 receptor expression via PKC- δ -mediated Sp1 dissociation from KLF4 and Smad-mediated PPAR- γ association with KLF4. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1015–1023.
- Zhang, Y., Kwon, S., Yamaguchi, T., Cubizolles, F., Rousseaux, S., Kneissel, M., Cao, C., Li, N., Cheng, H.-L., Chua, K., et al. (2008). Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1688–1701.
- Zhao, Z., and Manser, E. (2005). PAK and other Rho-associated kinases--effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem. J.* 386, 201–214.
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., et al. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* 21, 2747–2761.
- Zheng, D., Ezzeddine, N., Chen, C.-Y.A., Zhu, W., He, X., and Shyu, A.-B. (2008). Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 182, 89–101.
- Zhou, W., Otto, E.A., Cluckey, A., Airik, R., Hurd, T.W., Chaki, M., Diaz, K., Lach, F.P., Bennett, G.R., Gee, H.Y., et al. (2012). FAN1 mutations cause karyomegalic interstitial nephritis, linking chronic kidney failure to defective DNA damage repair. *Nat. Genet.* 44, 910–915.
- Zipprich, J.T., Bhattacharyya, S., Mathys, H., and Filipowicz, W. (2009). Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *RNA* 15, 781–793.
- Zollinger, H.U., Mihatsch, M.J., Edefonti, A., Gaboardi, F., Imbasciati, E., and Lennert, T. (1980). Nephronophthisis (medullary cystic disease of the kidney). A study using electron microscopy, immunofluorescence, and a review of the morphological findings. *Helv. Paediatr. Acta* 35, 509–530.

ANNEXE

Novel NEK8 Mutations Cause Severe Syndromic Renal Cystic Dysplasia through YAP Dysregulation.

Valentina Grampa, Marion Delous #, Mohamad Zaidan #, Gweltas Odyé, Sophie Thomas, Nadia Elkhartoufi, Emilie Filhol, Olivier Niel, Flora Silberman, Corinne Lebreton, Sophie Collardeau-Frachon, Isabelle Rouvet, Jean-Luc Alessandri, Louise Devisme, Anne Dieux-Coeslier, Marie-Pierre Cordier, Yline Capri, Suonavy Khung-Savatovsky, Sabine Sigaudy, Rémi Salomon, Corinne Antignac, Marie-Claire Gubler, Alexandre Benmerah, Fabiola Terzi, Tania Attié-Bitach, Cécile Jeanpierre‡, Sophie Saunier‡

These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work

A l'image de la stratégie utilisée pour identifier les mutations d'ANKS3, nous avons identifié huit mutations dans le gène NEK8/NPHP9 chez cinq familles. Les patients présentent des phénotypes similaires de maladies kystiques sévères. Comme introduit dans ce manuscrit, NEK8/NPHP9 code une protéine kinase de la famille des NIMA qui se localise au niveau du compartiment Inversine du cil primaire et interagit avec ANKS3. NEK8 est connue pour son rôle de régulation de la voie de signalisation Hippo (cf La voie Wnt), une voie essentielle du développement. Dans ce travail, nous avons montré pour la première fois la responsabilité de mutations NEK8 dans l'apparition de phénotypes d'agénésie rénale et d'hypodysplasie. Dans un premier temps l'étude des phénotypes nous a permis de mettre en évidence que les mutations perte de fonction de NEK8 conduisent à des phénotypes kystiques (reins et pancreas) tandis que les mutations faux-sens causent des hypodysplasies ou agénésies rénales associées à des cardiopathies. Cette corrélation phénotype/génotype est en corrélation avec ce qui a déjà été publié pour d'autres gènes de ciliopathies (cf Hétérogénéité phénotypique, une relation phénotype-génotype). Par la suite, l'étude cellulaire de l'impact de ces mutations a permis de mettre en évidence le caractère gain de fonction des mutations faux sens notamment pour leur effet sur la ciliogénèse et la localisation ciliaire du partenaire du compartiment inversine ANKS6. Plus, ces mutations altèrent également la translocation nucléaire de la protéine YAP, acteur de la voie Hippo. En conséquence l'expression des gènes cibles du facteur de transcription YAP est également dérégulée dans les fibroblastes et le modèle cellulaire IMCD3 invalidé pour NEK8. L'étude de la polarité en utilisant un modèle de culture tridimensionnelle a démontré pour les cellules invalidées pour NEK8 la formation de sphères de tailles et de formes anormales associées avec une persistance anormale du marquage nucléaire de la protéine YAP et de l'antigène Ki-67 soulignant une prolifération anormale. Le caractère gain de fonction et la pathogénicité des mutations a également été démontré dans ce modèle par reexpression des différentes formes mutantes entraînant alors des phénotypes plus sévères. Finalement l'utilisation de la Verteporfine, un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de la protéine YAP a permis de restaurer les défauts de polarité en culture 3D mais également *in vivo* chez le modèle animal de poisson zèbre. Ainsi nous avons démontré l'importance de la dérégulation de la voie Hippo dans l'apparition chez les patients des phénotypes en réponse aux mutations de la protéine NEK8.

Ma contribution dans ce travail a permis de démontrer l'effet des différentes mutations de NEK8 sur son interaction avec ANKS6 et notamment de l'effet délétère de la mutation T87A (Figure 3). De plus j'ai permis de mettre en évidence l'effet des différentes mutations de

NEK8 sur les voies de signalisation Hippo et Notch par l'analyse par qPCR de l'expression des gènes cibles de ces voies, respectivement *Ctgf*, *Cyr61*, *Ankrd1*, *Birc5* et *Jag1* (Figure 7 et 8). Par la même approche j'ai également contribué à mettre en évidence l'effet de la verteporfin sur la voie Notch permettant d'établir le lien entre l'activation de YAP et la dérégulation de la voie Notch dans les cellules mutantes pour NEK8 (Figure 8).

RESEARCH ARTICLE

Novel *NEK8* Mutations Cause Severe Syndromic Renal Cystic Dysplasia through YAP Dysregulation

Valentina Grampa^{1,2}, Marion Delous^{1,2}, Mohamad Zaidan³, Gweltas Odyé^{1,2}, Sophie Thomas^{2,4}, Nadia Elkhartoufi^{2,4,5}, Emilie Filhol^{1,2}, Olivier Niel^{1,2,6}, Flora Silberman^{1,2}, Corinne Lebreton^{2,7}, Sophie Collardeau-Frachon⁸, Isabelle Rouvet⁹, Jean-Luc Alessandri¹⁰, Louise Devisme¹¹, Anne Dieux-Coeslier¹², Marie-Pierre Cordier¹³, Yline Capri¹⁴, Suonavy Khung-Savatovsky¹⁵, Sabine Sigaudy¹⁶, Rémi Salomon^{2,17}, Corinne Antignac^{1,2,5}, Marie-Claire Gubler^{1,2}, Alexandre Benmerah^{1,2}, Fabiola Terzi³, Tania Attié-Bitach^{2,4,18}, Cécile Jeanpierre^{1,2}, Sophie Saunier^{1,2}*



OPEN ACCESS

Citation: Grampa V, Delous M, Zaidan M, Odyé G, Thomas S, Elkhartoufi N, et al. (2016) Novel *NEK8* Mutations Cause Severe Syndromic Renal Cystic Dysplasia through YAP Dysregulation. *PLoS Genet* 12(3): e1005894. doi:10.1371/journal.pgen.1005894

Editor: David R. Beier, Seattle Children's Research Institute, UNITED STATES

Received: August 4, 2015

Accepted: February 2, 2016

Published: March 11, 2016

Copyright: © 2016 Grampa et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by grants from the "Agence Nationale de la Recherche" (ANR-2010-BLAN-1122-01 to SSa and TAB and ANR-13-BSV1-0027 to TAB), the Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20130326532 to SSa), the foundation GIS-Maladies Rares (FONDATION_HTS-RD – I201302013), the European Union's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) under grant agreement 2012-305608 (EURenOmics to CJ) and the Fondation ARC (EML20110602384) for the purchase of the LEICA SP8 confocal microscope. VG

1 INSERM UMR1163, Laboratory of Inherited Kidney Diseases, Necker-Enfants Malades Hospital, Paris, France, 2 Paris Descartes—Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Paris, France, 3 INSERM U1151, CNRS UMR8253, Paris Descartes—Sorbonne Paris Cité University, Necker-Enfants Malades Institute, Mechanisms and Therapeutic Strategies of Chronic Kidney Diseases, Necker Hospital, Paris, France, 4 INSERM UMR1163, Laboratory of Embryology and Genetics of Congenital Malformations, Paris, France, 5 Department of Genetics, AP-HP, Necker Hospital, Paris, France, 6 Department of Pediatric Nephrology, AP-HP, Robert Debré Hospital, Paris, France, 7 INSERM UMR1163, Laboratory of Intestinal Immunity, Paris, France, 8 Department of Pathology, Hospices Civils de Lyon, CHU de Lyon, Lyon, France, 9 Cellular Biotechnology Department and Biobank, Hospices Civils de Lyon, CHU de Lyon, Lyon, France, 10 CHU de La Réunion Saint-Denis/Saint-Pierre, La Réunion, France, 11 Anatomopathological Department, CHRU Lille, University Hospital, Lille, France, 12 Department of Clinical Genetics, CHRU Lille, Lille, France, 13 Department of Genetics, Femme Mère-Enfant Hospital, University of Lyon 1, Bron, France, 14 Department of Genetics, CHU Robert-Debré, Paris, France, 15 Fetal Pathology department, CHU Robert-Debré, Paris, France, 16 Multidisciplinary Department of Prenatal Diagnosis, La Timone Children's Hospital, Marseille, France, 17 Department of Pediatric Nephrology, AP-HP, Necker Hospital, Paris, France, 18 Department of Histology-Embryology and Cytogenetics, AP-HP, Necker Hospital, Paris, France

* These authors contributed equally to this work.

† These authors also contributed equally to this work.

* sophie.saunier@inserm.fr

Abstract

Ciliopathies are a group of genetic multi-systemic disorders related to dysfunction of the primary cilium, a sensory organelle present at the cell surface that regulates key signaling pathways during development and tissue homeostasis. In order to identify novel genes whose mutations would cause severe developmental ciliopathies, >500 patients/fetuses were analyzed by a targeted high throughput sequencing approach allowing exome sequencing of >1200 ciliary genes. *NEK8/NPHP9* mutations were identified in five cases with severe overlapping phenotypes including renal cystic dysplasia/hypodysplasia, *situs inversus*, cardiopathy with hypertrophic septum and bile duct paucity. These cases highlight a genotype-phenotype correlation, with missense and nonsense mutations associated with hypodysplasia and enlarged cystic organs, respectively. Functional analyses of *NEK8* mutations in patient fibroblasts and mIMCD3 cells showed that these mutations differentially affect ciliogenesis, proliferation/apoptosis/DNA damage response, as well as epithelial morphogenesis. Notably, missense mutations exacerbated some of the defects due to *NEK8*

is supported by the Fondazione CARIPLO and by Institut Imagine, and GO is the recipient of a fellowship from the "Région Île de France, CORDDIM" (CORDDIM 2014/CP 14-349). The Institut Imagine is supported by an ANR Grant ANR-A0-IAHU-01. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

loss of function, highlighting their likely gain-of-function effect. We also showed that *NEK8* missense and loss-of-function mutations differentially affect the regulation of the main Hippo signaling effector, YAP, as well as the expression of its target genes in patient fibroblasts and renal cells. YAP imbalance was also observed in enlarged spheroids of *Nek8*-invalidated renal epithelial cells grown in 3D culture, as well as in cystic kidneys of *Jck* mice. Moreover, co-injection of *nek8* MO with WT or mutated *NEK8-GFP* RNA in zebrafish embryos led to shortened dorsally curved body axis, similar to embryos injected with human YAP RNA. Finally, treatment with Verteporfin, an inhibitor of YAP transcriptional activity, partially rescued the 3D spheroid defects of *Nek8*-invalidated cells and the abnormalities of *NEK8*-overexpressing zebrafish embryos. Altogether, our study demonstrates that *NEK8* human mutations cause major organ developmental defects due to altered ciliogenesis and cell differentiation/proliferation through deregulation of the Hippo pathway.

Author Summary

Genes mutated in ciliopathies encode proteins with various localizations and functions at the primary cilium. Here we report novel *NEK8* mutations in patients with renal cystic hypodysplasia and associated ciliopathy defects. *NEK8* belongs to a protein complex defining the Inversin compartment of the cilium. It is also a negative regulator of the Hippo signaling pathway that controls organ growth. We report genotype-phenotype correlation in the patients. We functionally demonstrate that the two types of mutations (missense *versus* nonsense) differentially affect ciliogenesis, cell apoptosis and epithelialisation. We also show that all the mutations lead to dysregulation of the Hippo pathway through nuclear YAP imbalance but that the nature of this imbalance is different according to the type of mutation. We confirm alteration of the Hippo pathway associated with *Nek8* mutation *in vivo* in *Jck* mice. Remarkably, we show that morphogenesis defects observed in *Nek8* knockdown epithelial cells or zebrafish embryos are rescued by Verteporfin, a specific inhibitor of YAP transcriptional activity, demonstrating the causative role of YAP dysregulation in the occurrence of these defects. Altogether, this study links *NEK8* mutations to dysregulation of the Hippo pathway and provide molecular clues to understand the variability of the multiorgan defects in the patients.

Introduction

Ciliopathies are a group of autosomal recessive disorders caused by a dysfunction of the primary cilium. These conditions are multisystemic disorders, affecting left-right symmetry (*situs inversus*) and various organs such as retina (retinitis pigmentosa, Senior-Løken syndrome), brain (cerebellar vermis aplasia, Joubert syndrome), liver (cysts, intrahepatic biliary fibroadenomatosis), pancreas (cysts) as well as skeleton (cone shape epiphysis, narrow thorax, polydactyly), and/or kidney (renal cystic dysplasia (RCD), nephronophthisis (NPH)) [1, 2]. RCD and NPH are major genetic causes of end stage renal failure in children and perinatal death for RCD. RCD is a kidney developmental defect whose antenatal diagnosis by ultrasound examination reveals hyperechogenic kidneys. Phenotypes range from enlarged cystic dysplastic kidneys to undersized, hypodysplastic kidneys. RCD is usually classified among the spectrum of CAKUT (congenital anomalies of the kidney and urinary tract). NPH is characterized by atrophic kidney tubules with thickened basal membrane, interstitial fibrosis and, at a later stage,

the development of cysts at the cortico-medullary junctions. Kidney size can be normal or reduced.

The primary cilium is a microtubule-based antenna-like structure present at the cell surface of almost all vertebrate cells, which controls signaling pathways (Hedgehog, canonical Wnt and planar cell polarity (Wnt/PCP)) with a major role during development and homeostasis of the kidney and other organs. In renal tubular cells, the primary cilium functions as a mechano/chemo-sensor regulating cell cycle and PCP in response to urine flow, in order to control the orientation of the mitotic spindles along the axis of the elongating tubules and the organization of the epithelial cells with respect to their neighbors in the tissue. Defects in these processes result in cyst formation [3]. Ciliopathies are genetically heterogeneous diseases and mutations in >100 genes encoding ciliary proteins have been identified in affected patients [4]. Genotype-phenotype correlation analyses revealed that different mutations in the same gene could result in phenotypes with varying severity. Among these genes, missense mutations in *NEK8*/*NPHP9* have been reported to lead to early onset isolated NPH [5]. However, a homozygous nonsense *NEK8* mutation leading to absence of the protein was also identified in a family with three fetuses presenting with a more severe phenotype similar to Ivemark I and II syndromes, characterized by enlarged cystic dysplastic kidneys, pancreas and liver, associated with skeletal abnormalities, asplenia and congenital heart defects [6]. *NEK8* is a serine/threonine kinase composed of an N-terminal kinase domain and five C-terminal Regulator of Chromosome Condensation 1 (RCC1) repeat domains that belongs to the family of Never in Mitosis gene A (NIMA) proteins involved in the control of cell cycle progression [7]. In the cilium, *NEK8* is located at the “Inversin (INVS) compartment”, a specific subcompartment of the proximal part of the axoneme, distal to the transition zone [8]. The function of this compartment is poorly understood, but human or mouse mutations in genes encoding components of the INVS compartment, *INVS*/*NPHP2*, *NPHP3* and *ANKS6*/*NPHP16*, are known to lead to infantile nephronophthisis with cystic kidneys, congenital heart defects and laterality defects [9–13]. Additionally, *NEK8* is also present in the nucleus where it controls the replication fork progression during S-phase and regulates DNA damage response [14].

Recently, *NEK8* has been proposed as a regulator of the Hippo signaling pathway [15]. The Hippo pathway regulates organ size by controlling the balance between cell proliferation and cell cycle arrest through the phosphorylation state and nuclear shuttling of transcriptional co-factors YAP/TAZ [16, 17]. Phosphorylation and nuclear shuttling of YAP/TAZ are strictly correlated to cell density, cell polarity and cellular actin cytoskeleton organization [18]. In low cell density conditions, YAP/TAZ are mainly unphosphorylated and able to translocate into the nucleus, resulting in cell proliferation. Conversely, at high cell density, YAP/TAZ are mainly phosphorylated and retained in the cytoplasm, leading to proliferation arrest. *NEK8* has been reported to favor TAZ nuclear translocation, a process that is enhanced by *NPHP4*, encoded by another gene causing NPH, highlighting these two proteins as inhibitors of the Hippo pathway [15, 19].

Here, we report novel *NEK8*/*NPHP9* mutations in five unrelated cases with severe multisystemic phenotypes. This study highlights the dual phenotype associated with the nature of the mutations and the key functions of *NEK8* in ciliogenesis and cell proliferation/differentiation through regulation of YAP.

Results

Novel *NEK8*/*NPHP9* mutations are associated with severe syndromic renal cystic dysplasia

To identify novel mutations responsible for renal ciliopathies, we performed exon-enriched NGS targeting 1,222 genes associated with cilia structure/function, including all genes already

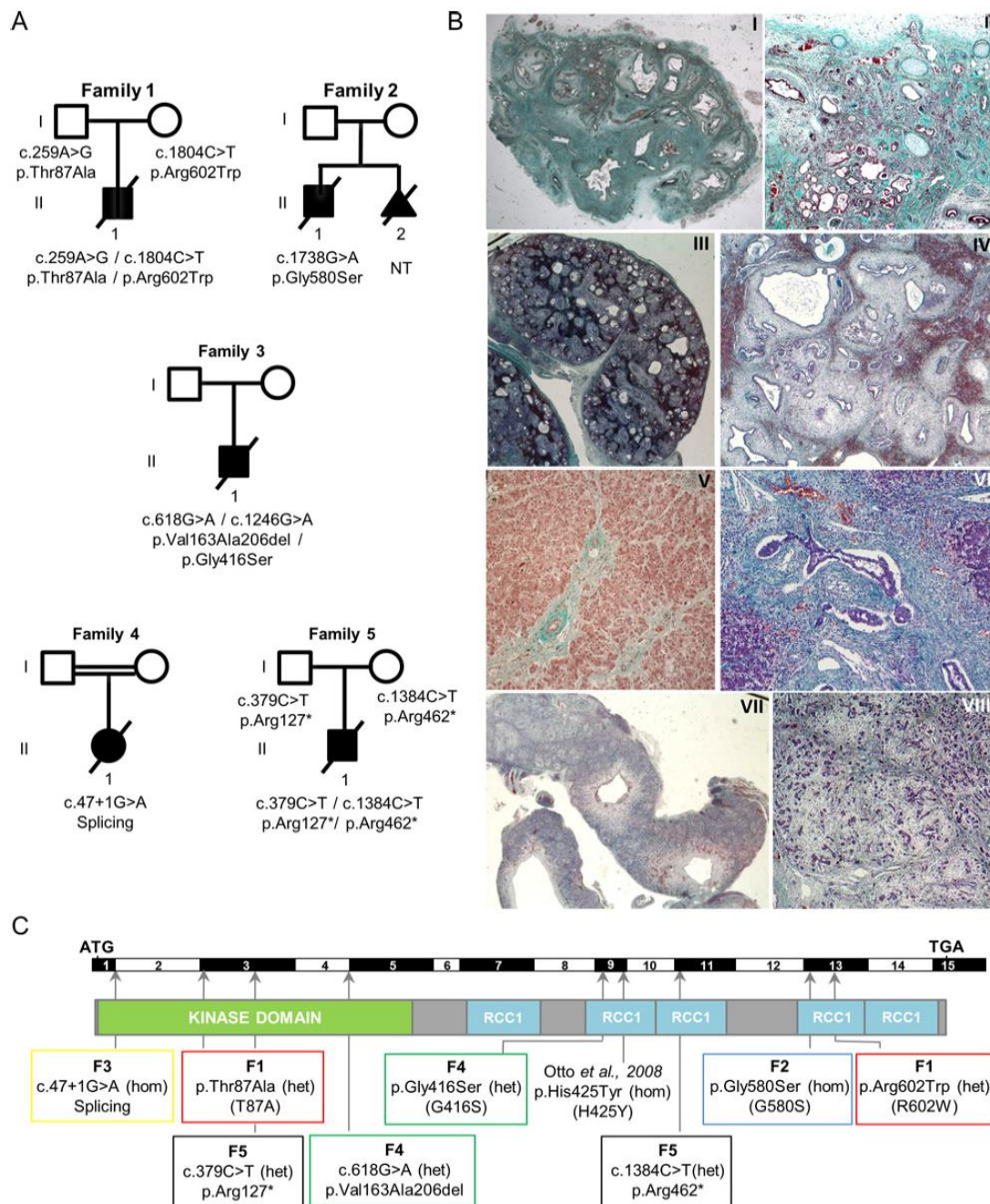


Fig 1. Identification of *NEK8/NPHP9* mutations associated with severe renal cystic dysplasia. (A) Pedigrees of the five families with identified compound heterozygous or homozygous *NEK8* mutations. (B) Trichrome light green staining of kidney (I–IV), liver (V, VI) and pancreas (VII, VIII) tissue sections from individual F1 II.1 (I, II, V) and F5 II.1 (III, IV, VI–VIII). (I–II) F1 II.1 presents a major cystic hypodysplasia of the right kidney (I) and a severe dysplasia of the left kidney (II) with persistence of few differentiated nephrons between large areas of fibrosis with primitive tubules (arrowhead) and presence of metaplastic cartilage (arrows). (III–IV) Fetus F5 II.1 shows enlarged cystic kidneys (III) of apparent normal shape. High magnification (IV) revealed a diffuse

architectural disorganization with the presence of cysts of various sizes, fibrosis and dysplastic tubules (asterisks) and persistence of few glomeruli (arrowhead). (V-VIII) Portal tract fibrosis with extensions bridging adjacent portal areas (arrow) and hepatocytes focally dissociated by fibrosis (V) in affected individual F1 II.1. Fetus F5 II.1 presents with massive portal fibrosis with ductular proliferation (arrows) (VI) and large cystic structures in the pancreas (VII). Higher magnification reveals a massive and diffuse fibrosis with dissociation of the pancreatic parenchyma (VIII). Magnifications are 5x (III, VII), 10x (I), 40x (II, V, VIII), 100x (IV) and 200x (VI). (C) Location of the mutations: exons, position of the start (ATG) and stop (TGA) codons, as well as the position of the kinase and five RCC1 domains are indicated. Abbreviations: heterozygous (het); homozygous (hom). The mutation reported in a patient with nephronophthisis [5] is indicated. Mutations analyzed in functional studies are indicated with one letter nomenclature.

doi:10.1371/journal.pgen.1005894.g001

known to be associated with ciliopathies (“ciliome sequencing”) [20–22] in two distinct cohorts of affected individuals: 342 patients with isolated or syndromic NPH and 200 fetuses or neonatal death cases with syndromic cystic dysplasia, including Meckel and Ivemark syndromes. Eight novel recessive mutations were identified in *NEK8/NPHP9* in five unrelated families with severe overlapping phenotypes (Fig 1A, Table 1).

All five cases presented with kidney involvement associated with extra-renal defects including *situs inversus* (4 cases), cardiomegaly (3 cases), paucity of bile ducts (3 cases), pancreas defects (3 cases), narrow thorax and short bowed femurs (2 cases), and brain defects such as corpus callosum or vermis agenesis (2 cases) (Table 1). Patients/fetus from families 1, 2 and 3 shared developmental abnormalities including asymmetric renal hypodysplasia with one absent or extremely reduced in size kidney and the other one with major dysplasia, diffuse interstitial fibrosis and incomplete cortico-medullary differentiation, cardiac septal hyperplasia and liver alterations including paucity of bile ducts (Fig 1B and Table 1). The fetus from family 3, diagnosed with Ivemark I syndrome, presented with short pancreas and asplenia in addition to the defects listed above. The patient from family 2 and his affected sibling have already been reported [23]. In contrast, the fetuses from families 4 and 5 exhibited enlarged multicystic kidneys, cystic pancreas and liver, and agenesis of the vermis (fetus 4). The patient from family 1 carried compound heterozygous missense mutations: a paternally-inherited c.259A>G variation in exon 3 leading to a missense alteration in the kinase domain (p.Thr87Ala) and a maternally-inherited c.1804C>T variation in exon 13 resulting in an amino acid change in the RCC1 domain (p.Arg602Trp) (Figs 1A, 1C and S1A, Table 1). The patient from family 2 carried a homozygous missense mutation in exon 13 (c.1738 G>A) leading to an amino acid substitution (p.Gly580Ser) in the RCC1 domain (Figs 1A, 1C and S1A, Table 1). The fetus from family 3 carried a maternally-inherited heterozygous variant of the last base pair of exon 4 (c.618G>A) resulting in the in-frame skipping of exon 4 and loss of 44 amino acids in the kinase domain (p.Val163-Ala206del), associated with a paternally-inherited heterozygous variation (c.1246G>A) leading to a missense mutation (p.Gly416Ser) in the RCC1 domain (Figs 1A, 1C and S1A, Table 1). All four missense mutations were predicted as damaging by PolyPhen-2 and SIFT. The fetus from consanguineous family 4 carried a homozygous mutation affecting the first base of the 5' essential splice site in intron 1 (c.47+1 G>A). This mutation, which is predicted to totally abolish intron 1 splicing, is thus expected to lead to an absence of the protein. Finally, the fetus from family 5 carried two compound heterozygous nonsense mutations (paternally-inherited p.Arg127* and maternally-inherited p.Arg462*) that may result in truncated proteins and/or RNA decay as indicated by *NEK8* mRNA quantification (S1B Fig).

NEK8 mutated proteins fail to localize to the ciliary axoneme in human primary fibroblasts and mIMCD3 cells and alter the INVS compartment composition

We first examined the impact of patient mutations on the targeting of NEK8 to the cilium as well as on ciliogenesis, using patient fibroblasts and mIMCD3 kidney cells.

Table 1. Clinical features of individuals with NEK8 mutations.

Family	Renal phenotype	Extrarenal phenotype				Gender	Age at death	CS	Nucleotide alteration (segregation)	Protein Change	Exon or intron	PolyPhen2 / Sift score	Allele frequency in ExAC
		SI	Heart	Liver	Pancreas	Other							
F1	R: major cystic hypodysplasia; L: tubulointerstitial nephropathy with dysplasia (primitive cystic tubules and cartilage nodules), cortical interstitial fibrosis	yes	Cardiomegaly, patent arteriosus ductus and interventricular septum hyperplasia	Hepatomegaly, cholestasis, paucity of bile ducts and fibrosis	/	/	M	1 month and 20 days	no c.259 A>G (Het, P) c.1804 C>T (Het, M)	p.Thr87Ala p.Arg602Trp	Exon 3	0.882/0.00 0.991/0.00	Absent
F2	R: microcysts in cortex and medulla; L: major hypodysplasia with macrocysts and cartilage nodules	No (yes in fetus sib)	Hypertrophic cardiomyopathy, interventricular septum hyperplasia	Paucity of bile ducts	/	Facial dysmorphism, narrow thorax, short bowed femurs, agenesis of corpus callosum	M	3 days	no c.1783 G>A (Hom)	p.Gly508Ser	Exon 13	1/0.00	8.2.10 ⁻⁶
F3	R: hypodysplasia, incomplete corticomedullary differentiation, cartilage nodules and fibrosis; L: absent	yes	Cardiomegaly with intraventricular communication	Paucity of bile ducts	Short and fibrotic	Asplenia, narrow thorax, short bowed femurs	M	fetus*	no c.618G>A (Het, M)	Splicing (p.Val163-Ala206del)	Exon 4	/	9.1.10 ⁻⁵
F4	R/L: enlarged with cystic dysplasia and massive fibrosis	yes	/	/	Enlarged with cysts	Absence of uterus and vagina, gonads with abnormal morphology, agenesis of posterior vermis	F	fetus**	yes c.47+1 G>A (Hom)	Splicing	Intron 1	/	Absent
F5	R/L: enlarged with cystic dysplasia incomplete corticomedullary differentiation, primitive cystic tubules and luminal calcification, fibrosis	yes	/	Ductal plate anomalies with cystic biliary fibroadenomatosis	Enlarged with cysts	Facial dysmorphism, arthrogryposis (anamniotic), neurological examination ND	M	fetus**	no c.379C>T (Het, P)	p.Arg127*	Exon 3	/	Absent
									c.1384C>T (Het, M)	p.Arg462*	Exon 10	/	Absent

NEK8/NPHP9 mutations are numbered according to the human cDNA (NM_178170.2). Position +1 corresponds to the A of ATG. Abbreviations are as follows: SI, situs inversus; CS, consanguinity; R, right kidney; L, left kidney; sib, sibling; P, paternal inheritance; M, maternal inheritance; Het, heterozygous; Hom, homozygous; ND, not determined. Termination of pregnancy at *26weeks, **28 weeks of gestation.

doi:10.1371/journal.pgen.1005894.t001

We obtained primary fibroblasts from skin biopsies of family1 and 5 affected cases F1 II.1 and F5 II.1 (subsequently referred as PT1 and PT5) harboring compound heterozygous mutations p.T87A/p.R602W or p.Arg127*/p.Arg462*, respectively. While NEK8 was located in the proximal part of the ciliary axoneme in control ciliated fibroblasts, it was absent from cilia in PT1 fibroblasts carrying missense mutations (Fig 2A and 2A'), and was instead detected onto a cytoplasmic juxtanuclear vesicular compartment that we identified as the Golgi apparatus (S2A Fig). As an aside, we noted that endogenous NEK8 or transfected NEK8-GFP proteins were also present at the Golgi in control fibroblasts (S2A and S2B Fig). However, in these cells, NEK8 Golgi localization seemed to be transient as it was clearly observed at low confluence (S2C Fig) and decreased in ciliated cells, suggesting a dynamic localization of NEK8 during ciliogenesis. In PT5 fibroblasts carrying nonsense mutations, no specific NEK8 staining was detected, indicating that the truncating mutations result in the loss of protein expression. Subsequent evaluation of the impact of *NEK8* mutations on ciliogenesis showed that the percentage of ciliated cells was significantly decreased in PT1 fibroblasts compared to control cells (50% vs 80%; Fig 2B). In contrast, ciliogenesis was not affected in PT5 fibroblasts (Fig 2B), in agreement with previously reported data showing that renal and MEF cells from *Nek8* knock-out mice do not show ciliogenesis defects [10,25]. In addition, cilia length was more reduced in cells with missense mutations than in those with loss-of-function mutations (Fig 2C).

In order to characterize the specific effect of each *NEK8* missense mutation, we generated murine inner medullary collecting duct (mIMCD3) cells depleted for *Nek8* expression using a lentiviral vector for shRNA expression. A 80% reduction of the mRNA level was obtained in the *Nek8* knock-down cell line (shNEK8) compared to the control cell line transduced with the empty vector (pLKO) leading to a non detectable expression of the protein by immunofluorescence and western blot analyses (S3A, S3B and S3D Fig). The shNEK8 cells were then stably transfected with human NEK8-GFP constructs encoding either the wild-type protein (WT) or the missense variants identified in the patients. In addition, the p.H425Y NEK8 variant, located in the RCC1 domain and previously associated with isolated infantile NPH, was used as a control as it has been reported to alter NEK8 localization at the cilium [5, 24]. The level of expression of human NEK8-GFP fusions was in the same range in all the cell lines (S3C and S3D Fig). The WT NEK8-GFP protein localized to the ciliary axoneme at the "inversin (INVS) compartment" (Fig 2D and 2D'). The proteins with mutations in the RCC1 domains, p.G580S and p.R602W, were no longer present at the cilium and accumulated into the cytosol, similar to the p.H425Y protein [5]. This is in agreement with the major role of the RCC1 domains in cilia localization [24]. In contrast, an axonemal staining, weaker than in control cells, was detected in half of the ciliated cells expressing the NEK8 protein mutated in the kinase domain (p.T87A) (Fig 2D and 2D'). This result is coherent with a previous study showing that some NEK8 mutations in the kinase domain and affecting the kinase activity do not prevent its localization to the cilia in cell culture and in mice [10]. However, the decreased localization of NEK8 T87A-GFP protein points to a role of the kinase domain, possibly independently of the kinase activity, in ciliary NEK8 targeting process.

Then, we evaluated ciliogenesis in the various mIMCD3 cell lines. As observed in PT5 fibroblasts, ciliogenesis was not significantly affected in shNEK8 cells (Fig 2E). However, expression of all but WT and p.H425Y NEK8-GFP proteins led to a reduced percentage of ciliated cells, similar to what we observed in PT1 fibroblasts (p.T87A/p.R602W), highlighting a "gain of function" effect of the missense mutations on this process (Fig 2E).

We next addressed the effect of NEK8 mutations on the ciliary localization of its partner ANKS6 [11]. While ANKS6 was located at the INVS compartment in 58% of control ciliated fibroblasts, its staining at the cilium was completely lost in PT1 and PT5 fibroblasts (Fig 3A and 3A'). As previously reported [10], a dramatic reduction of ANKS6 positive cilia was also

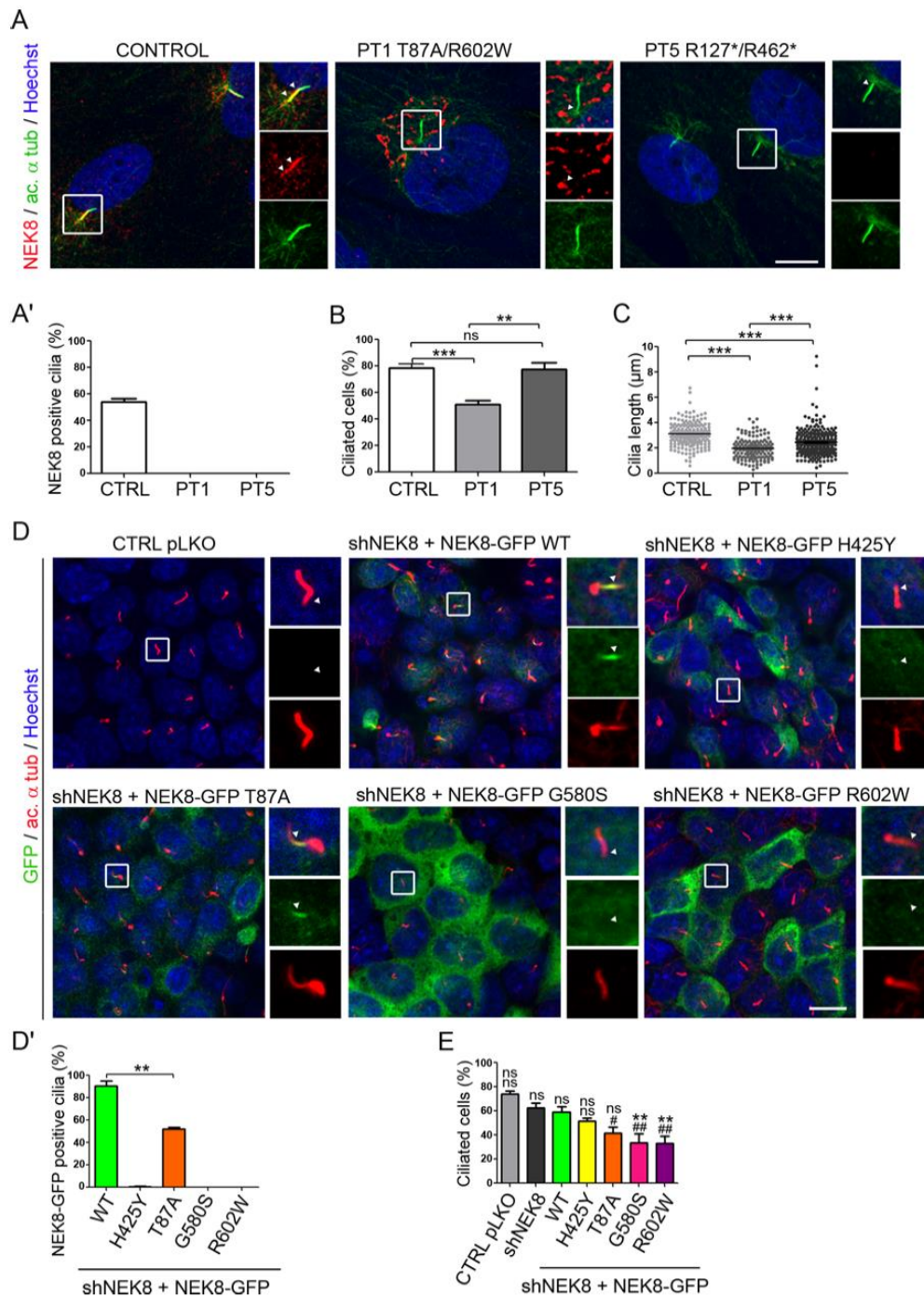


Fig 2. Mutant NEK8 proteins fail to localize at the ciliary axoneme in patient fibroblasts and in shNEK8 mIMCD3 cells re-expressing mutant constructs. (A) Fibroblasts from control (CTRL) and affected individuals II.1 of families 1 and 5 (PT1 and PT5) were grown for 6 days in standard medium

followed by 2 days of serum starvation in order to induce cilia growth (high cell density). Cells were stained for endogenous NEK8 (red) and acetylated α -tubulin (green). Arrows (insets) indicate the presence and absence of NEK8 at the axoneme in control and patient fibroblasts respectively. Scale bar, 10 μ m. (A') Percentage of cells with NEK8 staining along the cilium in control and patient fibroblasts. (B-C) Graphs representing the percentage of ciliated cells (B) and cilia length (μ m) (C) in control and patient fibroblasts. All graphs show the mean $\pm$ SEM of at least three independent experiments. *** $p < 0.001$, calculated via Kruskal-Wallis (B) or Bonferroni (C) post-hoc tests following ANOVA. (D) Ciliary localization of NEK8 in control pLKO and stable shNEK8 cells re-expressing GFP-tagged NEK8 wild type (WT) or patients' variants. Cells were stained for acetylated α -tubulin (red, cilia), GFP (green) and nuclei (Hoechst, blue). Only NEK8-GFP WT and partially NEK8-GFP T87A are able to localize along the axoneme. Scale bar, 10 μ m. (D') Histogram showing the percentage of cells with positive NEK8-GFP staining at the primary cilium. (E) Graph showing the percentage of ciliated cells in shNEK8 and shNEK8 re-expressing the mutated proteins cells. Statistical analysis performed by Bonferroni post-hoc test following ANOVA, ns = non significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ when samples are compared to shNEK8+NEK8-GFP WT and # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ to shNEK8.

doi:10.1371/journal.pgen.1005894.g002

observed in shNEK8 mIMCD3 cells (40% compared to 90% in control cells) (Fig 3B and 3B'). This phenotype was rescued by the re-expression of WT NEK8-GFP (80% of ANKS6-positive cilia), whereas none of the mutant forms were able to fully restore ANKS6 localization at the cilium (Fig 3B'). Moreover, in ANKS6 positive cilia of NEK8 mutant expressing cells, ANKS6 localization was restricted to the base of the cilium and did not extend along the INVS compartment as in control or NEK8-WT expressing cells (Fig 3B'). We next investigated the impact of NEK8 mutations on the interaction with ANKS6. Co-immunoprecipitation experiments demonstrated that only the p.T87A mutation led to a significant decrease of ANKS6 binding (Fig 3C and 3C'). This observation is in accordance with the recent report showing that NEK8 interacts directly with ANKS6 *via* its kinase domain [10, 11]. It is also in agreement with the observed lack of ciliary ANKS6 in shNEK8 cells expressing the p.T87A mutation. Altogether, these data demonstrate that all the NEK8 missense mutations affect both ciliogenesis and biogenesis of the INVS compartment in renal tubular cells and fibroblasts, by preventing correct targeting of NEK8 to cilia and/or binding to or recruitment of ANKS6.

NEK8 mutations affect cell cycle regulation

As NEK proteins are involved in cell cycle regulation [2], we sought to examine how NEK8 mutations affect the cell cycle and proliferation. Counting the cell number over 7 days of culture revealed that patient fibroblasts behave differently depending on the type of mutation. While the population of PT1 cells with the missense mutations failed to expand as fast as control cells, PT5 fibroblasts with loss-of-function mutations expand much faster (Fig 4A). In order to characterize this difference, we analysed cell cycle progression of control and patient fibroblasts. At low cell confluence, Ki-67 staining, a marker of G1 to M phase, did not show any difference (Fig 4B). However, analysis of cell cycle by flow cytometry revealed a higher proportion of cells in S-phase in fibroblasts from patients compared to control, at the expense of cells in G0/G1 (S4 Fig). We also analysed Ki-67 staining at high cell confluence, when cells are ciliated. As expected, in this condition, most if not all control cells were Ki-67-negative, likely in quiescent G0 status. In contrast, ~20% of PT1 and PT5 cells remained Ki-67-positive, including ciliated cells (Fig 4B and 4B'; insets), indicating that patient cells fail to enter into G0. This was confirmed by flow cytometry analysis, showing an increased proportion of cells in G2/M for both patient cell lines (S4 Fig).

Altogether, these results indicate a dysregulation of the cell cycle in patient cells, likely resulting in increased cell proliferation. This is in agreement with the data obtained by counting PT5 cell number that increases over time; however, for PT1 fibroblasts, we observed by Annexin-V staining that they underwent more apoptosis than control and PT5 cells after 48 hours of culture (33% vs 15% of control and PT5 cells; Fig 4C and 4C'), explaining why the population PT1 do not expand as well as PT5 fibroblast cells.

NEK8, like other proteins involved in ciliopathies, has recently been described as a regulator of DNA damage response (DDR), with loss of NEK8 dramatically affecting S-phase

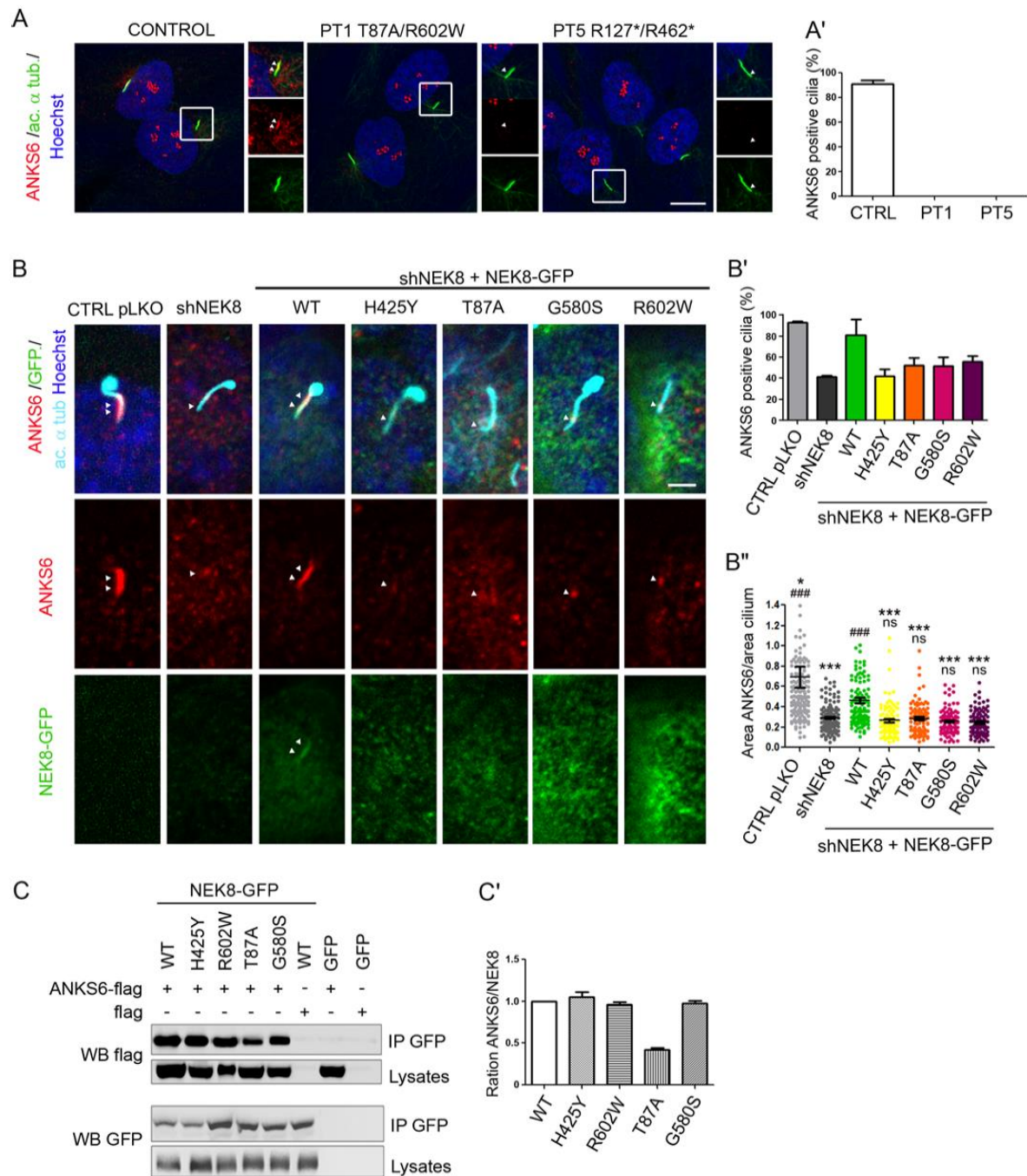


Fig 3. NEK8 mutations prevent ANKS6 localization at the INVS compartment and interaction in patient fibroblasts and shNEK8 mIMCD3 cells. (A) Serum-starved fibroblasts from control (CTRL) and affected individual II.1 of families 1 and 5 (PT1 and PT5) were stained for ANKS6 (red) and acetylated α -tubulin (green). Insets are magnifications of ciliary axonemes, showing that ANKS6 staining is lost in patient fibroblasts. Scale bar, 10 μ m. (A') Graph (mean $\pm$ SEM of three independent experiments) representing the percentage of cells with ANKS6 staining at cilia in control and patient fibroblasts. (B)

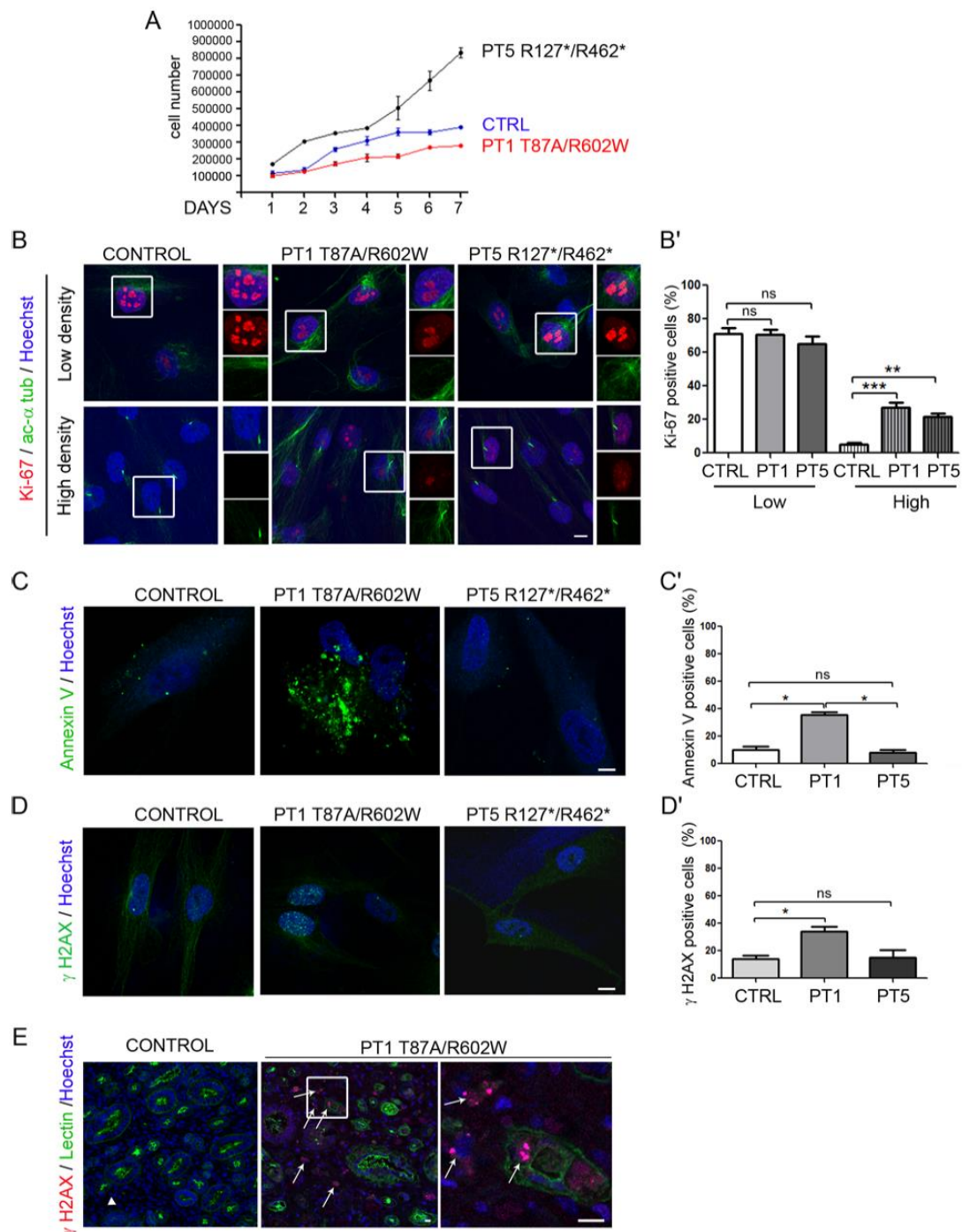


Fig 4. NEK8 missense mutations cause increased apoptosis and DNA damage accumulation in patient fibroblasts. (A) Control (CTRL) and affected individual II.1 from families 1 and 5 (PT1 and PT5) fibroblasts cultured in standard medium were counted for 7 days. Cell population expansions of PT1 and

PT5 fibroblasts were significantly slower and faster than control cells, respectively. (B) Immunostaining of Ki-67 (red, marker of proliferating cells) and acetylated α -tubulin (green, cilia) in proliferating (low density) and ciliated (high density) control and patient fibroblasts, showing Ki-67-positive ciliated patient cells. Scale bar, 10 μ m. (B') Percentage of Ki-67-positive cells in control and patient fibroblasts. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, calculated via Kruskal-Wallis test. (C) Immunolabelling of Annexin-V showing a higher rate of apoptosis in PT1 fibroblasts compared to control and PT5 cells. Scale bar, 10 μ m. (C') Graph representing the percentage of Annexin-V positive cells in control and patient fibroblasts. (D) Control and patient fibroblasts were grown for 2 days in normal medium (low cell density) and stained for γ H2AX (red, marker of double strand breaks) and nuclei (Hoechst, blue). Scale bar, 10 μ m. (D') Quantification of the percentage of γ H2AX-positive cells showing an increased staining only in PT1 cells. (E) PT1 kidney biopsy stained for γ H2AX (red, marker of double strand breaks), peanut Lectin (green, tubules) and nuclei (Hoechst, blue). Arrows point out γ H2AX-positive cells (inset) showing a dramatic increase of the staining. Scale bars, 10 μ m. All graphs show the mean $\pm$ SEM of at least three independent experiments. * $p < 0.05$, calculated via Kruskal-Wallis test.

doi:10.1371/journal.pgen.1005894.g004

nuclear YAP staining compared to control cells at low cell density and this expression level was not modulated by confluence (Fig 6A and 6A'). In contrast, a strong nuclear YAP staining was observed in PT5 fibroblasts at low cell density, that decreased at high cell density but remained higher than in control cells (Fig 6A and 6A'). Consequently, whereas the vast majority of control ciliated cells did not show any nuclear YAP staining (Fig 6A), maintenance of nuclear YAP staining occurred in about 40% of ciliated patient fibroblasts (Fig 6A, insets and Fig 6A"). These results indicate that *NEK8* mutations lead to an improper regulation of nuclear YAP shuttling from proliferation to quiescent state, which may affect cell growth and differentiation.

Upon cell confluence, inactivation of YAP is mediated by its phosphorylation on Ser127 [17]. As expected, immunofluorescence analysis revealed that cytosolic phospho-YAP increased with cell density in control fibroblasts (S5 Fig). A similar increase was observed in patient fibroblasts, indicating that *NEK8* mutations do not affect YAP phosphorylation (S5 Fig). YAP phosphorylation is regulated by the MTS1/2-SAV1 complex, which has also been recently reported to promote ciliogenesis and to localize at the basal body in ciliated cells [28]. We thus carefully examined phospho-YAP localization and detected the presence of phospho-YAP along the axoneme in 80% of cilia in control and PT5 fibroblasts (Fig 6B and 6B'). However, in PT1 fibroblasts, phospho-YAP was absent from cilia and the staining was restricted to the cilium base in half of the ciliated cells (Fig 6B and 6B'). Altogether, these data underline that *NEK8* mutations differently impair the cell density regulated nucleocytoplasmic shuttling of YAP, whereas only the missense mutations alter the localization of phospho-YAP at the cilium.

In order to better understand how *NEK8* mutations affect YAP nucleocytoplasmic shuttling, we analysed the ability of WT and mutated *NEK8*-GFP to promote nuclear YAP-myc localisation in co-transfected HEK293 cells. The co-transfection of each *NEK8* mutant form with YAP-myc decreased the nuclear translocation of YAP-myc compared to WT *NEK8*-GFP, confirming the results observed in PT1 fibroblasts (S6A Fig). Moreover, proximity ligation assay performed on cells co-expressing YAP-myc and *NEK8*-GFP-WT revealed that the two proteins are in close vicinity and are likely to interact at the perinuclear region (S6B Fig), supporting a direct role of *NEK8* in YAP regulation.

Then, in order to examine if nuclear YAP imbalance had an impact on target gene regulation, we analysed the expression of YAP target genes as well as the transcriptional YAP co-regulator *TEAD4* in control and patient fibroblasts. In control cells, the expression of *CYR61*, *CTGF* and *TEAD4* was decreased in confluent cells versus non-confluent cells (Fig 6C), thus following the amount of nuclear YAP in these cells, as previously described [29]. In contrast, in PT1 cells the expression of these genes was maintained at a similar level in high versus low confluent cells, consistent with maintenance of nuclear YAP localization in confluent cells. In PT5 cells, the expression of YAP target genes also reflected the nuclear YAP localization, with a high level of expression in non-confluent cells that decreased when cells reached confluence, although remaining at a higher level than in control cells.

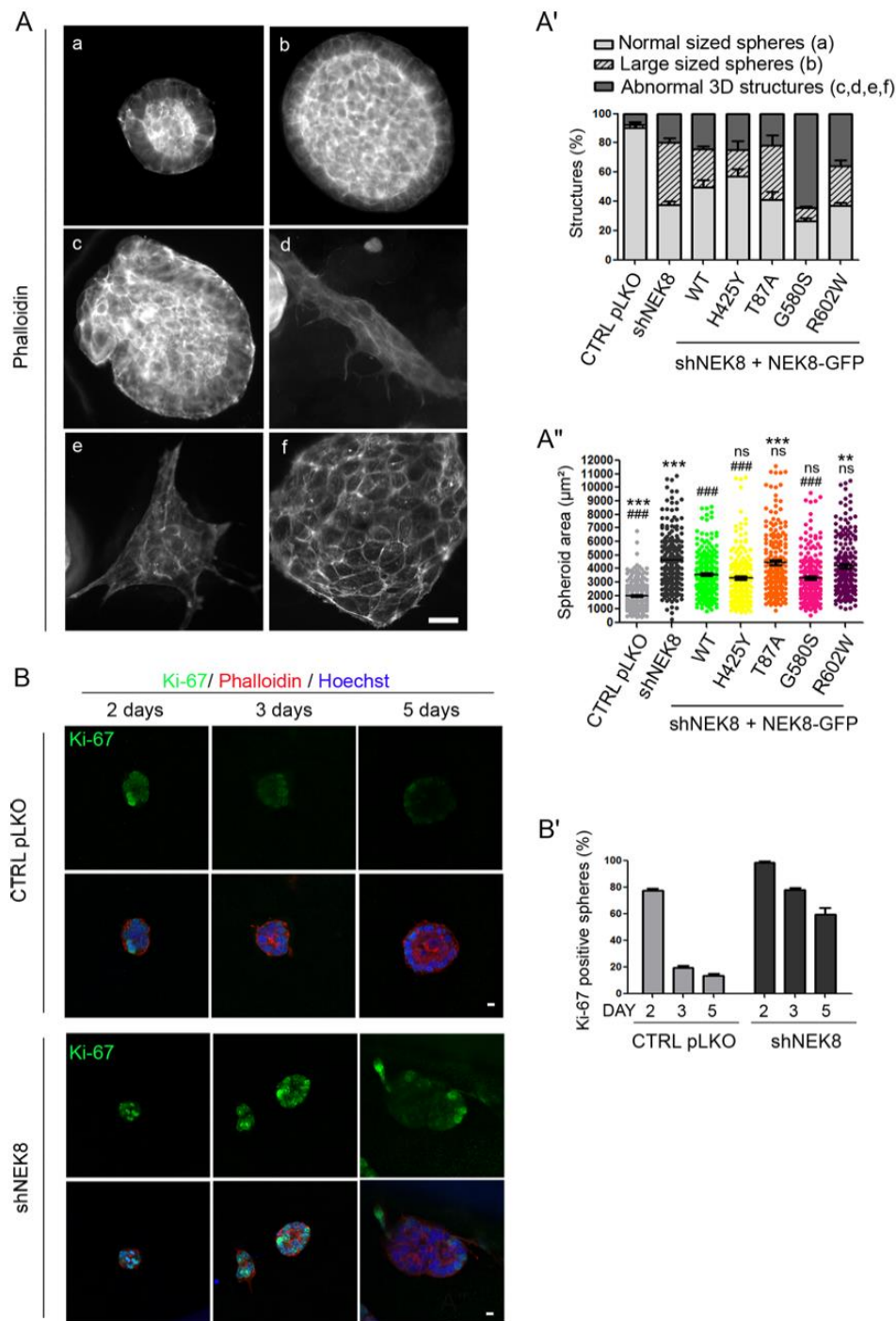


Fig 5. Abnormal 3D structures in shNEK8 and shNEK8 re-expressing NEK8 mutant protein cells. (A) 3D structures formed by shNEK8 and shNEK8 re-expressing NEK8 mutants. Cells were grown for 5 days in matrigel prior to phalloidin staining and six categories of structures were observed: (a) normal-sized spheres, (b) large-sized spheres, (c) malformed structures with lumen, (d) elongated structures, (e) branching structures and (f) aggregates without lumen. (A'-A'') Graphs (mean $\pm$ SEM of three independent experiments) showing the distribution of normal versus abnormal structures (A') and quantification of the sphere areas (A'') for each cell line. Scale bar, 10 μ m. Statistical analyses by Bonferroni post-hoc test following ANOVA, ns = non significant, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ when samples are compared to shNEK8 + NEK8-GFP WT and **** $p < 0.001$ to shNEK8. (B). Three-dimensional (3D) spheroids derived from control pLKO and shNEK8 cells were fixed after 2, 3 and 5 days of culture, and were stained for Ki-67 (green), phalloidin (red, F-actin), Hoechst (blue, nuclei). Equatorial sections of representative spheres are shown. Scale bars, 10 μ m. (B'') Quantification of Ki-67-positive spheres at 2, 3, and 5 days of culture.

doi:10.1371/journal.pgen.1005894.g005

Among the signalling pathways reported to be downstream of YAP, we examined the Notch pathway, crucial for kidney and liver development [30, 31]. In agreement with the upregulation of this pathway upon cell-cell contact, we observed an overexpression of *JAG1* as well as the downstream target *HES1* at high cell confluence in both control and PT1 fibroblasts. However, this increase was much higher in patient cells (Fig 6D), indicating that dysregulation of nuclear YAP may also affect Notch signaling.

Yap and Hippo target genes are upregulated in *Jck* mice

In order to investigate if *NEK8* mutations also led to YAP activation *in vivo*, we studied Yap and target gene expression in mutant juvenile cystic kidney (*Jck*) mice which bear a missense p.G448V mutation in the highly conserved RCC1 domain of Nek8 [32, 33]. Immunohistochemistry assay showed that Yap expression was predominantly cytoplasmic in the kidneys of wild-type mice, whereas it was markedly increased in nuclei of kidneys of 5-week old *Jck* mice, an age at which these mice exhibited a polycystic kidney disease (Fig 7A). Yap staining was particularly intense in the nuclei of tubular epithelial cells lining the cysts (Fig 7A, insets). Western blot analysis of whole-kidney extracts (Fig 7B and 7B') confirmed that the expression of both Yap and phospho-Yap (S127) was increased in mutant mice. Nevertheless, the phospho-Yap (S127) / Yap ratio was decreased, pointing again to an upregulation of Yap activity. In line with these observations, quantitative RT-PCR confirmed that Yap target genes, i.e. *Ctgf*, *Cyr61*, *Ankrd1* and *Birc5* were upregulated in *Jck* mice (Fig 7C).

Defects induced by *NEK8* alterations are rescued by Verteporfin treatment

To determine if the epithelial morphogenesis abnormalities observed in shNEK8 and mutated NEK8 re-expressing cells were caused by deregulation of the Hippo pathway, we quantified nuclear YAP staining during spheroid formation. Control and shNEK8 cells grown in 3D in matrigel were fixed after 2, 3 and 5 days of culture and stained for YAP (Fig 8A). After 2 days, the majority of control and shNEK8 spheroids were positive for YAP. In control cells, the proportion of YAP-positive spheroids dramatically decreased to 15% at day 5 (Fig 8A and 8A'). However, nuclear staining of YAP was still present in 75% of shNEK8 spheroids after 5 days of culture. The continuous activation of YAP in the nucleus in shNEK8 mIMCD3 cells could thus promote cell growth in forming structures, causing abnormal enlarged spheroids as recently described in MDCK cells [34]. To confirm this hypothesis, we performed size rescue experiments using Verteporfin, an inhibitor of YAP-TEAD4 interaction [35]. Indeed, we observed that 1 μ M of Verteporfin caused a reduction in size of the spheroids formed by shNEK8 cells after 5 days (Fig 8B). In parallel, we confirmed that the increased expression of YAP targets observed in patient fibroblasts and shNEK8 IMCD3 cells was reduced with Verteporfin treatment (S7 Fig).

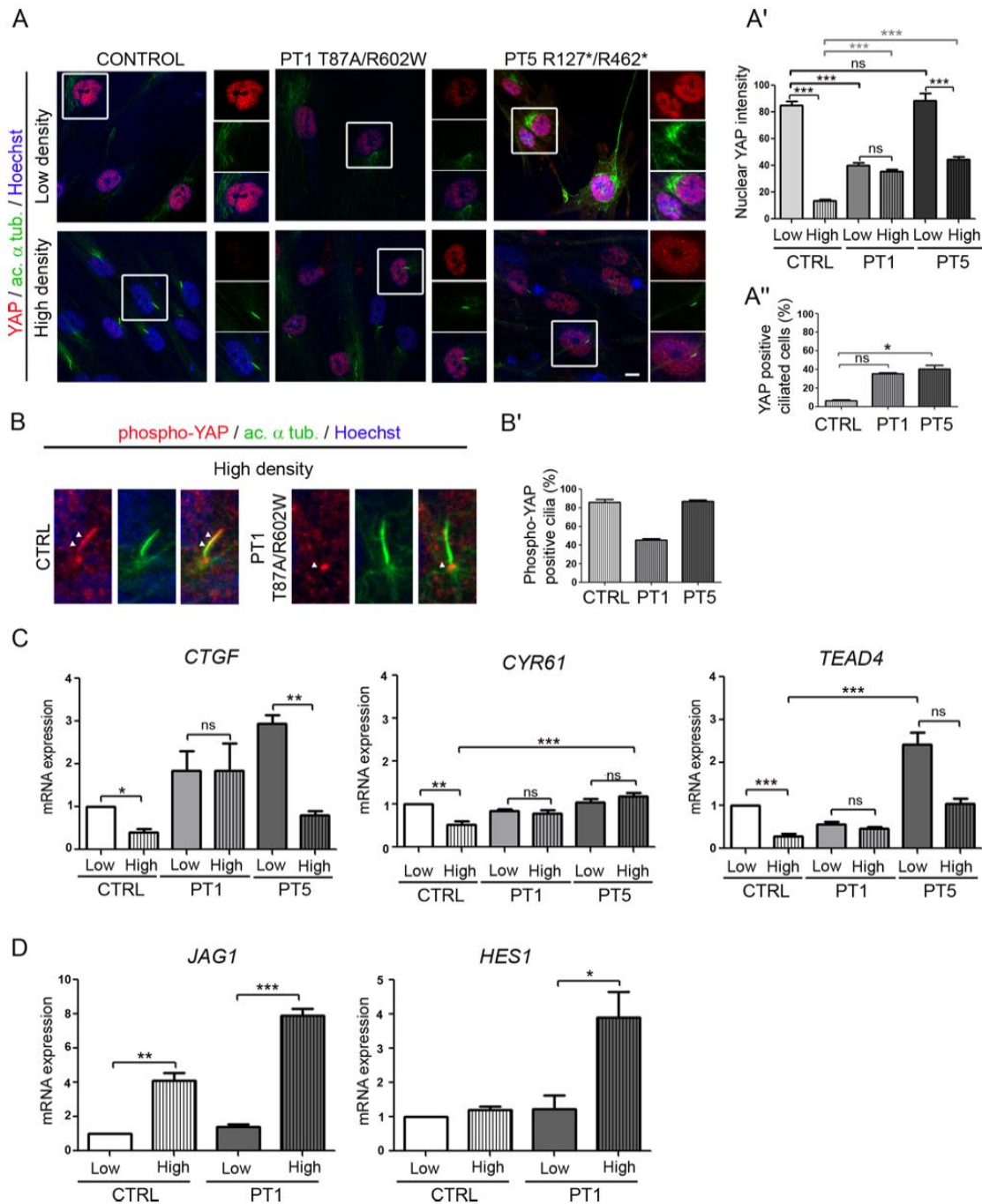


Fig 6. YAP nuclear shuttling is impaired in patient fibroblasts and results in Hippo pathway dysregulation. (A) Fibroblasts from control (CTRL) and affected individual II.1 of family 1 and 5 (PT1 and PT5) were grown for 2 days in standard medium with serum (low cell density) or for 6 days then serum-starved for 2 days (high cell density). Cells were co-immunostained for YAP (red), acetylated α -tubulin (green) and nuclei (Hoechst, blue). Insets show higher

magnification of YAP localization. Scale bar, 10 μ m. (A', A'') Graphs (mean $\pm$ SEM of three independent experiments) showing the nuclear YAP intensity in control and patient fibroblasts (A') and the percentage of ciliated cells positive for YAP staining (A''). ns = not significant, * p < 0.05, *** p < 0.001, calculated by Bonferroni or Kruskal-Wallis post-hoc test following ANOVA, respectively. (B, B') Localization of phospho-YAP at the cilium in control and patient fibroblasts (B) and quantification (mean $\pm$ SEM of three independent experiments) of phospho-YAP-positive cilia (B'). * p < 0.05 calculated via Kruskal-Wallis test. (C, D) qPCR analyses (mean $\pm$ SEM of three independent experiments) of the expression of YAP (*TEAD4*, *CYR61*, *CTGF*, *JAG1*) and Notch (*HES1*) target genes, normalized to *GAPDH*, in control and patient fibroblasts at low and high cell density. Statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis test, ns = non significant, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

doi:10.1371/journal.pgen.1005894.g006

We also investigated if persistence of nuclear YAP in confluent patient fibroblasts was involved in the abnormal activation of the Notch pathway. As shown in Fig 8C, Verteporfin

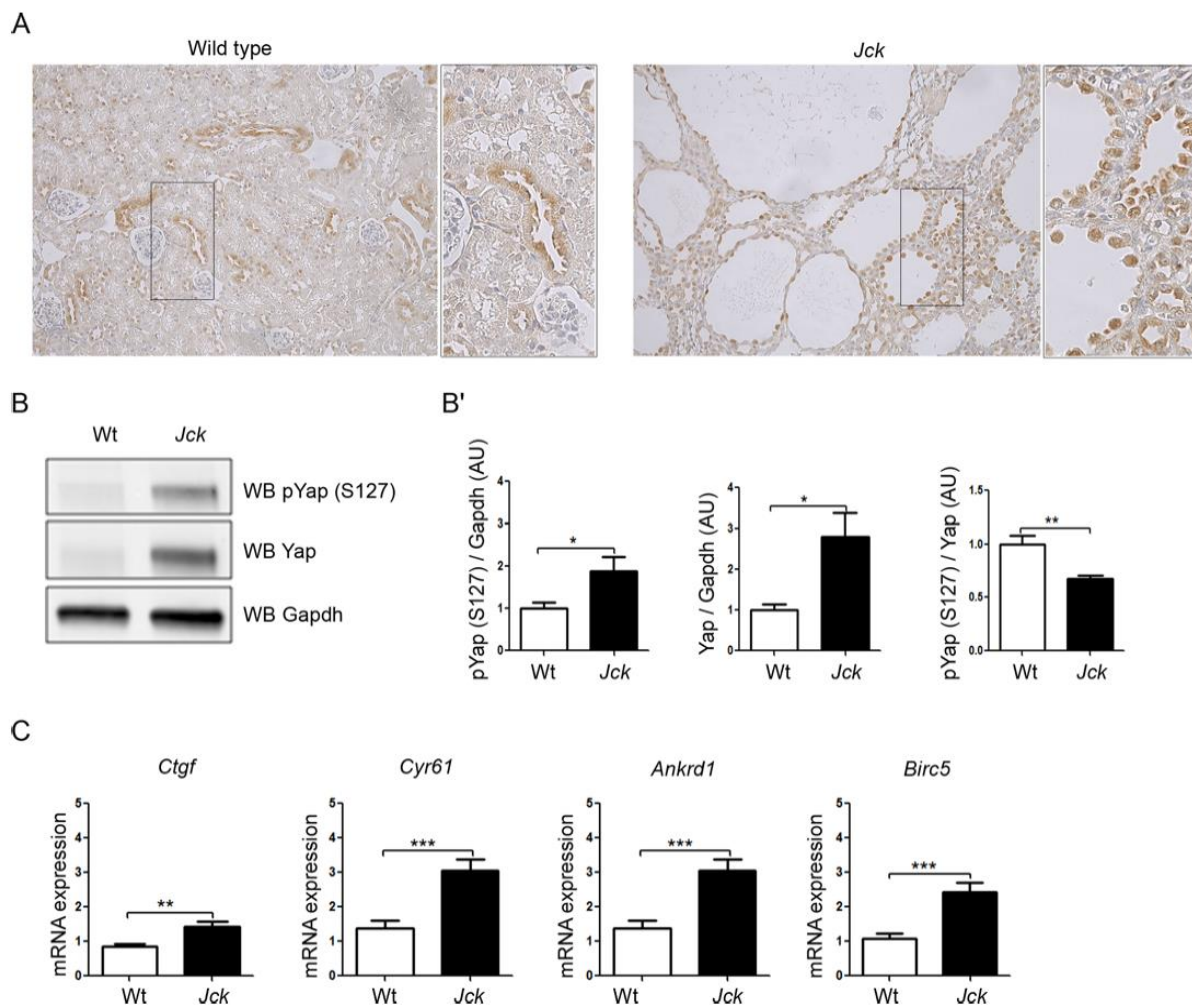


Fig 7. YAP and YAP target gene expression are induced in *Jck* mice. (A) Immunohistochemistry of YAP in wild-type (Wt) and *Jck* mice at 5 weeks of age (n = 4 of each). (B-B') Western blot analysis (B) and quantification of YAP and phospho-YAP (S¹²⁷) expression (B') in Wt (n = 8) and *Jck* mice (n = 8) at 5 weeks of age. ** p < 0.01, calculated by Mann-Whitney test. (C) Relative quantification of YAP targets *Ctgf*, *Cyr61*, *Ankrd1* and *Birc5* mRNA expression in wild-type (n = 10) and *Jck* mice (n = 8) at 5 weeks of age. ** p < 0.01, *** p < 0.001, calculated by Mann-Whitney test.

doi:10.1371/journal.pgen.1005894.g007

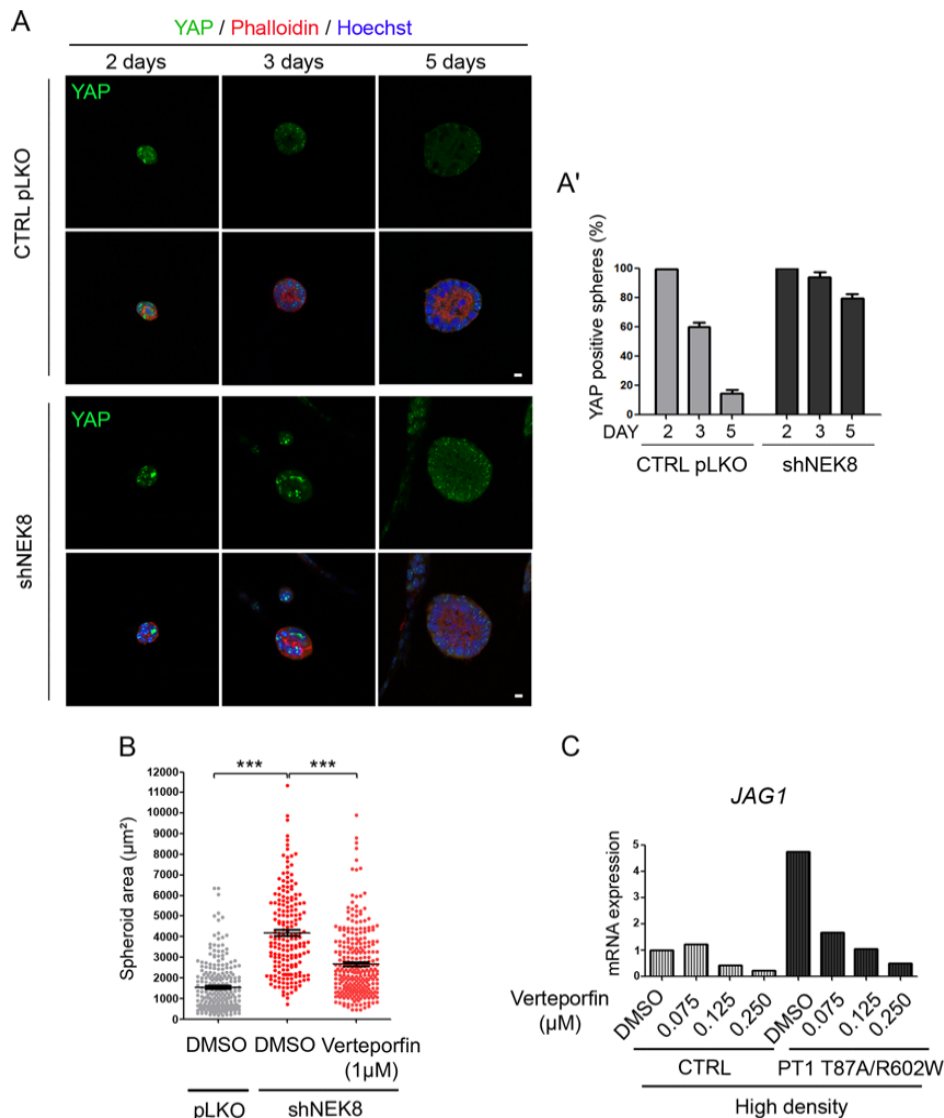


Fig 8. Nuclear YAP persistence in shNEK8 3D spheroids results in morphological and size abnormalities that are rescued by Verteporfin treatment. (A) Three-dimensional (3D) spheroids derived from control pLKO and shNEK8 cells were fixed after 2, 3 and 5 days of culture. Structures were stained for YAP (green), phalloidin (red, F-actin) and nuclei (Hoechst, blue). Equatorial sections of representative spheres are presented, showing that YAP is upregulated in shNEK8 3D spheres. Scale bars, 10 μm . (A') Quantification of YAP-positive spheres at day 2, 3 and 5. (B) Graph showing the quantification of sphere areas after 5 days of culture, upon DMSO or Verteporfin treatment. Verteporfin treatment reduces the area of the shNEK8 spheroids. The graph indicates the mean $\pm$ SEM. *** $p < 0.001$, calculated by Student *t*-test with Welch correction. (C) qPCR analysis of *JAG1* expression in control (CTRL) and patient (PT1) fibroblasts, cultivated at high density and treated with different doses of Verteporfin as indicated. Data show a reduction in the expression of *JAG1* in a dose-dependent manner in patient fibroblasts.

doi:10.1371/journal.pgen.1005894.g008

treatment performed in the high cell density condition dramatically reduced *JAG1* expression in patient fibroblasts, further demonstrating the link between YAP activation and Notch dysregulation in NEK8 mutant cells.

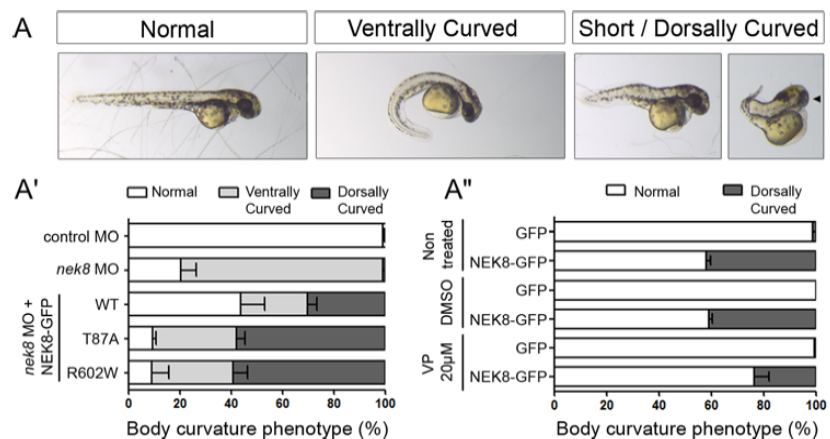


Fig 9. NEK8 overexpression in zebrafish induces Hippo pathway deregulation. (A) Representative pictures of the different classes of body phenotype observed upon *nek8* morpholino (MO) or human *NEK8-GFP* RNA injections in zebrafish embryos. Arrowhead points out cyclopia observed in a subset of short embryos. (A') Graph showing the distribution of the three classes of body axis curvature observed in rescue experiments with WT or mutated (T87A, R602W) *NEK8-GFP* RNA forms. 30% of embryos co-injected with *nek8* MO and WT *NEK8-GFP* RNA exhibited a stunted dorsally curved body axis similar to embryos injected with human YAP RNA. Data are from three independent experiments (n = 90 to 180 embryos). (A'') Graph showing the distribution of normal and stunted dorsally curved animals among GFP or WT *NEK8-GFP* RNA injected embryos upon Verteporfin (VP) treatment. A partial rescue of the phenotype can be observed in the presence of 20 µM Verteporfin. Data are from four independent experiments (n = 120 to 240 embryos).

doi:10.1371/journal.pgen.1005894.g009

Finally, we examined the impact of *NEK8* mutations identified in patients in zebrafish, an *in vivo* model relevant for ciliopathies [36]. Embryos injected with *nek8* morpholino (MO) displayed the classical ciliopathy-related phenotype including curved body axis, laterality defects and pronephric cysts (Fig 9A and 9A' and Fig 8A and 8A'), as previously described [37]. Body curvature was partially rescued by co-injection of human WT *NEK8-GFP* RNA (43% of normal embryos compared to 20% in *nek8* morphants; Fig 9A') but not by mutated *NEK8-GFP* RNA (p.T87A and p.R602W), thus confirming the pathogenicity of the human missense mutations. Of note, we observed that co-injection of *nek8* MO with WT *NEK8-GFP* RNA led to shortened dorsally curved embryos with occasionally a unique centered eye (Fig 9A and 9A'), a phenotype that was exacerbated by *NEK8* missense mutations (60% vs 30%), further indicating their gain of function effect. Overexpression of human *NEK8* accounts for the shortened dorsally curved phenotype since it was observed in 40% of embryos injected with WT RNA only (Fig 9A''). We also observed laterality defects (70% of embryos) and pronephros abnormalities (cysts or developmental defects in 50% of embryos) upon human *NEK8* overexpression (S8A and S8A' Fig). As a similar dorsal curvature phenotype has been reported for embryos injected with human YAP RNA [38], we performed rescue experiments using Verteporfin treatment (Fig 9A'', S8 Fig). WT *NEK8-GFP* RNA-injected embryos were treated with 20 µM Verteporfin from 90% epiboly stage to 34 hours post fertilisation (hpf). Analysis of Yap target gene expression by qPCR revealed that human *NEK8* overexpression does induce an upregulation of the target genes, which is blocked by Verteporfin treatment (S8B Fig). Contrary to laterality defects which remained unchanged, the proportion of stunted dorsally curved embryos and pronephros abnormalities decreased by 50% and 25% respectively upon treatment (Fig 9A'', S8A'' Fig). These data indicate that the *NEK8* overexpression-related phenotype partially results from an upregulation of YAP activity in zebrafish.

Altogether, these data demonstrate that abnormal YAP activation accounts for the epithelialisation, signaling and morphogenesis defects linked to *NEK8* mutations.

Discussion

To date, only two recessive human *NEK8* mutations had been reported, one missense mutation in the RCC1 domain in a patient with early onset NPH and one nonsense mutation in the same domain in three fetuses from a consanguineous family with Ivemark I/II syndromes including cystic dysplastic lesions occurring in kidneys, liver and pancreas, and heart and skeletal defects [5, 6]. Here, we describe 8 novel *NEK8* mutations in five cases with severe multi-organ developmental defects, and the first association of *NEK8* mutations with renal hypodysplasia and agenesis, *situs inversus*, agenesis of the vermis and bile duct paucity. Based on our results, *NEK8* seems to be a major gene for renal dysplasia, since mutations were identified in 5 out of 200 analyzed families with dysplastic kidneys. Conversely, the previously identified mutation in a patient with infantile NPH seems to be a rare event, as we did not identify any other *NEK8* mutation among the 342 analyzed NPH families. We also report the first two human mutations in the serine/threonine kinase domain of the protein.

We observed a strong genotype-phenotype correlation. Fetuses with total *NEK8* loss-of-function mutations (c.47+1G>A, family 3; p.R127*/p.R462*, family 5) presented enlarged cystic kidneys and pancreas associated with proliferative cystic biliary ducts, characteristics of Renal-Hepatic-Pancreatic Dysplasia syndrome (OMIM #208540), as described for the previously reported fetuses with a nonsense mutation [6]. In contrast, the three patients carrying missense mutations (p.T87A, p.R602W, p.G580S and p.G416S) or in-frame deletion due to a splicing defect (p.V163-A206del) presented with asymmetric dysplastic/hypodysplastic kidneys (agenesis in one case) with loss of differentiation, cortical interstitial fibrosis, dilated tubules and cartilage nodules, associated with paucity of bile ducts (Table 1).

The functional analyses of the *NEK8* mutations indicate that loss-of-function and missense mutations differentially alter ciliogenesis, proliferation/apoptosis and epithelial morphogenesis. Indeed missense mutations exacerbate some of the defects due to *NEK8* loss of function both *in vitro* and *in vivo* (zebrafish), highlighting their likely gain of function effect. In particular, only missense mutations lead to prominent ciliogenesis defects with reduction of percentage of ciliated cells and cilia length in fibroblasts and mIMCD3 cells. While both types of mutations affect cell cycle regulation, missense mutations also alter the function of *NEK8* as a regulator of DNA damage response [14], resulting in increased cell apoptosis in fibroblasts and kidney tissue. 3D culture assays showed that sh*NEK8* mIMCD3 cells (loss of function) form large spheroids (cystic phenotype) compared to *NEK8* mutant form re-expressing mIMCD3 cells that mostly fail to get organized into spheroids (dysplastic phenotype). Finally, co-injection of human mutant *NEK8* RNA in *nek8* zebrafish morphants further enhances their severe morphological alterations, resulting in a shortened dorsally curved body axis. It is noteworthy that the missense mutation previously reported in a patient with infantile NPH (p.H425Y, [5]) does not have the same gain of function effect, thus explaining the less severe phenotype. Therefore, this genotype/phenotype correlation points out the dual function of *NEK8* for which a loss of function (nonsense mutations) leads to proliferative/cystic phenotypes and a gain of function (missense mutations) to hypodysplastic phenotypes with loss of differentiation (S9 Fig).

Although *Nek8* mouse model phenotypes are different from those of human cases, a genotype-phenotype correlation seems to also exist in rodents in term of severity of the renal phenotypes. The *Nek8*^{ck/ck} mice, carrying a missense homozygous mutation in the RCC1 domain (p.G448V), which has been demonstrated to be a gain of function, develop enlarged cystic kidneys

[32]. In contrast, *Nek8* knockout mice (*Nek8^{tm1Bei}*) present a mild renal phenotype, with dilated proximal tubules and glomerular cysts [39] and the mouse model with a missense mutation (p.I124Y) in the kinase domain (*Nek8^{roc}*) exhibits hydroureter, cystic tubular dilations and small glomerular cysts [10]. However, both *Nek8^{tm1Bei}* and *Nek8^{roc}* mice also present *situs inversus* and heart defects that lead to death at birth and which may prevent renal cyst formation during the final, post-birth steps of murine nephrogenesis. Association of kidney defects with *situs inversus* and heart defects was also observed in the five human cases. This phenotype is consistent with a general alteration of the ciliary function of NEK8 and the integrity of the INVS compartment (absence of NEK8 or ANKS6 proteins in the cilia). Indeed, mutations in genes encoding other components of the INVS compartment (*INVS/NPHP2*, *NPHP3* and *ANKS6/NPHP16*) are known to lead to infantile NPH associated with enlarged cystic kidneys or to kidney cystic dysplasia associated with congenital heart defects and *situs inversus* [9, 11–13]. Interestingly, we also identified a homozygous frameshift mutation (c.1010_1011del, p.G337Afs*16, family 6) in *ANKS6* (S10 Fig) in a fetus whose phenotype was similar to that of *NEK8* loss of function cases, i.e. enlarged cystic kidneys associated with enlarged fibrotic pancreas, *situs inversus* and cardiopathy. This is in agreement with the phenotype of *Anks6^{Streaker}* mice whose *Anks6* mutation (p.M187K) decreases the binding to and activation of Nek8 and leads to cystic kidneys, *situs inversus* and congenital heart defects, thus mimicking the phenotype of patients with *NEK8* mutations [10]. Identification of this *ANKS6* mutation, together with our functional data, strengthens the close relationship between NEK8 and ANKS6, i.e. NEK8 recruits its target ANKS6 to the cilium, which in return enhances NEK8 kinase activity [10].

Besides its function at cilia, NEK8 is critical for cell cycle regulation. We demonstrate that *NEK8* mutations lead to defective Hippo pathway regulation, with a decreased amount of nuclear YAP in proliferating cells (missense mutations) as well as maintenance of a pool of nuclear YAP in confluent ciliated cells (missense and loss-of-function mutations) *in vitro* in patient fibroblasts. Such defects were also observed in shNEK8 mIMCD3 spheroids and *in vivo* in *Jck* cystic tubular cells. Maintenance of nuclear YAP in patient confluent ciliated cells was accompanied by higher expression of YAP targets compared to controls, sustained Ki-67 staining and abnormal cell cycle with an increased proportion of cells in G2/M. Therefore, NEK8 mutant cells still undergo proliferation and fail to differentiate when reaching confluence. Moreover, we show that cells harboring NEK8 missense mutations are more subject to DNA damage than NEK8 defective cells and undergo apoptosis, which can contribute to the difference in cell growth resulting in hypodysplastic *versus* enlarged multicystic kidneys respectively (S9 Fig).

Several mechanisms could account for nuclear YAP misregulation. Association of NEK8 with TAZ, the other major Hippo pathway effector, favors TAZ translocation into the nucleus [6, 15]. We show that NEK8 interacts with YAP in a perinuclear region, suggesting a similar regulation process for YAP and TAZ. Moreover, we show that NEK8 missense mutations alter YAP nuclear translocation. As all mutations in both kinase and RCC1 domains affect NEK8 localization into the nucleus in mIMCD3 cells (S3E and S3E' Fig), NEK8 mutant forms might thus affect YAP shuttling into the nucleus, through their own defective nuclear translocation. NPHP4 has previously been reported to favor NEK8 and TAZ translocation into the nucleus [15]. We can hypothesize that NEK8 mutations affect binding to NPHP4, resulting in a less efficient translocation of NEK8, and consequently YAP into the nucleus. During normal cell differentiation, ciliogenesis and quiescence are accompanied by activation of the Hippo pathway (i.e. YAP inactivation) and proteasome-mediated degradation of cytoplasmic NEK8 [24]. However, the constant level of NEK8 protein expression detected in low and high confluent cells of PT1 with missense mutations suggests that these mutations preserve NEK8 from degradation, resulting in maintenance of nuclear YAP and consequently the lack of proper cell

differentiation. This result is in agreement with our *in vivo* observations showing that NEK8 overexpression in zebrafish embryos mimics the YAP overexpression phenotype [38]. Moreover, the preserved YAP nuclear localization in cells with NEK8 loss-of-function mutations indicates that other proteins help YAP to translocate into the nucleus in proliferative condition, but also control its partial downregulation in confluent cells. This may explain why loss-of-function NEK8 mutations partially preserve nephrogenic differentiation, evidenced by the presence of some mature glomeruli in fetal renal biopsies.

The maintenance of YAP in the nucleus in confluent patient fibroblasts and renal cells in 3D culture may also be associated with defective Hippo pathway activation at the cilium in NEK8 mutant conditions. Recent studies on MST1/2, two major activators of the Hippo pathway, showed that they localize at the basal body and promote ciliogenesis [28]. In this study, we report the presence of phospho-YAP at the cilium and that this localization is partially affected in the presence of NEK8 missense mutations (S9 Fig). Phospho-YAP at the cilium may thus be a key component of activation of Hippo pathway under the control of NEK8. Finally, soft matrix, such as matrigel in 3D culture assays, is known to promote cytoplasmic retention of YAP and TAZ resulting in limited cell growth, *via* LATS independent non-canonical Hippo pathway activation, involving cytoskeleton, cell junctions, RhoGTPases or GPCR signaling [40]. Maintenance of nuclear YAP in enlarged spheroids in the absence of NEK8 suggests that NEK8 could also regulate YAP through non-canonical mechanisms.

The Hippo pathway is a highly integrative pathway whose regulation is connected to that of many other signalings crucial for organogenesis, including Wnt/ β -catenin, TGF- β , BMP and Notch. YAP dysregulation due to NEK8 mutations is thus expected to play a major role in the development of the multisystemic defects presented by the patients/fetuses. Specific inactivation of Yap in the nephrogenic lineage (*Yap^{CM-/-}*) leads to a reduced number of nephrons [41], as seen in the patients with NEK8 missense mutations. We can hypothesize that an abnormal amount of nuclear YAP during kidney development, as shown in patient fibroblasts and *Nek8^{dk/jck}* mice, would affect the expression of downstream targets that might participate to the pathophysiological processes. *CYR61*, a gene expressed in tubules and glomeruli in fetal kidney, encodes a CCN protein that interacts with integrins to mediate cell adhesion, migration and differentiation during nephrogenesis. Upregulation of the Notch1 ligand JAG1 may induce a dysregulation of Notch pathway, required during nephron tubular development [42, 43], thus contributing to renal hypodysplasia. Finally, *CTGF*, encoding a regulator of cartilage morphogenesis and mediator of fibrosis [44, 45] could be involved in the formation of cartilage islets and fibrosis observed on most of the kidney biopsies of NEK8 mutated patients/fetuses. In the liver, YAP is highly expressed in bile ducts and regulates the Notch pathway for ductal specification during development [31]. In the pancreas, YAP-TEAD regulates the transcriptional network controlling pancreatic cell proliferation and differentiation [46]. As for kidney defects, liver and pancreas defects vary according of the type of NEK8 mutation, suggesting that NEK8 loss of function and gain of function differentially affect the hepatic/pancreatic transcriptional program, leading to either proliferation or paucity of bile ducts in the liver, and cysts or fibrosis in the pancreas, respectively. Finally, Hippo pathway dysregulation is associated with heart overgrowth in mice [47], thus highlighting the involvement of this pathway in the pathophysiological mechanisms leading to cardiac defects seen in the NEK8 patients/fetuses.

In conclusion, we demonstrate that NEK8 is a multifunctional protein whose alterations lead to severe developmental abnormalities due to the synergic effect of dysfunction of key processes and signaling pathways. The demonstration of the central role of YAP dysregulation in NEK8 mutant conditions highlights potential therapeutic targets for the patients.

Materials and Methods

Ethics statement

This study was conducted with the approval of the « Comité de Protection des Personnes pour la Recherche Biomédicale Ile de France II ». Approval was obtained under numbers 2007-02-09/DC-2008-229 and 2009-164/DC-2011-1449 (fetuses) and 2008-A01039-46/DC-2008-229 (nephronophthisis patients). For each patient/fetus, written informed consent was obtained from the parents. For studies using animal data: housing and handling of mice were performed in accordance with the guidelines established by the French Council on animal care "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals": EEC86/609 Council Directive—Decree 2001–131. The project was approved by the departmental director of "Services Vétérinaires de la Préfecture de Police de Paris" and by the ethical committee of the Paris Descartes University (approval number: A75-15-34).

Patients

342 patients with isolated or syndromic NPH and 200 fetuses or early neonatal death cases with syndromic cystic dysplasia, including Meckel and Ivemark syndromes, were studied. Genomic DNA was isolated from peripheral blood or frozen tissues using standard procedures.

NEK8/NPHP9 mutation screening using "Ciliome" sequencing

Ciliary exome targeted sequencing and bioinformatic filtering was conducted in affected individuals using a custom SureSelect capture kit (Agilent Technologies) targeting 4.5 Mb of 20,168 exons (1221 ciliary candidate genes), including *NEK/NPHP9*. Briefly, Agilent SureSelect capture libraries were prepared from 3 µg of genomic DNA samples sheared with a Covaris S2 Ultrasonicator according to manufacturer's instructions. The SOLiD molecular barcodes for traceable ID of samples were added at the end of the capture step. The Ovation Ultralow System (NuGEN Technologies) was used to prepare HiSeq2500 pre-capture barcoded libraries. The ciliome capture by hybridization was performed on a pool of 10 to 16 barcoded precapture libraries. Sequencing performed on SOLiD5500XL (Life Technologies) and HiSeq2500 (Illumina) was done on pools of barcoded ciliome libraries (64 barcoded ciliome libraries per SOLiD FlowChip and 16 ciliome libraries per lane of HiSeq FlowCell). Paired-end reads were generated (75 + 35 base reads for SOLiD, 100 + 100 base reads for HiSeq) and mapped on human genome reference (NCBI build37/hg19 version) using Burrows-Wheeler Aligner (Illumina) or mapread (SoliD). Downstream processing was carried out with the Genome Analysis Toolkit (GATK), SAMtools, and Picard Tools, following documented best practices (<http://www.broadinstitute.org/gatk/guide/topic?name=best-practices>). All variants were annotated using a software system developed by the Paris Descartes University Bioinformatics platform. The mean depth of coverage obtained was greater than 90x, and more than 89% of the exome was covered at least 15x. Different filters were applied to exclude all variants located in non-exonic regions, pseudogenes, UTRs or known polymorphic variants with a frequency above 1%, i.e. present in databases such as dbSNP, 1000 genome projects and all variants identified by in-house exome sequencing (5150 exomes and 1020 ciliomes). The functional consequence of missense variants was predicted using SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html) and PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) softwares.

Human primary fibroblasts, mIMCD3 and HEK293T cell culture

Control and affected individual fibroblasts were cultured in Opti-MEM supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin, streptomycin, uridine, sodium pyruvate and Ultrosor G G

serum substitute (Pall Corporation). Control and patient fibroblasts (1.5×10^4 or 2.5×10^4 cells respectively) were plated on coverslips and grown for 2 days (low confluence) or 6 days followed by 48-hour serum deprivation (high confluence) before fixation. Murine inner medullary collecting duct (mIMCD3) cells were cultured in DMEM F-12 and HEK293T in DMEM both supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin, streptomycin and L-Glutamine (all from Life Technologies). For immunofluorescence, 2.5×10^4 cells were plated on coverslips and grown for 5 days before fixation. In all the experiments, the level of confluence was visually checked and counted to ensure similarity between control and samples.

Immunofluorescence staining

mIMCD3 and fibroblasts were fixed in 4% PFA in PBS 1X for 15 min followed by treatment with 50 mM NH_4Cl for 15 min. Antibodies used for immunofluorescence were: NEK8 (kind gift of D. Beier [32]), ANKS6 (1:50, Sigma-Aldrich HPA008355), GFP rabbit (1:500, Life Technology A11122), GFP chicken (2B Scientific, 1020), GM130 (1:50, BD 558712), YAP (1:50, Cell Signaling #4911), phospho-YAP (Ser127) (1:50, Cell Signaling #4911), γH2AX (1:500, Millipore 05–636) and anti-acetylated α -tubulin (1:10000, Sigma-Aldrich). Cells were permeabilized with Triton 0.5% for 10 min at room temperature and treated with blocking solution constituted of PBS 1X, 0.1% Tween 20, 3% (for fibroblasts) or 1% (for mIMCD3) BSA before incubating with primary antibodies overnight. Then, cells were washed 3 times with PBS 1X for 10 min and stained with appropriate Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:200, Molecular Probes). Nuclei were stained with Hoechst. For Annexin-V assays, cells were first incubated with a cold solution constituted by 10 mM HEPES, 140 mM NaCl and 25 mM CaCl_2 . Annexin V (Life Technologies) was secondly incubated in the same solution for 30 minutes at room temperature. Fixation was performed with PFA (4%) for 20 minutes and nuclei were stained with Hoechst.

Tissue biopsies embedded in paraffin blocks were sectioned (8 μm section thickness) using a Leica microtome. Next, sections were immersed in xylene baths (5 minutes in the first bath, 5 minutes in the second bath), then rehydrated for 5 minutes in ethanol baths of decreasing concentrations (100%, 95%, 70%, and 40%) and finally immersed in MilliQ water for 5 minutes. Dako target retrieval solution (Dako ref. S1699) was used according to the manufacturer's instructions. The slides were blocked for 45 minutes at 4°C by 10% NDS (Normal Donkey Serum) diluted in PBT (DPBS with 0.1% Triton X100). Fluorescein label Peanut Agglutinin (PNA) (1:200, Vector FL-1071) was used to detect collecting tubules. Other primary and secondary antibodies were used as described above. Slides were mounted in adapted medium, and analysed under an inverted confocal microscope Zeiss LSM 700.

Plasmids and lentiviral infections

Nek8-knockdown (KD) was performed in mIMCD3 cells by lentiviral infection of a shRNA expressing construct in pLKO puromycin vector (Sigma-Aldrich sh1570), as previously described [39]. Puromycin-resistant Nek8-KD cells were then transfected using Lipofectamine2000 with wild-type and mutated human NEK8-GFP constructs [24] and stable cell lines re-expressing NEK8-GFP were selected with double selection with geneticin and puromycin. NEK8-GFP variants were obtained through site-directed mutagenesis using Pfu turbo kit (Invitrogen). YAP-myc construct has been described in [18].

Coimmunoprecipitation and immunoblotting

HEK293 cells were transiently transfected using the calcium phosphate method. After 48 hours, cells were harvested with ice-cold PBS 1X. A small aliquot of this cell suspension was

immediately removed and lysed directly in SDS-PAGE sample buffer as a whole cell lysate. The remaining harvested cells were lysed and treated in accordance with the Miltenyi-Biotec beads protocol. Protein dosage was performed using the BCA protein assay kit (Thermo Scientific). Fifty micrograms of proteins were loaded on a 8% acrylamide gel (Bio-rad), and Western blot was conducted using the indicated anti-FLAG M2 (1:1000, Sigma-Aldrich F1804), anti-GFP (1:1000, Roche #1814460001), anti-tubulin (1:10000, Sigma-Aldrich T5168).

Proximity Ligation Assay

For *in situ* Proximity Ligation Assay (PLA) (OLINK Biosciences, Uppsala Sweden), HEK293 cells were fixed 48h after transfection in 4% PFA for 15 min, permeabilized 10 min with PBS-0.1% Triton before treated with blocking solution, labeled with anti-rabbit GFP and anti-mouse Myc (Thermo Fischer Scientific, #MS139P1) antibodies and then incubated with a pair of nucleotide-labeled secondary antibodies (rabbit PLA probe MINUS and mouse PLA probe PLUS) in hybridization solution. Interactions between the PLA probes, possible when within a distance less than 40 nm, were revealed by adding a ligase and by amplification of a rolling-circle product using labeled oligonucleotides and a polymerase, according to the manufacturer's instructions. Signals indicative of interactions were detected by confocal microscopy as fluorescent dots in visible red.

RNA extraction and RT-PCR

Total cellular mRNA was isolated using Qiagen Extraction Kit and then treated with DNase I. 1.5 µg of total RNA was reverse-transcribed using Superscript II (Life Technologies). Relative expression levels of genes of interest were determined by real-time RT-PCR using the Absolute SYBR Green ROX Mix (ABgene) and specific primers as follows: human *NEK8* forward 5'-GCCTCAAGAGGGGCTTCGA-3' and reverse 5'-AAGGTGCCACTCATGATCTTCAG-3'; mouse *Nek8* forward 5'-GCACCTTGGCCGAGTTCAT-3' and reverse 5'-GCCAGCAGGATCTGCACAA-3'; human *CTGF* forward 5'-CGAAGCTGACCTGGAAGAGAA-3' and reverse 5'-GTACTCCCAAATCTCCAAGCCT-3'; human *CYR61* forward 5'-GAGTGGGTCTGTGACGAGGAT-3' and reverse 5'-GGTTGTATAGGATGCGAGGCT-3'; human *TEAD4* forward 5'-GGACACTACTCTACCGCATCC-3' and reverse 5'-TCAAAGACATAGGCAATGCACA-3'; human *JAG1* forward 5'-GCCGAGGTCCTATACGTTGC-3' and reverse 5'-CCGAGTGAAGGCCTTTTCAA-3'; human *HES1* forward 5'-TCAACACGACACCGGATAAAC-3' and reverse 5'-GCCGCGAGCTATCTTTCTTCA-3'. Experiments were repeated at least three times and gene expression levels were normalized to *GAPDH*.

For qPCR analyses in IMCD3 cells, we used mouse primers described below.

Studies on *Jck* mice

Experiments were performed on 5-week-old female mutant juvenile cystic kidney (*Jck*) mice bearing a *Nek8* mutation (The Jackson Laboratory) and compared to wild-type littermates. Animals were fed *ad libitum* and housed at constant ambient temperature in a 12/12-hour light/dark cycle.

For mouse samples, 4 µm sections of paraffin-embedded kidneys were submitted to heat-mediated antigen retrieval and incubated with antibody to Yap (Cell Signaling Technology, 4912, 1:100), followed by a donkey anti-rabbit biotinylated antibody (GE Healthcare) at 1:200. Biotinylated antibodies were detected using HRP-labeled streptavidin (Dako) at 1:2000 and 3-3'-diamino-benzidine-tetrahydrochloride (DAB) revelation.

Western blot analyses were performed as previously described [48]. Briefly, protein extracts from kidneys were resolved by SDS-PAGE before being transferred onto the appropriate

membrane and incubated with antibodies to phospho-YAP (Ser127) (Cell Signaling Technology, 4911, 1:1000), and YAP (Santa Cruz, sc-101199, 1:1000), Gapdh (Millipore, 1:5000) followed by the appropriate Alexa-conjugated secondary antibody (Life Technologies).

Fluorescence was acquired using a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad), and densitometry was performed using Image Lab software 5.0.

For real-time RT-PCR, mRNA were extracted from whole kidney samples and *Ctgf*, *Cyr61*, *Birc5* and *Ankrd1* expression were analysed by real-time RT-PCR using CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Primers (Eurogentec) were as follows: *Ctgf* forward 5'-GCTGACCTGGAGGAAAACATTAA-3' and reverse 5'-TGACAGGCTTGGCGATTTTGA-3'; *Cyr61* forward 5'-CCTTCTCCACTTGACCAGAC-3' and reverse 5'-ATATTCACAGGGTCTGCCTTCT-3'; *Birc5* forward 5'-CCCGATGACAAACCGATAGAG-3' and reverse 5'-TGACGGGTAGTCTTTGCAGTC-3'; *Ankrd1* forward 5'-CTGTGAGGCTGAACCGCTAT-3' and reverse 5'-CCAGTGCAACACCAGATCCA-3'. *Rpl13* was used as the normalization control.

Cell growth rate assay and cell cycle analysis

A total of 7.5×10^4 cells/well were plated in triplicate in 6 well plates and grown for 1–7 days. Cells were incubated with complete medium as previously described. The number of cells was counted at the indicated time-points in triplicate.

For flow cytometry analysis, cells were plated at a density of 1×10^5 cells/ml. The cells were pulse-labeled with BrdU for 30 min, washed with PBS, and treated with trypsin. Cells were fixed with ethanol and stained with anti-BrdU-FITC antibody (BD Biosciences) and propidium iodide, according to the manufacturer's instructions. Flow cytometry analysis was carried out with the BD LSRII flow cytometry system and BD FACSDiva software.

mIMCD3 3D culture in matrigel and immunofluorescence

96 well plates were coated with a thin layer of collagen (collagen I, Rat Tail, Corning #354236) that was allowed to polymerize at 37°C for 30 minutes. 4×10^4 cells per well in the appropriate medium (with antibiotics) was mixed with Matrigel (BD) and allowed to polymerize at 37°C for 30 minutes. Subsequently, the appropriate medium was added and changed every 2 days. Samples were fixed after 2, 3 or 5 days of culture. After two washes with PBS 1X, PFA 4% was added for 30 minutes. Antibody stainings were done as previously described; only incubation time with blocking solution was prolonged to 1 hour at room temperature.

Zebrafish experiments

Zebrafish were maintained at 28.5°C under standard protocols. *Tg(cmlc2:GFP)* and *Tg(wt1b:GFP)* transgenic lines were used to assess heart looping and pronephros morphology, respectively. Control and *nek8* (ATG) morpholinos [37] were injected into one-cell stage embryos at 0.4 pmol per embryo. Human full length *NEK8-GFP* RNA was obtained by *in vitro* transcription with mMESSAGE mMACHINE kit (Ambion) and injected into one-cell stage embryos at 100 pg per embryo. For Verteporfin treatment, embryos were injected with 100 pg of RNA and GFP-positive animals were selected at shield stage. Embryos were then treated with either DMSO or 20 μ M Verteporfin from 90% epiboly stage to 34 or 52 hours post fertilization (hpf), time points at which body curvature and laterality/pronephros phenotypes were measured, respectively. Phenotypes were analysed using a Leica M165FC stereoscope.

For real-time RT-PCR, mRNA was extracted from whole embryos at 34 hpf by TRIZOL and *ctgfa*, reported to be specific to Yap unlike *ctgfb* [49], *cyr61* and *tead4* expression were analysed by real-time RT-PCR using Absolute SYBR Green ROX Mix (ABgene) and specific

primers as follows: *ctgfa* forward 5'-TCCTCACAGAACCGCCACCTTGCCCAT-3' and reverse 5'-TCACGCCATGTCGCCAACCATTCTTGT-3'; *cyr61* forward 5'-CCGTGTCCACATGTACATGGG-3' and reverse 5'-GGTGCATGAAAGAAGCTCGTC-3'; *tead4* forward 5'-AAGGAGGACTGAAGGAGCTGTTGAGAAGG-3' and reverse 5'-GCCGAATGAGCA GACTTTAGTGGAGGAGGT-3'. *gapdh* was used as the normalization control.

Verteporfin treatment

For treatment of human fibroblasts, Verteporfin (Sigma-Aldrich, SML0534) was added after 5 days of culture when cells had achieved confluence. Several drug concentrations were tested and 0.5–0.075 μ M were chosen as optimal non toxic conditions. For treatment of shNEK8 re-expressing NEK8-GFP mIMCD3 cells, we used drug concentration ranging from 0.5 to 4 μ M. Verteporfin treatment was also used on control pLKO1 and shNEK8 mIMCD3 cells for rescue experiments in the matrigel 3D assay. In this case, the drug (1 and 2 μ M) was added after 2 days of culture and maintained until fixation at 3 or 5 days.

Supporting Information

S1 Fig. Human NEK8 mutations. (A) Chromatograms of the eight different *NEK8* mutations identified in individuals with renal cystic hypodysplasia and associated defects. Family numbers and predicted translational changes are indicated. Sequence traces are shown for mutations above normal controls or heterozygous carriers. Arrowheads indicate mutated nucleotides. (B) Quantification of the level of expression of *NEK8* in fibroblasts from affected cases of families 1 and 5 (PT1 and PT5) showing partial RNA decay in PT5 cells. (TIF)

S2 Fig. T87A/R602W NEK8 mutations lead to persistent localization of NEK8 at the Golgi membranes. (A) Serum-starved control and patient fibroblasts stained for NEK8 (red) and the Golgi marker, GM130 (green). (B) Control fibroblasts transiently transfected with WT NEK8-GFP and GFP constructs were fixed after 48 hours and labeled for GFP (green) and GM130 (red). Images show the co-localization of WT NEK8-GFP at the Golgi membranes. (C) Low density control fibroblasts staining for NEK8 (red) and the Golgi marker, GM130 (green). Scale bar, 10 μ m. (TIF)

S3 Fig. Establishment of *Nek8* depleted mIMCD3 cell line (shNEK8) re-expressing NEK8-GFP WT and mutants. (A) Murine *Nek8* mRNA levels were analyzed by qPCR in mIMCD3 (mIMCD3 WT), control pLKO and shNEK8 cells. (B) *Nek8* extinction was also analyzed by immunostaining. Staining of NEK8 (red), acetylated α -tubulin (green) and nuclei (Hoechst, blue) were performed in control pLKO and shNEK8 cells. Scale bar, 10 μ m. (B') Quantification of NEK8 positive cilia in shNEK8 cells. ** $p < 0.01$, calculated by Student *t*-test with Welsh correction. (C, D) analysis of the expression of human *NEK8* in the shNEK8 cell re-expressing WT and mutant NEK8-GFP by qPCR (C) and western blot (D). (E) Nuclear localization of GFP-NEK8 (green) in mIMCD3 cells transfected with plasmids encoding GFP-tagged NEK8 wild type (WT) or patients' variants. Stack images of the nucleus are shown. Scale bar, 10 μ m. (E') Ratio of the GFP intensity in the nucleus *versus* cytosol, showing that NEK8 mutations affect its nuclear localization. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, calculated by Bonferroni post-hoc test following ANOVA. (TIF)

S4 Fig. NEK8 mutations alter cell cycle progression in fibroblasts. (A) Cell cycle analysis by flow cytometry of control and patient fibroblasts cultivated in low (top) and high cell density

followed for 48 hours of serum starvation (bottom). Cells in S-phase stage were labeled with BrdU and DNA content was determined by propidium iodide staining. (A') Table presenting the average percentage of cells in each phase of cell cycle, in low (top) and high (bottom) cell density conditions.

(TIF)

S5 Fig. NEK8 mutations do not affect YAP phosphorylation on Serine 127. (A) Control and patient fibroblasts were fixed after 2 days (low cell density) or 6 days of culture in standard medium followed by 2 days of serum starvation (high cell density). Cells were stained with anti phospho-YAP antibody (red) and nuclei (Hoechst, blue). Scale bar, 10 μ m. (A') Quantification of phospho-YAP staining. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, calculated by Kruskal-Wallis test.

(TIF)

S6 Fig. Decreased nuclear YAP localization in presence of missense mutated NEK8 proteins and NEK8/YAP interaction in co-transfected HEK293T cells. (A) HEK293T cells were co-transfected with WT or mutated NEK8-GFP and YAP-MYC constructs, fixed after 48 hours and stained for GFP (green) and MYC (red). Scale bar, 10 μ m. (A') Graph representing the ratio between nuclear and cytosolic YAP intensities, based on three independent experiments. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, calculated via Bonferroni post-hoc tests following ANOVA. (B) 48h after transfection, cells were fixed and a proximity ligation assay was performed using the appropriate anti-GFP and anti-myc antibodies, showing that YAP and NEK8 WT are in close vicinity. Scale bar, 10 μ m.

(TIF)

S7 Fig. Efficiency of Verteporfin treatment on YAP target gene expression in mIMCD3 and fibroblast cells. qPCR analyses of YAP target gene expression in DMSO- and Verteporfin (VP)-treated control (pLKO) and shNEK8 mIMCD3 cells (A), as well as in control and patient (PT1) fibroblasts (B). In both cell lines, NEK8 mutations lead to upregulation of YAP target genes, which is blocked upon Verteporfin treatment.

(TIF)

S8 Fig. Verteporfin treatment partially rescues pronephric defects induced by NEK8 over-expression in zebrafish embryos. (A) Representative images of body axis, laterality (heart looping) and pronephros defects observed in zebrafish embryos. Four classes have been determined depending of the body shape, class I (blue) for normal embryos, class II (orange) for embryos with shortened axis, class III (red) for embryos with severely shortened and dorsally curved body axis, and class IV (black, only observed with *nek8* MO) with ventrally curved body axis. Laterality defects encompass no looped and right-sided hearts compare to normal left-sided heart. Ventral views, anterior to the top. Pronephros defects encompass cystic glomeruli (asterisks) and developmental (Dvlp) abnormalities. Dorsal views, anterior to the top. *Tg(cmlc2:GFP)* and *Tg(wt1b:GFP)* transgenic lines were used to observe heart looping and pronephros morphology, respectively. (A') Graphs representing the proportions of embryos presenting laterality defects (top panel) and pronephric cysts (bottom panel) in control MO-, *nek8* MO- and *nek8* MO/human *NEK8-GFP* RNA-injected embryos. (A'') Graphs representing the proportions of embryos presenting laterality (left panel) and pronephros (right panel) defects (dashed bars) within each class of body axis shape, in control *GFP* and human *NEK8-GFP* RNA-injected embryos, treated with DMSO or Verteporfin (VP, 20 μ M) from 90% epiboly to 34 hpf. (B) qPCR analysis of Yap target gene expression, *tead4*, *ctgfa*, *cyr61*, in human *NEK8-GFP* RNA-injected embryos treated with DMSO or Verteporfin (VP, 20 μ M) compare to control *GFP* RNA injected embryos.

(TIF)

S9 Fig. Schematic model of ciliary and YAP regulation mediated by NEK8 in control and in patient cells. In control cells at low cell density, NEK8 participates by its nuclear localization in insuring an efficient YAP-dependent transcriptional activity, allowing proliferation and cell survival. At high cell density, the Hippo pathway is activated and the total amount of NEK8 protein decreases through proteasomal degradation. We suggest that a decrease of NEK8 protein level facilitates the degradation of cytosolic YAP, stopping transcription of target genes. In parallel, NEK8 is targeted at the INVS compartment into the primary cilium, promoting the recruitment of both phospho-YAP and ANKS6 at the cilia. Altogether, cellular signals converge in the inhibition of proliferation in favour of differentiation. In patient cells at low cell density, **NEK8 missense mutations** prevent the nuclear localization of NEK8, thus causing a reduction of nuclear YAP localization and activity. As a consequence, patient cells fail to proliferate as much as control cells while undergoing both apoptosis and genomic instability. We hypothesize that **NEK8 missense mutations** also affect NEK8 proteasomal degradation, which participates in the maintenance of YAP into the nucleus and a sustained low level of transcriptional activity/proliferation when cells reach confluence. In parallel, missense mutations induce ciliogenesis defects and prevent NEK8 to localize at the cilium, resulting in defective INVS compartment integrity and loss of phospho-YAP at the cilium. Consequently, induction of differentiation is severely altered. In presence of **NEK8 loss-of-function mutations**, YAP nuclear translocation occurs under the control of (an)other, unidentified factor(s), resulting in a high level of proliferation. At high cell density, absence of NEK8, mimicking degradation of the protein that normally occurs, allows a reduction of the pool of nuclear YAP. However, as in the context of missense mutations, some YAP remains in the nucleus and proliferation is not arrested. Absence of NEK8 does not prevent cilium formation nor ciliary localization of phospho-YAP, but the INVS compartment is defective. Consequently, differentiation partially occurs but the balance between proliferation and differentiation is altered. (PPTX)

S10 Fig. ANKS6 loss of function causes a similar phenotype than NEK8 mutations in human. (A-B) Pedigree (A) and chromatograms (B) of family 6 identified with *ANKS6/NPHP16* mutation. The mutation is numbered according to the human cDNA (NM_173551). Position +1 corresponds to the A of ATG. Abbreviations in the table are: CS, consanguinity; **Termination of pregnancy at 28 weeks of gestation. (TIF)

Acknowledgments

We are grateful to the families for their participation. We thank D.R. Beier for the NEK8 antibody, S. Lienkamp for the ANKS6-flag plasmid, A.M. Fry for the NEK8-GFP plasmid and D. Lallemant for the YAP-myc plasmid. We greatly acknowledge M. Garfa-Traoré and N. Goudin (Necker Cell imaging facility), C. Dragu and L. Garnerio (Animal facilities), C. Bole-Feysot, O. Alibeu, S. Pruvost, M. Zarhrate and M. Parisot (Imagine Genomic platform) and P. Nitchké and C. Masson (Necker Bioinformatic facility). We thank S. Berissi (Histology facility), G. Pivert (Pathology department, Necker hospital) for their excellent technical assistance. We thank Dr R. Bouvier and MT Zabet for providing biopsies and fibroblasts from patient 1, S. Meihac and A. Boletta to helpful discussion, and R. Ryan for reading and correcting the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VG MD MZ ST AB CJ SSa. Performed the experiments: VG MD MZ GO ST NE EF ON FS CL. Analyzed the data: VG MD MZ ST EF ON

MCG AB FT TAB CJ Ssa. Contributed reagents/materials/analysis tools: SCF IR JLA LD ADC MPC YC SKS Ssi RS CA FT TAB. Wrote the paper: VG MD MZ AB FT CJ Ssa.

References

1. Benzing T, Schermer B. Clinical spectrum and pathogenesis of nephronophthisis. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2012; 21(3):272–8. doi: [10.1097/MNH.0b013e3283520f17](https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e3283520f17) PMID: [22388554](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22388554/).
2. Wolf MT. Nephronophthisis and related syndromes. *Current opinion in pediatrics*. 2015; 27(2):201–11. doi: [10.1097/MOP.0000000000000194](https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000194) PMID: [25635582](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25635582/); PubMed Central PMCID: PMC4422489.
3. Fischer E, Legue E, Doyen A, Nato F, Nicolas JF, Torres V, et al. Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Nature genetics*. 2006; 38(1):21–3. doi: [10.1038/ng1701](https://doi.org/10.1038/ng1701) PMID: [16341222](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16341222/).
4. Arts HH, Knoers NV. Current insights into renal ciliopathies: what can genetics teach us? *Pediatric nephrology*. 2013; 28(6):863–74. doi: [10.1007/s00467-012-2259-9](https://doi.org/10.1007/s00467-012-2259-9) PMID: [22829176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22829176/); PubMed Central PMCID: PMC3631122.
5. Otto EA, Trapp ML, Schultheiss UT, Helou J, Quarmby LM, Hildebrandt F. NEK8 mutations affect ciliary and centrosomal localization and may cause nephronophthisis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2008; 19(3):587–92. doi: [10.1681/ASN.2007040490](https://doi.org/10.1681/ASN.2007040490) PMID: [18199800](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18199800/); PubMed Central PMCID: PMC2391043.
6. Frank V, Habbig S, Bartram MP, Eisenberger T, Veenstra-Knol HE, Decker C, et al. Mutations in NEK8 link multiple organ dysplasia with altered Hippo signalling and increased c-MYC expression. *Human molecular genetics*. 2013; 22(11):2177–85. doi: [10.1093/hmg/ddt070](https://doi.org/10.1093/hmg/ddt070) PMID: [23418306](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23418306/).
7. Fry AM, O'Regan L, Sabir SR, Bayliss R. Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases. *Journal of cell science*. 2012; 125(Pt 19):4423–33. doi: [10.1242/jcs.111195](https://doi.org/10.1242/jcs.111195) PMID: [23132929](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23132929/); PubMed Central PMCID: PMC3500863.
8. Shiba D, Manning DK, Koga H, Beier DR, Yokoyama T. Inv acts as a molecular anchor for Nphp3 and Nek8 in the proximal segment of primary cilia. *Cytoskeleton*. 2010; 67(2):112–9. doi: [10.1002/cm.20428](https://doi.org/10.1002/cm.20428) PMID: [20169535](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20169535/).
9. Bergmann C, Fliegauf M, Bruchle NO, Frank V, Olbrich H, Kirschner J, et al. Loss of nephrocystin-3 function can cause embryonic lethality, Meckel-Gruber-like syndrome, situs inversus, and renal-hepatic-pancreatic dysplasia. *American journal of human genetics*. 2008; 82(4):959–70. doi: [10.1016/j.ajhg.2008.02.017](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.02.017) PMID: [18371931](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18371931/); PubMed Central PMCID: PMC2427297.
10. Czamecki PG, Gabriel GC, Manning DK, Sergeev M, Lemke K, Klena NT, et al. ANKS6 is the critical activator of NEK8 kinase in embryonic situs determination and organ patterning. *Nature communications*. 2015; 6:6023. doi: [10.1038/ncomms7023](https://doi.org/10.1038/ncomms7023) PMID: [25599650](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25599650/); PubMed Central PMCID: PMC4361001.
11. Hoff S, Halbritter J, Epting D, Frank V, Nguyen TM, van Reeuwijk J, et al. ANKS6 is a central component of a nephronophthisis module linking NEK8 to INVS and NPHP3. *Nature genetics*. 2013; 45(8):951–6. doi: [10.1038/ng.2681](https://doi.org/10.1038/ng.2681) PMID: [23793029](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23793029/); PubMed Central PMCID: PMC3786259.
12. Okada M, Sugimoto K, Shimada Y, Fujita S, Yanagida H, Yagi K, et al. Association of INVS (NPHP2) mutation in an adolescent exhibiting nephronophthisis (NPH) and complete situs inversus. *Clinical nephrology*. 2008; 69(2):135–41. PMID: [18218308](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18218308/).
13. Tory K, Rousset-Rouviere C, Gubler MC, Moriniere V, Pawtowski A, Becker C, et al. Mutations of NPHP2 and NPHP3 in infantile nephronophthisis. *Kidney international*. 2009; 75(8):839–47. doi: [10.1038/ki.2008.662](https://doi.org/10.1038/ki.2008.662) PMID: [19177160](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19177160/).
14. Choi HJ, Lin JR, Vannier JB, Slaats GG, Kile AC, Paulsen RD, et al. NEK8 links the ATR-regulated replication stress response and S phase CDK activity to renal ciliopathies. *Molecular cell*. 2013; 51(4):423–39. doi: [10.1016/j.molcel.2013.08.006](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.006) PMID: [23973373](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23973373/); PubMed Central PMCID: PMC3790667.
15. Habbig S, Bartram MP, Sagmuller JG, Griessmann A, Franke M, Muller RU, et al. The ciliopathy disease protein NPHP9 promotes nuclear delivery and activation of the oncogenic transcriptional regulator TAZ. *Human molecular genetics*. 2012; 21(26):5528–38. doi: [10.1093/hmg/dds408](https://doi.org/10.1093/hmg/dds408) PMID: [23026745](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23026745/).
16. Varelas X. The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development*. 2014; 141(8):1614–26. doi: [10.1242/dev.102376](https://doi.org/10.1242/dev.102376) PMID: [24715453](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24715453/).
17. Yu FX, Guan KL. The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes & development*. 2013; 27(4):355–71. doi: [10.1101/gad.210773.112](https://doi.org/10.1101/gad.210773.112) PMID: [23431053](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23431053/); PubMed Central PMCID: PMC3589553.
18. Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & development*. 2007; 21(21):2747–61. doi: [10.1101/gad.1602907](https://doi.org/10.1101/gad.1602907) PMID: [17974916](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17974916/); PubMed Central PMCID: PMC2045129.

19. Habbig S, Bartram MP, Muller RU, Schwarz R, Andriopoulos N, Chen S, et al. NPHP4, a cilia-associated protein, negatively regulates the Hippo pathway. *The Journal of cell biology*. 2011; 193(4):633–42. doi: [10.1083/jcb.201009069](#) PMID: [21555462](#); PubMed Central PMCID: PMC3166863.
20. Failler M, Gee HY, Krug P, Joo K, Halbritter J, Belkacem L, et al. Mutations of CEP83 cause infantile nephronophthisis and intellectual disability. *American journal of human genetics*. 2014; 94(6):905–14. doi: [10.1016/j.ajhg.2014.05.002](#) PMID: [24882706](#); PubMed Central PMCID: PMC4121475.
21. Halbritter J, Bizet AA, Schmidts M, Porath JD, Braun DA, Gee HY, et al. Defects in the IFT-B component IFT172 cause Jeune and Mainzer-Saldino syndromes in humans. *American journal of human genetics*. 2013; 93(5):915–25. doi: [10.1016/j.ajhg.2013.09.012](#) PMID: [24140113](#); PubMed Central PMCID: PMC3824130.
22. Thomas S, Wright KJ, Le Corre S, Micalizzi A, Romani M, Abhyankar A, et al. A homozygous PDE6D mutation in Joubert syndrome impairs targeting of farnesylated INPP5E protein to the primary cilium. *Human mutation*. 2014; 35(1):137–46. doi: [10.1002/humu.22470](#) PMID: [24166846](#); PubMed Central PMCID: PMC3946372.
23. Alessandri JL, Cartault F, Brayer C, Cuillier F, Riviere JP, Ramful D, et al. Renal cystic dysplasia, paucity of bile ducts, situs inversus, bowing of the femora in two siblings in the Reunion Island: a ciliopathy? *Clinical dysmorphology*. 2009; 18(4):209–12. doi: [10.1097/MCD.0b013e32832b1376](#) PMID: [19550299](#).
24. Zalli D, Bayliss R, Fry AM. The Nek8 protein kinase, mutated in the human cystic kidney disease nephronophthisis, is both activated and degraded during ciliogenesis. *Human molecular genetics*. 2012; 21(5):1155–71. doi: [10.1093/hmg/ddr544](#) PMID: [22106379](#); PubMed Central PMCID: PMC3277313.
25. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX—a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo*. 2008; 22(3):305–9. PMID: [18610740](#).
26. Giles RH, Ajzenberg H, Jackson PK. 3D spheroid model of mIMCD3 cells for studying ciliopathies and renal epithelial disorders. *Nature protocols*. 2014; 9(12):2725–31. doi: [10.1038/nprot.2014.181](#) PMID: [25356583](#).
27. Varelas X, Samavarchi-Tehrani P, Narimatsu M, Weiss A, Cockburn K, Larsen BG, et al. The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF-beta-SMAD pathway. *Developmental cell*. 2010; 19(6):831–44. doi: [10.1016/j.devcel.2010.11.012](#) PMID: [21145499](#).
28. Kim J, Jo H, Hong H, Kim MH, Kim JM, Lee JK, et al. Actin remodelling factors control ciliogenesis by regulating YAP/TAZ activity and vesicle trafficking. *Nature communications*. 2015; 6:6781. doi: [10.1038/ncomms7781](#) PMID: [25849865](#).
29. Pobbati AV, Hong W. Emerging roles of TEAD transcription factors and its coactivators in cancers. *Cancer biology & therapy*. 2013; 14(5):390–8. doi: [10.4161/cbt.23788](#) PMID: [23380592](#); PubMed Central PMCID: PMC3672182.
30. Tschaharganeh DF, Chen X, Latzko P, Malz M, Gaida MM, Felix K, et al. Yes-associated protein up-regulates Jagged-1 and activates the Notch pathway in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2013; 144(7):1530–42 e12. doi: [10.1053/j.gastro.2013.02.009](#) PMID: [23419361](#); PubMed Central PMCID: PMC3665638.
31. Yimlamai D, Christodoulou C, Galli GG, Yanger K, Pepe-Mooney B, Gurung B, et al. Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell*. 2014; 157(6):1324–38. doi: [10.1016/j.cell.2014.03.060](#) PMID: [24906150](#); PubMed Central PMCID: PMC4136468.
32. Liu S, Lu W, Obara T, Kuida S, Lehoczy J, Dewar K, et al. A defect in a novel Nek-family kinase causes cystic kidney disease in the mouse and in zebrafish. *Development*. 2002; 129(24):5839–46. PMID: [12421721](#).
33. Smith LA, Bukanov NO, Husson H, Russo RJ, Barry TC, Taylor AL, et al. Development of polycystic kidney disease in juvenile cystic kidney mice: insights into pathogenesis, ciliary abnormalities, and common features with human disease. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2006; 17(10):2821–31. doi: [10.1681/ASN.2006020136](#) PMID: [16928806](#).
34. Archibald A, Al-Masri M, Liew-Spilger A, McCaffrey L. Atypical protein kinase C induces cell transformation by disrupting Hippo/Yap signaling. *Mol Biol Cell*. 2015; 26(20):3578–95. doi: [10.1091/mbc.E15-05-0265](#) PMID: [26269582](#); PubMed Central PMCID: PMC4603929.
35. Liu-Chittenden Y, Huang B, Shim JS, Chen Q, Lee SJ, Anders RA, et al. Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes & development*. 2012; 26(12):1300–5. doi: [10.1101/gad.192856.112](#) PMID: [22677547](#); PubMed Central PMCID: PMC3387657.
36. Zaghloul NA, Katsanis N. Zebrafish assays of ciliopathies. *Methods in cell biology*. 2011; 105:257–72. doi: [10.1016/B978-0-12-381320-6.00011-4](#) PMID: [21951534](#); PubMed Central PMCID: PMC3638959.

37. Fukui H, Shiba D, Asakawa K, Kawakami K, Yokoyama T. The ciliary protein Nek8/Nphp9 acts downstream of Inv/Nphp2 during pronephros morphogenesis and left-right establishment in zebrafish. *FEBS letters*. 2012; 586(16):2273–9. doi: [10.1016/j.febslet.2012.05.064](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.05.064) PMID: [22687244](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22687244/).
38. Skouloudaki K, Puetz M, Simons M, Courbard JR, Boehlke C, Hartleben B, et al. Scribble participates in Hippo signaling and is required for normal zebrafish pronephros development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; 106(21):8579–84. doi: [10.1073/pnas.0811691106](https://doi.org/10.1073/pnas.0811691106) PMID: [19439659](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19439659/); PubMed Central PMCID: PMC2688978.
39. Manning DK, Sergeev M, van Heesbeen RG, Wong MD, Oh JH, Liu Y, et al. Loss of the ciliary kinase Nek8 causes left-right asymmetry defects. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2013; 24(1):100–12. doi: [10.1681/ASN.2012050490](https://doi.org/10.1681/ASN.2012050490) PMID: [23274954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23274954/); PubMed Central PMCID: PMC3537214.
40. Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiological reviews*. 2014; 94(4):1287–312. doi: [10.1152/physrev.00005.2014](https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2014) PMID: [25287865](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25287865/).
41. Reginensi A, Scott RP, Gregorieff A, Bagherie-Lachidan M, Chung C, Lim DS, et al. Yap- and Cdc42-dependent nephrogenesis and morphogenesis during mouse kidney development. *PLoS genetics*. 2013; 9(3):e1003380. doi: [10.1371/journal.pgen.1003380](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003380) PMID: [23555292](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23555292/); PubMed Central PMCID: PMC3605093.
42. Heliot C, Desgrange A, Buisson I, Prunskaitė-Hyryläinen R, Shan J, Vainio S, et al. HNF1B controls proximal-intermediate nephron segment identity in vertebrates by regulating Notch signalling components and *lrx1/2*. *Development*. 2013; 140(4):873–85. doi: [10.1242/dev.086538](https://doi.org/10.1242/dev.086538) PMID: [23362348](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23362348/).
43. Massa F, Garbay S, Bouvier R, Sugitani Y, Noda T, Gubler MC, et al. Hepatocyte nuclear factor 1beta controls nephron tubular development. *Development*. 2013; 140(4):886–96. doi: [10.1242/dev.086546](https://doi.org/10.1242/dev.086546) PMID: [23362349](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23362349/).
44. Lipson KE, Wong C, Teng Y, Spong S. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis & tissue repair*. 2012; 5(Suppl 1): S24. doi: [10.1186/1755-1536-5-S1-S24](https://doi.org/10.1186/1755-1536-5-S1-S24) PMID: [23259531](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23259531/); PubMed Central PMCID: PMC3368796.
45. Takigawa M. CCN2: a master regulator of the genesis of bone and cartilage. *Journal of cell communication and signaling*. 2013; 7(3):191–201. doi: [10.1007/s12079-013-0204-8](https://doi.org/10.1007/s12079-013-0204-8) PMID: [23794334](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23794334/); PubMed Central PMCID: PMC3709051.
46. Cebola I, Rodriguez-Segui SA, Cho CH, Bessa J, Rovira M, Luengo M, et al. TEAD and YAP regulate the enhancer network of human embryonic pancreatic progenitors. *Nature cell biology*. 2015; 17(5):615–26. doi: [10.1038/ncb3160](https://doi.org/10.1038/ncb3160) PMID: [25915126](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25915126/); PubMed Central PMCID: PMC4434585.
47. Heallen T, Zhang M, Wang J, Bonilla-Claudio M, Klysik E, Johnson RL, et al. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science*. 2011; 332(6028):458–61. doi: [10.1126/science.1199010](https://doi.org/10.1126/science.1199010) PMID: [21512031](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21512031/); PubMed Central PMCID: PMC3133743.
48. Viau A, El Karoui K, Laouari D, Burtin M, Nguyen C, Mori K, et al. Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *The Journal of clinical investigation*. 2010; 120(11):4065–76. doi: [10.1172/JCI42004](https://doi.org/10.1172/JCI42004) PMID: [20921623](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20921623/); PubMed Central PMCID: PMC2964970.
49. Mateus R, Lourenco R, Fang Y, Brito G, Farinho A, Valerio F, et al. Control of tissue growth by Yap relies on cell density and F-actin in zebrafish fin regeneration. *Development*. 2015; 142(16):2752–63. doi: [10.1242/dev.119701](https://doi.org/10.1242/dev.119701) PMID: [26209644](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26209644/).

RESUME

Caractérisation fonctionnelle de la protéine ANKS3 impliquée dans les ciliopathies rénales et étude de son rôle dans la régulation des ARNs

La Néphronophthie (NPH) est une néphropathie tubulo-interstitielle autosomique récessive, caractérisée par la présence d'une fibrose interstitielle massive et la formation de kystes. Elle est une cause majeure d'insuffisance rénale terminale chez l'enfant ou le jeune adulte. Elle peut être isolée ou associée à des atteintes extrarénales. La NPH appartient au groupe des ciliopathies, un ensemble de maladies multisystémiques causées par des mutations dans des gènes codant pour des protéines participant à la fonction des cils primaires et motiles. Le cil primaire agit, à la surface de la plupart des cellules, comme un mécano et chimiosenseur contrôlant des voies de signalisation essentielles au développement et à l'homéostasie tissulaire (Sonic hedgehog (Shh), Wnt, polycystines/Calcium, mTOR). La NPH est une maladie génétiquement hétérogène avec vingt-trois gènes NPHP responsables identifiés à ce jour (dont 14 dans notre laboratoire). La plupart de ces gènes codent des protéines assurant des fonctions ciliaires telles que le contrôle de la composition protéique et de la signalisation ciliaire, à la base du cil (zone de transition (TZ)), au niveau du compartiment Inversine (CI), ou lors du transport intraflagellaire (IFT).

Par analyse d'exome, nous avons identifié une mutation homozygote pathogène dans un nouveau gène, ANKS3, responsable d'une NPH associée à une fibrose hépatique. ANKS3 code pour une protéine à domaines Ankyrines et SAM, connue pour interagir avec plusieurs protéines NPHP de la TZ (NPHP1), du CI (ANKS6, NEK8) ainsi qu'avec BICC1, une ribonucléoprotéine mutée dans les dysplasies rénales kystiques.

Mon projet de thèse a porté sur la caractérisation de la fonction d'ANKS3 et de l'impact de la mutation humaine dans les processus cellulaires altérés dans les ciliopathies rénales. Ces études ont été réalisées à partir de différents modèles cellulaires: fibroblastes de patients, cellules tubulaires rénales IMCD3 déplétés pour Anks3 (ANKS3_KD) ré-exprimant la forme sauvage ou mutée.

Mes travaux ont ainsi montré que la mutation du gène ANSK3 diminue son interaction avec les composants de la TZ, NPHP1 et du CI, NEK8. Par ailleurs, l'absence ou l'expression de la forme mutée d'ANKS3 perturbe la taille des cils et la biogenèse du CI, avec une relocalisation anormale des composants du CI tout le long du cil. De plus, une perturbation de la signalisation ciliaire de la voie Shh et de la localisation de la protéine Polycystine-2 au cil ont été observées dans les cellules ANKS3_KD ou KD_P269L. Des alterations de la motilité ciliaire et de l'élévation calcique ont également été observés dans la vésicule de Kupffer du poisson zèbre muté pour anks3 (TALEN), entraînant des défauts de latéralité. Outre ces défauts ciliaires, la perte ou la mutation d'ANKS3 entraînent des anomalies de polarité apico-basale dans les cellules tubulaires rénales IMCD, avec une diminution de la hauteur des cellules et un retard de la formation des jonctions serrées, un phénotype déjà observé dans les modèles mutés pour NPHP1.

De façon cohérente, nous avons observé une diminution de la stabilité des transcrits NPHP1 dans les cellules ANKS3_KD et KD_P269L et démontré que la réexpression de NPHP1 restaure les défauts de polarité dans ces cellules et les cils plus longs dans les cellules KD_P269L. Suggérant qu'une dérégulation des transcrits NPHP1 due à l'absence ou la mutation de ANKS3 est à l'origine de ces phénotypes. Afin de préciser le mécanisme par lequel ANKS3 régule la stabilité des ARNs de NPHP1 et possiblement d'autres ARN ciliaires, nous avons étudié l'implication de son partenaire BICC1, connu pour lier et réguler les ARNs. Des analyses transcriptomiques par RNAseq et RIPseq sur des cellules ANKS3-KD en présence ou non de BICC1, nous ont permis de démontrer que ANKS3 en s'associant à BICC1, prévient la liaison de plusieurs transcrits ciliaires à ce dernier, les empêchant ainsi d'être dégradés par le complexe RISC/AGO2.

L'ensemble de ces résultats nous ont permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme de régulation des transcrits ciliaires par le complexe ANKS3/BICC1, dont les mutations causent des ciliopathies rénales.