HAL
open science

Etude du complexe CEP90-FOPNL et OFD1 dans le processus d'ancrage des corps basaux

Pierrick Le Borgne

To cite this version:

Pierrick Le Borgne. Etude du complexe CEP90-FOPNL et OFD1 dans le processus d'ancrage des corps basaux. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASL009 . tel-03638718

HAL Id: tel-03638718

https://theses.hal.science/tel-03638718v1

Submitted on 12 Apr 2022

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.

université PARIS-SACLAY

Etude du complexe CEP90-FOPNL et OFD1 dans le processus d'ancrage des corps basaux

Study of CEP90-FOPNL and OFD1 complex in basal body anchoring process

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°577, Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé
Graduate School : Life Science and Health. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Institute for Integrative Biology of the Cell- I2BC** (Université Paris-Saclay, CEA, CNRS),
sous la direction d'**Anne-Marie TASSIN**, Directrice de recherche

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 11 février 2022, par

Pierrick LE BORGNE

Composition du Jury

Laurent THÉODORE Professeur, Université Paris-Saclay	Président
Alexandre BENMERAH Directeur de Recherche, Institut Imagine	Rapporteur & Examinateur
Christine VESQUE Chargée de Recherche (HDR), Institut de biologie Paris-Seine	Rapporteur & Examinatrice
Bénédicte DURAND Directrice de Recherche, Institut NeuroMyoGène	Examinatrice
Virginie HAMEL Directrice de Recherche, Université de Genève	Examinatrice
Anne-Marie TASSIN Directrice de Recherche, CNRS/I2BC	Directrice de thèse

THESE DE DOCTORAT

NNT : 2022UPASL009

ÉCOLE DOCTORALE
Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)

université PARIS-SACLAY

Titre : Etude du complexe CEP90-FOPNL et OFD1 dans le processus d'ancrage des corps basaux

Mots clés : FOPNL, CEP90, Centrioles, corps basaux, centrosome, cil, ciliopathies, ancrage, appendices distaux

Résumé : Les centrioles sont des structures cellulaires très conservées au cours de l'évolution. Ils sont organisés en symétrie 9 de triplets de microtubules. Chez les animaux, les centrioles sont des éléments constitutifs du centrosome. Le centrosome est le principal centre organisateur des microtubules et est nécessaire pour assurer des processus fondamentaux tels que la division et la polarité cellulaire. Lorsque que les conditions le permettent, le centriole père est capable de migrer et de s'ancrer à une membrane cellulaire pour former un cil. Le processus d'ancrage fait intervenir la partie distale du centriole père et notamment les appendices distaux. Au cours de la ciliogenèse, le centriole père subit une maturation et est appelé corps basal. Les appendices distaux forment les fibres de transition et déterminent la partie antérieure de la zone de transition qui joue un rôle de filtre nécessaire pour assurer la spécificité de la composition protéique et lipidique du cil. Au cours de l'évolution, la structure des cils est très conservée malgré l'observation de variations structurales entre différents organismes. Les cils jouent un rôle essentiel dans la signalisation et/ou de motilité. Par conséquence, chez l'homme, les défauts ciliaires sont à l'origine de maladies génétiques rares causant des syndromes poly-malformatifs regroupés sous le nom de ciliopathies. Au cours de ma thèse je me suis intéressé à identifier de nouveaux acteurs de l'ancrage des corps basaux en utilisant deux modèles complémentaires : des cultures de cellules humaines et l'organisme unicellulaire Paramecium Tetraurelia. Les corps basaux de la paramécie sont tous ancrés à la membrane plasmique sans passer par une étape centriolaire. Par conséquence chez cet organisme des défauts d'ancrage se caractérisent par la présence de corps basaux non ancrés dans le cytoplasme et facilement observables. Grâce à ce modèle les membres de l'équipe ont déjà caractérisés l'implication de 4 protéines dans l'ancrage des corps basaux : Cen2, OFD1, FOPNL et Cen3. Chez l'homme FOPNL, OFD1 et MNR forment un complexe nécessaire à la ciliogenèse, MNR et OFD1 étant toutes les deux impliquées dans des ciliopathies. J'ai recherché de nouveaux acteurs de l'ancrage des corps basaux en réalisant une technique d'identification par proximité, la BioID, en utilisant FOPNL comme appât. Nous avons déterminé que la protéine CEP90 est localisée dans l'environnement proche de FOPNL. Dans les cellules humaines, CEP90 partage la même localisation que FOPNL et OFD1 aux centrioles et aux satellites centriolaires et est aussi impliquée dans des ciliopathie. En utilisant une technique d'imagerie super-résolutive appelée microscopie à expansion, nous montrons que CEP90, FOPNL et OFD1 sont organisées en symétrie 9 en partie distale des centrioles et des corps basaux, proche de la protéine des appendices distaux CEP83. Le recrutement aux centrioles et corps basaux de CEP90, FOPNL et OFD1 est interdépendant et l'absence d'une de ces protéines entraine des défauts d'ancrage des corps basaux chez la paramécie. Chez les mammifère, la déplétion de FOPNL ou CEP90 affecte le recrutement de 3 protéines de appendices distaux (CEP83, CEP89 et CEP164) impliquées dans l'ancrage des corps basaux. Dans les cellules de mammifères, nous avons démontré que CEP90 et OFD1 sont recrutées très précocement sur les procentrioles au cours de la duplication et que la co-surexpression de MNR et CEP90 est suffisante pour recruter OFD1 et CEP83 le long du réseau de microtubules. La surexpression de CEP90 seule forme des agrégats capables de recruter OFD1 et CEP83. L'ensemble de ces résultats apporte un éclairage nouveau sur le processus d'ancrage des corps basaux. Le recrutement précoce du complexe CEP90, FOPNL et OFD1 nous a conduit à proposer que ce complexe permettait de spécifier la future localisation des appendices distaux

Enfin, dans cette thèse nous montrons que le complexe CEP90, FOPNL et OFD1 est fonctionnellement conservé chez la paramécie et les cellules de mammifères.

ÉCOLE DOCTORALE
Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)

université PARIS-SACLAY

Title: Study of CEP90-FOPNL and OFD1 complex in basal body anchoring process

Keywords: FOPNL, CEP90, Centriole, basal body, centrosome, cilia, ciliopathies, anchorage, distal appendages

Abstract: Centrioles are highly conserved structures throughout evolution. They are organized in a 9-fold symmetry of microtubule triplets. In animals, centrioles are building blocks of the centrosome. The centrosome is the main organizing center of microtubules and is necessary for fundamental processes such as cell division and polarity. Under specific conditions, the mother centriole is able to migrate and anchor to a cell membrane to build a cilium. The anchoring process involves the distal extremity of the mother centriole and in particular the distal appendages. During ciliogenesis, the mother centriole matures and is called the basal body. The distal appendages mature in transition fibers and determine the proximal extremity of the transition zone, which acts as a filter to ensure the specificity of the protein and lipid composition of the cilium. During evolution, the structure of cilia is highly conserved, despite variations between organisms have been observed. Cilia play an essential role in signaling and / or motility. Consequently, in humans, rare genetic diseases originate from ciliary defects causing poly-malformation syndromes called ciliopathies. During my thesis, I was interested in identifying new actors of basal bodies anchoring using two complementary models: human cell cultures and Paramecium Tetraurelia. The basal bodies in Paramecium are all anchored to the plasma membrane and did not display any centriolar stages. Consequently, in this organism, anchoring defects are characterized by the presence of easily observable non-anchored basal bodies. Using this model, members of the team have already characterized the involvement of 4 proteins in the basal bodies anchoring: Cen2, OFD1, FOPNL and Cen3. In human, FOPNL, OFD1 and MNR form a complex involved in ciliogenesis, MNR and OFD1 both being involved in ciliopathies. To The search of novel actors involved in the basal body anchoring process has been achieved using BioID, a proximity identification technic, using FOPNL as a bait. We determined that the CEP90 protein is localized in the close environment of FOPNL. In human cells, CEP90 shares the same localization as FOPNL and OFD1 at centrioles and centriolar satellites and is also involved in ciliopathy. Using a super-resolution imaging technique called expansion microscopy, we show that CEP90, FOPNL, and OFD1 are organized in 9-fold symmetry at the distal part of the centrioles and basal bodies, close to the distal appendage protein CEP83. The recruitment of CEP90, FOPNL and OFD1 at basal bodies is interdependent and the absence of one of these proteins leads to basal body anchoring defects in Paramecium. In mammals, the depletion of FOPNL or CEP90 affects the recruitment of 3 distal appendage proteins (CEP83, CEP89 and CEP164). In mammalian cells, we demonstrated that CEP90 and OFD1 are recruited during duplication on early born procentrioles and that the co-overexpression of MNR and CEP90 is sufficient to recruit OFD1 and CEP83 along the microtubule network. Altogether these results shed new light on the basal body anchoring process . In addition, the early recruitment of CEP90, FOPNL and OFD1 complex on newly born procentrioles led us to propose that the localization of the complex specify the future location of the distal appendages. Finally, in this thesis, we show that CEP90, FOPNL and OFD1 is functionally conserved from Paramecium to mammalian cells despite it is absent in some phyla such as Drosophila and C.elegans.

Remerciements

Tout d'abord je souhaiterai remercier les membres de mon jury : Alexandre Benmerah, Bénedicte Durand, Virginie Hamel, Laurent Théodore et Christine Vesque d'avoir accepté avec enthousiasme de lire et d'évaluer mon travail.

Un grand merci aux membres de mon comité de thèse, Juliette Azimzadeh et Bénedicte Durand pour m'avoir suivi tout au long de ma thèse pour vos conseils et votre bienveillance.

Anne-Marie, je ne saurais jamais assez te remercier pour témoigner toute la reconnaissance que j'ai pour ces quatre années passées dans ton équipe. Je te remercie de toute la confiance que tu m'as accordée et de m'avoir toujours poussé à valoriser mon travail. Merci d'avoir toujours été présente pour moi lorsque je me remettais en question sur le plan personnel et professionnel, merci de m'avoir écouté. Ta bienveillance et ta gentillesse m'ont permis de surmonter les coups durs. Merci aussi d'avoir su donner un petit coup de boost quand c'était nécessaire sans quoi cette thèse n'aurait jamais vu le jour. Je comprends aujourd'hui pourquoi tu gardes un lien si fort avec tes anciens thésards. Merci pour ton humanité !

France je tiens aussi te remercier plus particulièrement. Ton aide et ta patience ont été très précieuses pour surmonter ma phobie des clonages. Merci pour ton honnêteté et ton franc-parler un peu direct qui « traumatisent » les stagiaires mais qui cachent l'une des personnes les plus gentilles que j'ai eu la chance de rencontrer. Merci d'avoir toujours veillé sur moi depuis ta tanière !

Logan, tu étais l'un de mes premiers stagiaires au laboratoire et je suis très heureux de voir aujourd'hui à quel point tu t'épanouis en thèse. Ton soutient et ta présence ont été très importants à mes yeux. Merci d'être resté tard avec moi en écoutant de la musique un peu trop forte au labo, d'avoir tant partagé avec moi et d'avoir été le petit frère que je n'ai jamais eu. Merci pour les fous rires avec Manon pendant nos « expériences » et tous les souvenirs. Je te souhaite le meilleur pour l'avenir, je sais que tu es entre de bonnes mains.

Un énorme merci à tous les membres du laboratoire pour toutes les discussions et votre bonne humeur. Merci Khaled et Michel pour vos conseils durant mes périodes

d'enseignement. Michel je te remercie pour tout le temps que tu as passé au microscope électronique, promis un jour j'apprendrai à mieux compter les paramécies ! Khaled merci d'avoir toujours répondu présent sans hésiter quand j'ai eu besoin de toi. Delphine merci de m'avoir appris à manipuler les paramécies, j'aurais aimé que tu restes plus longtemps (Au moins pour faire un concert de plus!) Karima continue d'être le petit rayon de soleil du laboratoire!

Paul et Virginie je vous remercie ainsi que l'ensemble de votre laboratoire pour m'avoir invité apprendre la microscopie à expansion qui a permis d'enrichir considérablement le contenue de ma thèse. Vos conseils tout au long de la thèse et de l'écriture de l'article ont été d'une grande aide. Un énorme merci à Marine pour tout le temps que tu as investi dans mon projet, pour ton enthousiasme et ton amour de la recherche.

Aux membres des équipes paramécies du bâtiment 26, je souhaite vous remercier pour nos échanges et vos remarques, en particulier Mireille pour ton état d'esprit positif à tout épreuve. A Coralie et Mélanie pour avoir transformé nos pièces respectives en bureaux des commères en mangeant des kinder surprises.

Une pensée aux membres de la « team Summer School » : Aude, Amélie, Noémie et Marjorie. Comment mieux commencer que de vous rencontrer et s'entraider au long de la thèse ?

Enfin, un grand merci à mes parents de nous avoir transmis vos valeurs et de nous aimer inconditionnellement. Vous êtes l'une de mes plus grandes forces.

Ce projet a reçu, pour sa réalisation, le soutient de la Fondation ARC

Abréviations

ALF	Anterior left filament
APEX	Engineered ascorbate peroxidase
ATP	Adénosine triphosphate
BBS	Bardet–Biedl syndrome
BioID	proximity-dependent biotinylation identification
Co-IP	Co-immunoprécipitation
DA	appendices distaux
sDA	appendices subdistaux
DCP	daugther centriole protein
DIG	Digoxigenin
ExM	Expansion microscopy
U-ExM	Ultrastructural expansion microscopy
GEF	Guanin exchange factor
HEK293	Human embryonic kidney 293
IDA	inner dynein arms
IFT	intraflagellar transport
KO	Knockout
MKS	Meckel-Gruber syndrome
MT	Microtubule
NK	Natural Killer
NPHP	Nepephronophtisis
ODA	outer dynein arms
OFD	oro-facial-digital
PCD	primary cilia dyskinesia
PCM	pericentriolar material
PCNT	pericentrin
RPE1	Human retinal pigment epithelial-1
SIM	Structured-illumination microscopy
STORM	Stochastic optical reconstruction Microscopy
TZ	transition zone
U2OS	Human Bone Osteosarcoma Epithelial Cells
γ-TuRC	γ-Tubulin Ring Complexe

I. INTRODUCTION : 9

A. LE CENTROSOME 9
1. Structure des centrioles 9
2. Le matériel péri-centriolaire 12
3. Les satellites centriolaires 15
B. FONCTION DU CENTROSOME 17
1. Le centrosome est le régulateur des microtubules dans la cellule 17
2. Le centrosome est également un centre organisateur de l'actine 18
3. Centrosome, organisateur de la formation des cils 18
C. STRUCTURES ET FONCTION DES CILS 20
1. Les cils non motiles 21
2. Les cils motiles 21
D. COMPOSITION MOLECULAIRE DU CENTRIOLE 22
1. Appendices distaux 22
2. Appendices subdistaux 25
3. Protéines communes aux appendices distaux et subdistaux 27
4. Les protéines spécifiques au centriole fils 29
E. LA CILIOGENESE 30
1. La duplication des centrioles 30
2. La migration du centriole père 34
3. La maturation du centriole en corps basal 36
4. L'ancrage des corps basaux 38
5. La formation de la zone de transition 42
6. L'élongation de l'axonème 45
F. LES CILIOPATHIES 47
1. Les atteintes des cils primaires 48
2. Atteinte de cils motiles 53
G. LA PARAMECIE 54
1. Organisation et structure des corps basaux 55
2. La division cellulaire chez la paramécie 56
3. Les outils 60
H. LES PROTEINES DE CETTE ETUDE : 62
I. LES OBJECTIFS DE LA THESE 66

II. RESULTATS 69

A. CEP90, FOPNL ET OFD1 FORMENT UN COMPLEXE FONCTIONNEL NECESSAIRE AU RECRUTEMENT DES APPENDICES DISTAUX 69
B. CEP90, OFD1 ET FOPNL FORMENT UN COMPLEXE CAPABLE DE SPECIFIER LA LOCALISATION DES FUTURS APPENDICES DISTAUX 120
1. FOPNL, CEP90 et OFD1 sont capables d'interagir physiquement 121
2. CEP90, OFD1 et FOPNL permettent de déterminer la localisation de CEP83 122

III. DISCUSSION 130

A. LA BIOID : LA PUISSANCE D'UN OUTIL ET SES LIMITES 130
B. CEP90, AVEC FOPNL ET OFD1, DETERMINENT TRES TOT LA POSITION DES APPENDICES DISTAUX APRES LA FORMATION DU PROCENTRIOLE. 133
1. Un complexe nécessaire au recrutement des appendices distaux 133
2. Un complexe recruté précocement pour marquer la future position des appendices distaux 135
3. CEP90-OFD1-FOPNL : un complexe suffisant pour recruter CEP83 137

C. DISCO : LE COMPLEXE DISTAL DES CENTRIOLES 140
D. L'« ULTRASCUTURAL EXPANSION MICROSCOPY » ADAPTEE A L'ANALYSE DES STRUCTURES CENTRIOLAIRES ET CILIAIRES 142
E. LA PARAMECIE COMME MODELE D'ETUDE DES CILS ET DES CILIOPATHIES 144

IV. BIBLIOGRAPHIE 142

I. Introduction :

A. Le centrosome

Le centrosome a été découvert et nommé dans les années 1880 par Theodor Boveri au cours de ces études sur la division cellulaire chez le nématode *Ascaris megalocephala*. En 1887, Theodor Boveri décrit le centrosome pour la première fois en tant qu'organite cellulaire capable de se diviser, de croitre et de fonctionner comme un centre attractif pour son environnement (Scheer, 2014).

Le centrosome est considéré comme un organite cellulaire. Mais à la différence d'autres organites bien décrits tels que le noyau ou les mitochondries, le centrosome ne possède pas de limite membranaire. Il est composé de deux cylindres appelés centrioles entourés d'une matrice de matériel péricentriolaire (PCM) (Figure 1) et de satellites centriolaires

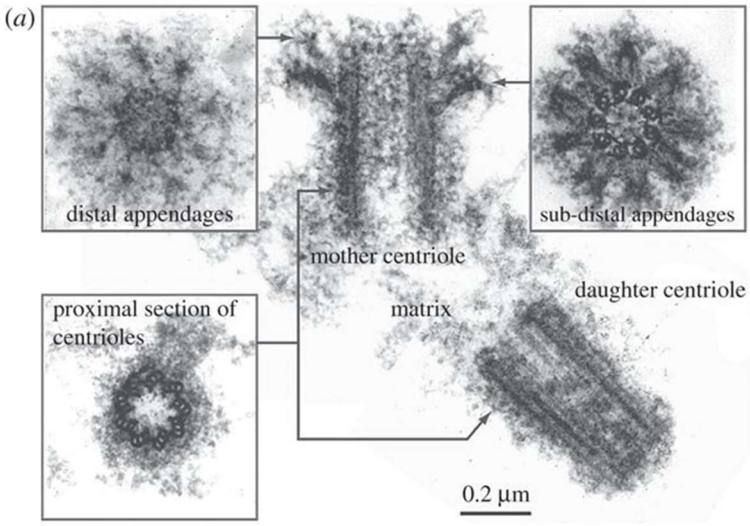


Figure 1 : structure d'un centrosome (Paintrand et al., 1992) *Le centrosome est composé de deux centrioles entourés de matériel péricentriolaire. Le centriole père (mother centriole) se distingue structuralement du fils par la présence d'appendices distaux et subdistaux à son extrémité distale.*

1. Structure des centrioles

Les centrioles sont composés de triplets de microtubules organisés en symétrie 9. Le microtubule (MT) A, constitué de 13 protofilaments, est assemblé le premier à partir d'une structure caractéristique du γ-TuRC (Guichard et al., 2010; Gupta et al., 2020). Les microtubules B et C s'assemblent respectivement à partir des MT A et B et sont composés uniquement de 10 protofilaments (Guichard et al., 2010). Le microtubule C est plus court en partie distale que les microtubules A et B. Deux modèles existent quant à la formation des

triplets. Dippell (Dippell, 1968) en étudiant la duplication des corps basaux de paramécie par ME (microscopie électronique) décrit une nucléation séquentielle des microtubules composants les triplets. D'abord il y aura formation de manière ordonnée de tous les microtubules A, puis il y aura formation des microtubules B puis des C. Par contre, Guichard et al. (Guichard et al., 2010), après analyse par cryo-tomographie électronique de centrioles de cellules KE37 purifiés, proposent un assemblage stochastique des triplets. Des doublets A et B sont observés alors que tous les microtubules A ne sont pas encore formés.

Le nombre de microtubules composant le mur centriolaire peut varier d'une espèce à l'autre. Contrairement aux mammifères, les centrioles de C. *elegans* sont composés uniquement de singlets de microtubules organisé autour d'un tube central distinct de la roue de charrette « cartwheel » observée dans les centrioles de la plupart des espèces. Il existe aussi des variations au sein d'une même espèce comme c'est le cas chez la drosophile. Dans cette espèce, les centrioles sont composés de singlets/doublets dans le blastoderme syncitial (Moritz et al., 1995a).Une hypothèse pourrait être que, dans ce type cellulaire, les divisions s'enchainent rapidement ce qui ne laisse pas suffisamment de temps aux centrioles pour atteindre le stade de doublet/triplet. Néanmoins dans des cellules différenciées telles que les neurones olfactifs, les centrioles sont composés de 9 doublets de microtubules alors qu'ils sont formés de triplets dans les spermatozoïdes (Greenan et al., 2018; Khire et al., 2016; Klena et al., 2020)

Chez l'homme, les centrioles, tels qu'ils ont été observés au microscope électronique (Figure 1) sont organisés au sein du centrosome en une paire orthogonale. Le mur de microtubules qui les compose forme un cylindre d'un diamètre de 250nm et d'une longueur de 500nm environ.

Des analyses plus résolutives en cryo-tomographie ont permis d'identifier trois régions structuralement distinctes du centriole

(i) En partie proximale, les triplets adjacents sont reliés entre eux par une structure appelée le A-C linker (Klena et al., 2020; Li et al., 2012) . Selon l'organisme étudié, il est possible d'observer dans la région la plus proximale une structure centrale

en roue de charrette appelée « cartwheel » qui est essentielle à la duplication des centrioles et la mise en place de la symétrie 9. Cette structure peut être perdue au cours de la maturation des centrioles, comme c'est le cas dans la majorité des cellules de mammifères ou au contraire conservée comme pour les corps basaux de *P. tetraurelia* ou C. *reinhardtii*

(ii) Dans la région médiane du centriole, une structure hélicoïdale appelée « inner scaffold » conservée au cours de l'évolution, malgré de légères différences entre les espèces, couvre 70% de la lumière du centriole (Le Guennec et al., 2020).L'association de la cryo-tomographie à la microscopie à expansion a révélé que cette structure est composée majoritairement de POC1B, FAM161A, POC5, Centrin-2 et WDR90 (Le Guennec et al., 2020). Du γ-TuRC a été observé dans la lumière centrale du centriole et pourrait être associé à l'inner scaffold (Bahtz et al., 2012; Schweizer et al., 2021). L'« inner scaffold » est relié au triplet de MT via le microtubule A (Le Guennec et al., 2020). Les différents travaux étudiant le A-C linker et l'inner scaffold proposent que ces deux structures pourraient jouer un rôle dans le maintien de la cohésion des centrioles (Klena et al., 2020; Le Guennec et al., 2020; Li et al., 2012; Meehl et al., 2016)

(iii) La région distale du centriole correspond à la zone s'étendant de la transition des triplets de microtubules en doublets jusqu'à l'extrémité distale des microtubules. Les deux centrioles sont recouverts à l'extrémité distale par une coiffe permettant de réguler leur longueur (Schmidt et al., 2009). Les appendices distaux et subdistaux sont recrutés uniquement en partie distale du centriole père. Les détails structuraux et moléculaires des appendices seront développés dans la

partie correspondante.

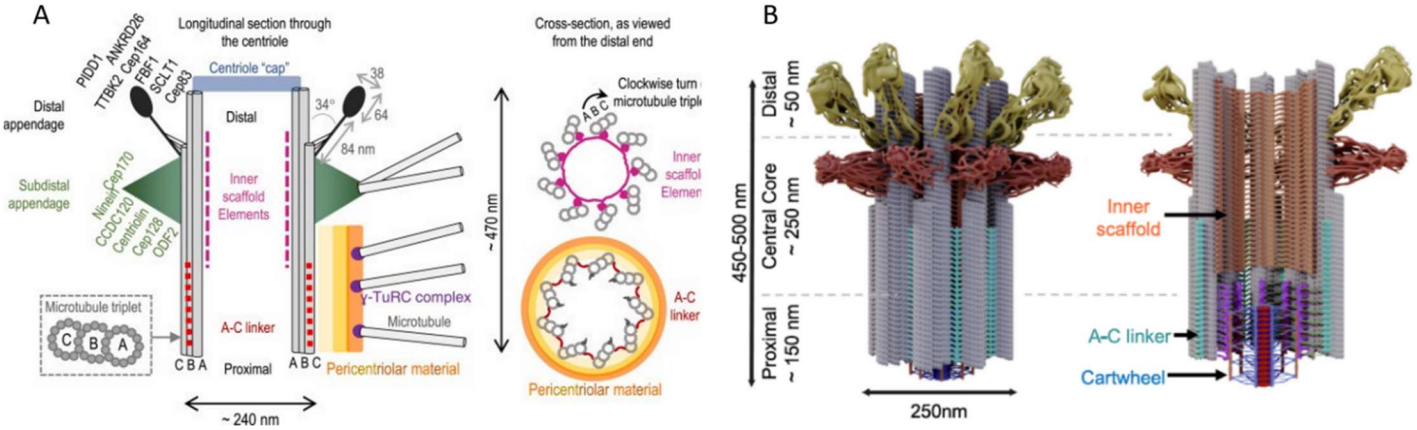


Figure 2 : Architecture du centriole père chez l'homme (A) Schéma décrivant la structure d'un centriole père mature. Le centriole est composé de triplets de microtubules (A, B et C) organisés en symétrie 9. Les microtubules A et C sont connectés via un linker (en rouge). Le « inner scaffold » (magenta) assure la stabilité du centriole et est connecté aux microtubules par des densités présentes à la jonction des microtubules A et B. La partie proximale du centriole est également entourée du matériel péricentriolaire (PCM) qui possède des composants nécessaires à la nucléation et l'ancrage des microtubules. La partie distale du centriole père est décorée par les appendices distaux (noir) et subdistaux (vert) (Vasquez-Limeta and Loncarek, 2021). *(B) Modèle structural des différentes régions du centriole père observé en cryo-tomographie* (Le Guennec et al., 2020)

2. Le matériel péri-centriolaire

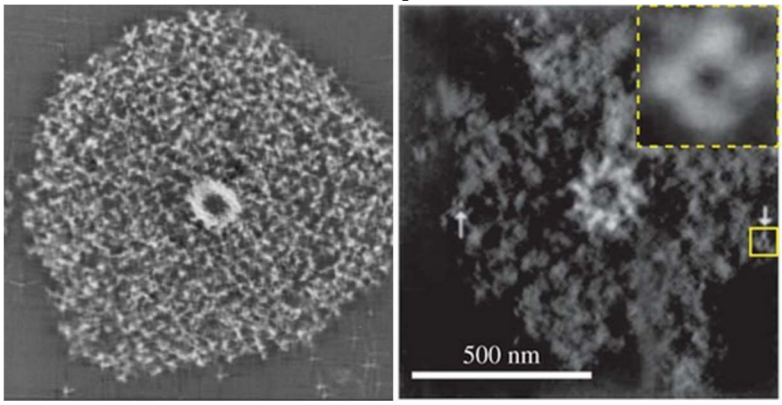


Figure 3 : Structure du matériel péri-centriolaire en microscopie électronique. Observation d'un centrosome après traitement d'iodure de potassium chez Spisula (gauche) ou purification de centrosome chez la drosophile (droite). Le centriole est observé en vue de dessus et présente sa symétrie 9 de microtubules entouré par le matériel péri-centriolaire (PCM). (Moritz et al., 1995b; Schnackenberg et al., 1998).

Le PCM est constitué d'un assemblage dense et dynamique de protéines souvent décrites comme filamenteuses et insolubles (Figure 3). Ses composants majeurs sont la péricentrine (PCNT), CEP192, CDK5RAP2, CEP152, CPAP et γ-tubuline. Toutes ces protéines sont riches en domaines « coiled-coil » qui favorisent les interactions protéines-protéines. Les premières observations en microscopie électronique n'ont pas permis d'identifier d'organisation précise, suggérant que le PCM était une matrice amorphe. Les techniques de super-résolutions ont révélé, au contraire, que le PCM est une structure poreuse et très organisée qui rassemble des régulateurs importants des fonctions du centrosome. En interphase, le PCM est organisé en plusieurs couches compactes autour des centrioles (Mennella et al., 2014). Les protéines PCNT et Cep152 définissent le diamètre du PCM. Elles sont ancrées par leur C-terminale aux centrioles alors que l'extrémité N-terminale s'étend en direction du cytoplasme. La longueur prédite de ces protéines dans leur forme allongée correspond au diamètre du PCM (150 nm) en interphase. Les protéines CEP192, CDK5RAP2 et γ-tubuline s'accumulent entre les fibres de PCNT et CEP152 pour former la couche interne du PCM.

La taille et la composition du PCM varie au cours du cycle cellulaire. La phosphorylation de nombreux de ses composants par Polo-like Kinase 1 (PLK1) en amont de la mitose, entraîne une augmentation de sa taille (Mennella et al., 2014). Ce processus est associé à un recrutement massif de protéines constitutives qui formeront la couche externe. Contrairement à la couche interne, cette nouvelle couche ne présente pas d'organisation précise mais s'assemble en structure désorganisée. Elle est nécessaire au recrutement des microtubules mitotiques. A la fin de la mitose, l'inactivation de Plk1 et par conséquence la déphosphorylation des protéines du PCM entraine le désassemblage de sa couche externe pour retrouver le diamètre défini par la couche interne uniquement (Figure 4).

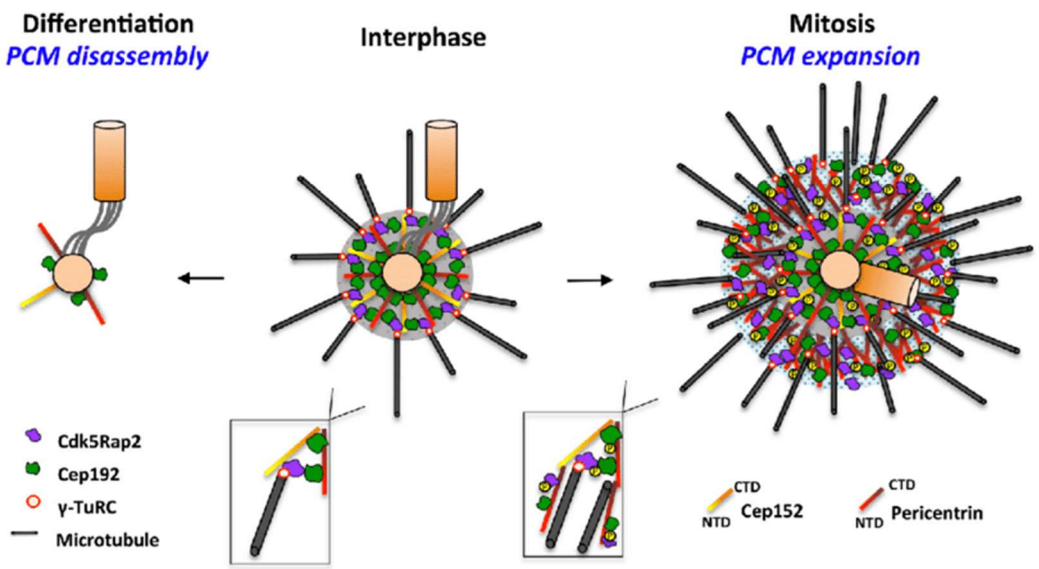


Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation du PCM. Au cours de l'interphase, les deux centrioles sont connectés et le PCM est organisé autour du centriole père. La taille et la forme du centriole est définie par les protéines péricentrine et CEP52 qui forment la couche interne (cercle gris) Cette couche contient également Cdk5Rap2 et Cep192 et s'organise en matrice fibreuse permettant la liaison des γ-TuRCS. En mitose, la phosphorylation de nombreuses protéines par Plk1 entraine l'expansion du PCM créant la couche externe. Cette couche est moins organisée mais elle contient les protéines adaptatrices pour la nucléation des microtubules du fuseau mitotique. Dans certaines cellules différenciées, les protéines du PCM sont recrutées vers d'autres centres organisateurs des microtubules autre que le centrosome. La couche interne du PCM est alors désorganisée (Fry et al., 2017)

En interphase, le PCM assure la fonction la plus connue du centrosome : la nucléation des microtubules. L'étape critique de la nucléation des microtubules est l'étape dite d'initiation qui consiste en l'assemblage *de novo* de dimères α/β de tubulines en 13 protofilaments caractéristiques de microtubules. Cette étape est facilitée au PCM grâce au recrutement de larges complexes protéiques appelés complexes en anneau de γ-tubuline (γ-TuRCs). Le γ-TuRC est une structure en symétrie 13 qui va servir de support aux dimères de α/β tubulines pour garantir leur assemblage en 13 protofilaments. Le γ-TuRC stabilise également l'extrémité (-) des microtubules au centrosome. Les microtubules croissent par l'ajout de dimère de tubuline sur leur extrémité (+) en direction de la périphérie des centrosomes. Dès lors que l'élongation des microtubules est terminée, ceux-ci serviront au trafic intra cellulaire à l'aide de moteurs moléculaires.

Dans la majorité des types cellulaires, des granules gravitent à proximité du PCM le long des microtubules. Ce sont les satellites centriolaires.

3. Les satellites centriolaires

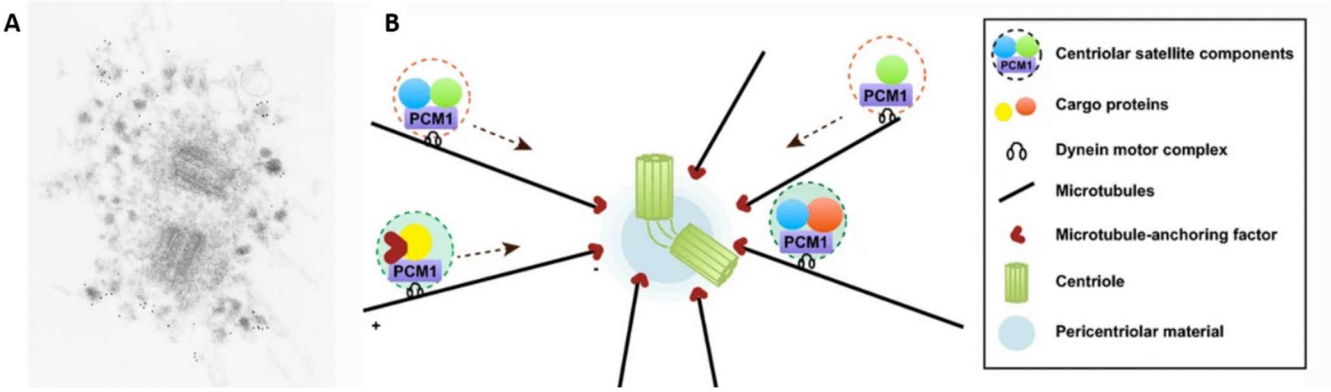


Figure 5 : A : *Microscopie électronique d'un centrosome. Les satellites centriolaires, marqués par des billes d'or grâce à un anticorps anti-PCM1, forment des granules en périphéries des centrioles échelle : 500nm*(Kubo et al., 1999). **B** : *Représentation schématique d'un centrosome et des satellites centriolaires. PCM1 est une plateforme structurale des satellites localisée le long des microtubules et qui est maintenue à proximité du centrosome par les moteurs de dynéine* (Hori and Toda, 2017)

Les satellites centriolaires sont des granules non membranaires qui se localisent et se déplacent autour du centrosome. A ce jour, la fonction précise des satellites centriolaires est encore peu connue et leur localisation peut varier en fonction du tissu/type cellulaire. Dans la majorité des types cellulaires le centrosome dicte la position des satellites centriolaires mais ils peuvent également être retrouvés autour de l'enveloppe nucléaire ou concentrés au pôle apicale des cellules épithéliales du rein et de l'intestin.

La limite majeure de l'étude des satellites réside dans le fait que les protéines qui les composent sont généralement localisées au niveau d'autres structures cellulaires telles que le centrosome, le cil, les microtubules et/ ou le noyau.

Il est généralement admis que la protéine PCM1 joue le rôle de plateforme structurale des satellites centriolaires. Lorsque la protéine PCM1 devient dysfonctionnelle, ils se désassemblent. Ils sont localisés le long des microtubules qui émanent du centrosome (Hori and Toda, 2017). L'intégrité du réseau de microtubules est nécessaire au maintien des

satellites à proximité du centrosome. La dépolymérisation des microtubules par le nocodazole ou des traitements par le froid entrainent la dispersion des satellites centriolaires dans le cytoplasme (Lopes et al., 2011) . De plus leur maintien à proximité des centrosomes nécessite le déplacement ATP-dépendant des dynéines vers l'extrémité (-) des microtubules (Kubo et al., 1999) grâce à l'association de PCM1 aux complexes de dynéines par les protéines BBS4 (Kim et al., 2004) et Par6α (Kodani et al., 2010) (Figure 5).

L'émergence de techniques de marquage par proximité tels que l'identification par biotinylation *in vivo* (BioID) a permis de caractériser de nombreux constituants des satellites centriolaires. Parmi, les composants principaux, de nombreuses protéines impliquées dans les pathologies causées par le dysfonctionnement des cils, ciliopathies, ont été identifiées telles que BBS4, OFD1, CEP290, CEP90…

Ces études utilisant comme appât l'un des constituants majoritaires des satellites, PCM1 (Quarantotti et al., 2019), ainsi que 22 autres protéines des satellites (Gheiratmand et al., 2019) ont permis de générer des interactomes incluant 660 protéines. La comparaison des protéines ainsi identifiées avec les fonctions déjà décrites (Hori and Toda, 2017; (Prosser and Pelletier, 2020) a mis en évidence des rôles de régulation des satellites sur la duplication des centrioles (Kodani et al., 2015), l'assemblage du cil (Odabasi et al., 2019), la nucléation et l'organisation des microtubules (Dammermann and Merdes, 2002) , la progression de la mitose (Balczon et al., 1994; Logarinho et al., 2012), l'autophagie (Pampliega et al., 2013; Tang et al., 2013) la réponse aux stress cellulaires et la neurogenèse (Zhang et al., 2016).

L'ensemble de ces résultats de protéomiques à grande échelle, confirmé par les études fonctionnelles démontrent qu'un grand nombre de protéines destinées à réaliser des fonctions clefs au centrosome sont également présentes aux satellites centriolaires. Les satellites centriolaires pourraient être une plateforme de recrutement transitoire destinée à conserver ces nombreuses protéines à proximité du centrosome pour les rendre accessibles et disponibles.

B. Fonction du centrosome

Le centrosome est connu pour être le centre organisateur de la cellule. Cette fonction n'est, en réalité, qu'un des nombreux rôles de cet organite. Le centrosome joue un rôle important dans la polarité cellulaire, la neurogenèse, dans le positionnement du fuseau mitotique et enfin dans la nucléation et la régulation de l'actine et des microtubules. Je détaillerai par la suite uniquement le rôle du centrosome dans la régulation des réseaux de microtubules et d'actine car ces processus seront nécessaires à la description du dernier rôle du centrosome : la ciliogenèse.

1. Le centrosome est le régulateur des microtubules dans la cellule

a) Nucléation des microtubules

Le centrosome est le principal site de nucléation des microtubules dans la majorité des cellules. *In vitro,* en présence de forte concentration de tubuline, les microtubules sont capables de s'auto assembler mais ils présentent un nombre variable de protofilaments. Comme décrit précédemment, le PCM du centrosome est le lieu majoritaire de nucléation des microtubules grâce à la présence de γ-TuRCs assurant l'assemblage correct des microtubules.

b) L'ancrage des microtubules

Le centrosome organise le réseau de microtubules dans la cellule en régulant leur nucléation et leur ancrage. Dans les cellules de mammifères, les microtubules néo-formés sont majoritairement ancrés aux appendices subdistaux du centriole père principalement par la Ninéine(Delgehyr et al., 2005). Dans des épithéliums polarisés comme c'est le cas des cellules de la cochlée, la Ninéine est délocalisée du centrosome en région apicale des cellules (Mogensen et al., 2000), où elle est responsable de l'ancrage de l'extrémité (-) des microtubules.

Enfin, la formation des cils nécessite non seulement un remodelage des microtubules mais également du cytosquelette d'actine (Pitaval et al., 2017).

2. Le centrosome est également un centre organisateur de l'actine

Bien que décrit exclusivement comme le centre nucléateur des microtubules, les groupes de M. Théry et AM Lennon ont montré en 2016, que le centrosome est également un centre organisateur de l'actine (Farina et al., 2016; Obino et al., 2016). De manière intéressante, ces équipes ont montré *in vitro*, que le centrosome nucléait soit des microtubules soit de l'actine(Inoue et al., 2019). Les fonctions de la nucléation d'actine au centrosome ne sont pas encore claires. On peut néanmoins citer un rôle dans la polarité cellulaire. Dans les lymphocytes, la protéine ARP2/3 associée au centrosome participe, via la nucléation de F-actin, au lien entre le centrosome et le noyau par le complexe LINC. En réponse à un stimulus externe, la régulation de la F-actine entraîne le détachement du centrosome au noyau pour permettre la polarisation de la cellule (Obino et al., 2016). Le 2ème rôle de l'actine au centrosome est dans la division cellulaire. En effet, en anaphase, une forte augmentation des filaments d'actine est observée au centrosome alors que la densité de microtubules au centrosome est réduite (Farina et al., 2019). La formation de filaments d'actine au centrosome semble être initiée par WASH, retrouvée aussi aux satellites péricentriolaires, et le complexe ARP2/3 (Farina et al., 2019; Plessner et al., 2019). Le centrosome est donc un lieu où les réseaux d'actine et de microtubule peuvent interagir pour se réguler l'un l'autre (Farina et al., 2019).

3. Centrosome, organisateur de la formation des cils

Les centrioles ne sont pas nécessaires uniquement à l'organisation des microtubules dans la cellule. Ils servent de base à l'organisation des cils. Le cil est une extension cellulaire présente à la surface de la plupart des cellules eucaryotes ; Ils sont conservés structurellement mais aussi fonctionnellement. On les trouve présents à la surface des cellules eucaryotes unicellulaires jusqu'aux cellules des différents tissus humains. L'observation d'un cil permet de décrire trois régions : le corps basal, l'axonème et entre les deux la zone de transition (figure 6).

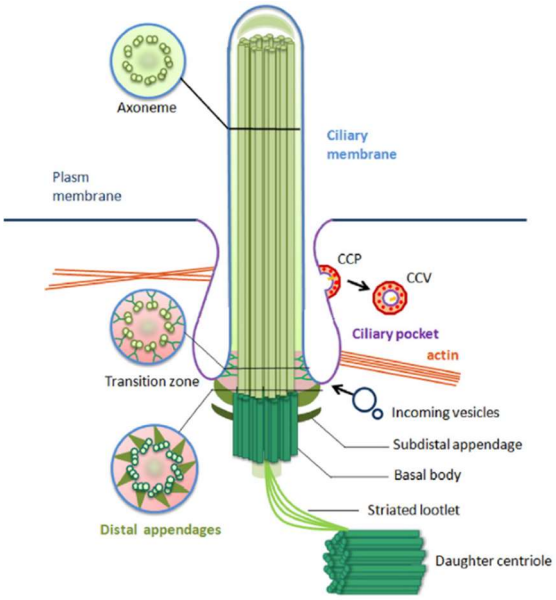


Figure 6 : Structure d'un cil primaire. Le cil divisé en trois régions : le corps basal (vert foncé) composé de triplet de microtubules, la zone de transition (rouge) localisé à la transition des triplets en doublet. Celle-ci est caractérisée par les fibres de transition (appendices distaux après maturation du centriole en corps basal) et les Y-links reliant la structure axonémale à la membrane ciliaire. Enfin l'axonème (vert clair) est composé de 9 doublets de microtubules et, en fonction du type cellulaire, d'une paire centrale. L'axononème est entouré de la membrane ciliaire. Pour la majorité des cils primaires, la membrane ciliaire est invaginée dans le cytoplasme et forme la poche ciliaire (Ke and Yang, 2014)

c) *Le corps basal*

Le centriole, une fois ancré est défini comme le corps basal. Sa structure est similaire à celle des centrioles. En revanche les 9 triplets qui composent le corps basal sont ancrés à la membrane plasmique par les fibres de transitions (une structure dérivée des appendices distaux du centriole père).

d) *La zone de transition*

La zone de transition se forme dès l'ancrage du corps basal à une membrane. Elle joue un rôle de filtre sélectif permettant de contrôler la composition protéique et lipidique du cil. La zone de transition est caractérisée par la présence de deux structures spécifiques :

-les fibres de transition délimitent la partie proximale de cette région. Elles se situent à l'intersection entre les triplets et les doublets de microtubule du centrosome et sont ancrées à la base de la membrane ciliaire.

-Les Y-links sont associés physiquement aux doublets de microtubules et projettent leurs bras vers la membrane ciliaire. En microscopie électronique, les domaines transmembranaires formés par les bras des Y-links sont proposés former le collier ciliaire, une structure composée de plusieurs rangées parallèles de particules intramembranaires

observée après cryo-décapage et ressemblant à un collier de perles. (Dute and Kung, 1978; Schouteden et al., 2015).

e) L'axonème

Lorsqu'il est ancré à une membrane cellulaire (membrane plasmique ou vésicule ciliaire selon le mode de ciliogenèse), les extrémités distales des microtubules A et B du corps basal s'allongent pour former l'axonème. Ainsi l'axonème est formé d'une symétrie 9 de doublets de microtubules. Dans la majorité des cils motiles, une paire centrale de microtubules est présente (9+2) alors qu'elle est généralement absente dans les cils primaires (9+0). L'axonème est entouré de la membrane plasmique. De nombreux récepteurs transmembranaires spécifiques du cil y sont présents

f) La poche ciliaire

Dans de nombreux modèles cellulaires, le cil n'est pas totalement délivré dans le milieu extracellulaire à l'issu de la ciliogenèse. Dans ce cas, il reste enraciné dans le cytoplasme et une invagination de la membrane se forme autour du cil appelé la poche ciliaire. La poche ciliaire est présente dans la majorité des cils primaires ou motiles mais elle peut également être retrouvée chez des organismes unicellulaires comme Trypanosoma Brucei où l'on parle de poche flagellaire (Ghossoub et al., 2011). La présence de la poche ciliaire dans les tissus multiciliés reste encore à discuter à ce jour. La poche ciliaire est le lieu d'évènement d'endocytose utilisant la voie des clathrines (Benmerah, 2013; Molla-Herman et al., 2010) mais c'est aussi une plateforme d'accueil pour les vésicules transportant des protéines transmembranaires et des récepteurs ciliaires (Mahjoub and Stearns, 2012).

C. Structures et fonction des cils

La ciliogenèse permet la formation d'un ou plusieurs cils qui peuvent présenter aussi bien des structures que des fonctions diverses. La structure générale des cils est très conservée au cours de l'évolution. Ils sont composés d'un axonème organisé en 9 doublet de microtubules entouré par la membrane ciliaire. Comme décrit précédemment la composition protéique et lipidique du cil diffère du reste de la cellule. Les cils peuvent être regroupés en deux grandes catégories : les cils motiles et les cils non motiles.

1. Les cils non motiles

La plupart du temps, les cils non motiles sont présents en un exemplaire unique à la surface des cellules, ils sont alors appelés cils primaires. Ils ne possèdent généralement pas de paire centrale de microtubules (structure 9+0). Chez les mammifères, ils peuvent être observés à la surface de la grande majorité des cellules sous forme d'un cil unique appelé cil primaire comme c'est le cas des cellules épithéliales et des cellules rénales. Le cil peut être formé à la surface des cellules en phase de quiescence et sera résorbé lors de la reprise du cycle cellulaire. Dans le dernier cas, le cil est désassemblé lorsque les cellules reprennent leur phase proliférative pour libérer le corps basal et lui permettre de reprendre sa fonction de centrioles nécessaires à la progression du cycle cellulaire. Dans certaines cellules, les cils non motiles peuvent avoir une structure plus différenciée comme c'est le cas des cônes et bâtonnets de la rétine.

Les cils primaires ont souvent été décrits comme une antenne cellulaire. Ils possèdent sur leur membrane de nombreux récepteurs lui permettant de capter les signaux de son environnement qu'il transmettra à la cellule via différentes voies de signalisations. Parmi les plus connus, le cil primaire est impliqué dans les voies de signalisation Hedgehog et Wnt qui jouent un rôle crucial dans de nombreux processus cellulaires tel que la différentiation et la prolifération. Les cils non motiles peuvent aussi être spécialisés dans la détection de signaux plus spécifiques. C'est par exemple le cas des cils des cônes et batonnets de l'oeil qui détectent des signaux visuels grâce à leurs photorécepteurs et de ceux des neurones olfactifs peuvent détecter les molécules odorantes par la présence de chémorécepteurs dans les cils. Enfin les mécano-récepteurs des cils de l'épithélium rénal sont capables de détecter le flux de l'urine.

2. Les cils motiles

En plus de leur capacité à détecter des signaux de l'environnement, les cils motiles présentent la particularité de pouvoir générer un mouvement. Ce mouvement est permis par la présence de grands complexes associés le long des doublets de microtubules : les bras de dynéines. Ces complexes permettent le glissement des microtubules les uns par rapport aux autres grâce à l'hydrolyse de l'ATP. La présence de lien physique, appelés pont

de nexines, entre les microtubules adjacents permet de convertir ce glissement en courbure pour générer le battement ciliaire. Il existe deux types de bras de dynéine : les bras externes et les bras internes. Bien que les deux types de bras participent au battement ciliaire, un modèle propose que les bras externes de dynéine régulent la fréquence du battement ciliaire, alors que les bras internes participeraient plutôt à la forme du battement (Blanchon et al., 2020). La majorité des cils motiles possède aussi une paire centrale de microtubules (structure 9+2) reliée aux doublet par les fibres radiaires, ces deux structures régulent aussi le battement ciliaire par un jeu de phosphorylation.

Chez les vertébrés, les cils motiles sont présents à la surface de certains épithéliums, comme la trachée ou l'épendyme, où leur mouvement coordonné permet de créer des mouvements de fluides. Ils jouent un rôle essentiel dans le système reproductif : d'une part, chez la femme, ils tapissent les trompes de Fallope pour permettre l'acheminement de l'ovule vers l'utérus et d'autre part, chez l'homme le cil des spermatozoïdes (appelé flagelle) est utilisé comme système de propulsion. La fonction du cil comme source de déplacement de la cellule est communément utilisée par de nombreux organismes unicellulaires comme la paramécie ou *C. reinhardtii* mais aussi chez certains organismes pluricellulaires comme la planaire.

D. Composition moléculaire du centriole

La composition moléculaire des deux centrioles du centrosome n'est pas identique. Les centrioles « père et fils » sont structuralement différents. Le centriole père est identifiable par la présence de structures comme les appendices distaux et subdistaux et en conséquence présente des protéines spécifiques. De manière intéressante, les centrioles fils montrent également un petit groupe de protéines spécifiques.

1. Appendices distaux

En microscopie électronique, les appendices distaux sont organisés en symétrie neuf à l'extrémité distale du centriole père. Chaque appendice distal est ancré au centriole par une base en forme de triangle composée de densités filamenteuses. La base de chaque appendice distal est non seulement associée à un triplet de microtubules mais aussi avec le tubule C du triplet adjacent. Les densités filamenteuses fusionnent pour former une région

plus fine dense aux électrons puis se poursuit pour former la « tête » des appendices distaux (Figure 7 A et B) (Bowler et al., 2019).

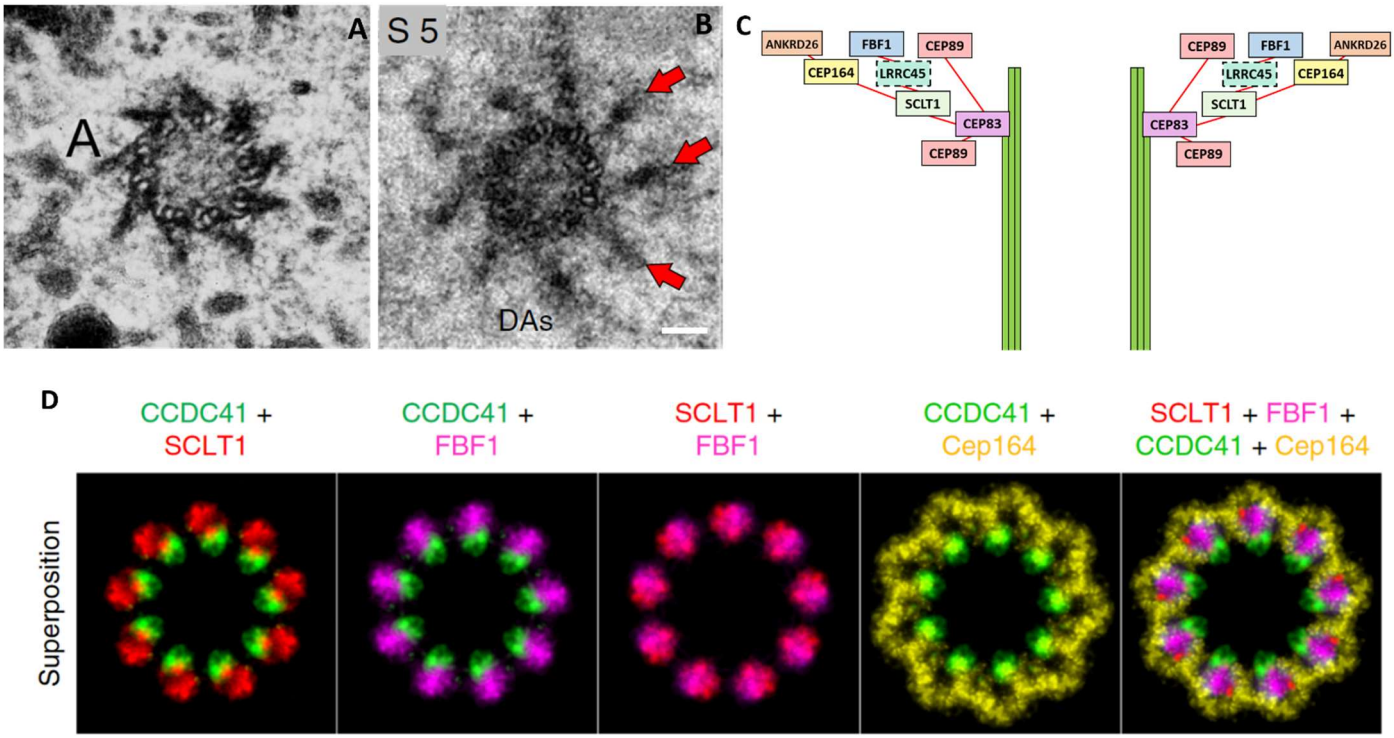


Figure 7 : A et B : Observation en microscopie électronique d'un centriole père de rein embryonnaire (A) et de cellule HeLa (B). Les appendices distaux sont organisés en symétrie 9 et chaque appendice est associé à un triplet de microtubules (Bowler et al., 2019; Uzbekov and Alieva, 2018) *échelle : 125nm. C : Représentation schématique des protéines constitutives des appendices distaux. La position relative de CEP83, CEP89, SCLT1, FBF1 et CEP164 est basé sur leur analyse en super-résolution (Yang et al. 2018) et les liens rouges représentent leur recrutement séquentiel* (Tanos et al., 2013). *La protéine des appendices distaux ANKRD26 et le candidat LRRC45 ont été ajouté en fonction de leur localisation en super résolution (ANKRD26 (Bowler et al., 2019)) ou de leur interaction avec d'autres protéines connues des appendices distaux (LRRC45* (Kurtulmus et al., 2018)*). D : Superposition des protéines des appendices distaux observées en STORM. Les images ont été moyennées et réorientées pour obtenir la position relative de CCDC41, SCLT1, FBF1 et CEP164 à l'extrémité distale du centriole père* (Bowler et al., 2019)

Initialement, Tanos *et al* (Tanos et al., 2013) ont utilisé les différences de constituants moléculaires des centrioles pères et fils afin de déterminer la composition moléculaire des appendices distaux, puis ont établi leur hiérarchie de recrutement. CCDC41/CEP83 est la première protéine des appendices distaux à être recrutée. Elle recrute ensuite les protéines SCLT1 et CEP89 aux centrioles. A son tour SCLT1 recrute les protéines FBF1 et CEP164 (Figure 7C et D). Lors de la maturation d'un centriole fils en centriole père, les appendices distaux

sont recrutés en partie distale du centriole (Tanos et al., 2013). La localisation respective des protéines des appendices distaux a été étudiée grâce aux techniques de super-résolution (Bowler et al., 2019; Chong et al., 2020; Viol et al., 2020; Yang et al., 2018). En accord avec la hiérarchie de recrutement des différentes protéines des appendices distaux, CEP83 est la protéine localisée la plus proche du triplet de microtubules alors que CEP164 est trouvée à l'extrémité distale de l'appendice (Chong et al., 2020; Yang et al., 2018). Une nouvelle protéine constitutive des appendices distaux a été caractérisée plus récemment : ANKRD26. Initialement ANKRD26 a été identifiée comme partenaire potentiel de CEP164 (Hein et al. 2015 BIOGRID) et il a été démontré plus tard chez la souris que le KO de ANKRD26 perturbe les fonctions ciliaires du système nerveux central (Marconi et al., 2017). L'analyse de la localisation de ANKRD26 par STORM révèle qu'elle colocalise avec la partie externe de CEP164. De plus, le KO de ANKRD26 dans les cellules RPE1 n'affecte pas le recrutement des protéines des appendices distaux (CEP164, FBF1, SCLT1 et CEP83), ce qui suggère que le recrutement de ANKRD26 pourrait avoir lieu en aval de CEP164 (Bowler et al., 2019). Enfin une autre protéine, LRRC45, pourrait être un composant potentiel des appendices distaux puisqu'elle est recrutée en partie distale du centriole père par CEP83 et SCLT1 et est nécessaire au recrutement de FBF1. Néanmoins sa déplétion ne conduit pas aux phénotypes attendus habituellement lors de la perte des appendices distaux (défauts de recrutement et d'ancrage du corps basal à la vésicule ciliaire) ce qui rend encore discutable son rôle au sein des appendices (Kurtulmus et al., 2018).

Il est proposé que CEP83, CEP89, SCLT1, et CEP164 formaient le squelette des « pales du moulin », entouré par une matrice constituée principalement de FBF1 et d'IFT88.

CCDC41/CEP83, la protéine la plus proximale des appendices distaux, est recrutée au centriole fils lors de sa conversion en centriole père, au cours de la phase G2 du cycle cellulaire. CEP83 continue à s'accumuler pendant la mitose jusqu'en métaphase. SCLT1 commence à être recrutée au centriole, en G2 et s'accumule à partir de la prophase, alors que FBF1 et CEP164 (les deux protéines les plus distales) s'accumulent principalement à partir de la télophase. Ce recrutement des différentes protéines des appendices distaux au centriole fils respecte la hiérarchie d'assemblage ; L'accumulation des protéines FBF1 et

CEP164 au centriole continue jusqu'en début de phase G1 (Bowler et al., 2019; Viol et al., 2020). De légères différences sont observées dans la cinétique de recrutement entre ces deux études mais les conclusions générales sont similaires.

Au cours du cycle cellulaire suivant, les appendices distaux resteront présents au centriole père mais une partie des protéines qui le compose se réorganisera au cours du cycle. L'abondance des protéines SCLT1 et FBF1 restera relativement constante au cours du cycle cellulaire (Bowler et al., 2019; Viol et al., 2020). En revanche, CEP164 et CEP89 diminuent considérablement en G2 et disparaissent quasiment complétement des centrioles en prophase. Une augmentation transitoire de CEP83 au centriole père en métaphase précède le recrutement de nouvelles protéines CEP164 (de l'anaphase jusqu'en phase G1) afin de reformer des appendices distaux matures en fin de G1(Bowler et al., 2019; Viol et al., 2020). Des travaux récents démontrent que l'activité kinase de la protéine NEK2a est nécessaire pour réaliser ce processus. La déplétion de *Nek2* dans des cellules KO entraine une dissociation incomplète des appendices distaux et la présence de vestige de cils au cours de la mitose. Ces travaux proposent que les appendices distaux sont composés d'un groupe fixe (CEP83 et SCLT1) et d'un groupe mobile au cours du cycle cellulaire (CEP164, CEP123 et LRRC45) (Viol et al., 2020). La délocalisation temporaire des composants dynamiques des appendices distaux au cours de la mitose pourrait expliquer pourquoi ils sont plus difficiles à détecter en mitose.

2. Appendices subdistaux

La représentation classique des appendices subdistaux est un cône surplombé d'une tête ronde. A la différence des appendices distaux, les appendices subdistaux ne sont pas toujours présents au nombre de 9 sur le centriole père. En fonction du type cellulaire (Figure 9A) il est possible d'observer la présence de 3-4-6-9 appendices subdistaux (Uzbekov and Alieva, 2018)

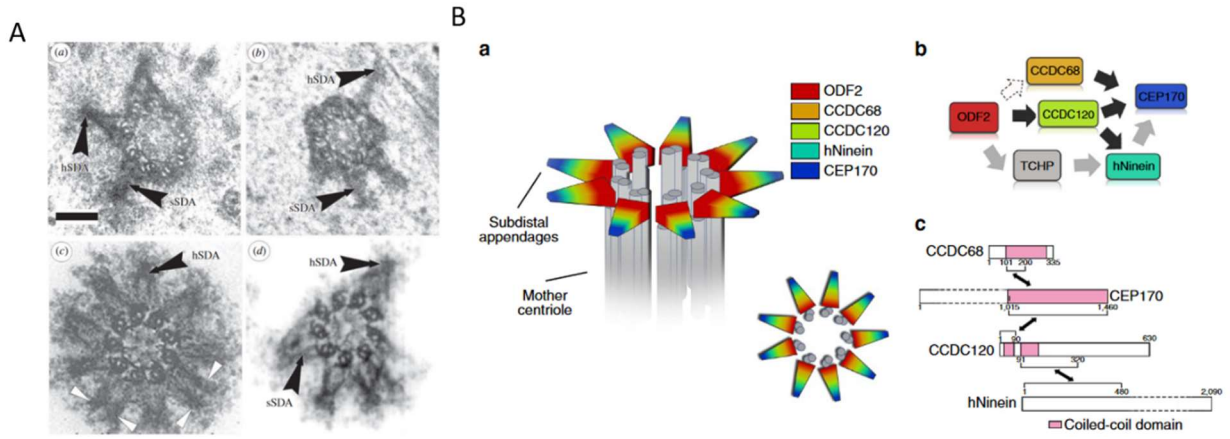


Figure 9 : A : Observation en microscopie électronique de la région subdistale du centriole père. (a) Cellule embryonnaire de rein présentant 3 appendices subdistaux (Alieva and Vorobjev, 2004) *Echelle : 200nm (b) Cellules d'oviducte de cochon présentant 4 appendices distaux* (Uzbekov and Alieva, 2018) *(c-d) Cellules humaines KE-37 présentant 9 et 6 appendices distaux*(Huang et al., 2017) (Paintrand et al., 1992). *Les pointes de flèches montrent la tête sphérique des appendices distaux. B : (a) représentation schématique des appendices subdistaux. (b) modèle de l'assemblage des appendices distaux : ODF2 initie l'assemblage des appendices. TCHP permet l'interaction entre ODF2 et la Nineine Le recrutement de OFD2 au centriole père permet le recrutement de CCDC120. A son tour CCDC120 permettra le recrutement de CEP170 et Nineine par deux domaines différents. La protéine TCHIP permet l'interaction entre ODF2 et Nineine. Enfin la Nineine recrutera les protéines Kif2a et p150glued(c) Modèle représentant les domaines d'interactions de CCDC68 ; CEP170, CCDC120 et Nineine* (Huang et al., 2017b).

En fonction du nombre d'appendices présents, ceux-ci sont associés à 2 ou 3 triplets de microtubules avec un angle de 90° selon l'axe proximo-distal du centriole père (Bowler et al., 2019). La raison du nombre variable d'appendices subdistaux n'est pour l'instant pas connue.

L'assemblage des appendices subddistaux s'effectue par le recrutement de la protéine ODF2 qui présente la localisation la plus proche du mur de microtubules des centrioles (Ishikawa et al., 2005) . Les travaux de Mazo et al. (Mazo et al., 2016) et Huang et al. (Huang et al., 2017) résument l'assemblage des appendices subdistaux comme représenté sur le schéma suivant :

Il est intéressant de noter que les protéines CCDC68 et CCDC120 entrent en compétition pour se lier au même domaine C-terminal de CEP170 pour permettre son recrutement.

Lorsque les deux protéines sont présentes, CEP170 est préférentiellement liée à CCDC68. L'ensemble de ces travaux démontre que l'assemblage des appendices subdistaux pourrait être un processus hiérarchisé en ramifications plutôt qu'un simple processus linéaire (Figure 9B).

La Ninéine n'est pas exclusivement localisée aux appendices subdistaux. Elle est aussi localisée en partie proximale des deux centrioles (Mogensen et al., 2000). CNAP-1, protéine localisée à l'extrémité proximale des centrioles, recrute la Ninéine par un processus indépendant de ODF2.

Une fois assemblés, les appendices subdistaux permettent la nucléation et l'ancrage des microtubules cytoplasmiques, en recrutant le complexe γ-TuRC.

3. Protéines communes aux appendices distaux et subdistaux

Initialement, il a été proposé que ODF2 participait à la formation des appendices distaux et subdistaux dans les cellules embryonnaires de souris (F9) (Ishikawa et al., 2005). Dans les cellules humaines RPE1, la déplétion de ODF2 par shRNA n'affecte pas significativement le recrutement des appendices distaux (Tanos et al., 2013). Ces résultats pourraient suggérer les deux hypothèses suivantes : (i) OFD2 aurait un rôle tissu-dépendant dans le recrutement des appendices distaux et (ii) le taux résiduel de ODF2 après déplétion par shRNA serait suffisant pour permettre le recrutement des appendices distaux. L'étude du rôle des variants transcriptionnels de ODF2 dans la ciliogenèse (Chang et al., 2013) a mis en évidence dans des lignées F9 *odf2 -/-* que l'expression de la Cenexin1, une isoforme de ODF2 présentant une partie C-terminale divergente, est suffisante pour restaurer la ciliogenèse alors que ODF2 seule ne suffit pas. Dans ces mêmes lignées F9 odf2 -/-, il a été démontré que la partie N-terminale de ODF2 seule est suffisante pour recruter les appendices–subdistaux. Au contraire, la partie C-terminale de ODF2 permet de restaurer le recrutement des appendices distaux dans ces lignées (Tateishi et al., 2013). Le recrutement des appendices distaux a pu être observé dans les cas où la forme tronquée de ODF2 s'exprimait en faible quantité dans la lignée F9. Dans une étude récente (Viol et al., 2020), l'étude des appendices distaux dans une lignée RPE1 ODF2 KO a révélé que le recrutement des appendices distaux et leur régulation par Nek2 ne sont pas affectés dans cette lignée cellulaire. Ce résultat est en accord

avec celui de Tanos (Tanos et al., 2013) et renforce l'idée que le lien entre ODF2 et les appendices distaux serait dépendant du type cellulaire.

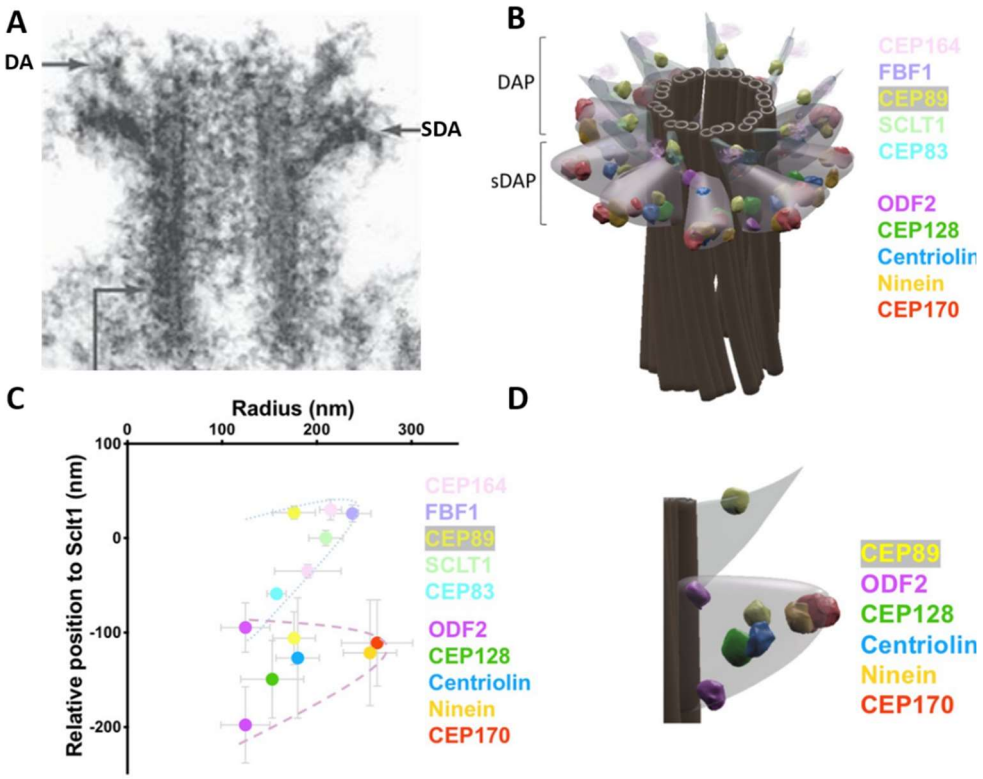


Figure 10 : Architecture moléculaire des appendices distaux et subdistaux. (A) Microscopie électronique d'un centriole père. DA : appendices distaux, SDA : appendices subdistaux (Azimzadeh and Bornens, 2007). *(B)Schéma de la localisation des protéines des appendices distaux (DAP) et subdistaux (sDAP). (C) Localisation relatives des protéines des appendices distaux et subdistaux en fonction de leur diamètre et de leur position proximo-distal par rapport à SCLT1. (D)Modèle 3D d'une vue latérale des appendices distaux et subdistaux. Il est intéressant de noter que ODF2 est localisée à la base des deux types d'appendices. CEP89 est aussi présent sur les deux types d'appendices* (Chong et al., 2020)

La relation entre ODF2 et les appendices distaux et subdistaux est accentuée par les cartographies récentes des appendices en super résolution par la technique de dSTORM (Chong et al., 2020; Yang et al., 2018). ODF2 est identifiée comme la protéine la plus proche du mur de microtubules du centriole père. Le marquage de ODF2 révèle la présence de la protéine en deux points au niveau de l'ancrage des appendices distaux aux microtubules : un point distal à l'intersection des appendices distaux et subdistaux, proche de la protéine CEP83 et un point plus proximal, sous-jacents de CEP128 (Figure 10). Deux niveaux de

localisation longitudinale de la protéine CEP89 ont été observé sur le centriole, un niveau distal qui pourrait correspondre au appendices distaux et un plus proximal proche des protéines des appendices subdistaux telles que CEP128. Dans des lignée KO de CE128 établies par CRISPR/Cas9, la localisation plus proximale de CEP89 est perdue. Ces résultats, similaires à ODF2 montrent que CEP89 jouerait à la fois un rôle aux appendices distaux et aux subdistaux (Chong et al. 2020). Ces nouveaux travaux démontrent les liens structuraux et fonctionnels entre les appendices distaux et subdistaux généralement considérés comme indépendants et schématisés de telle façon que les appendices distaux sont positionnés à l'extrémité distale du centriole père alors que les subdistaux sont plutôt dans la partie distale inférieure (Figure 10 A et B). En accord, les observations en ME suggèrent effectivement que les appendices distaux et subdistaux sont structuralement très proches (Bowler et al., 2019; Paintrand et al., 1992).

4. Les protéines spécifiques au centriole fils

La présence des appendices distaux et subdistaux sur le centriole père est un marqueur de l'asymétrie structurale entre les deux centrioles qui composent le centrosome. Le centriole fils possède également des protéines qui lui sont spécifiques. CEP120, Centrobine et Neurl4 sont recrutées après la duplication des centrioles sur le fils néoformé (Wang et al., 2018). Ces protéines permettent de réguler l'élongation et l'homéostasie des centrioles. Lors de maturation des centrioles fils en père les protéines spécifiques du fils seront éliminées d'une manière dépendante de TALPID3 et C2CD3. Cette étape est essentielle à la maturation des centrioles car la présence de CEP120, Centrobine et Neurl4 inhibe le recrutement des appendices distaux (Wang et al., 2018).

L'amélioration des techniques de super-résolution ces dernières années couplée à la microscopie électronique ont permis des avancées majeures sur l'étude de l'architecture des centrioles. La complexité des structures qui les composent sont le reflet direct de la diversité de fonctions qu'ils assurent au sein de la cellule.

E. La ciliogenèse

La ciliogenèse est un processus complexe permettant la formation d'un ou plusieurs cils à la surface de la cellule. La ciliogenèse comprend plusieurs étapes dont la migration du centrosome vers une membrane cellulaire, la maturation du centriole père en corps basal, son ancrage à la membrane et l'élongation du cil. Dans cette partie je décrirai plus précisément chacune de ces étapes et particulièrement l'étape d'ancrage des corps basaux qui m'a spécifiquement intéressée au cours de ma thèse.

La ciliogenèse est finement régulée au cours du cycle cellulaire grâce à la présence de différents signaux permettants de réguler la formation d'un cil, son maintien et sa résorption (Izawa et al., 2015; Pejskova et al., 2020). Il est généralement admis que le cil se forme en G0/G1 et sera complètement désassemblé avant l'entrée en mitose (fin de G2). Après réintroduction de sérum de veau fœtal, les cellules en G0 et présentant un cil primaire vont le résorber afin de reprendre le cycle cellulaire en G1/S (Jackson, 2011). Dans les cellules multiciliées les duplications successives des corps basaux précèdent directement leur ancrage et sont essentielles à la formation des nombreux cils présents à la surface. Au contraire, dans les cellules formants un cil primaire, la duplication des centrioles est plutôt décrite comme un processus nécessaire au bon déroulement de la mitose. La duplication est donc généralement dissociée de la ciliogenèse puisque celle-ci aura lieu au cours de la phase suivante du cycle cellulaire (G1). Cependant, les travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse proposent que, dès les étapes précoces de la duplication, des protéines s'assemblent à l'extrémité distale des procentrioles et l'intégrité de ce complexe est nécessaire au bon déroulement de la ciliogenèse au cours du prochain cycle cellulaire. En conséquence dans ce chapitre, je traiterai la duplication des centrioles dans les cellules multiciliées mais aussi dans les cellules monociliées comme l'une des étapes précoces nécessaires au bon déroulement de la ciliogenèse.

1. La duplication des centrioles

a) *Dans les cellules monociliées*

En phase G1 du cycle cellulaire, la cellule possède un centrosome unique composé de deux centrioles. Le premier signe visible de la duplication des centrioles est la séparation des deux

centrioles à la transition des phases G1/S. Au cours de la phase S, de nouveaux centrioles courts, appelés procentrioles, font leur apparition en position orthogonale aux deux centrioles déjà existants. Les procentrioles vont subir une élongation tout au long de la phase G2 pour atteindre leur longueur finale en fin de G2/ début de phase M. Au cours de l'élongation des procentrioles, l'ancien centriole fils subit une maturation : il perd les protéines spécifiques du centriole fils et recrute les appendices distaux à son extrémité distale. A l'issue de ce processus, la cellule est alors composée de deux centrosomes formés chacun d'un centriole père et d'un centriole fils. En G2/M, la séparation des deux centrosomes va s'effectuer en deux étapes : le matériel reliant les centrosomes est rompu grâce à la phosphorylation de CNAP1, localisée en position proximale des centrioles, par la kinase NEK2 (Hardy et al., 2014) puis les centrosomes vont migrés de part et d'autre de la cellule.

L'initiation de la formation d'un nouveau centriole est permise par l'action séquentielle de trois protéines conservées au cours de l'évolution : la Polo-like kinase 4 (PLK4), STIL (SCL-interrupting locus) et la protéine d'assemblage SAS6 qui sert de support à l'organisation en symétrie 9 du centriole. PLK4 est un régulateur majoritaire de la duplication des centrioles. Son inactivation conduit à des défauts de duplication alors que sa surexpression conduit à la formation de centrioles surnuméraires. En phase G1, PLK4 s'associe à la partie proximale des centrioles à l'aide des protéines CEP63, CEP192 et CEP152 (Takao et al., 2019). Par son activité kinase, PLK4 phosphoryle STIL pour favoriser sa liaison à SAS6 et initier la duplication des centrioles. SAS6 est capable de s'auto-organiser en symétrie 9 pour former le cartwheel (Guichard et al., 2017) Les microtubules sont polymérisés autour du cartwheel.

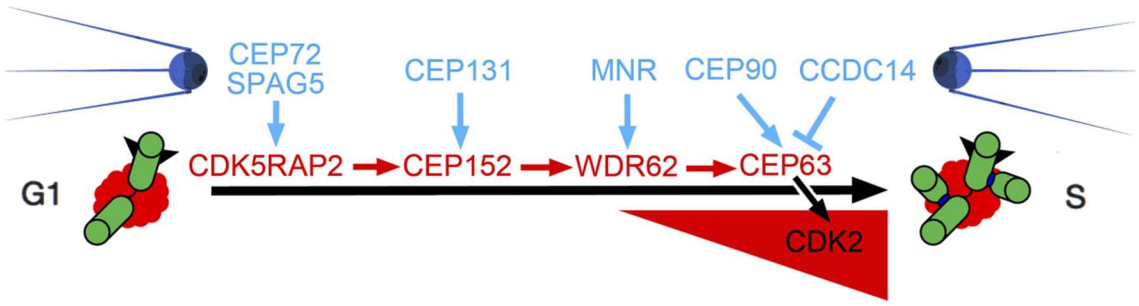


Figure 11 : Le recrutement séquentiel de CDK5RAP2, CEP152, WDR62 et CEP63 est permis par le protéines des satellites centriolaires CEP72, SPAG5 et CEP131 ainsi que MNR et CEP90. CCDC14 se lie à CEP63 pour le délocalisé des centrosomes pour contrôler la duplication en limitant le recrutement de CDK2 (Kodani et al., 2015)

Chez l'homme, les satellites centriolaires semblent essentiels pour le recrutement des protéines nécessaires à la duplication des centrioles. Parmi ces protéines, le recrutement séquentiel de CDK5RAP2, CEP152, WDR62 et CEP63 aux satellites centriolaires, serait réalisé par les protéines CEP72, SPAG5, CEP131, MNR et CEP90, permettant l'accumulation de CDK2 au centrosome (Figure 11) (Kodani et al., 2015). L'action kinase de Cdk2 au centrosome favorise la duplication des centrioles via Mps1 en levant l'action inhibitrice de la nucléoplasmine.

Les procentrioles vont s'allonger au cours de la phase S et G. La longueur des centrioles nouvellement formés est contrôlée par à la présence de nombreux régulateurs positifs tels que CPAP, CEP295, CEP120, Centrobine, SPICE1 C2CD3 et Talpid3 et négatifs comme CP110 ; OFD1, CEP290 et Centrine 2 (Schmidt et al., 2009; Singla et al., 2010; Wang et al., 2018). Plusieurs de ces protéines jouent aussi un rôle important dans la régulation et/ou l'initiation de la ciliogenèse et seront décrites dans le paragraphe correspondant.

b) Dans les cellules multiciliées

Chez les vertébrés, le centrosome des cellules destinées à être multiciliées est composé de 2 centrioles comme le reste des cellules de l'organisme. Au cours de la ciliogenèse, la cellule doit amplifier les centaines de centrioles/corps basaux qui formeront les centaines de cils présents à la surface de la cellule.

Les premières observations de la duplication des centrioles dans les cellules multiciliées ont mis en évidence deux voies de duplication : (1) une voie centriolaire et (2) une voie acentriolaire (Sorokin, 1968).

(1) Contrairement aux cellules monociliées où chaque centriole père n'est capable de nucléer qu'un seul procentriole, il a été observé dans les épithéliums pulmonaires de rat que les deux centrioles (père et fils) sont capables au cours de la duplication de nucléer plusieurs procentrioles. Dans les épithéliums pulmonaires un total de 8 procentrioles a pu être observé autour des deux centrioles. Plusieurs cycles de

duplications successifs vont avoir lieu pour générer les mutliples centrioles nécessaires à la ciliogenèse. La protéine CEP63 forme un complexe en anneau avec CEP152 autour du centriole père pour permettre le recrutement de Plk4 et SAS-6 en plusieurs points autour du centriole et générer une duplication en rosette (Al Jord et al., 2014). Bien que ce mécanisme permet la nucléation de plusieurs centrioles simultanément, ce processus seul ne parvient pas à expliquer la nucléation rapide des centaines de centrioles.

(2) Ce mode de duplication par voie centriolaire est complété par la formation d'une structure acentriolaire également capable de nucléer des procentrioles : les deutérosomes. En microscopie électronique il a été observé que les deutérosomes se forment par un assemblage d'agrégats fibrogranulaires pour former des structures sphériques de diamètre similaires aux centrioles (Sorokin, 1968). De la même manière que les centrioles, les deutérostomes sont capables de nucléér de nombreux procentrioles en même temps. Dans les cellules multiciliées, les protéines Deup1-CEP152 et CCDC78 s'assemblent pour former les deutérostomes. Les deutérosomes recruteront alors Plk4 et SAS-6 pour permettre la duplication en rosette de nombreux centrioles (Figure 12)(Al Jord et al., 2014).

Dans les cellules épendymaires de souris, il a été observé qu'en moyenne 14 deutérosomes sont formés au cours de la duplication et qu'individuellement chaque deutérosome peut former simultanément 6 procentrioles alors que les centrioles pères et fils n'en forment que 4. Les procentrioles sont nucléés au cours de vague successives simultanées de duplication jusqu'à atteindre le nombre requis. A ce moment, les centrioles sont relâchés et subissent une maturation avant de s'ancrer à la membrane en même temps (Al Jord et al., 2014).

La présence des centrioles parentaux (PC) ou de PLK4 n'est pas nécessaire pour permettre l'amplification des centrioles par les deutérosomes. L'inhibition de PlK4 par la centrinone empèche la duplication des centrioles ; Aussi après quelques cycles les cellules ne présenteront plus de centrioles. Néanmoins, dans les cellules ne montrant pas de centrioles parentaux, l'amplification des centrioles n'est pas affectée et le nombre final de centrioles dans les cellules multiciliées est maintenu (Mercey et al., 2019; Nanjundappa et al., 2019).

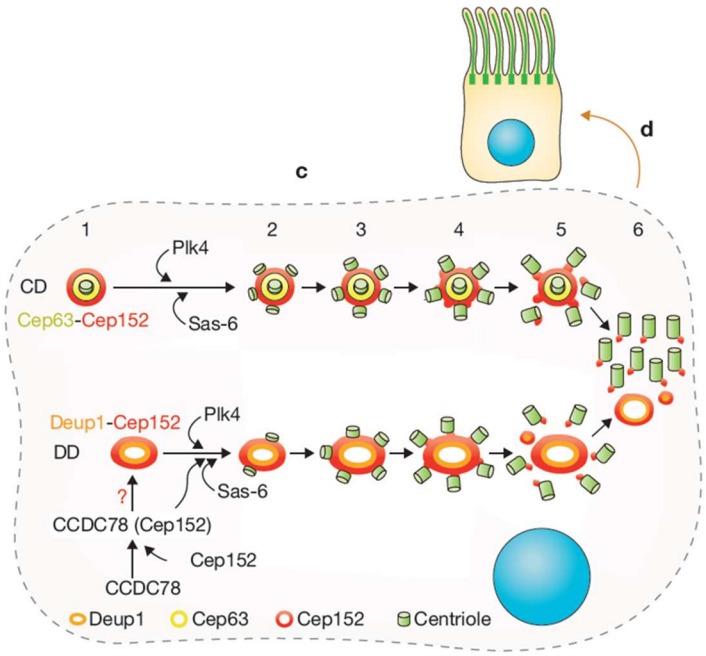


Figure 12 : duplication des centrioles/corps basaux dans les cellules multiciliées chez les vertébrés : Les duplications par voie centriolaire (CD) et acentriolaire (DD) ont lieu simultanément pour amplifier des centaines de centrioles. CEP63 et CEP152 s'organisent en anneau autour du centriole père pour la voie centriolaire alors que Deup1-CEP152 et CCDC78 forment les deuterosomes capables de recruter Plk4 et SAS-6 (Tang, 2013)

2. La migration du centriole père

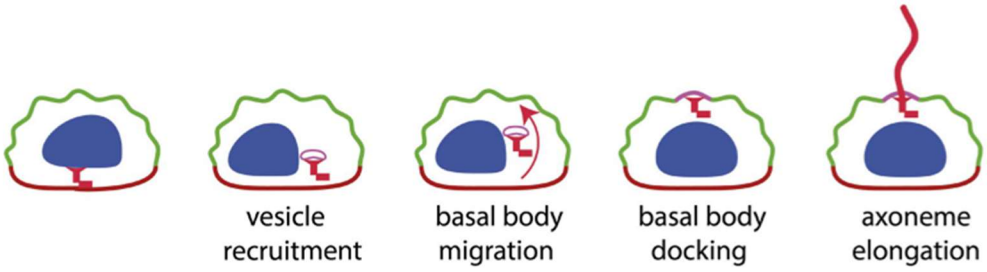


Figure 13 : Différentes étapes de la ciliogenèse d'un cil primaire. Dans le cas représenté ici, la ciliogenèse commence par la maturation du centriole et le recrutement de la vésicule ciliaire. Il s'en suit la migration du centriole vers la face apicale de la cellule et son adhésion au cortex. L'élongation complète de l'axonème a lieu lorsque le corps basal s'ancre à la membrane plasmique (Pitaval et al., 2017).

La position du centrosome dans les cellules est finement régulée. Les réseaux de cytosquelette participent majoritairement à ce processus par un équilibre de forces mécaniques entre poussée et traction. En interphase, les microtubules assurent le positionnement du centrosome au centre de la cellule (Burakov et al., 2003; Kimura and Kimura, 2011). En même temps, le centrosome est associé physiquement à la membrane nucléaire par le complexe LINC (Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton) qui fait le lien entre la lamine du noyau et l'actine et les microtubules nucléés par le centrosome, ce lien noyau-centrosome ne sera pas affecté lors de la migration du centrosome à la membrane apicale (Pitaval et al., 2017)

Lors de la ciliogenèse, le centrosome doit se repositionner à la membrane apicale de la cellule (Figure 13) (Pitaval et al., 2017). Ce processus est permis par des réarrangements du cytosquelette qui organisent les forces nécessaires pour acheminer le centrosome à proximité de la membrane.

Au cours de la ciliogenèse, l'action conjointe de la densification et stabilisation du réseau microtubulaire ainsi que la réorganisation asymétrique du réseau d'actine autour du centrosome vont permettre d'établir les forces nécessaires pour pousser le centrosome vers la surface apicale (Pitaval et al., 2017).

Ces résultats sont en accord avec les études réalisées précédemment mettant en évidence le rôle de l'actine dans la migration apicale des corps basaux dans les cellules multiciliées. Dans les cellules multiciliées, le réseau d'actine-myosine contrôle la migration des centrioles. Le traitement des oviductes de cailles avec la cytochalasine D empêche le transport des centrioles à la surface apicale. (Boisvieux-Ulrich et al., 1987, 1990; Klotz et al., 1986; Lemullois et al., 1987, 1988).

Des expériences de siRNA d'acteurs impliqués dans la ciliogenèse (protéines des appendices distaux, le réseau de transport, la liaison noyau centrosome ou liant l'actine) ont permis de montrer que la déplétion de la protéine CEP164 empêchait la migration apicale du centrosome alors que IFT88 ne semble pas impliquée (Pitaval et al., 2017). La déplétion de CEP164 empêche la stabilisation/densification du réseau de microtubules.

La majorité de ces travaux ont été réalisée dans les cellules RPE1, nous ne pouvons donc pas conclure que ce phénomène est ubiquitaire de l'ensemble des cellules de mammifères. Nous pouvons cependant proposer que dans la majorité des cas un réarrangement de la position du centrosome dans la cellule a lieu lors de l'initiation de la ciliogenèse.

La migration du centrosome s'accompagne de la maturation du centriole père.

3. La maturation du centriole en corps basal

a) *Le contrôle de la longueur des centrioles*

Au cours de la duplication des centrioles, l'extrémité distale des procentrioles est rapidement recouverte d'un ensemble de protéines régulatrices permettant de réguler la longueur des microtubules, comme indiqué précédemment. L'analyse de CP110 en immunofluorescence et en microscopie électronique démontre que CP110 est un des composants de la coiffe (Kleylein-Sohn et al., 2007) La déplétion de CP110 induit l'élongation de l'extrémité distale des microtubules du centriole (Schmidt et al., 2009). CP110 joue un rôle antagoniste à la protéine CPAP qui, comme CEP120 et SPICE1, favorise l'élongation des microtubules centriolaires (Comartin et al., 2013; Schmidt et al., 2009).

Le contrôle de la longueur des centrioles est également régulé par la sous-famille des kinesines-13. Bien que la majorité des kinésines sont connue pour leur rôle de transport le long des microtubules, les membres de la famille des kinésines-13 régulent la longueur des microtubules en désassemblant leur extrémité. Chez les mammifères, Kif24 interagit avec CP110 et CEP97 et sa déplétion entraine la perte de CP110 aux centrioles et est associée à une augmentation de la longueur des centrioles et la formation anormale de cils dans les cellules cyclantes (Kobayashi et al., 2011).

Enfin plusieurs protéines localisées en région distale des centrioles régulent la longueur des triplets/doublets de microtubules. Ces protéines, telles que MNR/KIAA0753, et OFD1 jouent également un rôle important dans la maturation du centriole en corps basal et dans l'ancrage des corps basaux à une membrane cellulaire (Singla et al., 2010). Je détaillerai plus précisément le rôle de ces protéines dans le chapitre suivant.

b) *Le lever de la coiffe CP110/CEP97*

Deux protéines présentes à l'extrémité distale des centrioles ont été identifiées comme critiques pour la formation des cils primaires dans les cellules de mammifères : CP110 et CEP97 (Spektor et al., 2007). En effet, le niveau de CP110 au centriole père est drastiquement réduit dans les cellules ciliées. La déplétion de CP110 et CEP97 dans les cellules RPE et 3T3 favorise la formation de cils. Ces données proposent que les protéines CP110 et CEP97 pourraient empêcher la conversion du centriole père en corps basal au cours du cycle cellulaire.

A l'initiation de la ciliogenèse, le domaine N-terminal CEP164 permet le recrutement de la kinase TTBK2 à l'extrémité distale du centriole père. La présence de TTBK2 permet la phosphorylation de CEP164 et CEP83, favorisant l'élimination de la coiffe CP110 (Čajánek and Nigg, 2014; Lo et al., 2019).Il semblerait également que la présence de TTBK2 à l'extremité des appendices distaux permettrait la stabilisation des protéines les constituant (Čajánek and Nigg, 2014). Au même moment le domaine C-terminal de CEP164 recrute la protéine IFT-81, essentielle à l'initiation de la ciliogenèse (Čajánek and Nigg, 2014; Qu et al., 2020). Des défauts de localisation de TTBK2, par exemple suite à la déplétion de la centrine 2, empêche l'élimination de CP110 et prévient la croissance (Prosser and Morrison, 2015)

c) *Des divergences entre les modèles*

La majorité des études sur le rôle de CP110 et CEP97 en tant que régulateur négatif de la longueur du centriole et de ciliogenèse a été réalisée dans les cellules de mammifère en culture. Néanmoins, il est intéressant de noter que des divergences dans le rôle des protéines de la coiffe ont pu être observées dans les modèles *in vivo* tels que la souris, la drosophile (Dobbelaere et al., 2020) ou le xénope (Walentek et al., 2016). Contrairement aux résultats obtenus dans les cellules de mammifères en culture, où la déplétion de CP110 est suffisante pour favoriser la ciliogenèse, les souris mutantes CP110$^{-/-}$ présentent une réduction du nombre de cils primaires dans des épithéliums de tissu cérébral. Celle-ci est accompagnée de défauts de recrutement des appendices subdistaux (réduction du signal ninéine, ODF2 et C2CD3) et absence d'ancrage de la vésicule ciliaire caractérisée par une distribution aléatoire dans la cellules des vésicules marquées par Rab11 (un marqueur précoce de l'initiation de la ciliogenèse)(Yadav et al., 2016). Chez la drosophile, la protéine de coiffe

CEP97 est maintenue au cours de la ciliogenèse et sa déplétion altère sévèrement la capacité des cellules à former un cil (Dobbelaere et al., 2020). Enfin chez le xénope, CP110 est maintenue sur les corps basaux matures des épithéliums multiciliés (Walentek et al., 2016)

L'ensemble de ces résultats démontrent que CP110 et CEP97, recrutés rapidement au cours de la duplication des centrioles pour réguler la longueur des microtubules, peuvent présenter des fonctions divergentes favorisant ou inhibant l'initiation de la ciliogenèse selon le modèle d'étude et/ou l'environnement cellulaire. Bien que ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes sur la divergence fonctionnelle des protéines impliquées dans la ciliogenèse au cours de l'évolution, il reste communément admis que dans les cellules de mammifères (souvent RPE1) l'élimination de CP110 et CEP97 contribue à la première étape de la ciliogenèse précédant l'ancrage des corps basaux.

4. L'ancrage des corps basaux

Les données de la littérature montrent que l'ancrage des corps basaux peut s'effectuer suivant deux modes. Ces deux voies partagent la même étape d'initiation qui correspond à l'ancrage du corps basal à une membrane cellulaire. Lorsque le corps basal s'ancre directement à la membrane plasmique, comme c'est le cas dans les épithéliums polarisés chez les mammifères ou les protistes comme la paramécie, la ciliogenèse est dite extracellulaire. La voie intracellulaire passe par le recrutement au corps basal d'une vésicule appelée, vésicule ciliaire, dans le cytoplasme au cours de la migration du centrosome vers la membrane apicale (Figure 14).

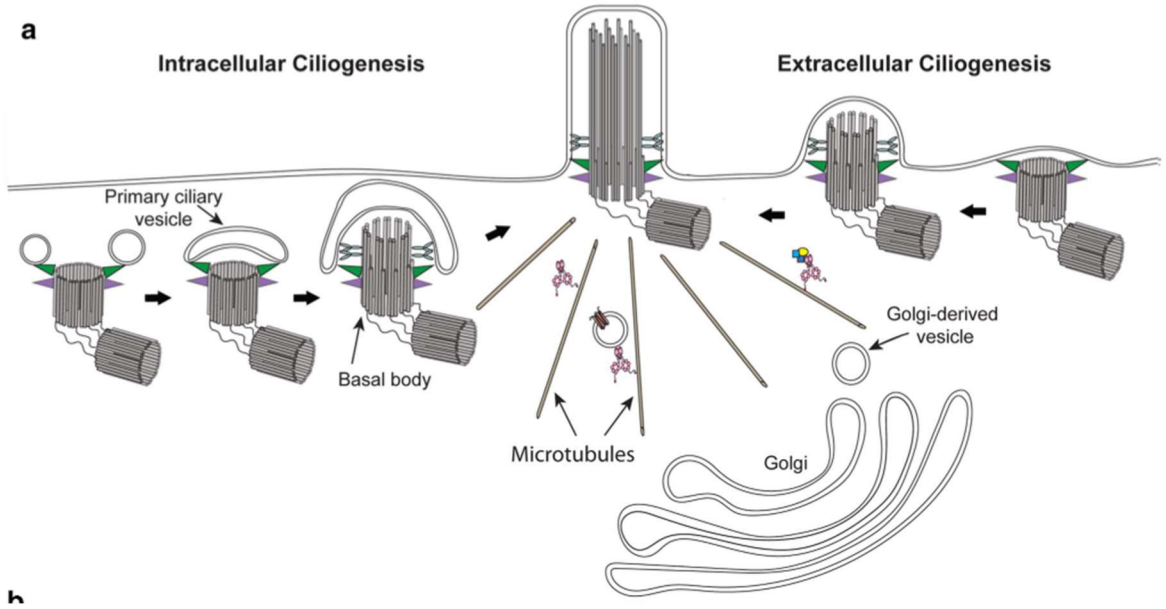


Figure 14 : Schéma représentant les deux modes de ciliogenèse. La majorité des cellules de mammifères forme leur cil primaire par la voie intracellulaire : des vésicules sont recrutées au corps basal pour former la vésicule ciliaire. L'axonème commence son élongation dans le cytoplasme. Enfin la vésicule ciliaire fusionne avec la membrane plasmique pour former la vésicule ciliaire. Les cellules des épithéliums polarisés de mammifères ainsi que de nombreux protistes utilisent la voie extracellulaire : le corps basal s'ancre directement à la membrane plasmique. Des vésicules dérivées du Golgi migrent le long des microtubules jusqu'au corps basal pour apporter les lipides et les protéines membranaires nécessaires à l'élongation du cil (Kumar et al., 2019).

d) La voie intracellulaire

La voie intracellulaire de la ciliogenèse commence dans le cytoplasme lors de la migration du centrosome. Elle implique un trafic interne de vésicules provenant des endosomes de recyclage (ERC) et de l'appareil de Golgi (Follit et al., 2006; Sorokin, 1968; Westlake et al., 2011). Ces petites vésicules appelées vésicules pré-ciliaires s'ancrent aux appendices distaux du corps basal et fusionnent entre elles pour former une vésicule plus large qui recouvre entièrement l'extrémité distale du corps basal : la vésicule ciliaire (Figure 14) (Lu et al., 2015). Par conséquence la voie intracellulaire nécessite d'une part le transport de ces vésicules pour les amener et les ancrer au corps basal et d'autre part un ensemble de protéines capables d'orchestrer leur fusion. Deux types de trafic vésiculaire ont été identifiés : l'un provenant d'endosome de recyclage et l'un provenant directement de l'appareil de Golgi (Yang and Huang, 2020).

Ce trafic vésiculaire provenant des endosomes de recyclage est permis grâce aux protéines de la famille Rab, des petites GTPases appartenant à la superfamille des Ras. Ces protéines sont des régulateurs importants dans la biogenèse, le transport et la fusion des structures membranaires dans la cellule (Homma et al., 2021). Rab11 organise le trafic des vésicules préciliaires. Ces vésicules transportent Rabin 8, un facteur d'échange de guanine (GEF) des protéines Rab8, jusqu'au corps basal dans le but d'activer la protéine Rab8 pour initier la croissance du cil (Lu et al., 2015; Westlake et al., 2011). Le transport des vésicules préciliaires le long des microtubules nécessite des moteurs moléculaires généralement associés à l'appareil de Golgi tels que la dynéine-2, Myosine Va et la kinésine-14 (KIFC1). Des travaux plus récents démontrent que les vésicules pré-ciliaires sont recrutées en région péricentrosomale le long des microtubules par un transport dynéine puis la myosine Va achemine les vésicules préciliaires le long des filaments d'actine jusqu'au appendices distaux du centriole père (Wu et al., 2018). La myosine Va régule également le transport des PCV au centriole père par un mécanisme Rabin8 indépendant, suggérant que plus d'un type de PCV est important pour la ciliogenèse. D'autres rab pourraient être impliquées (Shakya and Westlake, 2021).

Des vésicules provenant directement de l'appareil de Golgi sont également recrutées au cours de la ciliogenèse. La protéine GMAP210 recrute l'IFT20 au Golgi alors que GM130 et VSP15 sont nécessaires à la formation des vésicules golgiennes associées à IFT20. La protéines IFT54 interagit avec IFT20 et Radaptin5 (un effecteur de Rab8) pour permettre l'interaction entre les vésicules contenant Rab8 et Radaptin 5 avec les vésicules IFT20 au cours de leur adressage à la base du cil. La protéine des appendices distaux CEP83 interagit avec IFT20 au corps basal. (Yang and Huang, 2020).

Lorsque les vésicules préciliaires ont atteint le corps basal, la protéine Rabin 8 est capable d'interagir avec les appendices distaux via CEP164 (Schmidt et al., 2012). Des arguments suggèrent que le transport des vésicules pourrait être facilité par l'intermédiaire de grands complexes moléculaires tels que TRAPPII et le complex Exocyst. Ces deux complexes sont nécessaires pour la ciliogenèse et intéragissent avec Rabin 8 respectivement par TRAPPC14 et Sec15 (Chiba et al., 2013; Cuenca et al., 2019). Il a été démontré que TRAPPC14 est

également capable d'interagir avec les appendices distaux via CEP83 et FBF1, ce qui suggère également un rôle dans l'ancrage des vésicules préciliaires au corps basal (Cuenca et al., 2019).

Une fois ancrées au corps basal, les vésicules préciliaires vont fusionner pour former la vésicule ciliaire. Ce processus est permis par EHD1 et EHD3, des protéines à domaine EHD capables de contrôler les réorganisations membranaires. EHD1 et EHD3 s'associent avec Rab11 et Rab8 pour permettre la tubulation des vésicules préciliaires (Lu et al., 2015). Ces protéines vont participer à la fusion des membranes en recrutant SNAP29(Rapaport et al., 2010), un régulateur de la fusion membranaire, ainsi que PACSIN1/PACSIN2 et EHD1/EHD3 capables d'établir des courbures membranaires.

e) La voie extracellulaire

Dans les cellules de mammifères, l'ancrage des corps basaux à la membrane cellulaire a été observé lors de la formation de la synapse immunologique. Le corps basal s'ancre directement à la membrane plasmique mais ne forme pas de cil. Dans les cellules polarisées, telles les cellules de la trachée ou celles de la trompe de Fallope, le corps basal est supposé s'ancrer directement. Néanmoins, de nombreuses vésicules pré-ciliaires ont été observées dans les épithéliums de la trachée en microscopie électronique, suggérant aux auteurs que l'ancrage du corps basal s'effectue par l'intermédiaire de vésicules ciliaires (Siller et al., 2017). Cependant, les auteurs de cette étude ont utilisé du taxol, une drogue inhibant la dépolymérisation des microtubules, afin d'augmenter les vésicules ciliaires. Néanmoins, l'utilisation d'une drogue affectant les microtubules et le transport des cargos associés aux moteurs pourrait augmenter le nombre de vésicules à proximité de la partie distale des corps basaux sans pour cela suggérer que l'ancrage des corps basaux se fasse par l'intermédiaire d'une vésicule ciliaire. De plus, en l'absence de coupes sériées et d'observation en 3D du processus d'ancrage des corps basaux dans les cellules multiciliées de la trachée, il est difficile de conclure sur le mode d'ancrage dans ces cellules. Néanmoins dans l'épiderme muco-ciliaire de xénope, de nombreuses vésicules sont accumulées autour des corps basaux non ancrés suite à la déplétion de Dvl1 et 3 (Park et al., 2008).

Dans les cellules polarisées IMCD3, d'autres arguments pourraient suggérer que l'ancrage des corps basaux par voie extracellulaire pourrait passer par un intermédiaire vésiculaire. En effet, une étude révèle que les cellules IMCD3 connues pour former un cil par voie extracellulaire présentent aussi une vésicule ciliaire. Au cours des étapes précoces de la ciliogenèse des IMCD3, la vésicule ciliaire présente un marquage Myosine Va similaire à celui observé sur la vésicule dans les cellules RPE1 (voie intracellulaire) mais ce marquage est rapidement perdu au cours de l'élongation de l'axonème. Il est proposé que pour la voie intracellulaire, myosine Va et EHD1 sont nécessaires à la formation de la membrane ciliaire alors que pour la voie extracellulaire myosine Va serait nécessaire uniquement au recrutement des vésicules pré-cilaires alors que la membrane ciliaire serait formée par l'intermédiaire de Rab-Rabin 8 et Rab8. (Wu et al., 2018).

Enfin dans d'autre système il est démontré que l'ancrage des corps basaux peut se faire directement à la membrane plasmique comme c'est le cas chez la paramécie où un intermédiaire vésiculaire n'a jamais été observé en microscopie électronique (Aubusson-Fleury et al., 2012; Bengueddach et al., 2017)

L'ancrage du corps basal directement à la membrane plasmique ou à la vésicule ciliaire est rapidement suivi de l'élongation de l'axonème et de l'établissement de la zone de transition. Ce lien étroit entre ancrage, élongation de l'axonème et zone de transition a été démontré dans les cils primaires : Le recrutement des PACSIN et EHD1 est nécessaire à l'élimination de CP110 et CEP97 pour lever leur inhibition sur l'allongement des microtubules (Insinna et al., 2019; Xie et al., 2019).Par ailleurs EHD1 et EHD3 sont nécessaires au recrutement des protéines de la zone de transition CEP290, RPGRIP1L et TMEM67 (Lu et al., 2015).

5. La formation de la zone de transition

La zone de transition correspond à la frontière entre le corps basal et l'axonème. Lorsque le corps basal est ancré, les appendices distaux sont appelés fibres de transitions et elles forment la limite entre le corps basal et la zone de transition. En partie distale de la zone de transition des cils primaires, aucune structure spécifique n'est observée. Par contre, la paire centrale de microtubules déterminera la limite de la zone de transition dans les cils motiles. La zone de transition est caractérisée par les liens en Y qui relient les microtubules à la

membrane ciliaire. Les fibres de transition et les liens en Y sont supposés participer structuralement à la fonction de filtre « ciliary gate » de la zone de transition, permettant de garantir la composition spécifique des protéines et des lipides qui composent le compartiment ciliaire (Reiter et al., 2012).

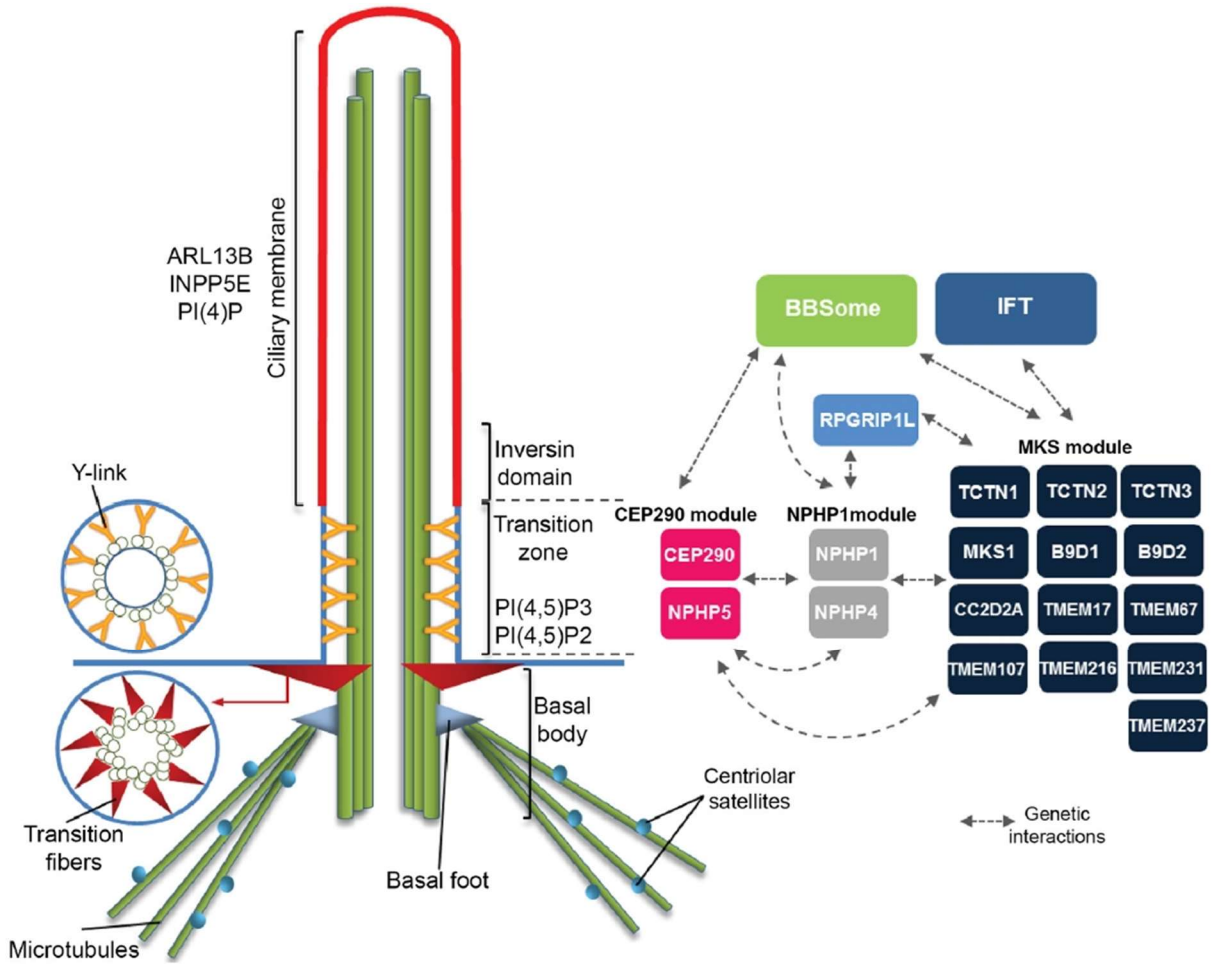


Figure 15 : Schéma de la zone de transition d'un cil primaire. Au niveau de la zone de transition, la membrane ciliaire est reliée au microtubules par des connecteurs tels que les liens en Y (jaune) et les fibres de transition (rouge). Cette région est également caractérisée par une composition lipidique particulière (PI(4,5)P3 et PI(4,5)P2). Les différents modules protéines qui composent la zone de transition sont représentés (Gonçalves and Pelletier, 2017).

Les protéines qui composent la zone de transition peuvent être regroupées en trois modules majoritaires : les modules MKS, NPHP et CEP290 (Figure 15). Chacun de ces complexes est composé de plusieurs protéines pouvant être co-purifiées et dont la localisation à la zone de transition est interdépendante (Chih et al., 2011; Garcia-Gonzalo et al., 2011; Gogendeau

et al., 2020; Huang et al., 2011; Sang et al., 2011). Des variations dans les fonctions de ces protéines sont observées entre les différents tissus d'un même organisme (Akella et al., 2019; Wiegering et al., 2018) et entre différents organismes.

La plupart des protéines qui composent la zone de transition sont mutées chez des patients atteints de ciliopathies, ce qui démontre l'importance de cette région dans les fonctions ciliaires. La combinaison de la déplétion d'un des composants du module MKS avec un membre du complexe NPHP affecte fortement la ciliogenèse (Huang et al., 2011; Lambacher et al., 2016; Williams et al., 2011) Des défauts structuraux tels la perte des liens en Y ou même des défauts d'ancrage du corps basal sont observés. L'ensemble de ces données montrent que les modules MKS et NPHP coopèrent pour assembler le cil et assurer sa fonction (Yee et al., 2015). Chez la paramécie, il a été démontré que les protéines de la zone de transition se localisent et assurent la fonction de « ciliary gate » comme dans les autres modèles cellulaires. Cependant, une nouvelle fonction de ces protéines a été mise en évidence dans le modèle paramécie. La déplétion de MKS2 et TMEM107 induit une cassure des cils au niveau de la zone de transition alors que la déplétion de NPHP4, CEP290 ou PRGRIP1L au contraire empêche la déciliation. Ces travaux suggèrent que la zone de transition pourrait également jouer un rôle dans le processus physiologique de déciliation présent dans certains tissus (Gogendeau et al., 2020)

Chez les mammifères, le recrutement de certaines protéines de la zone de transition a lieu avant l'ancrage à la vésicule ciliaire comme le démontre la présence de RPGRIP1L TMEM67 et CEP290 avant le recrutement de Rabin 8 (Lu et al. 2015). La protéine de la zone de transition Chibby (CBY) stabilise l'interaction entre Rabin8 et CEP164 suggérant que les protéines de la zone de transition pourraient réguler l'ancrage du corps basal à la vésicule ciliaire et leur stabilisation. L'établissement complet de la zone de transition a lieu peu de temps après le recrutement de la vésicule ciliaire et coïncide avec l'élongation de l'axonème. La perte d'un interactant de Cby, Dzip1, entraine un arrêt de la ciliogenèse et empêche le recrutement de RPGRIP1L.

Chez la drosophile, les protéines du module NPHP et RPGRIP1L ne sont pas conservées. L'absence des composants du complexe MKS (KO)n'entraine que de faibles défauts

d'assemblage de la zone de transition (Vieillard et al., 2016). En revanche, le complexe DZIP1-CBY-FAM92 présent à l'extrémité distale du corps basal forme un complexe fonctionnel impliqué dans l'interaction du corps basal avec la membrane et est nécessaire au recrutement de CEP290 et des protéines du complexe MKS.

Les études réalisées chez *C.elegans* et la souris ont montré des interactions génétiques entre les composants du complexe MKS et les membres du complexe NPHP comme décrit précédemment mais aussi avec les composants du BBSome (un complexe jouant un rôle dans le trafic vésiculaire des protéines membranaire du cil) (Yee et al., 2015). En effet, NPHP5 et CEP290 interagissent physiquement avec de nombreuses protéines du BBSome et sont nécessaires pour leur assemblage et leur passage dans le compartiment ciliaire (Barbelanne et al., 2015; Zhang et al., 2014). Enfin les protéines de la zone de transition assurent aussi la spécificité de la composition lipidique de la membrane ciliaire. Chez les mammifères, la protéine INPP5E est présente dans le cil au niveau de la zone de transition pour réguler la composition membranaire en phosphoinositide (PI) (Dyson et al., 2017)

6. L'élongation de l'axonème

L'élongation de l'axonème a lieu directement après l'ancrage du corps basal à une membrane. Suite à l'élimination de la coiffe, les doublets de microtubules qui composent l'extrémité distale du corps basal vont s'allonger pour former le cil. La formation du cil nécessite l'assemblage précis dans l'espace et le temps d'un grand nombre de protéines. La zone de transition permet l'entrée par diffusion passive des protéines de petites tailles uniquement. La majorité des protéines qui composent le cil est transportée par un système appelé transport intraflagellaire (IFT). Ces grands complexes s'assemblent à la base du cil sous forme de « wagons » capables de transporter les éléments nécessaires à l'élongation de l'axonème de la base du cil (zone de transition) à l'extrémité distale du cil : transport antérograde. Ce transport est assuré par le complexe IFT-B associé aux kinésine-II. Le transport s'effectue entre les microtubules et la membrane et le complexe se désassemble à l'extrémité distale. Là, un deuxième complexe IFT s'assemble : les IFT-A qui permettent le transport rétrograde en s'associant aux dynéine-2 afin de ramener les éléments à la base du cil pour les recycler (Figure 16) (Absalon et al., 2008; Pazour et al., 1998, 1999) Les travaux de

microscopie électronique chez *C. reinhardtii* ont démontré que le transport IFT (antérograde comme rétrograde) peut s'effectuer sur l'ensemble des doublets de l'axonème. Cependant le transport antérograde s'effectue le long des microtubules B alors que le transport rétrograde est restreint aux microtubules A (Stepanek and Pigino, 2016). A l'inverse chez d'autres organismes, le transport peut s'effectuer sur des doublets spécifiques comme c'est le cas chez *T. Brucei.* L'analyse en FIB-SEM des axonèmes de trypanosome démontre que les trains IFT sont répartis sur les doublet 3-4 et 7-8 avec une préférence pour les doublets 4 et 7(Bertiaux et al., 2018). L'une des hypothèses expliquant cette préférence du transport IFT sur certains doublets proposée dans ces travaux serait que ces doublets pourraient présenter des modifications post-traductionnelles de la tubuline comme la (poly)glycylation ou la (poly)glutamylation souvent identifiées dans des sites d'interaction avec des moteur moléculaires (Konno et al., 2012; Sirajuddin et al., 2014). D'autre part la présence de la « paraflegellar rod » au niveau des doublets du flagelle de T. Brucei peut expliquer pourquoi le transport IFT n'a pas lieu sur ces doublets.

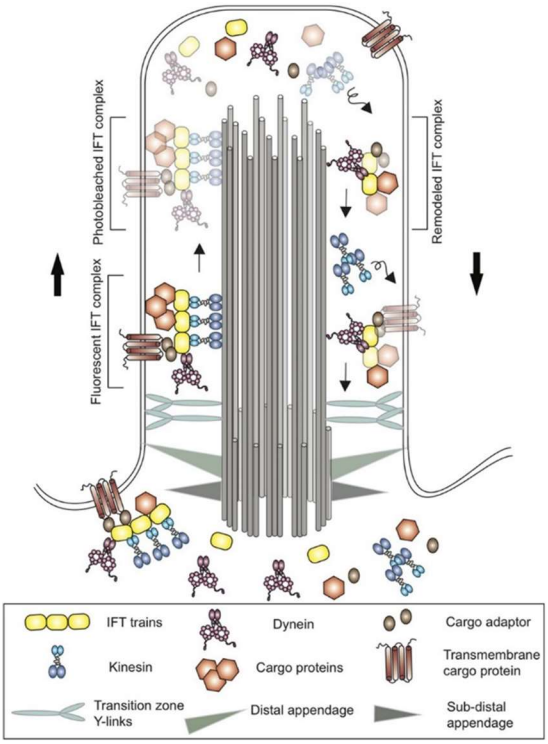


Figure 16 : Schéma du trafic ciliaire. Le transport intraflagellaire (IFT) s'organise sous forme de complexes appelés « train » associés d'une part à l'axonème par des moteurs moléculaires et d'autre part à des protéines transmembranaires. Le transport antérograde est permis grâce aux kinésines et le complexe se désassemble lorsqu'il a atteint l'extrémité distal du cil. Le complexe se remodèle en s'associant à des dynéines pour permettre l'export ciliaire par transport rétrograde. Une fois dans le

cytoplasme les composants des IFT se dispersent à proximité du corps où ils seront recyclés et/ou réutilisé pour former de nouveaux trains (Kumar et al., 2019)

La longueur du cil doit être régulée précisément dans la plupart des cellules. Parmi les modèles existants, l'un d'eux propose que le transport IFT pourrait participer à la régulation entre assemblage et désassemblage des sous unités de tubulines. L'extrémité (+) des microtubules est une structure dynamique qui perd et assemble de nouvelles sous-unités de tubulines en continue. L'extrémité distale de l'axonème est soumise au même processus. Par conséquence le transport IFT assure continuellement le transport de tubuline pour maintenir la croissance du cil. Hors la quantité de trains d'IFT rentrant dans le cil est constante ; par conséquence, plus le cil est long plus les IFT mettrons de temps pour atteindre l'extrémité distal du cil. Ce modèle propose donc que, lorsque le cil est court, l'apport en matériel à l'extrémité distale du cil par les IFT est rapide et permet la croissance de l'axonème (Broekhuis et al., 2013). Au contraire, lorsque le cil a atteint sa taille finale, il existe un équilibre entre le désassemblage de la tubuline et l'apport de nouveau matériel par les IFT. Un autre modèle propose que lorsque l'élongation de l'axonème est terminée, il y a une diminution de la fréquence d'entrée des IFT dans le cil (Marshall and Rosenbaum, 2001). Des travaux plus récents chez *Trypanosoma brucei* ont démontré que l'inactivation de la kinésine assurant le transport antérograde des IFT entraine un ralentissement de l'élongation de l'axonème causant une diminution de la taille des flagelles (Fort and Bastin, 2014). Ces travaux démontrent que chez *T. brucei*, quel que soit la vitesse d'élongation de l'axonème, celle-ci prend fin à l'issue de la division cellulaire suggérant la présence d'un signal de fin de ciliogenèse.

F. Les ciliopathies

La quasi-totalité des cellules humaines possèdent un cil. La découverte des fonctions ciliaires a mis en évidence leur rôle capital dans de nombreuses fonctions cellulaires. Les cils jouent aussi un rôle central dans le développement humain. Par conséquence, des défauts dans la formation des cils ou de leur fonction sont associés à des syndromes polymalformatifs regroupés sous le terme de ciliopathies. Ces pathologies multisystémiques complexes affectent généralement plusieurs organes incluant les reins, le cerveau, les yeux, les voies

respiratoires et les poumons. Le terme ciliopathie est un sens large qui recouvre l'ensemble des syndromes liés à des pathologies ciliaires. Pour n'en citer que quelques-unes elles regroupent les maladies rénales polykystiques, la nephronophtise (NPHP), le syndrome oro-facial-digital (OFD) et les syndromes de Jeune ou Joubert (JBTS) (Figure 19) mais aussi une pathologie qui affecte spécifiquement les cils motiles : la dyskinésie ciliaire primitive. Les ciliopathies sont des pathologies génétiques héréditaires individuellement rares, mais prise dans leur ensemble les ciliopathies affectent 1 naissance sur 2000.

L'étude de la biogenèse et des fonctions ciliaires est donc d'une importance capitale dans la compréhension des ciliopathies.

1. Les atteintes des cils primaires

Depuis les premières études fondatrices associant le rôle des cils primaires dans le développement des vertébrés et son implication dans des maladies humaines (Pazour et al., 2000; Torres, 1998), l'étude des gènes impliqués dans les ciliopathies a permis de caractériser la majeure partie des acteurs de la ciliogenèse et des fonctions ciliaires. Les ciliopathies sont des maladies autosomales récessives généralement associées à une grande variabilité phénotypique. En fonction du syndrome de nombreux organes peuvent être atteints. Par exemple des défauts ciliaires ont été associés à des maladies rénales comme la polykystose rénale (PKD) ou la nephronophtise (NPHP) qui entrainent respectivement la formation de kystes rénaux et une réduction de la taille associée à une fibrose interstitielle. D'autres organes peuvent être touchés comme le foie, l'œil ou le système nerveux central… (Figure 17) En raison de la présence des cils sur la presque totalité des cellules

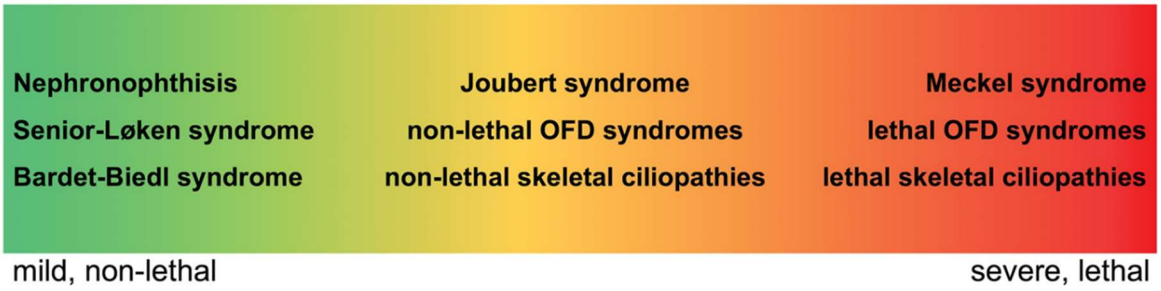
A

Table 1. Hallmarks of human ciliopathies

	Alström	BBS	JBTS	Jeune	MKS	NPHP	OFD
Cleft palate					✓		
Cognitive defects		✓	✓			✓	✓
Deafness	✓						
Encephalocele					✓		
Liver disease		✓	✓	✓	✓	✓	✓
Obesity	✓	✓	✓				
Polydactyly		✓	✓	✓	✓		✓
Renal cysts		✓	✓	✓	✓	✓	✓
Retinopathy	✓	✓	✓	✓		✓	
Situs inversus		✓	✓		✓		✓
Skeletal defects				✓	✓		✓

Tick marks indicate presence of a hallmark feature in human ciliopathy patients. BBS, Bardet-Biedl syndrome; JBTS, Joubert syndrome; MKS, Meckel-Grüber syndrome; NPHP, nephronophtisis; OFD, orofaciodigital syndrome.

B



C

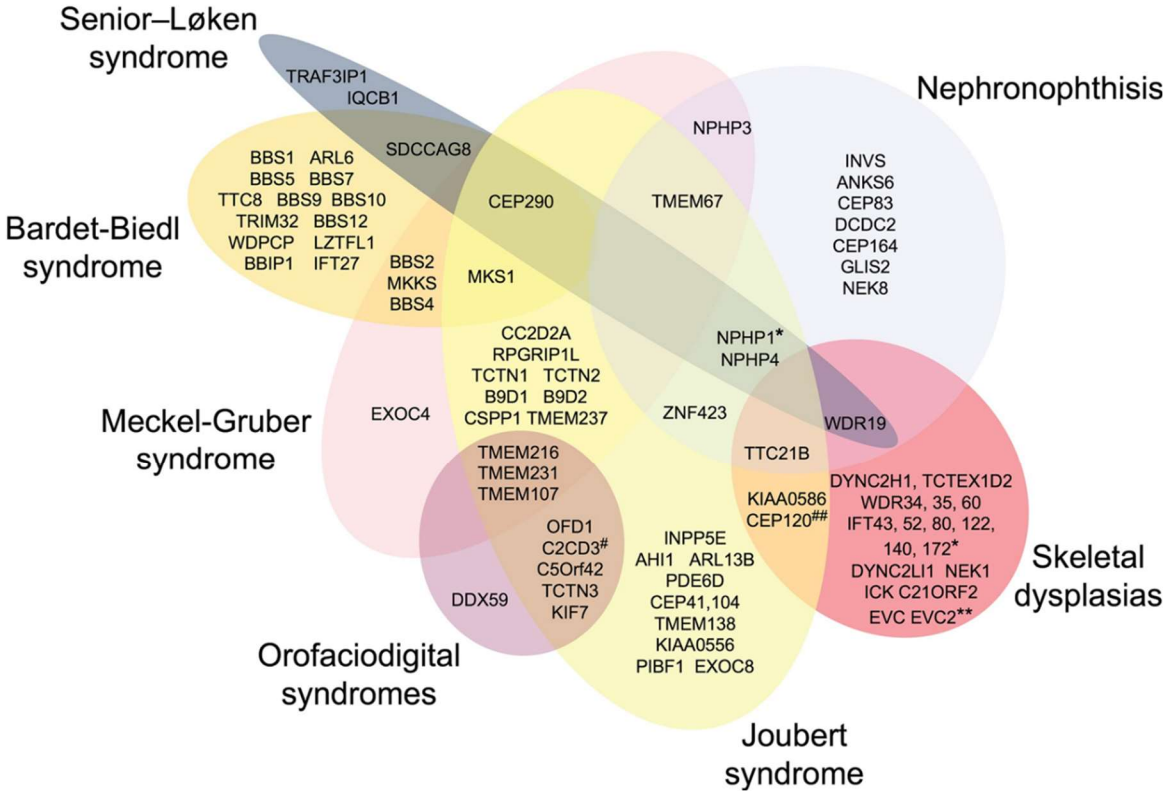


Figure 17 : Recouvrement phénotypiques et de gènes impliqués dans différentes ciliopathies. A : Tableau récapitulatif des symptômes causés par différentes ciliopathies humaines. B : Distribution des ciliopathies affectant les cils primaires en fonction de leur sévérité. (Mitchison and Valente, 2017)*C :*

Diagramme de Venn résumant les implications de différents gènes dans différentes ciliopathies (Mitchison and Valente, 2017).

humaines et de leur rôle majeur dans le développement, plusieurs organes peuvent être touchés chez un même patient et la combinaison de ces signes cliniques a été regroupée sous forme de syndrome. Ces syndromes peuvent être classés en fonction de leur sévérité (Figure 17) : des ciliopathies dites non létales comme le syndrome de Bardet-Biedl (dégénérescence rétinienne, obésité, hypogonadisme, polydactylie, dysfonctionnement rénal et retard mental) à des ciliopahties létales in utero ou peu après la naissance (syndrome de Meckel).

Au cours de ma thèse je me suis intéressé particulièrement aux protéines OFD1, CEP90 et MNR dont les gènes sont impliqués dans le syndrome oro-facial-digital (OFD1), de Joubert (OFD1, MNR et CEP90) et de Jeune (CEP90).

Syndrome Oro-facial-digital

Les chercheurs ont identifié au moins 13 formes potentielles de syndrome oro-facial-digital (Bruel et al., 2017). Cependant, des caractéristiques similaires entre les différents types peuvent être identifiées et certains types ne sont pas bien définis. Le système de classification du syndrome oro-facial-digital continue d'évoluer à mesure que les chercheurs trouvent davantage d'individus touchés et en apprennent davantage sur ce trouble.

Les traits faciaux distinctifs souvent associés au syndrome oral-facial-digital comprennent une fente dans la lèvre (fente labiale); un nez large avec un pont nasal large et plat; et les yeux largement espacés (hypertélorisme). Les anomalies peuvent affecter à la fois les doigts et les orteils chez les personnes atteintes du syndrome oro-facial-digital. Ces anomalies comprennent la fusion de certains doigts ou orteils, une réduction de leur longueur(brachydactylie) ou de leur courbure. La présence de doigts supplémentaires (polydactylie) est également observée dans la plupart des formes de syndrome oro-facial-digital. (Gurrieri et al., 2007)

D'autres caractéristiques se produisent dans seulement un ou quelques types de syndrome digital oral-facial. Ces caractéristiques aident à distinguer les différentes formes de la maladie. Par exemple, la forme la plus courante de syndrome oro-facial-digital, de type I, est associée à la polykystose rénale.(Saal et al., 2010)

Syndrome de Joubert

Le syndrome de Joubert est un trouble qui affecte de nombreuses parties du corps. Les signes et les symptômes de cette maladie varient selon les personnes touchées, même parmi les membres de la même famille.

La caractéristique principale du syndrome de Joubert est une combinaison d'anomalies cérébrales qui, ensemble, sont connues sous le nom de signe de dent molaire, qui peuvent être vues sur des études d'imagerie cérébrale telles que l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Ce signe résulte du développement anormal de structures situées près de l'arrière du cerveau, notamment le vermis cérébelleux et le tronc cérébral. (Maria et al., 1999)

La plupart des nourrissons atteints du syndrome de Joubert ont un faible tonus musculaire (hypotonie) dans la petite enfance, ce qui contribue à la difficulté à coordonner les mouvements (ataxie) dans la petite enfance. D'autres caractéristiques de la maladie comprennent des épisodes de respiration inhabituellement rapide (hyperpnée) ou lente (apnée) pendant la petite enfance et des mouvements oculaires anormaux (apraxie motrice oculaire). La plupart des personnes touchées ont un retard de développement et une déficience intellectuelle, qui peuvent aller de légères à graves. Des traits faciaux distinctifs peuvent également apparaître dans le syndrome de Joubert ; ceux-ci comprennent un front large, des sourcils arqués, des paupières tombantes (ptosis), des yeux largement espacés (hypertélorisme), des oreilles basses et une bouche en forme de triangle. (Parisi, 2009)

Le syndrome de Joubert peut inclure un large éventail de signes et de symptômes supplémentaires. La condition est parfois associée à d'autres anomalies oculaires (telles que la dystrophie rétinienne, qui peut entraîner une perte de vision, et le colobome, qui est une lacune ou une fissure dans une structure de l'œil), une maladie rénale (y compris la

polykystose rénale et la néphronophtise), une maladie hépatique, des anomalies squelettiques (telles que la présence de doigts et d'orteils supplémentaires) ou des problèmes hormonaux (endocriniens). Une combinaison des traits caractéristiques du syndrome de Joubert et d'un ou plusieurs de ces signes et symptômes supplémentaires caractérisait autrefois plusieurs troubles distincts. Ensemble, ces troubles étaient appelés syndrome de Joubert et troubles apparentés (JSRD). Cependant, tous les cas impliquant le signe de la dent molaire, y compris ceux présentant ces signes et symptômes supplémentaires, sont généralement considérés comme un syndrome de Joubert. (Valente et al., 2013)

Le syndrome de Jeune

Le syndrome de Jeune, également connu sous le nom de dystrophie thoracique asphyxiante, est un trouble héréditaire de la croissance osseuse caractérisé par une poitrine étroite, des côtes courtes, des os raccourcis dans les bras et les jambes, une petite taille et des doigts et des orteils supplémentaires (polydactylie). Des anomalies squelettiques supplémentaires peuvent inclure des clavicules et des os pelviens de forme inhabituelle, ainsi que des extrémités en forme de cône des os longs des bras et des jambes. De nombreux nourrissons atteints de cette maladie naissent avec une poitrine extrêmement étroite en forme de cloche qui peut limiter la croissance et l'expansion des poumons. Des problèmes respiratoires potentiellement mortels en résultent, et les personnes atteintes de dystrophie thoracique asphyxiante ont une espérance de vie relativement courte (petite enfance). Cependant, chez les personnes qui survivent au-delà des premières années, l'étroitesse de la poitrine et les problèmes respiratoires associés peuvent s'améliorer avec l'âge.(Baujat et al., 2013)

Certaines personnes atteintes de dystrophie thoracique asphyxiante naissent avec des anomalies squelettiques moins graves et n'ont que de légères difficultés respiratoires, comme une respiration rapide ou un essoufflement. Ces personnes peuvent vivre jusqu'à l'adolescence ou l'âge adulte. Après la petite enfance, les personnes atteintes de cette maladie peuvent développer des anomalies rénales (rénales) potentiellement mortelles qui provoquent un dysfonctionnement ou une défaillance des reins. Des malformations cardiaques et un rétrécissement des voies respiratoires (sténose sous-glottique) sont

également possibles. D'autres caractéristiques moins courantes de la dystrophie thoracique asphyxiante comprennent une maladie du foie, kystes dans le pancréas, des anomalies dentaires et une maladie oculaire appelée dystrophie rétinienne qui peut entraîner une perte de vision.(Keppler-Noreuil et al., 2011; Schmidts et al., 2013)

2. Atteinte de cils motiles

La dyskinésie ciliaire primaire est un trouble caractérisé par des infections chroniques des voies respiratoires, des organes internes anormalement positionnés et l'incapacité d'avoir des enfants (infertilité). Les signes et les symptômes de cette affection sont causés par une altération des cils motiles.

Dans les voies respiratoires, le battement coordonné des cils permet l'évacuation du mucus vers la gorge. Ce mouvement de mucus aide à éliminer les fluides, les bactéries et les particules des poumons. La plupart des bébés atteints de dyskinésie ciliaire primaire éprouvent des problèmes respiratoires à la naissance, ce qui suggère que les cils jouent un rôle important dans l'élimination du liquide fœtal des poumons. Dès la petite enfance, les enfants atteints développent fréquemment des infections des voies respiratoires(Escudier et al., 2009)

Certaines personnes atteintes de dyskinésie ciliaire primaire ont des organes anormalement placés dans leur poitrine et leur abdomen. Ces anomalies surviennent au début du développement embryonnaire lorsque les différences entre les côtés gauche et droit du corps sont établies. Environ 50 % des personnes atteintes de dyskinésie ciliaire primaire présentent une inversion de l'image miroir de leurs organes internes (situs inversus totalis). Par exemple, chez ces personnes, le cœur est du côté droit du corps au lieu du côté gauche. Situs inversus totalis ne cause aucun problème de santé apparent. Lorsqu'une personne atteinte de dyskinésie ciliaire primaire a un situs inversus totalis, on dit souvent qu'elle a le syndrome de Kartagener.(Kennedy et al., 2007; Leigh et al., 2009; Shapiro et al., 2014)

Environ 12 % des personnes atteintes de dyskinésie ciliaire primaire souffrent d'une affection connue sous le nom de syndrome d'hétérotaxie ou situs ambiguus, qui se caractérise par

des anomalies du cœur, du foie, des intestins ou de la rate. Ces organes peuvent être structurellement anormaux ou mal positionnés. En outre, les personnes touchées peuvent manquer de rate (asplénie) ou avoir plusieurs rates (polysplénie). Le syndrome d'hétérotaxie résulte de problèmes d'établissement des côtés gauche et droit du corps au cours du développement embryonnaire déterminé par le battement des cils du nœud embryonnaire. La sévérité de l'hétérotaxie varie considérablement selon les individus affectés.

La dyskinésie ciliaire primaire peut également conduire à l'infertilité. Chez l'homme elle est expliqué par l'altération du battement des flagelles des spermatozoïdes alors que chez la femme, les cils qui tapissent les parois des trompes de Fallope sont nécessaire pour acheminer l'ovocyte.

Bien que ces cas soient rare, certaines personnes atteintes de dyskinésie ciliaire primaire peuvent également présenter une accumulation de liquide dans le cerveau (hydrocéphalie) qui peut être expliqué par des défauts du battement des cils de l'épendyme nécessaire aux mouvement des liquides céphalo-rachidien.

L'étude des protéines impliquées dans les DCP a permis d'identifier les acteurs majoritaires du battement ciliaire qui sera traité plus en détail dans l'annexe 3.

G. La paramécie

La paramécie est un organisme unicellulaire de grande taille (130µm) comportant plus de 4000 cils motiles. Contrairement à de nombreux modèles biologiques, la paramécie ne possède pas de centrioles libres dans le cytoplasme. L'ensemble de ces corps basaux sont ancrés à la membrane en suivant une organisation précise.

1. Organisation et structure des corps basaux

Le cortex de la paramécie est soutenu par un cytosquelette superficiel, l'épiplasme, segmenté en unités corticales. Ces unités corticales peuvent comporter un corps basal unique, on parle alors de singlet, ou deux corps basaux dans le cas des doublets.

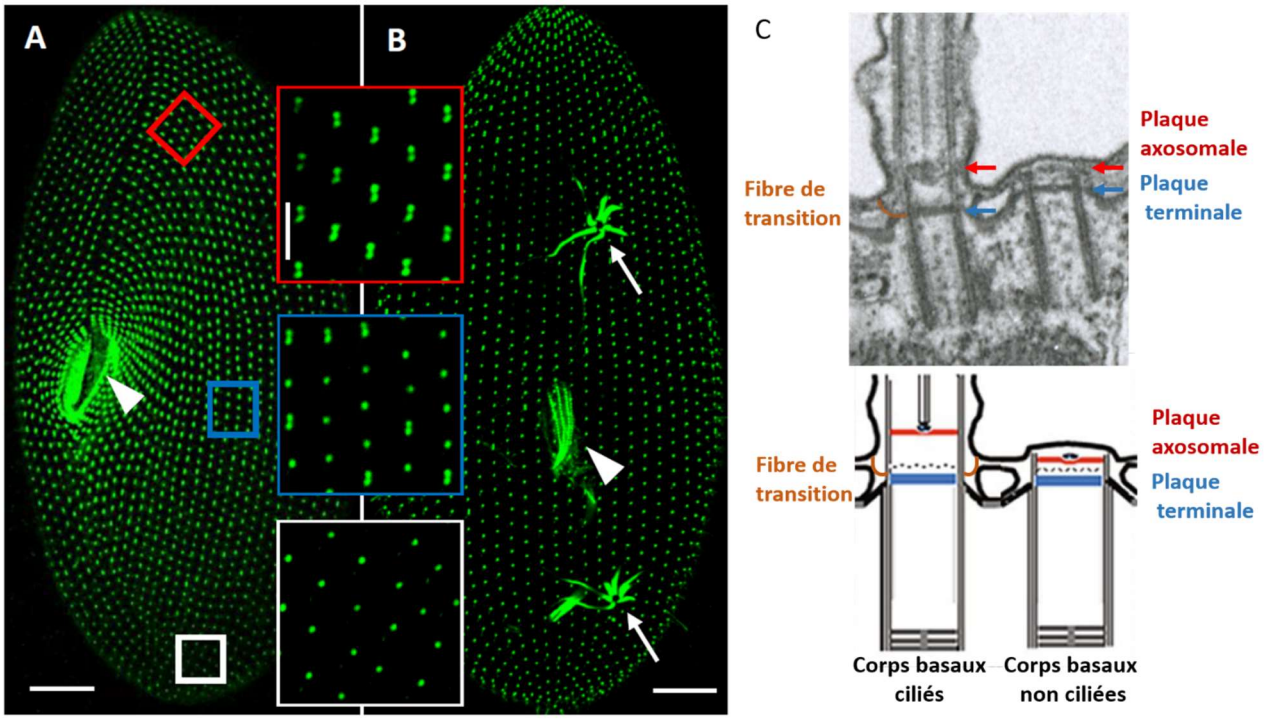


Figure 18: Organisation des corps basaux sur le cortex des paramécies. Observation au microscope confocale d'une paramécie en vue ventrale (A) et dorsale (B) après marquage par un anticorps spécifique des corps basaux (poly-E). Les corps basaux sont organisés en rangées parallèles appelées cinéties. Les cadres rouge, bleu et blanc représentent des zooms optiques représentatifs des trois régions du cortex ventral de la paramécie. En rouge le champ invariant constitué uniquement de doublets de corps basaux, en bleu le champs mixte composé de doublet et de singlet enfin en blanc la région postérieure exclusivement composée de singlets. Les vacuoles pulsatives (flèches) et l'appareil oral (tête de flèche) sont visibles. Barre d'échelle : 10µm sur les paramécies entière et 2µm sur les zooms optiques. C : Observation en microscopie électronique d'un doublet de corps basaux du champ mixte. Le corps basal gauche (postérieur) est cilié alors que le corps basal de droite (antérieur) issu de la dernière duplication n'est pas cilié. Les plaques de la zone de transition sont représentées : plaque axosomale (rouge) et plaque terminale (bleu). La plaque intermédiaire, située entre les plaques axosomale et terminale, n'est pas observable sur cette image. Elle est représentée en pointillé sur le schéma. Une fibre de transition est observée sur le corps basal postérieur (surligné en orange).

Le cortex de la paramécie est organisé très précisément en rangées parallèles de corps basaux appelées cinéties. Il est possible de distinguer le cortex en 3 régions distinctes :1) la région antérieure droite de la paramécie en vue ventrale est appelée le champ invariant car

elle possède uniquement des unités corticales composées de deux corps basaux ciliés, 2) la région la plus postérieure de la paramécie est composée exclusivement de singlets et 3) Le champ mixte, appelé ainsi car il est composé à la fois de singlets et de doublets (Figure 18)(Aubusson-Fleury et al., 2012). Chez la paramécie, contrairement aux cellules de mammifères, l'ancrage du corps basal à la membrane plasmique n'est pas couplé à l'allongement d'un cil. Dans le champ mixte, les unités corticales composées de doublets ne présentent que le corps basal postérieur cilié. Le corps basal non cilié ne formera un cil qu'au cours du cycle cellulaire suivant. Dans le champ antérieur (champ invariant), les deux corps basaux sont ciliés.

Que les corps basaux soient ciliés ou non, ils possèdent à leur extrémité distale 3 plaques reconnaissables qui forment la zone de transition. La plaque terminale représente la partie la plus proximale de la zone de transition et est associée au réseau d'épiplasme sous corticale. La partie la plus distale de la zone de transition est délimitée par la plaque axosomale. La paire centrale de microtubules du cil s'organise au-dessus de cette plaque. Enfin entre les deux se trouve une 3ème plaque plus fine nommée la plaque intermédiaire. A l'interface entre la plaque terminale et la plaque intermédiaire émergent les fibres de transition (Dute and Kung, 1978). Au cours de la ciliogenèse, une maturation structurale a lieu au niveau de la zone de transition des corps basaux ancrés. Cette maturation se traduit par une augmentation de la distance qui sépare les 3 plaques.

Bien que la structure et la composition protéique du cil soient bien conservée entre la paramécie et les mammifères, les satellites centriolaires sont absents dans ce modèle. Cette affirmation est appuyée par 1) l'absence de protéines majoritaires de satellites telles que PCM1 et 2) les images de microscopie électroniques n'ont jamais révélé la présence de granules à proximité des corps basaux chez la paramécie.

2. La division cellulaire chez la paramécie

L'organisation précise des corps basaux sur l'ensemble du cortex de la paramécie suppose une régulation précise de leur duplication. Après la division cellulaire, l'organisation stéréotypée des corps basaux observée dans la cellule maternelle doit être reproduite à

l'identique dans les cellules filles. Cette duplication suit un schéma précis faisant intervenir plusieurs cycles de duplication. (Iftode and Fleury-Aubusson, 2003; Iftode et al., 1989).

Contrairement aux modèles de duplication des centrioles décrits chez les mammifères, les duplications des corps basaux de paramécie se font à partir de corps basaux ancrés à la membrane plasmique. Le nouveau corps basal formé se développe donc à proximité de la membrane plasmique, en position antérieur, perpendiculairement au corps basal père (Dippell, 1968). Cette position est dictée par l'apparition transitoire d'une structure filamenteuse appelée ALF (Anterior Left Filament) reliée à la racine striée via du matériel fibreux et qui se développe sous les microtubules transverses précèdent l'apparition de l'ébauche du nouveau corps basal. C'est sous les microtubules transverses et entre la racine striée et l'ALF que se produit la nucléation du nouveau corps basal (Jerka-Dziadosz et al., 2013). Des liens sont établis entre les régions proximales des corps basaux père et fils, dès les étapes les plus précoces de la duplication. Les microtubules A sont nucléés en premier, puis le corps basal se redresse au même moment que les microtubules B et C se forment. A la fin de la duplication, le corps basal fils est parallèle à son père, son extrémité distale faisant face à la membrane plasmique. La maturation du corps basal fils se termine par l'assemblage des trois plaques caractéristiques de la zone de transition (Dippell, 1968). Finalement le corps basal s'ancre directement à la membrane plasmique. Aucune évidence de la présence de vésiculaires ciliaires n'a été mis en évidence chez la paramécie.

Chez la paramécie, la duplication des corps basaux s'initie au niveau équatorial et progresse vers les deux pôles de la cellule. La duplication doit respecter avec précision l'organisation des différents territoires qui composent le cortex de la paramécie. C'est pourquoi le processus est complexe et diffère en fonction du champ observé. Deux vagues de duplication sont observées : la première vague permet la génération de nouvelles unités corticales alors que la deuxième vague n'affecte que les corps basaux destinés à constituer les doublets des unités corticales. Dans les deux cas, les nouveaux corps basaux sont toujours formés antérieurement selon l'axe antéro-postérieur de la paramécie.

Comme décrit précédemment, le champ invariant est composé exclusivement de doublets de corps basaux et est situé sur la région antérieure gauche de la paramécie. Par

conséquence, au cours de la duplication, il est hérité par la cellule fille antérieure alors que la cellule postérieure doit le reconstituer intégralement. Chez la cellule antérieure, la duplication dans cette région fait intervenir une étape supplémentaire : dans chaque unité corticale, le corps basal antérieur de chaque paire disparait pendant la première vague de duplication. Après duplication du corps basal postérieur, le corps basal nouvellement généré viendra s'insérer à la place du corps basal qui s'est détaché et

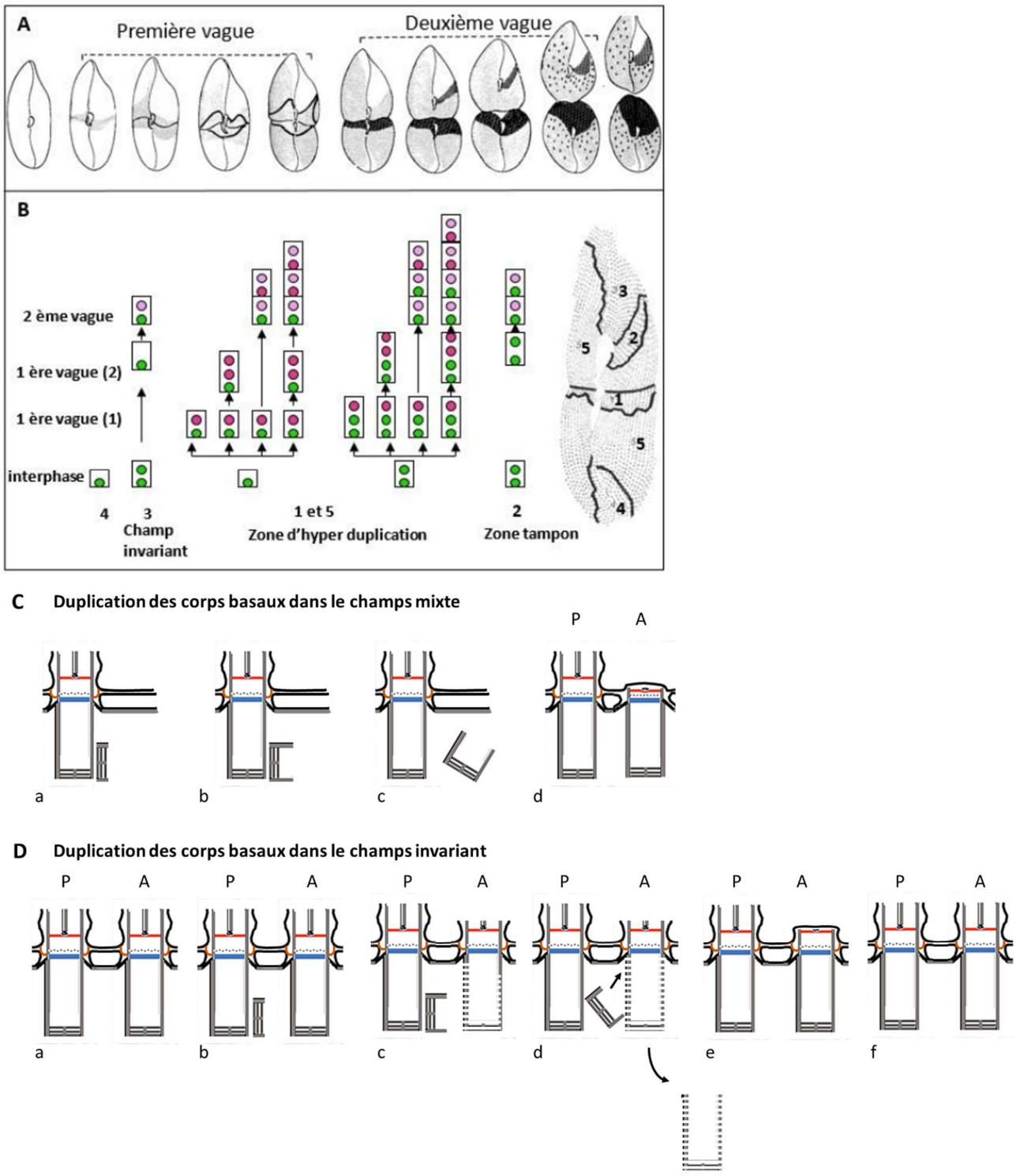


Figure 19: Schéma de duplication des corps basaux chez la paramécie. (A) Les cellules sont schématisées à différentes étapes de la division. La première vague de duplication est représentée par les zones grisées, puis les zones noires représentent la seconde vague de duplication. (B) A droite est schématisée une paramécie au cours de division sur laquelle sont indiqués ses différents territoires (1 à 5). Selon les territoires, le processus de duplication des corps basaux est différent et est détaillé à gauche. Les anciens corps basaux sont représentés en vert, ceux issus de la première duplication en rouge et en rose pour la 2ème duplication. (Iftode et al., 1989). Schéma de duplication des corps basaux de paramécie dans le champ mixte (C) et le champ invariant (D). Dans le champ mixte (C) un nouveau corps basal est

dupliqué à partir d'un corps basal ancré et cilié (a et b) puis se redresse pour s'ancrer directement à la membrane plasmique (d). Il ne formera un cil qu'au cycle cellulaire suivant. Dans le champ invariant (D) le corps basal est dupliqué à partir du corps basal posterieur du doublet alors alors que le corps basal antérieur est éliminé en laissant à la membrane les protéines de la zone de transition (d). Le nouveau corps basal vient remplacer le corps basal antérieur puis forme un nouveau cil (e,f).

dégradé. Dans la cellule postérieure, les corps basaux des doublets du champ invariant sont tous néoformés au cours des deux vagues de duplications.

A l'inverse la région la plus postérieure de la cellule mère, composée exclusivement de singlet de corps basaux est hérité par la cellules fille arrière sans qu'aucune duplication n'ait lieu (Iftode et al., 1989)

L'inactivation de protéines impliquées dans les processus de division, de maturation ou d'ancrage des corps basaux, grâce à des outils génétiques simples, affecte sévèrement cette organisation ce qui permet d'identifier rapidement les gènes nécessaires à la biogenèse des corps basaux et des cils chez la paramécie.

3. Les outils

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

Une méthode d'inactivation génique par ARN interférence dite de « feeding » a été mise au point au début des année 2000 (Galvani and Sperling, 2002). Cette méthode consiste à nourrir les paramécies avec des bactéries produisant de longs ARNs double brin (300-500pb en moyenne) qui seront pris en charge par les complexes d'inactivation génique de la paramécie. Cette technique permet de générer de nombreux petits ARNi différents de 23pb qui ciblent le ou les gènes à inactiver sur une large séquence, garantissant une inactivation efficace et rapide. Par conséquent, cette technique permet d'observer les défauts précoces

induits par l'inactivation des gènes d'intérêt dès la première division et sur un grand nombre de cellules.

Il est possible de transformer les paramécies par micro-injection d'ADN dans le macronoyau. Cette technique permet d'exprimer des protéines étiquetées (principalement avec la GFP). En couplant la microinjection d'un gène synthétique avec l'inactivation par ARN interférence, il est possible de réaliser des expériences de complémentations fonctionnelles.

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

L'efficacité des outils associée à la caractérisation rapide des phénotypes ciliaires chez la paramécie en font un excellent modèle d'étude de la ciliogenèse

Chez l'homme de nombreuses protéines ont été identifiées pour jouer un rôle dans la ciliogenèse. Ce processus est complexe et fait intervenir de nombreuses étapes. Ainsi l'absence de formation d'un cil peut être liée à une absence très précoce de migration du centriole en direction de la membrane apicale, ou de son interaction avec une membrane ou enfin un défaut d'élongation des microtubules de l'axonème. Dans les cellules de mammifère il est possible de réussir à déterminer l'étape de la ciliogenèse affectée en réalisant des coupes sériées en microscopie électronique dans le but d'identifier les défauts lors de l'initiation de la ciliogenèse. De plus de nombreuses protéines présentent de multiples localisations communes entre les centrioles et les satellites centriolaires. Il est donc tout à fait possible que ces protéines puissent assurer des fonctions différentes selon leur environnement. Comme dit précédemment, les corps basaux fils sont dupliqués à proximité de la membrane et s'ancrent directement sans étape de migration. Par conséquence, tous les corps basaux sont ancrés à la membrane plasmique. De plus ces corps basaux suivent un schéma d'organisation très précis à la membrane qui permet de discriminer rapidement des défauts d'ancrage, caractérisés par la présence de corps basaux dans le cytoplasme, à des

défauts de positionnement qui perturberaient l'organisation en rangées parallèles des corps basaux. Ces avantages permettent d'identifier facilement chez cet organisme si une protéine est impliquée dans le processus d'ancrage. Dans ce cas, les corps basaux seront incapables de se lier à la membrane et seront observés dans le cytoplasme de la paramécie. Grâce à ce processus, le laboratoire a identifié 5 protéines impliquées dans l'ancrage des corps basaux chez la paramécie

H. Les protéines de cette étude :

a) OFD1

Des mutations portant sur le gène codant la protéine OFD1 ont été identifiées chez des patients atteints du syndrome Oro-facial-digital de type 1 caractérisé par une dysmorphie oro-facial-digital ainsi que des reins polykystiques dûs à des défauts de ciliogenèse. OFD1 possède en N-terminal un domaine LisH (Lis1 homology) alors que sa partie C-terminale est composée de 6 domaines coiled-coil nécessaires pour assurer sa localisation au centrosome (Budny et al., 2006; Coene et al., 2009; Emes and Ponting, 2001; Romio et al., 2004). Les domaines LisH sont présents dans de nombreuses protéines où ils contribuent aux interactions protéines-protéines par leur dimérisation, à la stabilité et/ou à la localisation des protéines (Gerlitz et al., 2005). De plus il a été démontré que le domaine LisH serait nécessaire à la régulation de la dynamique des microtubules (Emes and Ponting, 2001; Ferrante et al., 2003; Gerlitz et al., 2005). Dans le cas de OFD1, des mutations faux sens dans le domaine LisH entraine une élongation des centrioles (Singla et al., 2010). Comme de nombreuses protéines impliquées dans les ciliopathies, OFD1 est localisée au centrosome tout au long du cycle cellulaire (Romio et al., 2004) mais aussi aux satellites centriolaires. Les domaines coiled-coil de OFD1 sont nécessaires pour son interaction avec la protéine des satellites PCM1 alors que la perte du domaine C-terminal de OFD1 entraine la dispersion des satellites centriolaires (Lopes et al. 2010). Au centrosome, elle est plus précisément localisée en partie distale des centrioles et son absence entraine une élongation excessive des microtubules. De plus, L'absence de recrutement de CEP164 chez les mutants OFD1 démontre que OFD1 est nécessaire à l'ancrage des corps basaux à la membrane plasmique (Singla et al., 2010). Dans des travaux plus récents, l'analyse en super-résolution de la protéines OFD1 a révélé que la localisation de OFD1 est légèrement différente entre le centriole père et le centriole

fils. Dans ces travaux, la protéines OFD1 est observée en partie distale des centrioles pères et fils mais le diamètre décrit pour la protéine est plus large sur le centriole père. Néanmoins, la présence de cette/ces protéine/s n'est pas suffisant pour recruter les appendices distaux aux centrioles pères. Des travaux récents démontrent que si les protéines spécifiques du centriole fils ne sont pas éliminées (centrobine, CEP120) ni OFD1, ni les appendices distaux ne seront recrutés au centriole père (Wang et al., 2018).

b) FOPNL

La protéine FOR20/FOPNL n'est impliquée dans aucune ciliopathie. Elle a été identifiée par tBLAST dans le but de rechercher des protéines présentant des homologies de séquences avec la protéine centrosomale FOP (Acquaviva et al., 2009; Popovici et al., 1999). FOPNL partage des homologies de séquence avec FOP dans la partie N-terminal. Parmi les domaines identifiés chez la protéines FOPNL, la partie N-terminale présente des similarités avec la protéine OFD1. Les deux protéines possèdent le même domaine LisH. Le deuxième domaine est un domaine PLL qui n'est pas retrouvé chez OFD1. Ce domaine est nécessaire à la liaison aux microtubules. De manière similaire à OFD1, FOPNL est localisée au centrosome tout au long du cycle cellulaire ainsi qu'aux satellites centriolaires.

L'étude de la déplétion de FOPNL par siRNA dans les cellules RPE1 a permis de démontrer que FOPNL est nécessaire pour le maintien des satellites centriolaires à proximité du centriole ainsi que la formation du cil primaire. Dans les cellules multiciliées, le marquage FOPNL révèle que la protéine est localisée en partie distale du corps, et pourrait correspondre à la zone de transition (Sedjaï et al., 2010).

Des travaux plus récents ont identifié MNR/OFIP/KIAA0753, comme partenaire de FOPNL. Cette protéine est localisée aux centrosomes et aux satellites centriolaires et est impliquée dans les ciliopathies. Les auteurs ont mis en évidence que MNR, FOPNL et OFD1 co-localisent aux centrioles et aux satellites centriolaires et forment un complexe : le domaine C-terminal de MNR interagirait avec les domaines N-terminaux de OFD1 et FOPNL.

En plus du marquage des centrioles et des satellites centriolaires, lorsque que MNR est surexprimée, elle décore aussi les microtubules des cellules. Ce n'est pas le cas lorsque FOPNL ou OFD1 sont surexprimées seules. Alors que lors de la co-expression de MNR, OFD1

et FOPNL, une colocalisation des 3 protéines aux microtubules est observée dans les cellules Cos1 et RPE1 (Chevrier et al., 2016). L'ensemble de ces résultats démontre que la protéine MNR est capable de s'associer aux microtubules et est suffisante pour recruter OFD1 et FOPNL. Ces 3 protéines forment un complexe nécessaire à la formation du cil primaire.

L'association de FOPNL, MNR et OFD1 sous forme de complexe ainsi que leur rôle commun dans la formation du cil primaire pourrait suggérer que la fonction de ces protéines dans la ciliogenèse est similaire. Cependant aucune étude n'a été réalisée chez les mammifères pour prouver cette interprétation.

Chez la paramécie, seules OFD1 et FOPNL sont conservées. L'analyse fonctionnelle de ces deux protéines a révélé que ces protéines sont localisées en partie distale des corps basaux et que leur déplétion entraine des défauts d'ancrage des corps basaux. L'analyse en microscopie électronique des corps basaux internes a révélé des défauts de maturation similaires de la partie distale des corps basaux (Aubusson-Fleury et al., 2012; Bengueddach et al., 2017)

c) CEP90 : un possible partenaire de FOPNL impliquée dans la ciliogenèse.

En utilisant la technique de BioID avec FOPNL comme appât dans les cellules HEK-FLp-TRex, j'ai identifié CEP90 à proximité de FOPNL. De façon similaire à MNR et OFD1, des mutations du gène de CEP90 ont été identifiées chez des patients souffrant de ciliopathie (syndrome de Jeune et Joubert).

Le gène codant la protéine CEP90, aussi appelé PIBF1 (progesterone induced blocking facteur 1), code 4 isoformes. Les isoforme 1 (forme longue de 757 AA) et isoforme 4 (forme courte dépourvue des AA 225 à 683) sont les deux formes les plus étudiées (Figure 20).

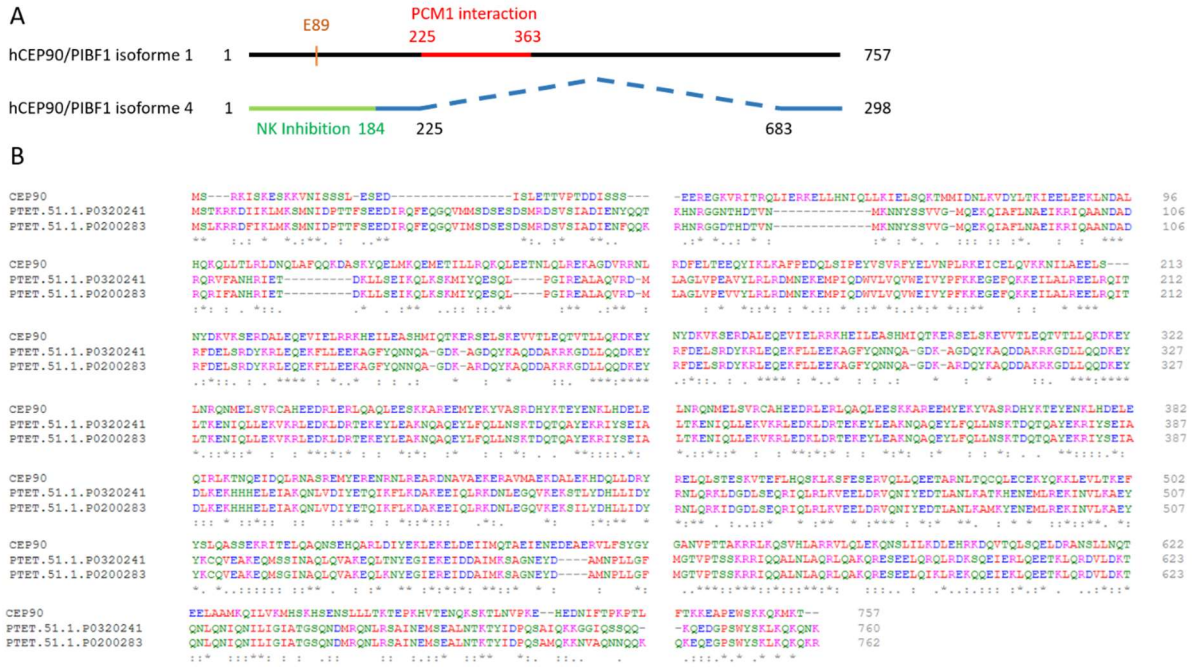


Figure 20 : (A) Schéma de l'alignement des isoformes 1 (forme longue) et 4 (forme courte) humaines de CEP90. L'isoforme 4 se caractérise par l'absence des AA 225-683 et notamment du domaine d'interaction avec la protéine des satellites PCM1 alors que les domaines Nter (1-225 de l'isoforme 1) et Cter(683-757 de l'isoforme1) sont maintenus dans les deux isoformes.

(B)Alignement de l'isoforme 1 de CEP90 avec les deux protéines conservées chez la paramécie. L'identité des deux protéines de paramécie est de 95% ce qui suggère qu'elles sont issues de la dernière duplication globale du génome de la paramécie. Par contre, le pourcentage d'identité entre protéines de paramécie et humaine est d'environ 25%. La forme courte humaine n'est pas conservée chez la paramécie

Les études réalisées sur les isoformes 1 et 4 révèlent que ces deux protéines produites par le même gène possèdent des fonctions très différentes :

(1) L'isoforme 4 est une forme courte et secrétée de PIBF1/CEP90 secrétée au cours de la grossesse par les lymphocyte B. Avant la 37eme semaine de grossesse, la naissance prématurée est lié dans 30% des cas à des inflammations intra-utérines ou des infections systémiques. Des études ont démontré que certains lymphocytes B sont modifiés au cours de la grossesse. L'effet des Lymphocytes B sur le travail prématuré

est étudié sur des souris déficientes en Lymphocyte B. Ces souris ont plus de chance de développer un PTB (preterm labor) en cas d'inflammation comparé à des WT (Ferrarelli, 2017). Le mécanisme par lequel les Lymphocytes B réduisent les inflammations intra-utérines est dépendant de l'isoforme 4 de CEP90/PIBF1. Cette dernière est secrétée par les Lymphocytes B du stroma choriodecicuale en réponse à la progestérone et à l'IL-33 (Huang et al., 2017a). L'injection de la forme secrétée réduit l'apparition d'inflammation intra-utérine. La forme courte de CEP90/PIBF1 induit une réponse immune de type Tg2 en jouant sur la voie JAK/STAT (active la phosphorylation de STAT6 et inhibe STAT4) et possède un effet anti-avortement en régulant l'activité des cellules NK.

(2) L'isoforme 1 que je nommerai CEP90 dans le reste de ma thèse, correspond à la forme longue de CEP90/PIBF. Contrairement à l'isoforme 4, aucune étude ne semble montrer que CEP90 pourrait être secrétée. Au contraire CEP90 se localise au centrosome et aux satellites centriolaires. Une étude en 2012 semble démontrer que CEP90 serait nécessaire à la ciliogenèse en maintenant l'intégrité des satellites centriolaires. Cette étude révèle que CEP90 est capable d'interagir avec PCM1 par un domaine situé entre les AA 271 et 363, cette région n'est pas présente sur l'isoforme 4. La déplétion de CEP90, comme OFD1, entraine une dispersion des satellites (Kim et al., 2012). Le rôle de CEP90 aux satellites a également été étudié dans le laboratoire de Reiter en 2015 (Kodani et al., 2015). Les auteurs ont démontré que CEP90 participe au recrutement de CEP63 aux satellites centriolaires pour permettre la duplication de centrioles. La mutation de l'acide aminé E89, retrouvée chez un patient atteint de microcéphalie, est suffisante pour empêcher le recrutement de CEP63 aux centrioles.

L'étude de la conservation de CEP90/PIBF1 chez la paramécie a révélé que seule la forme longue est conservée chez cet organisme.

I. Les objectifs de la thèse

L'ensemble des résultats obtenus dans les cellules de mammifères montrent que les protéines MNR et OFD1 sont impliquées dans l'ancrage des corps basaux à la membrane. Dans les cellules de mammifères, il est montré que la protéine FOPNL, i) se localise de manière similaire à OFD1 et MNR, ii) sa déplétion conduit à des défauts de formation de cils primaire ciliogenèse iii) interagit avec les protéines MNR et OFD1 suggère que FOPNL serait comme les autres membres du complexe impliqué (MNR et OFD1) dans l'ancrage des corps basaux. Chez la paramécie, l'équipe a montré l'implication de la protéine FOPNL dans l'ancrage des corps basaux. Les corps basaux des cellules déplétées en FOPNL présentent des défauts d'assemblage de la partie distale du corps basal. Ces défauts sont à rapprocher de ceux observés chez la paramécie suite à la déplétion de la protéine OFD1. L'ensemble de ces résultats montre que l'utilisation en parallèle du modèle paramécie et des cellules de mammifères est un atout pour l'étude de l'ancrage des corps basaux à la membrane. Mon travail de thèse consistait à découvrir de nouveaux acteurs de l'ancrage des corps basaux.

Identifier de nouveaux acteur de l'ancrage

Chez la paramécie, quatre protéines CEN2, FOPNL, OFD1 et CEN3, sont nécessaires à l'ancrage des corps basaux à la membrane. Le laboratoire a montré que ces 4 protéines interviennent simultanément pour permettre l'ancrage des corps basaux. L'analyse par microscopie électronique des défauts d'assemblage des corps basaux suite à la déplétion de chacune de ces protéines et l'étude de la cinétique de recrutement de ces protéines au corps basal après déplétion de l'une et analyse du marquage des autres ont permis de démontrer que Cen2 intervient en premier, suivi par FOPNL et OFD1 et enfin par Cen3. Le projet de ma thèse a été d'identifier de nouveaux acteurs intervenant dans ce processus et de tirer parti de la complémentarité de la paramécie et des cultures de cellules de mammifères pour réaliser leur analyse fonctionnelle.

Pour identifier de nouvelles protéines impliquées dans l'ancrage des corps basaux, nous avons tiré parti de la technique de BioID. Cette technique permet l'identification par biotinylation *in vivo* de l'ensemble des protéines situées dans l'environnement proche (15nm) d'une protéine appât. Cette biotinylation est permise grâce à une forme mutante de la biotine ligase bactérienne BirA* fusionnée à notre protéine d'intérêt. Après culture des

cellules en présence de biotine, les protéines à proximité de la protéine de fusion « protéine appât BirA* » seront biotinylées. La biotinylation est une modification post-traductionnelle très rare. Par conséquence cette technique permet l'isolement de protéines d'intérêt par une simple colonne d'affinité à la biotine. Nous avons raisonné que les protéines à proximité de la protéine appât elle-même impliquée dans l'ancrage des corps basaux devaient être impliquées dans l'ancrage des corps basaux. Dans le cadre de ma thèse, nous avons choisis d'utiliser la protéine FOPNL puisque, chez la paramécie, elle est recrutée en position intermédiaire dans la séquence des protéines impliquées dans l'ancrage. La recherche de partenaires par BioID a été réalisée dans les cellules HEK293. L'identification par spectrométrie de masse nous a permis d'identifier la protéine CEP90/PIBF1. Nous avons décidé d'étudier cette protéine car i) cette protéine est conservée chez la paramécie ; ii) des mutations dans le gène encodant CEP90 conduisent à des ciliopathies sévères (Jeune et Joubert syndrome). L'étude fonctionnelle de CEP90 et les relations avec ses partenaires ont été réalisées chez la paramécie puis dans les cellules de mammifères.

II. Résultats

A. CEP90, FOPNL et OFD1 forment un complexe fonctionnel nécessaire au recrutement des appendices distaux.

Dans le but d'identifier de nouvelles protéines impliquées dans l'ancrage des corps basaux, des lignée HEK 293 Flp T-Rex permettant l'expression tétracycline-dépendante des constructions myc-BirA* seule ou myc-BirA*-FOPNL ont été établies. La protéine de fusion myc-BirA*-FOPNL présente une localisation aux centrioles et aux satellites centriolaires similaire à FOPNL endogène. Par la technique de BioID, nous désirons identifier les protéines à proximité de la fraction centrosomale de FOPNL car c'est cette fraction qui est impliquée dans l'ancrage du corps basal. Pour cette raison nous avons décidé de réaliser des purifications de noyaux-centrosomes consistant en l'isolement des centrosomes associés aux enveloppes nucléaires mais dépourvus de leur contenu ADN et ARN, effectués par des traitements DNAse et RNAse (« fantôme de noyaux »). Cette méthode contrairement à la purification des centrosomes présente un rendement de 95%. Les lignées exprimant myc-BirA* et myc-BirA*-FOPNL ont été induites pendant 24H à la tétracycline en présence de biotine (Figure 21 A). Les complexes noyaux-centrosomes issus de ces deux lignées ont été purifiés puis lysés suivant le protocole de Roux (Roux et al., 2012). Des billes magnétiques recouvertes de streptavidine sont ensuite utilisées pour capturer par affinité les protéines biotinylées dans chaque condition. Les protéines isolées ont été analysées par spectrométrie de masse. Puis les résultats obtenus sont analysés en comparant les protéines biotiniylées des échantillons contrôles myc-BirA* à celles de myc-BirA*-FOPNL.

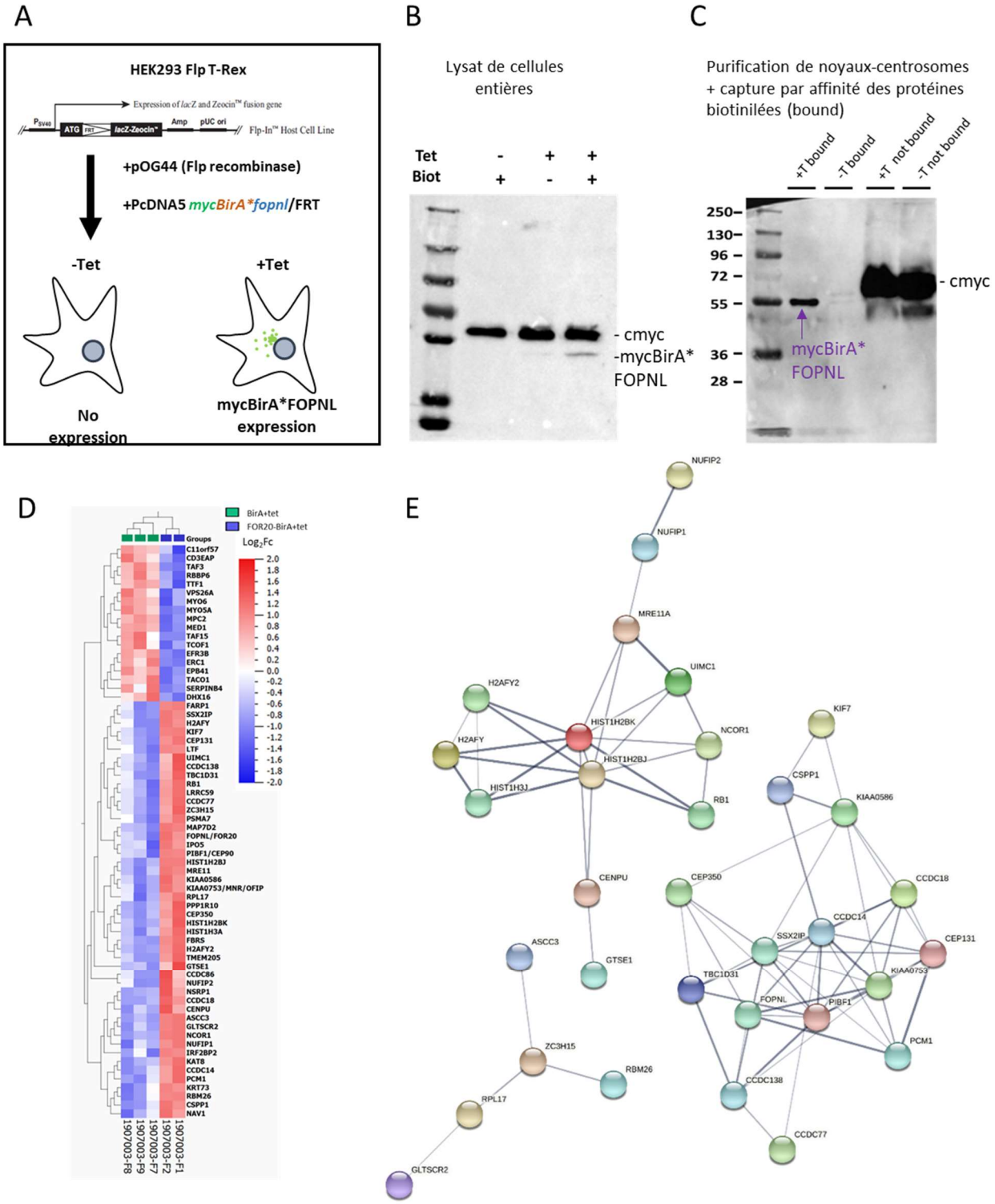


*Figure 21 : A : établissement de la lignée HEK293 Flp T-Rex mycBirA*FOPNL inductible à la tétracycline. B western blot sur lysat de cellules HEK293 Flp T-Rex mycBirA*FOPNL entière après induction à la tétracycline (Tet +) et en présence de biotine (Biot +) révélé par un anticorps dirigé contre myc. La bande majoritaire correspond à la protéine cmyc endogène. La protéine mycBirA*FOPNL est faiblement détectée dans les conditions Tet +. C : purification des noyaux centrosomes de cellules HEK293 Flp T-Rex mycBirA*FOPNL après induction(+T) ou non (-T) suivie de la capture par affinité des protéines biotiniliées sur billes de streptavidine (bound). La protéine mycBirA*FOPNL est observée dans la fraction*

*associée aux billes de streptavidine. D : Heatmap des protéines identifiées dans les conditions mycBirA*FOPNL+tet comparées à mycBirA* +tet grâce au logiciel Qlucore. Les protéines sont filtrées sur la base d'une p-value <0.05 et d'un facteur d'enrichissement>5. L'enrichissement des protéines est transformé en log_2 puis interprété en gradient de couleurs. E Réseau d'interaction des protéines enrichies dans la fraction mycBirA*FOPNL+tet comparées à mycBirA* +tet filtrées sur la base d'une p-value <0.05 et d'un facteur d'enrichissement>5. Le réseau a été créé grâce au logiciel STRING DB. Les figures D et E ainsi que l'analyse par spectrométrie de masse ont été réalisé par T. Léger, L. Lignieres et G. Chevreux de l'institut Jacques Monod.*

Parmi les protéines enrichies dans la fraction myc-BirA*-FOPNL, de nombreuses protéines des satellites centriolaires ont été identifiées (PCM1, CEP131) ainsi que des partenaires connus de FOPNL tel que MNR (Figure 21 D). Dans le but d'identifier de nouveaux acteurs de l'ancrage des corps basaux j'ai sélectionné les deux critères suivant : l'implication de la protéine dans des ciliopathies et la conservation chez la Paramécie afin de permettre un crible rapide. J'ai ainsi décidé de me concentrer sur la protéine CEP90. Ayant participé à une formation de la technique de microscopie à expansion : « Ultrastructural expansion microscopie (U-ExM) » réalisée par le labo Guichard-Hamel avec Marine Laporte et Davide Gambarotto, j'ai ensuite adapté cette technique au cortex de paramécie. La microscopie à expansion est un protocole d'imagerie qui permet d'améliorer la résolution finale d'une image sur un microscope confocal standard en agrandissant physiquement un échantillon biologique à l'aide un gel d'acrylate de sodium. Les premiers résultats concernant la localisation de CEP90 en microscopie à expansion, ont été obtenus lors de cette formation.

Les résultats obtenus lors de ma thèse ont permis d'écrire un article actuellement en révision.

The ternary complex CEP90, FOPNL and OFD1 specifies the future location of centriolar distal appendages, and promotes their assembly

Résumé :

Les études préliminaires ont révélé que des mutations dans le gène de *cep90* sont à l'origine de deux types de ciliopathies : le syndrome de Jeune et le syndrome de Joubert. L'analyse par la technique U-ExM (ultrastructural expansion microscopy) a révélé que CEP90, FOPNL et OFD1 sont localisées à l'extrémité distale des centrioles et des corps basaux chez la Paramécie et dans les cellules de mammifères. Ces protéines sont recrutées précocement sur le procentriole. L'analyse fonctionnelle réalisée à la fois chez la Paramécie et les cellules

de mammifère a démontré que FOPNL, CEP90 et OFD1 forme un complexe fonctionnel nécessaire à l'assemblage des appendices distaux (fibres de transition) et à l'ancrage du corps basal à une membrane cellulaire. L'ensemble de ces résultats suggère que ces protéines sont assemblées précocement sur le centriole fils afin de permettre l'assemblage des appendices distaux. Nous avons proposé que le complexe FOPNL, CEP90, OFD1 permettait de marquer la position future des appendices distaux.

J'ai réalisé la majeure partie du travail publié dans cet article grâce à l'aide de Anne-Marie Tassin et de Logan Greibill. Les acquisitions en microscopie électroniques ont été réalisée par Michel Lemullois et Marine Laporte a effectué les images de microscopie à expansion de CEP90 et OFD1 en cellules de mammifères ainsi que les mesures de localisation de FOPNL, CEP90 et OFD1 sur les 2 modèles d'études.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

The ternary complex CEP90, FOPNL and OFD1 specifies the future location of centriolar distal appendages, and promotes their assembly

Pierrick Le Borgne[1], Marine Hélène Laporte[2], Logan Greibill[1], Michel Lemullois[1], Mebarek Temagoult[3], Olivier Rosnet[4], Maeva Le Guennec[2], Laurent Lignières[5], Guillaume Chevreux[5], France Koll[1], Virginie Hamel[2], Paul Guichard[2], Anne-Marie Tassin[1]

1- Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France

2- University of Geneva, Department of Cell Biology, Geneva, Switzerland

3- Imagerie-Gif Light facility, Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France

4- Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Aix Marseille Univ, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, 13009 Marseille, France.

5- ProteoSeine@IJM, Université de Paris/CNRS, Institut Jacques Monod, 75006 Paris, France

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Abstract

Cilia assembly starts with centriole to basal body maturation, migration to the cell surface and docking to the plasma membrane. The basal body docking process involves the interaction of both the distal end of the basal body and the transition fibers (or mature distal appendages), with the plasma membrane. During this process, the transition zone assembles and forms the structural junction between the basal body and the nascent cilium. Mutations in numerous genes involved in basal body docking and transition zone assembly are associated with the most severe ciliopathies, highlighting the importance of these events in cilium biogenesis.

The conservation of this sequence of events across phyla is paralleled by a high conservation of the proteins involved. We identified CEP90 by BioID using FOPNL as a bait. Ultrastructure expansion microscopy showed that CEP90, FOPNL and OFD1 localized at the distal end of both centrioles/basal bodies in *Paramecium* and mammalian cells. These proteins are recruited early after duplication on the procentriole. Finally, functional analysis performed both in *Paramecium* and mammalian cells demonstrate the requirement of this complex for distal appendage assembly and basal body docking. Altogether, we propose that this ternary complex is required to determine the future position of distal appendages.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Introduction

The centrosome is the main microtubule organizing center in most animal cells. It is composed of two centrioles, microtubules based organelles displaying a nine-fold symmetry, surrounded by layers of pericentriolar material (Paintrand *et al*, 1992), (Tassin & Bornens, 1999), (Mennella *et al*, 2014). A structural asymmetry between the two centrioles is observed, the mother one, bearing distal and subdistal appendages, while the daughter lacks these appendages (Paintrand *et al*, 1992). In resting cells, the mother centriole matures into a basal body (BB), which functions as a platform to template the assembly of a cilium. Cilia can be found at the cell surface either unique or in multiple copies, motile or unmotile (Mitchison & Valente, 2017). They are highly conserved organelles from protist to mammalian cells in terms of structure and protein composition (Vincensini *et al*, 2011). In all cases, cilia possess mechano- and chemo-sensitivity properties. In addition, motile cilia beat to generate a flow such as cerebral fluid (brain ventricle), mucus (respiratory tract) or the forces required to propulse the cells (spermatozoid, ovum, unicellular organisms) (Mitchison & Valente, 2017).

Ciliogenesis is a multistep process involving: BB duplication, migration to the cell surface and anchoring of the mother centriole, followed by ciliary growth. These steps are common to all systems, although variations in some steps may exist between different organisms or between cellular types within a given organism, (Sorokin, 1962), (Garcia-Gonzalo & Reiter, 2017), (Wiegering *et al*, 2018), (Vieillard *et al*, 2016). The conservation of this sequence of events across phyla is paralleled by a high conservation of the proteins involved (Vincensini *et al*, 2011), (Jana *et al*, 2014).

The BB anchoring process, which occurs both during ciliogenesis and formation of the immunological synapse, requires the tethering between the distal appendages, which in mammalian cells contain Cep83, Cep89, SCLT1, FBF1 and Cep164 (Tanos *et al*, 2013), (Joo *et al*, 2013), (Failler *et al*, 2014), (Yang *et al*, 2018) and a membrane. This membrane could be either Golgi-apparatus derived-vesicles membrane that fuse together to form the ciliary shaft, as in most metazoan cells, or the plasma membrane

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

directly as in some mammalian cell types such as the immunological synapse (Stinchcombe *et al*, 2015) or in *Paramecium*. The interaction of the BB with the membrane leads to the formation of the transition zone (TZ), bridging the BB to the axoneme, which has recently been recognized to act as a diffusion barrier between the intracellular space and the cilium, defining the ciliary compartment (Reiter *et al*, 2012), (Gonçalves & Pelletier, 2017). Mutations in genes encoding proteins localized at the BB distal end, distal appendages and TZ lead to various syndromes in humans, called ciliopathies, (Oro-facial-digital, Nephronophtysis, Joubert), reinforcing the importance to study and understand how these structures and the proteins that compose it are controlling ciliogenesis (Singla *et al*, 2010), (Lopes *et al*, 2011a), (Thauvin-Robinet *et al*, 2014), (Failler *et al*, 2014), (Chevrier *et al*, 2016).

The ternary complex composed of OFD1 (Lopes *et al*, 2011), FOPNL/FOR20 (Sedjaï *et al*, 2010) and OFIP/MNR/KIAA0753 (Kodani *et al*, 2015), (Kumar *et al*, 2021) has been localized in mammalian cells at the centriole distal end and at the centriolar satellites, membrane-less cytoplasmic granules that concentrate in the vicinity of the centrosome (Kubo & Tsukita, 2003). OFIP was shown to interact directly with FOPNL and OFD1 (Chevrier *et al*, 2016), two proteins required for building the distal end of the basal bodies and for the anchoring process in both mammalian cells (Singla *et al*, 2010), (Thauvin-Robinet *et al*, 2013) and *Paramecium* (Aubusson-Fleury *et al*, 2012), (Bengueddach *et al*, 2017). In mammalian cells, the dual location of these proteins at both distal end and centriolar satellites (Sedjaï *et al*, 2010),(Singla *et al*, 2010) (Chevrier *et al*, 2016) prevents from determining, which pool is involved in BB anchoring process, since centriolar satellites are also involved in cilia formation (Sedjaï *et al*, 2010), (Stowe *et al*, 2012). Interestingly, a recent study using satellites-less PCM1-/- cells demonstrated that the centriolar pool of the complex composed of MNR, OFD1 and CEP90 is crucial for ciliogenesis (Kumar et al. 2021). In this paper, we turn to *Paramecium* as a physiological model, devoid of centriolar satellites, as far as we can tell from electron microscopy studies and by the absence of PCM1 orthologues, to further demonstrate the requirement and the evolutionary conservation of the BB distal end proteins FOPNL/FOR20 together with OFD1 and CEP90 in the BB anchoring process (Aubusson-Fleury *et al*, 2012), (Bengueddach *et al*, 2017).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

However, the function in ciliogenesis of OFIP/MNR/KIAA0753 in *Paramecium* is not conserved (Koll, personal communication), despite the presence of a small conserved domain (Chevrier *et al*, 2016).

Paramecium tetraurelia is a free-living unicellular organism, easy to cultivate that bear at its surface ca. 4000 cilia. The corresponding BB are arranged in longitudinal rows, and their polarity is marked by the asymmetrical organization of their associated appendages (Iftode *et al*, 1989), (Tassin *et al*, 2015). In *Paramecium*, BB organization is highly precise, with regions composed of units with singlet or doublet BB. Units with doublets BB can display either 2 ciliated BB or a ciliated and an unciliated one (Iftode *et al*, 1989). Interestingly, the TZ matures biochemically and structurally between the two states (Gogendeau *et al*, 2020). Unlike metazoa, there is no centriolar stage in *Paramecium:* new BB develop from the docked ones. Once duplicated, they just have to tilt-up for anchoring directly at the surface. Due to the high number of BB at the cell surface, defective BB anchoring process is easily detected in *Paramecium* by immunofluorescence (IF), making of *Paramecium* an outstanding model to characterize new partners in the BB anchoring process. As a proof of concept, we demonstrated the functional conservation of both FOPNL (Aubusson-Fleury *et al*, 2012) and OFD1 (Bengueddach *et al*, 2017) in BB anchoring process in *Paramecium.*

In order to identify new proteins involved in BB docking, we reasoned that proteins located at proximity of a known BB anchoring protein could be acting in the same process. Therefore, we identified proteins at proximity of FOPNL/FOR20 proteins by BioID in human cells followed by mass spectrometry. Among the candidate proteins, we focused our study on, CEP90/PIBF1, whose mutations in the *CEP90* gene lead to both Jeune and Joubert (Wheway *et al*, 2015), (Shen *et al*, 2020) syndromes suggesting defective ciliogenesis. In addition, CEP90 is conserved from protist to Human, despite being absent in some groups as drosophilidae or rabditidae. Functional analysis performed both in *Paramecium* and mammalian cells using RNAi demonstrates the involvement of CEP90 in the BB anchoring process. We show that CEP90 is required to build the distal end of the BB, as previously shown in *Paramecium* for OFD1 and FOPNL/FOR20. Using ultrastructure expansion microscopy (U-ExM), we demonstrate that CEP90 and

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

OFD1 proteins localize, in both Paramecium and U2OS cells, at the distal end of BB in a 9-fold symmetry. Both CEP90 and OFD1 associate early with nascent procentrioles in human cells and stay associated with their distal tips during centrioles elongation, as already known for FOPNL and OFD1 in *Paramecium* (Aubusson-Fleury *et al*, 2012), (Bengueddach *et al*, 2017). We demonstrate that CEP90 is recruited at the centriolar distal end together with OFD1 and FOPNL both in *Paramecium* and mammalian cells. The early recruitment of both CEP90 and OFD1 on procentrioles, led us to propose that these proteins specify the future distal appendage location. We show that CEP90 together with FOPNL and OFD1 are necessary to recruit distal appendages proteins in mammalian cells. In conclusion, our results demonstrate that these proteins build the centriole/BB distal ends and allow BB docking at cell membrane.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Results

To discover novel proteins involved in the BB anchoring process, BioID was performed using FOPNL as a bait in human cells. To do so, Flp-In HEK293 cells expressing myc-BirA*-FOPNL under the control of the tetracycline repressor were generated. Centrosomal biotinylated proteins were purified on streptavidin beads and analyzed by mass spectrometry. Candidates were ranked according to their fold change and p-value. According to these criteria, several known BB anchoring proteins such as Talpid3 (Kobayashi *et al*, 2014), OFIP/MNR/KIAA0753 (Chevrier *et al*, 2016), PCM1 (Sedjaï *et al*, 2010) were enriched in our mass spectrometry validating our approach (see Table S1). In addition, some novel potential interactors were found. We focused further our functional analysis on the candidate centriolar protein CEP90/PIBF1 as: i) *Cep90* gene was found mutated in ciliopathies (Wheway *et al*, 2015).; ii) *Cep90* is well conserved from unicellular to mammalian cells.

Paramecium CEP90-GFP localizes to basal body

As *Paramecium* appears as an outstanding model to decipher the BB anchoring process, we searched for CEP90 homologs in *Paramecium tetraurelia*. Two CEP90 homologs, CEP90a and CEP90b, derived from the last whole genome duplication (Aury *et al*, 2006) were identified. RNAseq analysis of the *P. tetraurelia* transcriptome during vegetative growth revealed that CEP90a is 24x more expressed than CEP90b (Arnaiz *et al*, 2010, and paramecium.i2bc.paris-saclay.fr).

To ascertain the localization of CEP90 in *Paramecium*, we expressed CEP90a-GFP-tagged, since it is the most expressed protein, under the control of the constitutive calmodulin gene-regulatory elements. After transformation, rows of GFP dots were observed on transformants displaying a wild type growth rate and phenotype (Figure 1A). Labelling with an antibody directed against tubulin poly-glutamylation (poly-E), which decorates BB (Gogendeau et al, 2020), showed that this GFP signal corresponded to the BB (Figure 1A). This staining is reminiscent of the GFP-FOPNL (Figure 1B) and OFD1-GFP staining (Aubusson-Fleury *et al*, 2012), (Bengueddach *et al*, 2017), as expected for a proximity partner. A careful

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

observation of the GFP staining pattern relative to the BB, revealed that all BB are decorated, i.e., ciliated and unciliated, (Figure 1A, magnification), unlike the GFP-tagged MKS and NPHP protein complex, which stained only ciliated BB (Gogendeau *et al*, 2020). Double labelling of CEP90-GFP cells using poly-E antibodies and anti-epiplasm (Jeanmaire-Wolf *et al*, 1993), a superficial cytoskeleton layer, which embeds the BB, revealed that the CEP90-GFP staining is restricted at BB distal ends (Figure 1A', magnification) similar to GFP-FOPNL staining (Figure 1B', magnification).

The ternary complex CEP90, FOPNL and OFD1 localizes at the basal body distal ends in a 9-fold symmetry in Paramecium

To characterize more precisely the localization of CEP90 together with FOPNL and OFD1, we used U-ExM (Gambarotto *et al*, 2019), (Gambarotto *et al*, 2021). Since *Paramecium* is 150 µm long and 50µm thick, U-ExM was performed on isolated cortexes (Le Guennec *et al*, 2020) from *Paramecium* expressing GFP-FOPNL, CEP90-GFP or OFD1-GFP to allow a nanoscale localization of these proteins within the structure (Figure 1C-G). During cortex purification, we observed ciliary shedding just above the TZ (Figure S1A), as it is known to occur in physiological conditions (Adoutte *et al*, 1980), (Gogendeau *et al*, 2020). Double stained longitudinally oriented BB show that in CEP90-GFP paramecia, the GFP staining was located either at the top of the BB assessed by the anti-tubulin staining (Figure S1B, yellow arrowhead) or slighlty underneath (Figure 1C, S1B). This observed difference could be associated with the ciliation status, since ciliated BB showed a longer TZ with extended microtubule doublets than unciliated ones (Figure S1A); (Tassin *et al*, 2015), (Gogendeau *et al*, 2020). Therefore, we propose that the staining is found at the proximal part of the TZ on all BB and the observed tubulin staining above the GFP staining might be associated to ciliated BB (Figure 1C-E, Figure S1) and would correspond to the elongation of the TZ that occurs during ciliogenesis. Longitudinally oriented BB stained for OFD1-GFP (Figure 1D, Figure S1C) and GFP-FOPNL (Figure 1E, Figure S1D-E) BB show a similar pattern than CEP90-GFP, suggesting that these three proteins localized at the end of the BB or at the proximal part of the TZ (Figure 1C-E, F). Moreover, analysis of the protein's positions along the microtubule wall indicated that all three proteins

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

localize at the same average position at around 425 nm from the proximal extremity (Figure 1F). Observations on top-viewed BB showed that the three proteins were organized in a 9-fold symmetry, close to the microtubule wall but externally (Figure 1C', D', E'). Quantification of the distance between both GFP and tubulin maximal intensity signal of the rings revealed that CEP90-GFP, OFD1-GFP and GFP-FOPNL localized close to the microtubule wall with CEP90 and FOPNL appearing at around 15 nm away from the microtubule wall, while OFD1 was at around 30 nm, suggesting that OFD1 is more external than the 2 others (Figure 1G). This localization was further refined by immunogold staining of CEP90-GFP on whole permeabilized cells in which the gold particles were found mostly at the level of the TZ, close to the microtubular wall (Figure 1I-K). Counting of gold particles confirmed that most of the particles are localized at the proximal part of the TZ (65%) (Figure 1J).

CEP90 depletion prevents basal body docking in Paramecium

Since CEP90 was found at proximity of FOPNL by BioID and localized similarly as OFD1-GFP and GFP-FOPNL, we predicted that it will be involved in BB anchoring through its contribution in building the BB distal end. To test this hypothesis, we first decided to knock-down *CEP90* in *Paramecium* by feeding wild-type cells with dsRNA-producing bacteria to induce RNA interference (Galvani & Sperling, 2002). As a control, we inactivated the unrelated gene *ND7*, involved in the exocytosis of trichocystes, using the same protocol. The high percentage of identity between *CEP90a* and *CEP90b* genes made difficult to design RNAi constructs to inactivate each gene individually. Therefore, we silenced them both together. The efficiency of the vector to inactivate its target was tested by verifying the effective depletion of GFP-CEP90a by immunofluorescence (Figure 2B, Figure S2A). *CEP90* knock-down induced a slowdown of cellular growth and cellular death after 3/4 divisions (Figure S2B). A modification of the cell size and cell shape was observed from the first division. *Paramecia* appeared smaller and rounder after *CEP90* inactivation (Figure 2A,CEP90^{RNAi}). The swimming velocity was also reduced, as previously observed for defective BB (Figure S2C, Gogendeau et al, 2020). To analyze the effects of the depletion on the BB, inactivated cells were labeled for BB using poly-E antibodies. Whereas, control depleted cells (Ctrl RNAi)

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

display BB at the cell surface organized in longitudinal rows (Figure 2A, cortex), Cep90-depleted cells show misaligned BB at the cortical surface (Figure 2A, CEP90^{RNAi}). Confocal microscopy demonstrated that numerous BB were found in the cytoplasm after CEP90 depletion, suggesting BB anchoring defects (Figure 2A', CEP90^{RNAi}), while none were observed in control depleted cells (Figure 2A', Ctrl^{RNAi}). To ascertain the specificity of this phenotype, RNAi resistant CEP90a-GFP transformants were inactivated by CEP90a/b RNAi. GFP staining of RNAi resistant CEP90-GFP transformants decorated BB as revealed by poly-E antibodies as CEP90-GFP (Figure 2C cortex, magnification). In addition, cytoplasmic aggregates were observed most probably due to the protein overexpression (Figure 2C cytoplasm and magnification). Cells were then analyzed for swimming velocity, cell viability and BB organization. RNAi resistant GFP-CEP90a paramecia inactivated for CEP90 divide about 4 times a day, as controldepleted cells, and do not die anymore (Figure S2B). Similarly, the swimming velocity of RNAi resistant CEP90a-GFP paramecia was also restored (Figure S2C). Finally, the expression of RNAi resistant CEP90a-GFP on CEP90-depleted cells rescue BB organization at the cell surface (Figure 2C). Those cells display longitudinal rows of BB (Figure 2C), while CEP90a-GFP transformants inactivated for CEP90 display numerous BB in the cytoplasm (Figure 2B). The misaligned BB at the cell surface and cytoplasmic BB observed after CEP90 depletion is reminiscent of the phenotypes observed after depletion ofeither of FOPNL or OFD1 depletion (Figure 2 A, A', FOPNL^{RNAi}) and (Aubusson-Fleury *et al*, 2012) (Bengueddach *et al*, 2017)). Altogether, these results suggest that CEP90 is involved in BB anchoring process in *Paramecium*.

To understand this BB anchoring defect, we analyzed by electron microscopy the ultra-structure of the undocked BB. Control depleted cells show BB anchored at the cell surface and displaying the characteristic three plates of the BB TZ (arrowheads on Figure 3A). In contrast, in CEP90 depleted cells, numerous BB were lying in the cytoplasm. All of them, display defective distal ends with vestigial structures resembling the intermediate (blue arrowhead) and axosomal (magenta arrowhead) plate, while the terminal plate (green arrowhead) was mostly absent (Figure 3B-E). Occasionally, microtubule extensions were observed on the uncapped side of the BB (Figure 3E, white arrow).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

In mammalian cells, CEP90 seems required for centrosome duplication (Kodani *et al*, 2015). Therefore, we decided to determine if it was also required for BB duplication in *Paramecium*. CEP90 depleted cells undergoing their second division under silencing conditions were stained for BB. The depletion of CEP90 did not disturb BB duplication, as demonstrated by the characteristic longitudinal groups of three or four BB issued from parental groups of two (Figure S3). This result suggests that in *Paramecium* CEP90 is not involved in the BB duplication process.

Taken together, these results indicate that CEP90 in *Paramecium* is required to build the distal ends of BB, which is necessary to dock the BB at the cell surface, as already observed for both FOPNL and OFD1.

CEP90, FOPNL and OFD1 are required for basal body distal end assembly in Paramecium

In *Paramecium*, like FOPNL (Aubusson-Fleury *et al*, 2012), and OFD1 (Bengueddach *et al*, 2017), Centrin2 (Ruiz *et al*, 2005), have been shown to be required to assemble the BB distal end. Centrin2 is recruited first and initiates the assembly of the three plates found at the BB distal end of the TZ. This step is followed by a co-recruitment of both FOPNL and OFD1 (Aubusson-Fleury *et al*, 2012) (Bengueddach *et al*, 2017). Finally, Centrin3 is recruited to allow the tilting-up of the BB after duplication in order to let the BB to anchor (Jerka-Dziadosz *et al*, 2013). BB of Centrin3-depleted cells are nicely assembled, and display the three plates of the TZ, characteristic of unciliated docked BB.

To determine the involvement of CEP90 in distal end assembly, paramecia expressing GFP-tagged proteins (Centrin2, CEP90, OFD1, FOPNL) were inactivated by either Centrin2, OFD1, FOPNL, CEP90 and Centrin3 RNAi as well as control RNAi. The fate of fluorescence in each transformed cells was followed after two/three divisions under RNAi conditions by immunostaining (Figure 4A) and the remaining fluorescence was quantified in each case (Figure 4B-D). The recruitment of CEP90-GFP to BB, required the presence of FOPNL and OFD1 (Figure 4A, 4B). Reciprocally, CEP90 depletion prevented the recruitment of GFP-FOPNL (Figure S4A, S4B) and OFD1-GFP (Figure 4A, 4D). As expected from this

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

result, cells depleted for FOPNL, OFD1, or CEP90 maintained the recruitment of Centrin2 on newly formed BB (Figure 4A, C). We demonstrated that Centrin2 depletion prevented the recruitment of CEP90 and OFD1 to the newly formed BB (Figure S4C, Figure 4B, 4D). By contrast, the depletion of Centrin3, which is not involved in the distal end assembly, did not affect the recruitment of Centrin2-GFP, CEP90-GFP and OFD1-GFP (Figure S4D, Figure 4 B-D). Therefore, we propose that CEP90-GFP, GFP-FOPNL and OFD1-GFP are co-recruited at the BB to assemble its distal end.

Altogether, these results obtained in *Paramecium* show that CEP90, FOPNL and OFD1 localize similarly as suggested by the U-ExM. The interdependent recruitment of this ternary complex is involved in BB distal end maturation, allowing the BB anchoring process.

Mammalian CEP90 and OFD1 localize at the distal end of mother and daughter centrioles as well as procentrioles

To investigate the functional conservation of CEP90 throughout the evolution, we analyze CEP90 function in mammalian cells. In RPE1 cells, CEP90 localizes, at centrioles and centriolar satellites, as previously shown by Kodani *et al*, (2015) reminiscent of FOPNL (Sedjaï *et al*, 2010) and OFD1 (Lopes *et al*, 2011) (Figure 5A, B and Figure S5A). To assess the function of CEP90 during mammalian ciliogenesis, we first use U-ExM to resolve its localization at nanoscale resolution. We observed first that, in dividing cells, the endogenous CEP90 or OFD1 longitudinal fluorescence signal is restricted to the centriolar distal end as compared to the tubulin signal, which depicts the whole centriolar length (Figure 5C, D, F and G). The precise measurement of both CEP90 and OFD1 staining revealed that these two proteins localize on the two parental centrioles at about 375 nm from their proximal centriolar extremity (Figure 5I), about 50nm from their distal end of the centrioles. From top-viewed centrioles, we observed a staining organized in a 9-fold symmetry close to the external surface of the centriolar microtubule wall (Figure 5 E, H, J). The measurements of both CEP90 and OFD1 stainings relative to the tubulin maximal intensity signal show that CEP90 is slightly closer to the microtubule wall than OFD1 (average distance between CEP90 and

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

tubulin about 30 nm, while OFD1 is about 40 nm) (Figure 5 K). Unfortunately, we have not been able to localize FOPNL using U-ExM, since our antibodies were not working under these conditions. Importantly, the analysis of both CEP90 and OFD1 staining during centriole duplication showed that both proteins were recruited on procentrioles (Figure 5C, D, F, G). Altogether, these results obtained by U-ExM demonstrate that the nanometric localization of both CEP90 and OFD1 in mammalian cells is similar to the one observed in *Paramecium,* the slight differences being most probably due to the fact that in *Paramecium* cells, BB are anchored at the cell membrane, whereas in mammalian cells, our observations arise from non-ciliated centrioles. The conserved localization between two evolutionary distant organisms might suggest a conserved function.

The co-recruitment of CEP90, FOPNL, OFD1 is required for the formation of distal appendages

Next, we investigated the hierarchy of recruitment of these three proteins to the centriole distal end in RPE1 cells. We first inactivated either *CEP90* or *FOPNL* gene using 2 sets of siRNA for each gene and found a significant reduction in CEP90 (about 80%) and FOPNL (about 90%) levels respectively at the centrosome (Figure 6A-C) demonstrating the efficiency of the siRNA, as previously reported (Kodani *et al*, 2015), (Sedjaï *et al*, 2010). Next, we analyzed the recruitment of CEP90, FOPNL and OFD1 to the centrioles upon depletion of CEP90 or FOPNL. We demonstrated that the recruitment of endogenous FOPNL and OFD1 at the centrosome was decreased of about 66% upon CEP90 depletion (Figure 6A, B, D). Similarly, the depletion of FOPNL decrease the localization of both CEP90 and OFD1 to the centrioles of about 66% (Figure 6A, C, D). These results suggest that the inter-dependant recruitment of CEP90, FOPNL, OFD1 to centrioles and BB is conserved in *Paramecium* and mammalian cells.

To gain further insights into the role of CEP90, OFD1 and FOPNL in ciliogenesis, we depleted either CEP90 or FOPNL protein in serum-starved RPE1 cells. As expected from previous results (Kim *et al*, 2012), (Sedjaï *et al*, 2010), (Chevrier *et al*, 2016), we observed a significant decrease in cilia formation (about 66% compared to control siRNA) (Figure S5B) for both CEP90 and FOPNL siRNA treated cells.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Since we demonstrated in *Paramecium* that the ternary complex is involved in BB docking by affecting the BB distal end, we investigated the formation of distal appendages after depletion of one member of the complex. Distal appendage formation requires both removal of daughter specific proteins (Wang *et al*, 2018) and specific proteins able to recruit them. First, we analyzed if the depletion of CEP90 and FOPNL may affect the behavior of one daughter centriolar protein (DCP), Centrobin. As shown on Figure S6, we did not observe any difference in the localization of Centrobin in control and CEP90 or FOPNL depleted cells. Secondly, we investigated the localization of the most proximal distal appendage protein CEP83, together with CEP89 and CEP164. We showed that the depletion of either CEP90 or FOPNL decreased the localization at the mother centriole of these three proteins of about 66% (Figure 6A, B). Altogether, these results suggest that the depletion of CEP90 and FOPNL prevents the formation of the distal appendages as previously shown for OFD1. Consequently, BB docking at a ciliary vesicle cannot occur, leading to defective ciliogenesis.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Discussion

The search of proximity partners of FOPNL in mammalian cells led us to identify CEP90. As expected from previous results, we identified in our mass spectrometry MNR/OFIP in proximity of FOPNL (Chevrier *et al*, 2016), (Kumar *et al*, 2021). Interestingly, these two proteins are working in a complex with OFD1 to build a cilium (Lopes *et al*, 2011a). Surprisingly, OFD1 is not significantly found despite the presence of biotinylated peptides. In addition, several centriolar satellite proteins as PCM1, CEP350, Cep131 or Talpid3 were significantly detected in proximity to FOPNL in our mass spectrometry, consistent with previous work (Gheiratmand *et al*, 2019). In agreement with our mass spectrometry results, CEP90 was previously identified as a centrosomal and centriolar satellite protein. Previously, CEP90 has been involved in spindle pole integrity in mitotic cells (Kim *et al*, 2012) or in centrosome duplication, by recruiting CEP63 to the centrosome (Kodani *et al*, 2015). The analysis in *Paramecium* of the effect of CEP90 depletion on BB duplication shows no duplication defects. Two hypotheses may explain this result. First, *Paramecium* cells being devoid of centriolar satellites, our results could suggest that it is most probably the centriolar satellite pool that is involved in BB duplication to target CEP63 to the centrosome, reinforcing previous results (Kodani *et al*, 2015). Another possible explanation would be that, despite numerous actors being conserved (Jerka-Dziadosz *et al*, 2010), (Gogendeau *et al*, 2011) (Klotz *et al*, 2003), (Ruiz *et al*, 2000), (Dupuis-Williams *et al*, 2002), some proteins are not, such as CEP63, suggesting that the mechanism of BB duplication might differ between *Paramecium* and mammalian cells.

The ternary complex CEP90, FOPNL and OFD1 is required for basal body anchoring

Patients showing *CEP90* mutations and displaying Joubert and Jeune syndromes, two ciliopathies, led Kim et al (2012) to postulate that CEP90 function in ciliogenesis may occur through centriolar satellites since their disruption inhibits the ciliogenesis process. To determine if CEP90 functions at centrioles or at satellites during ciliogenesis, we took advantage of the *Paramecium* model, which does not possess centriolar satellites, simplifying the read out of the underlying phenotype. We found that CEP90 depletion

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

in *Paramecium* prevents BB distal end formation as previously shown for FOPNL and OFD1, resulting in unanchored BB that remain in the cytoplasm. Interestingly, the depletion of CEP90 prevents maturation of the distal end of BB at the same step as FOPNL or OFD1 (Aubusson-Fleury *et al*, 2012), (Bengueddach *et al*, 2017) as observed by electron microscopy. This suggests that CEP90, FOPNL and OFD1 are working together to constitute a functional ternary complex. Two other arguments suggest that it is the case. First, expansion microscopy performed both in *Paramecium* and mammalian cells, demonstrate that the three proteins localize similarly, close and external to the microtubule wall in a 9-fold symmetry. Secondly, the depletion of one of these proteins in *Paramecium* prevents the recruitment of the two others. Similar results were obtained in mammalian cells.

In mammalian cells, the initial step of BB anchoring requires an interaction between the distal appendages and a cellular membrane (Knödler *et al*, 2010), (Westlake *et al*, 2011), (Schmidt *et al*, 2012), (Sillibourne *et al*, 2013), (Tanos *et al*, 2013), (Shakya & Westlake, 2021). Remarkably, we found that either CEP90 or FOPNL depletion prevents the recruitment of the most proximal distal appendage protein CEP83 as well as CEP89 and CEP164, suggesting that the assembly of distal appendages is strongly impaired in these depleted cells. This result is reminiscent of OFD1 depletion, which prevents the assembly of distal appendages (Singla *et al*, 2010). Altogether, these results indicate that the ternary complex composed of CEP90, FOPNL and OFD1 is required to tether the BB at a membrane in *Paramecium* and mammalian cells. Interestingly, *Paramecium* and mammalian cells use two distinct BB anchoring pathways. In *Paramecium*, the BB anchors directly to the cell membrane, whereas in RPE1 mammalian cells, cytoplasmic vesicles are recruited to the distal appendages, fuse to form the ciliary vesicle, in which the axoneme elongates, suggesting a functional conservation of this molecular complex in these two evolutionary distant organism. Intriguingly, these proteins are absent in the *drosophila* and *C. elegans* genome. A possible explanation might be that in these species, the mechanism of BB anchoring might differ due to the absence of centriolar distal appendage structures. Interestingly, Hou et al (in revision)

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

demonstrate in *Drosophila*, that the distal appendage proteins CEP89, FBF1 and CEP164 are not required for BB docking and TZ formation, despite their recruitment, in a 9 fold symmetry, during BB anchoring.

The ternary complex points out the future position of distal appendages assembly

The examination of the localization of either CEP90, FOPNL or OFD1 by U-ExM in *Paramecium* and mammalian cells established that these proteins localize at the distal end in a 9-fold symmetry. U-ExM quantification in addition to EM results suggest that CEP90 staining remains at the same position along the MT while TZ maturation occurs. As previously described, a structural lengthening of the TZ (Gogendeau *et al*, 2020) occurs during ciliary growth. CEP90 localizes to all BB whatever their ciliation status at the most proximal part of the TZ as observed by immunogold staining in EM. This is in contrast with the TZ proteins belonging to either MKS or NPHP complex or the regulators of TZ assembly CEP290 and RPGRIP1L, which are recruited only on at the distal part of the TZ of ciliated BB. In *Paramecium*, the transition fibers emerge from the microtubule doublets at the level of the intermediate plate (Dute & Kung, 1978), a position compatible with our U-ExM and immunogold staining.

In agreement with the *Paramecium* staining, in mammalian cells both the mother and the daughter centrioles are decorated. However, the staining is observed slightly underneath the extreme end of the centriole. This localization is compatible with the localization of CEP83 along the BB proximo-distal axis (Bowler *et al*, 2019). Examination of centrioles during the duplication process, demonstrates that either CEP90 or OFD1 are recruited on the newly born procentriole at a subdistal position similar to the one observed on mature centriole. This result differs from the one (Kumar *et al*, 2021), which reports the recruitment of the MNR, CEP90, OFD1 complex on elongating procentrioles in G2. This discrepancy might be due to the fact that these authors used 5-ethynyl-29-deoxyuridine (EdU) to distinguish the different phases of the cell cycle, while we used unsynchronized U2OS cells. Another possibility is that the recruitment of the complex differs between cell types causing this difference between our study (Kumar *et al*, 2021) which used RPE1 cells. Consistent with our findings, numerous distal end proteins such as

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

C2CD3, CP110, Centrin2 (Thauvin-Robinet *et al*, 2014), (Kleylein-Sohn *et al*, 2007), (Paoletti *et al*, 1996) have already been observed on newly born procentrioles. However, the precise localization of these distal end proteins show differences, C2CD3 beeing localized internally of the centriolar microtubule wall, while CP110 is at the extreme distal end. Therefore, the localization of the complex slightly underneath the distal end together with the early recruitment on procentriole led us to propose that the presence of the complex on the microtubule wall will mark the future position on which the distal appendages will assemble. However, the reason for the localization of these proteins at the distal ends on both mother and daughter centriole is not yet clear. A possible explanation might come from the results of Wang et al, (2018), showing that daughter centriolar proteins (DCP) are observed on both mother and daughter centrioles after depletion of either C2CD3 and Talpid3, which prevents distal appendages assembly, suggesting that DCP are removed from the mother centriole before distal appendages assembly. By contrast, the removal of OFD1 maintained the asymmetric localization of Centrobin on the daughter centrioles (Wang *et al*, 2018). In agreement, the depletion of either CEP90 or FOPNL maintains the asymmetry of the two centrioles by maintaining Centrobin only on the daughter centriole. Therefore, we propose the following model: the ternary complex composed of CEP90, FOPNL and OFD1 is recruited soon after centrosome duplication on the two procentrioles, slightly underneath the extreme distal end. POC1B (Chang *et al*, 2016) and POC5 (Azimzadeh *et al*, 2009) are then recruited to allow centriole elongation. Centrin2 (Ruiz *et al*, 2005), (Aubusson-Fleury *et al*, 2012), OFD1 (Singla *et al*, 2010) and MNR (Kumar *et al*, 2021) have been shown to participate in the regulation of microtubule wall length, since their absence lead to elongated centrioles. Maturation of the daughter centriole in mother is carried out by first removing daughter centriole proteins and secondly by the recruitment of distal appendage proteins (Wang *et al*, 2018), (Bowler *et al*, 2019), (Viol *et al*, 2020) during G2/M (Figure 7). A similar scenario might also been conserved in *Paramecium* since the daughter centriole protein CEP120 is conserved. It will be interesting to determine in this model the fate of CEP120 during the BB anchoring process.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Material and methods

P. tetraurelia strains and cultures conditions

The wild type reference strain, stock d4-2 of *Paramecium tetraurelia*, was used in RNAi experiment. To facilitate the screening of transformants in microinjection experiments, the mutant *nd7-1* (Skouri & Cohen, 1997) which carries a mutation preventing trichocyst exocytosis was used. Cells were grown at 27°C in wheatgrass infusion (BHB) bacterized with Klebsiella pneumoniae and supplemented with 0.8 µg/mL of β-sitosterol according to standard procedures(Sonneborn, 1970).

Human cell lines and culture condition

The human retinal pigment epithelium (RPE1), human embryonic kidney (HEK293), human bone osteosarcoma (U2OS) cell lines were grown in DMEM/F12 (RPE1), DMEM (HEK293, U2OS), respectively supplemented with 10% of Fetal bovine serum and Penicillin-streptomycin (1000 units/mL and 1000µg/mL respectively HyClone), Glutamax cultured in the presence of 5% CO2. Flp-In T-REx HEK293 cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, GlutaMAX, zeocin (100 µg/mL), and blasticidin (3µg/mL). Flp-In T-REx HEK293 stable lines expressing myc-BirA* or myc-BirA*-FOPNL were maintained as above, with the addition of hygromycin (200 µg/mL) instead of zeocin.

Antibodies

The following antibodies were used: the polyclonal PolyE (1:100) antibody(Janke & Bulinski, 2011) stained cilia. For mammalian cells, polyclonal rabbit anti-CEP90 (1/500- Proteintech 14413-1-AP ((Kodani *et al*, 2015)), anti-OFD1 (1/500, Sigma HPA031103 (Wang *et al*, 2013)), anti-CEP83 (1/500- Proteintech 26013-1AP, (Hossain *et al*, 2020)), anti-Cep89 (1/800- Proteintech 24002-1AP, (Kanie *et al*, 2017)), Cep164 (1/1000- Proteintech 22227-1AP, (Bowler *et al*, 2019)), anti-Centrobin (1/500-mouse-Abcam-Ab70448 (Wang *et al*, 2018)) and monoclonal anti-FOPNL antibodies (1/200- (Sedjaï *et al*, 2010)) were used. Monobodies AA344 (1:250, scFv-S11B, Beta-tubulin) and AA345 (1:250, scFv-F2C, Alpha-tubulin;

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

(Nizak *et al*, 2003) were used in expansion microscopy to stain for the microtubule wall. Goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 F(ab')2 fragment and goat anti mouse Alexa Fluor 568 IgG (H+L) were provided by Invitogen and used at 1/1000.

BioID sample preparation

Since we searched for proteins at proximity of the centrosomal pool of FOPNL, we first enriched our sample in centrosomes using isolated centrosome-nucleus complexes (Maro & Bornens, 1980) from HEK293 FlpIn mycBirA*FOPNL and HEK293 FlpIn mycBirA* cells in presence or absence of Tetracycline. BioID purification was then performed according to (Roux *et al*, 2012). Briefly, the purified centrosome-nucleus complexes were then incubated 10 min in 50mM Tris pH 7.4, 300mM NaCl, 0.4% SDS, 5mM EGTA, 1mM DTT, Complete anti- protease cocktail (Roche) then 1% Triton-X-100 were added for 10 min. An equivalent volume of Tris pH 7.4 was added and the lysate was centrifuged à 4°C at 25 000g for 10min at 4°C. The supernatant was collected and incubated overnight with 70 µL of streptavidin beads with gentle agitation at 4°C. Streptavidin beads were washed with 50mM Tris pH7.4. After the last wash, the proteins were recovered from the beads using Laemmli sample buffer. Proteins were allowed to enter the SDS acrylamide gel for 1cm. Gels were stained using colloidal blue. The gel containing the proteins is then cut (gel plug).

Samples preparation prior to LC-MS/MS analysis

Gel plugs were discolored using a solution of ACN/NH_4HCO_3 50mM (50/50) during 15 min with agitation. Plugs were reduced with a solution of 10 mM DL-Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) during 45 min at 56°C, then the plugs were alkylated using à 55mM solution of Iodoacetamide (IAA, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) during 45 min at room temperature. After a step of washing and dehydration, proteins in the plugs where digested overnight with Trypsin (10µg/ml) (Promega, Madison, WI, USA) at 37°C in a 25-mM NH_4HCO_3 buffer (0.2 µg trypsin in 20 µL). The resulting peptides were desalted using ZipTip µ-C18 Pipette Tips (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

LC-MS/MS acquisition

Samples were analyzed using an Orbitrap Fusion equipped with an easy spray ion source and coupled to a nano-LC Proxeon 1200 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Peptides were loaded with an online preconcentration method and separated by chromatography using a Pepmap-RSLC C18 column (0.75 x 750 mm, 2 µm, 100 Å) (Thermo Scientific), equilibrated at 50°C and operating at a flow rate of 300 nl/min. Peptides were eluted by a gradient of solvent A (H_2O, 0.1 % FA) and solvent B (ACN/H_2O 80/20, 0.1% FA), the column was first equilibrated 5 min with 95 % of A, then B was raised to 28 % in 105 min and to 40% in 15 min. Finally, the column was washed with 95% B during 20 min and re-equilibrated at 95% A during 10 min. Peptide masses were analyzed in the Orbitrap cell in full ion scan mode, at a resolution of 120,000, a mass range of *m/z* 350-1550 and an AGC target of 4.10^5. MS/MS were performed in the top speed 3s mode. Peptides were selected for fragmentation by Higher-energy C-trap Dissociation (HCD) with a Normalized Collisional Energy of 27% and a dynamic exclusion of 60 seconds. Fragment masses were measured in an Ion trap in the rapid mode, with and an AGC target of 1.10^4. Monocharged peptides and unassigned charge states were excluded from the MS/MS acquisition. The maximum ion accumulation times were set to 100 ms for MS and 35 ms for MS/MS acquisitions respectively.

Data analysis

Label-free quantification was done on Progenesis QI for Proteomics (Waters, Milford, MA, USA) in Hi-3 mode for protein abundance calculation. MGF peak files from Progenesis were processed by Proteome Discoverer 2.2 with the Mascot search engine (Matrix Science, version 2.4). Identification of proteins was done with the Swissprot database release 2018_12 with the *Homo sapiens* taxonomy. A maximum of 2 missed cleavages was authorized. Precursor and fragment mass tolerances were set to respectively 7 ppm and 0.5 Da. The following post-translational modifications were included as variable: Acetyl (Protein N-term), Oxidation (M), Phosphorylation (STY), D-Biotin (K). The following post-translational modifications

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

were included as fixed: Carbamidomethyl (C). Spectra were filtered using a 1% FDR using the percolator node.

CEP90 gene identification in Paramecium

By BLAST search in Parameciumdb (https://paramecium.i2bc.paris-saclay.fr/), we identified two *Paramecium* genes encoding proteins homologous to CEP90: *CEP90a* (PTET.51.1.G0320241) and CEP90b (PTET.51.1.G0320283) (Arnaiz *et al*, 2020). CEP 90a and b protein shares about 20,7% identity with human CEP90 protein. These two genes result from the last whole genome duplication, which occurred in *Paramecium*, and share 95,2% identity. RNAseq analysis as well as microarray show that CEP90a is 10x more expressed than CEP90b.

Genes cloning

For gene silencing, the more divergent part of the gene was chosen to selectively inactivate either *CEP90a* or *CEP90b*, since the two paralogs of *CEP90* in *Paramecium* share a high percentage of identity. A 479bp fragment (bp 1472-1951 from ATG start codon) from *CEP90a* gene and a 501bp (bp 1399-1900 from ATG start codon, see Table S2) fragment from *CEP90b* were amplified by PCR and cloned into the appropriate sites of the L4440 vector. This vector allows the synthesis of double-stranded RNA corresponding to the cloned gene from two T7 promoters. The possible off-target effect of this sequence was analyzed using the RNAi off-target tool in the *P. tetraurelia* genome database (https://paramecium.i2bc.paris-saclay.fr/cgi/tool/rnai_off_target) that searches the genome for stretches of 23 identical nucleotides (the size of *Paramecium* siRNA). The only genomic sequence matching for *CEP90a* and *CEP90b* RNAi fragment were *CEP90a* or *b*, thus ruling out possible off-targeting. The inactivation of both CEP90a and CEP90b was performed using a L4440 vector containing the same *CEP90a* fragment (1472-1951) linked to a new fragment of *CEP90b* (139-618 from ATG start codon). Since the 139-618 *CEP90b* fragment is localized in a less divergent part, an OFF-Target effect has been identified on CEP90a with a hit of 3.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Silencing vectors of FOPNL, OFD1, PtCen2 and PtCen3 have already been described previously(Aubusson-Fleury *et al*, 2012), (Bengueddach *et al*, 2017), (Ruiz *et al*, 2005).

For CEP90-GFP expression, *CEP90a* gene showing a 10x higher expression level than *CEP90b* gene during the vegetative state of *Paramecium*, *CEP90a* gene was chosen for expressing the GFP-tagged fusion protein. A synthetic *CEP90a* gene, resistant to *CEP90a* RNAi vector was designed by punctual modifications (from base 1472 to 1951 from the ATG start codon). Both wild type and RNAi resistant constructions were inserted in PPXV-GFP plasmids. As a result, the GFP is fused in the C-terminus of *CEP90a* and RNAi resistant *CEP90a* gene. The fusion proteins are expressed under the control of the calmodulin promoter.

Human cDNA of FOPNL (provided by O. Rosnet) was amplified by PCR using primers (Table S2) and cloned into pcDNA5 FRT/TO mycBirA* using the appropriate restriction sites.

Generation of stable and inducible HEK293 flpIn FOPNL for BioID

Flp-In T-REx HEK293 cells were cotransfected with pOG44 (Flp-recombinase expression vector) and either pcDNA5FRT/TO mycBirA*FOPNL or pcDNA5FRT/TO. Transfections were performed with Lipofectamine2000 according to the manufacturer's instructions. After transfection, cells were selected with hygromycin (200µg/mL) and blasticidin (15µg/mL). HEK293 FlpIn mycBirA*FOPNL and HEK293 FlpIn mycBirA* cells were incubated for 24 h with 50 µM biotin (Sigma-Aldrich) in the presence or absence of 0.1 µg/ml tetracycline.

Paramecium transformation

Nd7-1 cells were transformed by microinjection into their macronucleus (Gilley *et al*, 1988). DNA containing a mixture of the plasmid of interest (*CEP90-GFP*, *CEP90RNAi resistant GFP*, *OFD1-GFP*, *GFP-FOPNL* at 5 µg/µl) with the DNA directing the expression of the *ND7* gene to complement the *Nd7* mutation. Microinjection was made under an inverted Nikon phase-contrast microscope, using a Narishige

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

micromanipulation device and an Eppendorf air pressure microinjector. Transformants were screened for their ability to discharge their trichocysts and further analyzed for GFP. Clones expressing the fusion protein and showing a growth rate similar to untransformed paramecia were chosen for further analyses.

Gene silencing in Paramecium by feeding

L4440 inactivation vectors were transformed in HT115 DE3 Escherichia coli strain to produce T7Pol-driven dsRNA as previously described (Galvani & Sperling, 2002). Paramecia were fed with these bacteria and refed daily with a fresh feeding medium at 27°C. Control cells were fed with HT115 bacteria carrying the L4440 vector containing the *ND7* gene (control). Phenotypes were analyzed after 48h of feeding. In these conditions, most of the mRNA of silenced genes are knocked-down therefore leading to the depletion of the proteins.

Effectiveness of RNAi was quantified by analyzing the decrease of BB fluorescence in transformed cell lines expressing the GFP –tagged transgene after silencing. In *Paramecium*, the phenotype of silenced cells is highly reproducible from one experiment to another and from one cell to another. In each experiment paramecia were analyzed in at least 2 or 3 independent experiments.

Paramecia fixation for immunofluorescence

Fixation and immunofluorescence techniques were performed on cells in suspension. 50-100 cells were collected in the smallest volume possible and were permeabilized in 200 µl PHEM (Pipes 60mM, Hepes 25 mM, EGTA 10mM, MgCl2 2mM, adjusted to pH 6.9) with 1% Triton-X-100 (PHEM-Triton) for 30 secondes. Cells were fixed for 10min in 2% PHEM-PFA. Buffer was then aspirated and cells were rinsed 3 times for 10 min in PBS –tween 0.1%-3% BSA

Confocal acquisition

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Confocal acquisitions were made with a Leica SP8 equipped with a UV diode (line 405), and three laser diodes (lines 488, 552 and 635) for excitation and two PMT detectors. For U-ExM data, images were collected with an inverted confocal Microscope Leica DMI 6000 CS (*Paramecium*) or an inverted Leica TCS SP8 microscope (human cells) using a 63 × 1.4 NA oil objective with Lightening mode at max resolution, adaptive as 'Strategy' and water as 'Mounting medium' to generate deconvolved images. 3D stacks were acquired with 0.12 µm z-intervals and an x, y pixel size of 35 nm.

Expansion microscopy- U-ExM

For analyzing CEP90 and OFD1 in human centrioles, U-ExM was performed as previously described (Steib *et al*, 2020). The following reagents were used in U-ExM experiments: formaldehyde (FA, 36.5–38%, F8775, SIGMA), acrylamide (AA, 40%, A4058, SIGMA), N,N'-methylenbisacrylamide (BIS, 2%, M1533, SIGMA), sodium acrylate (SA, 97–99%, 408220, SIGMA), ammonium persulfate (APS, 17874, ThermoFisher), tetramethylethylendiamine (TEMED, 17919, ThermoFisher), nuclease-free water (AM9937, Ambion-ThermoFisher) and poly-D-Lysine (A3890401, Gibco). Briefly, coverslips were incubated in 2% AA + 1.4% FA diluted in PBS for 5 hr at 37°C prior to gelation in monomer solution (19% sodium acrylate, 0.1% BIS, 10% acrylamide) supplemented with TEMED and APS (final concentration of 0.5%) for 1 hr at 37°C and denaturation for 1h30 min at 95°C, gels were stained for 3 hr at 37°C with primary antibodies :CEP90 or OFD1 and a combination of tubulin monobodies (see antibodies section) diluted in homemade PBS-BSA 2%. After 3 PBS-tween 0.1% washes, secondary antibodies were incubated for 2h30 min at 37°C. Gels were then washed 3 times in PBS-tween 0.1% and incubated in water overnight to allow expansion.

For *Paramecium* BB expansion microscopy, the following modification has been done: purified cortex was incubated in 1%AA + 0.5%FA diluted in 1XPBS for 5h at 37°C. The GFP-tagged proteins were stained with Rabbit anti-GFP (1/400 Torrey Pines TP-401) and the combination of tubulin monobodies as above.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Electron microscopy

For ultrastructural observations, cells were fixed in 1% (v/v) glutaraldehyde and 1% OsO4 (v/v) in 0.05 M cacodylate buffer, pH 7.4 for 30 min. After rinsing, cells were embedded in 2% agarose. Agarose blocks were then dehydrated in graded series of ethanol and propylene oxide and embedded in Epon812 (TAAB, Aldermaston, Berkshire, UK). For pre-embedding immunolocalization, the immunostaining process was carried out as described for immunofluorescence using gold-coupled instead of fluorochrome-coupled secondary antibodies (gold-labeled anti-rabbit IgG -GAR G10, Aurion) diluted 1/30 for 30 min. Cells were then treated as described above.

All ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The sections were examined with a Jeol transmission electron microscope1400 (at 120kV).

Paramecium swimming analysis.

4 to 8 paramecia were transferred in 10 µl drops of conditioned BHB (bacterized BHB solution and depleted of bacteria after their growth and sterilized) for 15 min before being tracked for 10s every 0.3s. We used a Zeiss Steni 2000-C dissecting microscope with a Roper Coolsnap-CF camera and Metamorph software (Universal Imaging). Stacks were analyzed using the Manual tracking tool in ImageJ.

Mammalian cell fixation and immunofluorescence

RPE1 cells were grown on coverslips, washed in PBS, and fixed in methanol at -20°C for 6 min. Alternatively, after a PBS wash, cells were extracted in a PHEM buffer (45 mM Pipes, 45 mM Hepes, 10 mM EGTA,5 mM MgCl2 adjusted to pH 6.9, and 1 mM PMSF) containing 1% TritonX-100 and then fixed as described above. Cells were rinsed in PBS containing 0.1% Tween 20. Primary antibodies diluted in PBS containing 3%BSA were added for 1 h at room temperature. Three washes were per-formed in PBS-Tween, and the Alexa-labeled secondary antibodies were applied (FisherScientific)).Cells were washed in ethanol and mounted in Citifluor (CityUniversity, London, England). Observations were done on a confocal

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

microscope. All documents presented are two-dimensional projections of images collected at all relevant z-axes

siRNA-mediated protein depletion

30000 RPE1 cells were plated onto coverslips 24 hr prior transfection. For CEP90 depletion, two siRNA were synthesized. One is a smart pool of Dharmacon and the other one corresponding to nucleotides 1651-1675 and used in the Kodani's paper (Kodani *et al*, 2015). Similarly, two siRNA were used for FOPNL. One is a smart pool of Dharmacon and the other one the published siRNA sequence (Sedjaï *et al*, 2010) as well as a smart pool of Dharmacon. Scrambled siRNA was used as a negative control. Cells were transfected with 20nM of siRNA using Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen). Medium was changed 4 hr post-transfection and cells were analyzed 48 hr post-transfection.

Image analysis

For immunofluorescence, image stacks were processed with ImageJ and Photoshop. Confocal acquisition parameters were kept identical (same laser intensity and same gain and same resolution) for quantification of BB fluorescence intensity in control and RNAi treated cells. Mean pixel fluorescence intensity of the different antibodies was then measured within a defined and constant circular area of the size of the BB (*Paramecium*) or centrosome (RPE1 cells), using the measurement tools of ImageJ.

For U-ExM data acquisition of Paramecium cortex, confocal images were acquired with a LEICA TCS SP8x (DMi 6000) equipped with a 63x Apochromat oil-immersion objective (numerical aperture (NA): 1.4), U.V diode laser 405nm and a white light laser (WLL) AOTF coupled. Excitation at 490nm and 571nm of Alexa 488 and Alexa 568, respectively. Images were recorded with two hybrid detectors. Acquistions were made at 512x512 pixels and 400Hz speed and zoom of 8.4. Alexa 488 was acquired with a frame accumulation of 3. Sample sampling was 43nm in XY and for 3D imaging, stacks were acquired with a z-step of 130nm. The whole system was driven by LAS X software version 3.5.6. Image manipulation were done with ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health). Images were deconvolved employing

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

the Huygens Essential package (Scientific Volume Imaging, Hilversum, The Netherlands), with sampling of 43nm in XY and 130nm in Z and the following parameters: algorithm : CMLE; signal/noise ratio : 20; quality threshold : 0.01%; maximum iterations : 40; background calculation : in/near objects.

For U-ExM analysis, length coverage and diameter quantification was performed as previously published in (Steib *et al*, 2020b).

To generate the panels in Figure 1I, 5I, 5J and S1F, two homemade plugins for ImageJ were used. The first one helps the user to easily pick the extremities of a centriolar protein signal. For each protein of each image, the user picks the first and the last point of the signal along the centriole length. This generates an entry in a table for each centriole describing where the proteins start and end. The results are saved in a .csv file that can be directly read by the second plugin. The second plugin reads the table generated by the first plugin and summarizes the positions of different proteins in one plot. For each centriole, one protein (here the tubulin) is defined as the reference protein and its Y coordinates are shifted so its Y starting point is set to 0. The same shift is applied to the second protein to keep the correct distances between the 2 proteins. The Y coordinates values of both signals are then rescaled to the average length of the reference protein. For each protein, the average and side deviation of the Y starting position and of the Y ending position is calculated. A plot is then generated illustrating the average position of one protein to the other.

Statistical analysis

The statistical significance of the difference between groups was determined using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. All data are presented as mean +/- SEM as specified in the figure legends. Differences were considered significant when $p<0.05$. Results reported are from 2-3 independent biological replicates as noted in legends with reproducible findings each time.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Acknowledgements:
We would like to thank Carsten Janke for his generous gift of anti-poly-E antibodies. We acknowledge Mireille Bétermier and all members of the Bétermier lab and Tassin lab for stimulating discussions. We thank B. Durand for critical reading of the manuscript. We thank Cindy Mathon for maintaining the Paramecium cell cycle and her great help in molecular biology and immunofluorescence staining and Pascaline Tirand for excellent technical assistance. The present work has benefited from Imagerie-Gif core facility supported by I'Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-EQPX-0029/Morphoscope, ANR-10-INBS-04/FranceBioImaging; ANR-11-IDEX-0003-02/ Saclay Plant Sciences). This work has been founded by basal body anchoring in ciliogenesis: structure-function analysis: ANR-15-CE11-0002-01 to AMT. PLB was supported by PhD fellowships from Universite´ Paris-Saclay (https://www.paris-saclay.fr/). This work has been supported by the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer" to PLB ARCDOC4202003000178 and by the Swiss National Science Foundation (SNSF) PP00P3_187198 and by the European research Council ERC ACCENT StG 715289 attributed to Paul Guichard.

Author contributions

AMT conceived, supervised, designed the project, and wrote the final manuscript with input from all authors. PLB, performed almost all experiments, image acquisition, processing and analyzed the data. ML performed ultrastructure expansion on mammalian cells, images acquisition and analyzed and quantified all U-ExM data. LG performed the first mammalian siRNA experiments; ML performed the electron microscopy of *Paramecium*. MLG wrote the U-ExM quantification ImageJ PlugIn. OR provided antibodies and cell lines. LL and GC performed mass spectrometry analysis. MT acquired with PLB the *Paramecium* U-ExM confocal images. FK, VH and PG performed formal analysis, review and editing.

Conflict of interest
The authors have declared that no competing interests exist**.**

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Figures legends:

Main

Figure 1: Localization of CEP90 GFP, GFP-FOPNL and OFD1-GFP In *Paramecium*.

A-B': Labelling of CEP90-GFP (A, B) and GFP-FOPNL (C,D) paramecia transformants using the polyclonal anti-polyglutamylated tubulin antibodies (Poly-E, magenta). A, B: Projection of confocal sections through the ventral surface. On the ventral side (A, B), the green emitted fluorescence of GFP overlapped with the anti-poly-E labeling on all basal bodies, as shown on the magnification on the right panel. Scale bars= 20 µm and 2 µm (magnification). A', B': Projection of confocal sections at the intracytoplasmic level. BB at the cell surface showed that the GFP signal (green) is located at the distal part of all basal bodies (magenta) underneath the epiplasm (orange) for both CEP90-GFP and GFP-FOPNL. Scale bars= 20 µm and 1.7 µm (magnification)

C-G: Cortex from transformants expressing CEP90-GFP, OFD1-GFP and GFP-FOPNL were purified and expanded using the U-ExM technique. Gullet cortical fragments displaying ciliated BB were selected since U-ExM gave better results in this region. Anti-GFP antibodies (green) and anti-tubulin mixed antibodies (magenta) (see material and methods) were used to label respectively the fusion protein and the BB microtubule wall. C-E': Labeling of the fusion protein on BB observed longitudinally (upper panel) or top view (lower panel). CEP90-GFP (C), OFD1-GFP (D) and GFP-FOPNL (E) BB display the GFP staining close to the microtubule wall of the BB (magenta) and slightly underneath the distal end staining of the anti-tubulin signal. Top view images demonstrate that the GFP signal is organized in a 9-fold symmetry (C',D', E'). Scale bar= 100nm. The distance to the proximal end (F) and microtubule wall (G) were quantified and statistically analyzed (***$p<0.0001$, one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

N= 14 (CEP90), 15 (FOPNL), 9 (OFD1) BB from 2 independent experiment. Average +/- SD: CEP90= 418.4 +/- 21.7 nm ;FOPNL=430.6 +/- 62.6 nm; OFD1=432.3 +/- 29.9 nm.

H-J: Representative EM images of the immunolocalization of CEP90-GFP protein on BB revealed by anti-GFP antibodies. H-I: longitudinal view (H) and transverse sections of BBs at the level of the intermediate plate (I). Note that gold particle are located close to the transition zone or at the level of the intermediate plate Scale bar= 100nm. J: BB diagrams recapitulating the localization of gold beads in the 5 different zones indicated (1-5). Quantification of gold particle number counted on 35 BB in 2 independent experiments. Note that the majority of the beads were localized at the transition zone level between the axosomal plate and the terminal plate, known to be the place where the transition fibers emerge from the microtubule doublet.

Figure 2: CEP90 depletion affects basal body docking

A: Projection of optical sections through the ventral surface (A) labeled with polyE antibodies (grey) in control (Ctrl) RNAi, CEP90 RNAi and FOPNL RNAi *Paramecium*. A': Projection of confocal sections at the intracytoplasmic level labeled with poly-E antibodies (grey) in Ctrl RNAi and *CEP90* RNAi and *FOPNL* RNAi. In control-depleted cells, basal bodies are organized in parallel longitudinal rows highlighted in the magnification (right panel) (A) with no BB observed in the cytoplasm (A'). Cells observed after 2 divisions upon CEP90 or FOPNL depletion appear smaller than control ones, with a severe disorganization of the basal body pattern (A). Numerous internal basal bodies are observed in the cytoplasm (A'). Scale bars= 20 µm and 2 µm (magnification).

B-C: Specificity of CEP90 RNAi. Transformants expressing either WT CEP90-GFP (B) or a RNAi resistant CEP90-GFP (C) were observed after 2-3 divisions upon CEP90 depletion and analyzed for green emitted fluorescence and BB staining using poly-E antibodies. Scale bars= 20µm and 2 µm (magnification). B: The green fluorescence (green) of WT CEP90-GFP transformants was severely reduced along with the expected

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

disorganisation of BB at the cell surface. C: By contrast the expression of an RNAi-resistant CEP90-GFP rescued endogenous CEP90 depletion and restored the cortical organization of BB.

Figure 3: CEP90 depletion affects basal body's distal end maturation

A: *Paramecium* showing one BB unit with a ciliated after control RNAi depletion (Ctrl). The TZ is characterized by three plates indicated by colored arrowheads: terminal plate (green), intermediate plate (blue) and axosomal plate (magenta). B-D: Upon CEP90 depletion, undocked basal bodies are detected close to the cell surface (C, E) or deep in the cytoplasm (B, D). Vestigial structures resembling the axosomal plate (magenta arrowhead) and intermediate plate (blue) are detected on all internal BB (63 examined). E: Some BB display microtubule extensions on the free, uncapped side of the basal body (white arrow). Scale bar= 200nm.

Figure 4: Sequential recruitment of basal body anchoring proteins in *Paramecium*.

(A) *Paramecium* transformants expressing either Cen2-GFP, CEP90-GFP or OFD1-GFP (green) have been stained for basal bodies (poly-E antibodies magenta) after 2 or 3 divisions in control cells (Ctrl) and upon OFD1, CEP90 and FOPNL depletion. Control depleted paramecia displayed well anchored basal bodies organized in parallel longitudinal rows, with the GFP emitted signal overlapping BB labeling. After OFD1, CEP90 and FOPNL depletion, BB disorganization is observed. The depletion of either OFD1, CEP90, or FOPNL does not affect Cen2-GFP recruitment to BB, as determined by the colocalization of GFP signal and poly-E staining which appear in white. In contrast, depletion of OFD1, CEP90 and FOPNL on CEP90 or OFD1 transformants prevents the recruitment of the fusion protein to the newly formed BB. The BB appear in magenta instead of white on control depleted cells (white arrowheads). Scale bars= 20µm and 2µm (magnification). B-D: Quantification of the GFP fluorescence of CEP90-GFP (B), Cen2-GFP (C) and OFD1-GFP (D) on newly formed basal body in Control and upon Cen2, OFD1, CEP90, FOPNL and Cen3 depletions. Dot plot showing the mean percentage of GFP fluorescence (n= 80 cells, 3 independent replicates), error bars show SEM. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA followed by

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Tukey's post hoc test p<0.0001 ****. E: Schematic representation of the sequential recruitment of basal body anchoring proteins leading to proper maturation of BB distal end. Cen2 arrives first at the BB followed by the interdependent recruitment of FOPNL, CEP90 and OFD1. This functional ternary complex is required to allow Cen3 recruitment and basal body docking.

Figure 5: Centrosomal localization of CEP90 and OFD1 in mammalian cells

A, B: RPE1 cells were stained with the mouse monoclonal GT335 antibody directed against tubulin polyglutamylation (centrioles magenta) and rabbit anti-CEP90 (green) (A) or rabbit anti-OFD1 (cyan) (B). Both CEP90 and OFD1 decorated the centrosome and the centriolar satellites. Scale bar= 5µm C-H: U2OS cells were expanded using the U-ExM technique stained for tubulin (magenta) and CEP90 (green) or OFD1 (cyan). C,D, F,G Longitudinally oriented S phase centrosomes, stained with CEP90 (C,D) and OFD1(F,G) antibodies. Note that both CEP90 and OFD1 are localized slightly underneath the distal end of both the mother (MC) as well as the procentrioles (PC). E,H: top view of a mother centriole showing the 9-fold symmetry organization of CEP90 and OFD1 at the distal end of the centriole. Scale bar= 200nm. I: Distance between the proximal part of centriole (tubulin) and the maximal intensity of CEP90 (green) or OFD1 (cyan). N=23 and 25 centrioles from 3 independent experiments. Average +/- SD : CEP90= 364.4 +/- 17.3 nm, OFD1 = 370.3 +/- 16.9 nm. J: Angle measured between two following dots CEP90 or OFD1 fluorescent dots and the center of the centriole (on top view). N= 16 (CEP90) and 14 (OFD1) centrioles from 3 independent experiment. Average +/- SD: CEP90=41.7 +/- 1.3°; OFD1=40.7 +/- 2.9°. J: Distance between the maximal intensity of tubulin and the maximal intensity of CEP90 (green) or OFD1 (cyan) based on 22 (CEP90) and 18 (OFD1) centrioles from 3 independent experiments. Average +/- SD: CEP90= 31.4 +/- 4.2 nm, OFD1 = 42.7 +/- 5.9 nm . K: Localization of CEP90 and OFD1 with respect to the microtubule wall. Note that OFD1 localizes more externally than CEP90.

Figure 6: FOPNL and CEP90 regulate distal appendage proteins recruitment in mammalian cells.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

A: CEP90, FOPNL, OFD1 and distal appendage proteins (CEP83, CEP89, and CEP164) were examined in control siRNA (Ctrl), FOPNL siRNA and CEP90siRNA in RPE1 cells by IF after 24h of serum-starvation using the indicated antibody. Scale bar= 5µm. B-G: quantification of the fluorescence intensity of antibodies: FOPNL (B), CEP90 (C), OFD1 (D), CEP83 (E), CEP89 (F) and CEP164 (G) staining at the centrosome. All data are presented as mean ± SD. ****$p < 0.001$ (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test), $n \geq 60$ centrosomes in 2/3 independent experiment.

Figure 7: diagram of the function of the CEP90, FOPNL and OFD1 in distal appendages assembly

During centriole duplication the ternary complex composed of CEP90, FOPNL and OFD1 is recruited on the two procentrioles at the distal extremity position, which is correlated with the position of distal appendages. During G2/M the procentrioles elongate maintaining the ternary complex distally. The ancient daughter centriole matures in a mother one, by losing DCP and assembling distal appendages. When one of the protein of this complex (CEP90, FOPNL, and OFD1) is depleted, none of these proteins is recruited to the centriolar wall leading to defective distal end appendage assembly and defective ciliogenesis. We propose that this complex is required to specify on the procentriole the future location of distal appendage assembly.

Supplementary material:

Table S1: myc-BirA*-FOPNL BioID raw protein measurement.

MS/MS comparison of two biological replicates of the myc-BirA*-FOPNL with the myc-BirA*. High-confidence interactors were defined as those with q value <0.05 and max fold >2.

Table S2: Primer, RNAi, siRNA and CEP90-GFP RNAi-resistant sequences. All primers used to construct *Paramecium* CEP90-GFP and CEP90-GFP resistant plasmid as well as *CEP90a* and *CEP90b* gene silencing vectors were synthesized by Eurofins Genomics. The RNAi-resistant sequence of CEP90-GFP RNAi-resistant plasmid (red) was designed following the ciliated codon code and

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

was synthesized by Integrated DNA technologies. siRNA sequences directed against CEP90 and FOPNL were synthesized by Dharmacon according to the manufacturer's protocol. In both case a published single sequence were used (siRNA CEP90 #2 and siRNA FOPNL #1) as well as a combination of 4 sequences directed against the gene (smartpool).

Figure S1: Localization of CEP90-GFP, OFD1-GFP and GFP-FOPNL by U-ExM

A: EM on *Paramecium* cortex fragment showing a two-BB unit. During cortex purification, cilia shed above the transition zone (white arrowhead). The unciliated BB (yellow arrowhead) remain unmodified. Scale bar= 100 nm. B-E: U-ExM performed on paramecia transformant expressing CEP90-GFP (B), OFD1-GFP (C) and GFP-FOPNL (D, E) show BB and cilia stained with tubulin antibody (magenta). Note that a space indicated by a white arrowhead shows the cilium breakage between the distal end of the TZ and the cilium. B, C: CEP90-GFP and OFD1-GFP signal are localized at the distal extremity of non-ciliated BB (yellow arrowhead) while GFP signal is slightly underneath the distal end of ciliated BB (white arrowhead). Scale bar= 250 nm. F: Schematic representation of OFD1 (blue square), FOPNL (orange square) and CEP90 (green square) localization on ciliated and unciliated basal bodies.

Figure S2: CEP90 depletion phenotypes

A,C: *Paramecium* were transformed with a construction expressing either WT CEP90-GFP or a RNAi-resistant CEP90-GFP. A: BB GFP signal fluorescence has been quantified on newly formed basal bodies (anterior ones) after 2/3 division upon CEP90 depletion. mean ± SD is represented, ****$p < 0.001$ (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test), $n \geq 60$ basal bodies on 2 independent experiments. B: cells compared to control depleted cells. Note that both CEP90 and FOPNL depleted cells died after 4 or 5 divisions. C: Dot plot graph depicting the mean swimming speeds of non-injected paramecia (NI), paramecia expressing WT CEP90-GFP or RNAi-resistant CEP90-GFP after 48h under control condition or CEP90 RNAi condition. Each dot shows the mean velocity of 1 cell, mean ± SD is represented, ****p<

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

0.001 (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, $n \geq 120$ cells per condition performed in 2 independent replicates).

Figure S3: CEP90 depletion does not affect BB duplication

Early to middle stage of *Paramecium* division decorated with poly-E antibodies (grey). In the ventral side of the cell at an early stage of division, a new oral apparatus assembles. On both sides of the future fission line, basal body duplication takes place. The first division of paramecia was observed after control (Ctrl), CEP90 or FOPNL depletion. No significant duplication defects have been observed after FOPNL or CEP90 depletion. Scale bars= 20µm and 2 µm (magnification)

Figure S4: Recruitment of CEN2-GFP, CEP90-GFP, OFD1 GFP and GFP-FOPNL in Cen2, Cen3 and CEP90 depleted cells to newly formed BB

A: Transformants expressing a GFP-tagged FOPNL were observed 2-3 divisions upon control (Ctrl) or CEP90 depletion. GFP-FOPNL fluorescence (green) was severely reduced on newly formed basal bodies along with the expected basal body disorganization. Scale bar= 20µm. B: Dot plots showing the mean percentage of GFP-FOPNL BB fluorescence after 2-3 divisions in either FOPNL or CEP90 RNAi ($n \geq 100$ basal bodies per condition performed in 2 independent replicates), error bars show SEM. Statistical significance was assessed by a one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test $p<0.0001$ ****. C-D: *Paramecium* transformants expressing Cen2-GFP, CEP90 GFP or OFD1-GFP (green) have been stained for basal bodies (poly-E antibodies, magenta) after 2-3 divisions upon Cen2 (C) or Cen3 (D) depletion. After Cen2 and Cen3 depletion, BB disorganisation is observed. C: The GFP fluorescence is not recruited to newly formed BB after Cen2 RNAi. D: By contrast, Cen3 depletion did not affect neither CEP90-GFP, OFD1-GFP and GFP-FOPNL recruitment to BB. Scale bars= 20µm and 2 µm (magnification).

Figure S5 :Colocalization of FOPNL and CEP90 in HeLA cells and ciliogenesis defects

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

A: HeLa-Kyoto cell lines expressing GFP-FOPNL (green) were stained for CEP90 (magenta). Confocal images show the colocalization of both proteins at centrosome and centriolar satellites. Scale bar= 5µm. B: Serum-starved RPE1 during 24h were stained for cilia with GT335 in control (Ctrl), CEP90 or FOPNL siRNA. Percentage of ciliated cells were quantified in each condition. mean ± SD is represented, ****$p < 0.001$ (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, $n \geq 350$ cells per condition performed in 3 independent replicates).

Figure S6: **Effect of CEP90 and FOPNL depletion on the daughter centriolar protein, Centrobin**

The daughter centriolar protein Centrobin was localized in control (Ctrl), CEP90 and FOPNL depleted RPE1 cells. No significant differences are observed between control-depleted cells and CEP90 or FOPNL depleted cells. Scale bar= 5µm

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Bibliography

Adoutte A, Ramanathan R, Lewis RM, Dute RR, Ling KY, Kung C & Nelson DL (1980) Biochemical studies of the excitable membrane of Paramecium tetraurelia. III. Proteins of cilia and ciliary membranes. *J Cell Biol* 84: 717–738

Arnaiz O, Goût J-F, Bétermier M, Bouhouche K, Cohen J, Duret L, Kapusta A, Meyer E & Sperling L (2010) Gene expression in a paleopolyploid: a transcriptome resource for the ciliate Paramecium tetraurelia. *BMC Genomics* 11: 547

Arnaiz O, Meyer E & Sperling L (2020) ParameciumDB 2019: integrating genomic data across the genus for functional and evolutionary biology. *Nucleic Acids Res* 48: D599–D605

Aubusson-Fleury A, Lemullois M, de Loubresse NG, Laligné C, Cohen J, Rosnet O, Jerka-Dziadosz M, Beisson J & Koll F (2012) The conserved centrosomal protein FOR20 is required for assembly of the transition zone and basal body docking at the cell surface. *J Cell Sci* 125: 4395–4404

Aury J-M, Jaillon O, Duret L, Noel B, Jubin C, Porcel BM, Ségurens B, Daubin V, Anthouard V, Aiach N, *et al* (2006) Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate Paramecium tetraurelia. *Nature* 444: 171–178

Azimzadeh J, Hergert P, Delouvée A, Euteneuer U, Formstecher E, Khodjakov A & Bornens M (2009) hPOC5 is a centrin-binding protein required for assembly of full-length centrioles. *J Cell Biol* 185: 101–114

Bengueddach H, Lemullois M, Aubusson-Fleury A & Koll F (2017) Basal body positioning and anchoring in the multiciliated cell Paramecium tetraurelia: roles of OFD1 and VFL3. *Cilia* 6: 6

Bowler M, Kong D, Sun S, Nanjundappa R, Evans L, Farmer V, Holland A, Mahjoub MR, Sui H & Loncarek J (2019) High-resolution characterization of centriole distal appendage morphology and dynamics by correlative STORM and electron microscopy. *Nat Commun* 10: 993

Chang C-W, Hsu W-B, Tsai J-J, Tang C-JC & Tang TK (2016) CEP295 interacts with microtubules and is required for centriole elongation. *J Cell Sci* 129: 2501–2513

Chevrier V, Bruel A-L, Van Dam TJP, Franco B, Lo Scalzo M, Lembo F, Audebert S, Baudelet E, Isnardon D, Bole A, *et al* (2016) OFIP/KIAA0753 forms a complex with OFD1 and FOR20 at pericentriolar satellites and centrosomes and is mutated in one individual with oral-facial-digital syndrome. *Hum Mol Genet* 25: 497–513

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

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

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Failler M, Gee HY, Krug P, Joo K, Halbritter J, Belkacem L, Filhol E, Porath JD, Braun DA, Schueler M, *et al* (2014) Mutations of CEP83 cause infantile nephronophthisis and intellectual disability. *Am J Hum Genet* 94: 905–914

Galvani A & Sperling L (2002) RNA interference by feeding in Paramecium. *Trends Genet TIG* 18: 11–12

Gambarotto D, Hamel V & Guichard P (2021) Ultrastructure expansion microscopy (U-ExM). *Methods Cell Biol* 161: 57–81

Gambarotto D, Zwettler FU, Le Guennec M, Schmidt-Cernohorska M, Fortun D, Borgers S, Heine J, Schloetel J-G, Reuss M, Unser M, *et al* (2019) Imaging cellular ultrastructures using expansion microscopy (U-ExM). *Nat Methods* 16: 71–74

Garcia-Gonzalo FR & Reiter JF (2017) Open Sesame: How Transition Fibers and the Transition Zone Control Ciliary Composition. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9

Gheiratmand L, Coyaud E, Gupta GD, Laurent EM, Hasegan M, Prosser SL, Gonçalves J, Raught B & Pelletier L (2019) Spatial and proteomic profiling reveals centrosome-independent features of centriolar satellites. *EMBO J* 38: e101109

Gilley D, Preer JR, Aufderheide KJ & Polisky B (1988) Autonomous replication and addition of telomerelike sequences to DNA microinjected into Paramecium tetraurelia macronuclei. *Mol Cell Biol* 8: 4765–4772

Gogendeau D, Hurbain I, Raposo G, Cohen J, Koll F & Basto R (2011) Sas-4 proteins are required during basal body duplication in Paramecium. *Mol Biol Cell* 22: 1035–1044

Gogendeau D, Lemullois M, Le Borgne P, Castelli M, Aubusson-Fleury A, Arnaiz O, Cohen J, Vesque C, Schneider-Maunoury S, Bouhouche K, *et al* (2020) MKS-NPHP module proteins control ciliary shedding at the transition zone. *PLoS Biol* 18: e3000640

Gonçalves J & Pelletier L (2017) The Ciliary Transition Zone: Finding the Pieces and Assembling the Gate. *Mol Cells* 40: 243–253

Hossain D, Barbelanne M & Tsang WY (2020) Requirement of NPHP5 in the hierarchical assembly of basal feet associated with basal bodies of primary cilia. *Cell Mol Life Sci CMLS* 77: 195–212

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

Jana SC, Marteil G & Bettencourt-Dias M (2014) Mapping molecules to structure: unveiling secrets of centriole and cilia assembly with near-atomic resolution. *Curr Opin Cell Biol* 26: 96–106

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

Jeanmaire-Wolf R, Clérot JC, Nahon P, Iftode F, Fleury A & Adoutte A (1993) Isolation and characterization of monoclonal antibodies to cytoskeletal and membrane proteins of the Paramecium cortex. *Eur J Protistol* 29: 311–333

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

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

Jerka-Dziadosz M, Koll F, Włoga D, Gogendeau D, Garreau de Loubresse N, Ruiz F, Fabczak S & Beisson J (2013) A Centrin3-dependent, transient, appendage of the mother basal body guides the positioning of the daughter basal body in Paramecium. *Protist* 164: 352–368

Joo K, Kim CG, Lee M-S, Moon H-Y, Lee S-H, Kim MJ, Kweon H-S, Park W-Y, Kim C-H, Gleeson JG, *et al* (2013) CCDC41 is required for ciliary vesicle docking to the mother centriole. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 5987–5992

Kanie T, Abbott KL, Mooney NA, Plowey ED, Demeter J & Jackson PK (2017) The CEP19-RABL2 GTPase Complex Binds IFT-B to Initiate Intraflagellar Transport at the Ciliary Base. *Dev Cell* 42: 22-36.e12

Kim K, Lee K & Rhee K (2012) CEP90 is required for the assembly and centrosomal accumulation of centriolar satellites, which is essential for primary cilia formation. *PloS One* 7: e48196

Kleylein-Sohn J, Westendorf J, Le Clech M, Habedanck R, Stierhof Y-D & Nigg EA (2007) Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. *Dev Cell* 13: 190–202

Klotz C, Ruiz F, Garreau de Loubresse N, Wright M, Dupuis-Williams P & Beisson J (2003) Gamma-tubulin and MTOCs in Paramecium. *Protist* 154: 193–209

Knödler A, Feng S, Zhang J, Zhang X, Das A, Peränen J & Guo W (2010) Coordination of Rab8 and Rab11 in primary ciliogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 6346–6351

Kobayashi T, Kim S, Lin Y-C, Inoue T & Dynlacht BD (2014) The CP110-interacting proteins Talpid3 and Cep290 play overlapping and distinct roles in cilia assembly. *J Cell Biol* 204: 215–229

Kodani A, Yu TW, Johnson JR, Jayaraman D, Johnson TL, Al-Gazali L, Sztriha L, Partlow JN, Kim H, Krup AL, *et al* (2015) Centriolar satellites assemble centrosomal microcephaly proteins to recruit CDK2 and promote centriole duplication. *eLife* 4: e07519

Kubo A & Tsukita S (2003) Non-membranous granular organelle consisting of PCM-1: subcellular distribution and cell-cycle-dependent assembly/disassembly. *J Cell Sci* 116: 919–928

Kumar D, Rains A, Herranz-Pérez V, Lu Q, Shi X, Swaney DL, Stevenson E, Krogan NJ, Huang B, Westlake C, *et al* (2021) A ciliopathy complex builds distal appendages to initiate ciliogenesis. *J Cell Biol* 220: e202011133

Le Guennec M, Klena N, Gambarotto D, Laporte MH, Tassin A-M, van den Hoek H, Erdmann PS, Schaffer M, Kovacik L, Borgers S, *et al* (2020) A helical inner scaffold provides a structural basis for centriole cohesion. *Sci Adv* 6: eaaz4137

Lopes CAM, Prosser SL, Romio L, Hirst RA, O'Callaghan C, Woolf AS & Fry AM (2011a) Centriolar satellites are assembly points for proteins implicated in human ciliopathies, including oral-facial-digital syndrome 1. *J Cell Sci* 124: 600–612

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Lopes CAM, Prosser SL, Romio L, Hirst RA, O'Callaghan C, Woolf AS & Fry AM (2011b) Centriolar satellites are assembly points for proteins implicated in human ciliopathies, including oral-facial-digital syndrome 1. *J Cell Sci* 124: 600–612

Maro B & Bornens M (1980) The centriole-nucleus association: Effects of cytochalasin B and nocodazole. *Biol Cell*: 287–290

Mennella V, Agard DA, Huang B & Pelletier L (2014) Amorphous no more: subdiffraction view of the pericentriolar material architecture. *Trends Cell Biol* 24: 188–197

Mitchison HM & Valente EM (2017) Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. *J Pathol* 241: 294–309

Nizak C, Martin-Lluesma S, Moutel S, Roux A, Kreis TE, Goud B & Perez F (2003) Recombinant antibodies against subcellular fractions used to track endogenous Golgi protein dynamics in vivo. *Traffic Cph Den* 4: 739–753

Paintrand M, Moudjou M, Delacroix H & Bornens M (1992) Centrosome organization and centriole architecture: their sensitivity to divalent cations. *J Struct Biol* 108: 107–128

Paoletti A, Moudjou M, Paintrand M, Salisbury JL & 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

Reiter JF, Blacque OE & Leroux MR (2012) The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO Rep* 13: 608–618

Roux KJ, Kim DI, Raida M & Burke B (2012) A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol* 196: 801–810

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

Ruiz F, Garreau de Loubresse N, Klotz C, Beisson J & Koll F (2005) Centrin deficiency in Paramecium affects the geometry of basal-body duplication. *Curr Biol CB* 15: 2097–2106

Ruiz F, Krzywicka A, Klotz C, Keller A, Cohen J, Koll F, Balavoine G & Beisson J (2000) The SM19 gene, required for duplication of basal bodies in Paramecium, encodes a novel tubulin, eta-tubulin. *Curr Biol CB* 10: 1451–1454

Schmidt KN, Kuhns S, Neuner A, Hub B, Zentgraf H & Pereira G (2012) Cep164 mediates vesicular docking to the mother centriole during early steps of ciliogenesis. *J Cell Biol* 199: 1083–1101

Sedjaï F, Acquaviva C, Chevrier V, Chauvin J-P, Coppin E, Aouane A, Coulier F, Tolun A, Pierres M, Birnbaum D, *et al* (2010) Control of ciliogenesis by FOR20, a novel centrosome and pericentriolar satellite protein. *J Cell Sci* 123: 2391–2401

Shakya S & Westlake CJ (2021) Recent advances in understanding assembly of the primary cilium membrane. *Fac Rev* 10: 16

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Shen Y, Wang H, Liu Z, Luo M, Ma S, Lu C, Cao Z, Yu Y, Cai R, Chen C, *et al* (2020) Identification of two novel pathogenic variants of PIBF1 by whole exome sequencing in a 2-year-old boy with Joubert syndrome. *BMC Med Genet* 21: 192

Sillibourne JE, Hurbain I, Grand-Perret T, Goud B, Tran P & Bornens M (2013) Primary ciliogenesis requires the distal appendage component Cep123. *Biol Open* 2: 535–545

Singla V, Romaguera-Ros M, Garcia-Verdugo JM & Reiter JF (2010) Ofd1, a human disease gene, regulates the length and distal structure of centrioles. *Dev Cell* 18: 410–424

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

Sonneborn TM (1970) Gene action in development. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 176: 347–366

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

Steib E, Laporte MH, Gambarotto D, Olieric N, Zheng C, Borgers S, Olieric V, Le Guennec M, Koll F, Tassin A-M, *et al* (2020a) WDR90 is a centriolar microtubule wall protein important for centriole architecture integrity. *eLife* 9: e57205

Steib E, Laporte MH, Gambarotto D, Olieric N, Zheng C, Borgers S, Olieric V, Le Guennec M, Koll F, Tassin A-M, *et al* (2020b) WDR90 is a centriolar microtubule wall protein important for centriole architecture integrity. *eLife* 9: e57205

Stinchcombe JC, Randzavola LO, Angus KL, Mantell JM, Verkade P & Griffiths GM (2015) Mother Centriole Distal Appendages Mediate Centrosome Docking at the Immunological Synapse and Reveal Mechanistic Parallels with Ciliogenesis. *Curr Biol CB* 25: 3239–3244

Stowe TR, Wilkinson CJ, Iqbal A & Stearns T (2012) The centriolar satellite proteins Cep72 and Cep290 interact and are required for recruitment of BBS proteins to the cilium. *Mol Biol Cell* 23: 3322–3335

Tanos BE, Yang H-J, Soni R, Wang W-J, Macaluso FP, Asara JM & Tsou M-FB (2013) Centriole distal appendages promote membrane docking, leading to cilia initiation. *Genes Dev* 27: 163–168

Tassin AM & Bornens M (1999) Centrosome structure and microtubule nucleation in animal cells. *Biol Cell* 91: 343–354

Tassin A-M, Lemullois M & Aubusson-Fleury A (2015a) Paramecium tetraurelia basal body structure. *Cilia* 5: 6

Tassin A-M, Lemullois M & Aubusson-Fleury A (2015b) Paramecium tetraurelia basal body structure. *Cilia* 5: 6

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

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.13.452210; this version posted July 14, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

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

Vieillard J, Paschaki M, Duteyrat J-L, Augière C, Cortier E, Lapart J-A, Thomas J & Durand B (2016) Transition zone assembly and its contribution to axoneme formation in Drosophila male germ cells. *J Cell Biol* 214: 875–889

Vincensini L, Blisnick T & Bastin P (2011) 1001 model organisms to study cilia and flagella. *Biol Cell* 103: 109–130

Viol L, Hata S, Pastor-Peidro A, Neuner A, Murke F, Wuchter P, Ho AD, Giebel B & Pereira G (2020) Nek2 kinase displaces distal appendages from the mother centriole prior to mitosis. *J Cell Biol* 219

Wang L, Failler M, Fu W & Dynlacht BD (2018) A distal centriolar protein network controls organelle maturation and asymmetry. *Nat Commun* 9: 3938

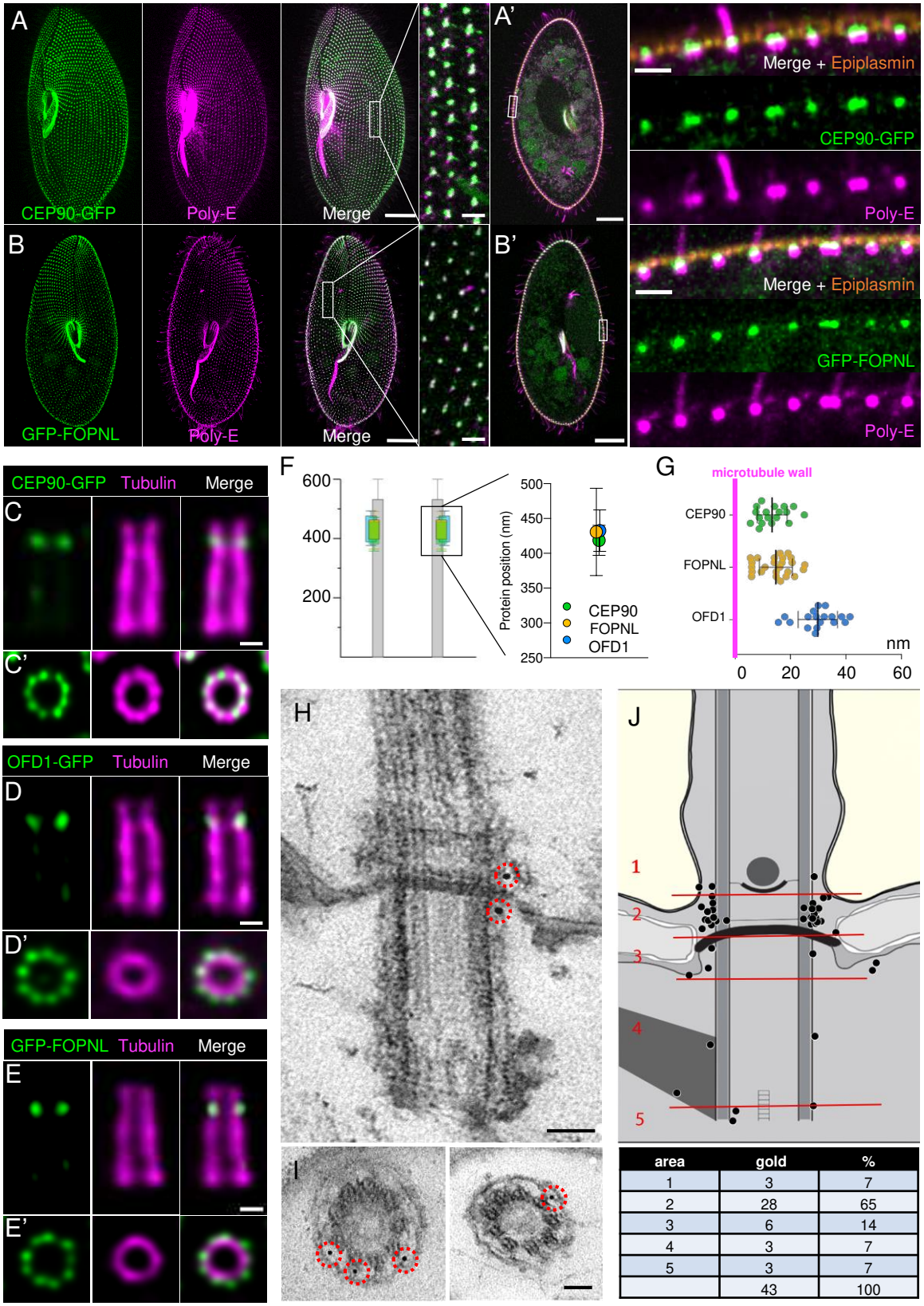
Wang W-J, Tay HG, Soni R, Perumal GS, Goll MG, Macaluso FP, Asara JM, Amack JD & Tsou M-FB (2013) CEP162 is an axoneme-recognition protein promoting ciliary transition zone assembly at the cilia base. *Nat Cell Biol* 15: 591–601

Westlake CJ, Baye LM, Nachury MV, Wright KJ, Ervin KE, Phu L, Chalouni C, Beck JS, Kirkpatrick DS, Slusarski DC, *et al* (2011) Primary cilia membrane assembly is initiated by Rab11 and transport protein particle II (TRAPPII) complex-dependent trafficking of Rabin8 to the centrosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 2759–2764

Wheway G, Schmidts M, Mans DA, Szymanska K, Nguyen T-MT, Racher H, Phelps IG, Toedt G, Kennedy J, Wunderlich KA, *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

Wiegering A, Dildrop R, Kalfhues L, Spychala A, Kuschel S, Lier JM, Zobel T, Dahmen S, Leu T, Struchtrup A, *et al* (2018) Cell type-specific regulation of ciliary transition zone assembly in vertebrates. *EMBO J* 37

Yang TT, Chong WM, Wang W-J, Mazo G, Tanos B, Chen Z, Tran TMN, Chen Y-D, Weng RR, Huang C-E, *et al* (2018) Super-resolution architecture of mammalian centriole distal appendages reveals distinct blade and matrix functional components. *Nat Commun* 9: 2023



area	gold	%
1	3	7
2	28	65
3	6	14
4	3	7
5	3	7
	43	100

Figure 1

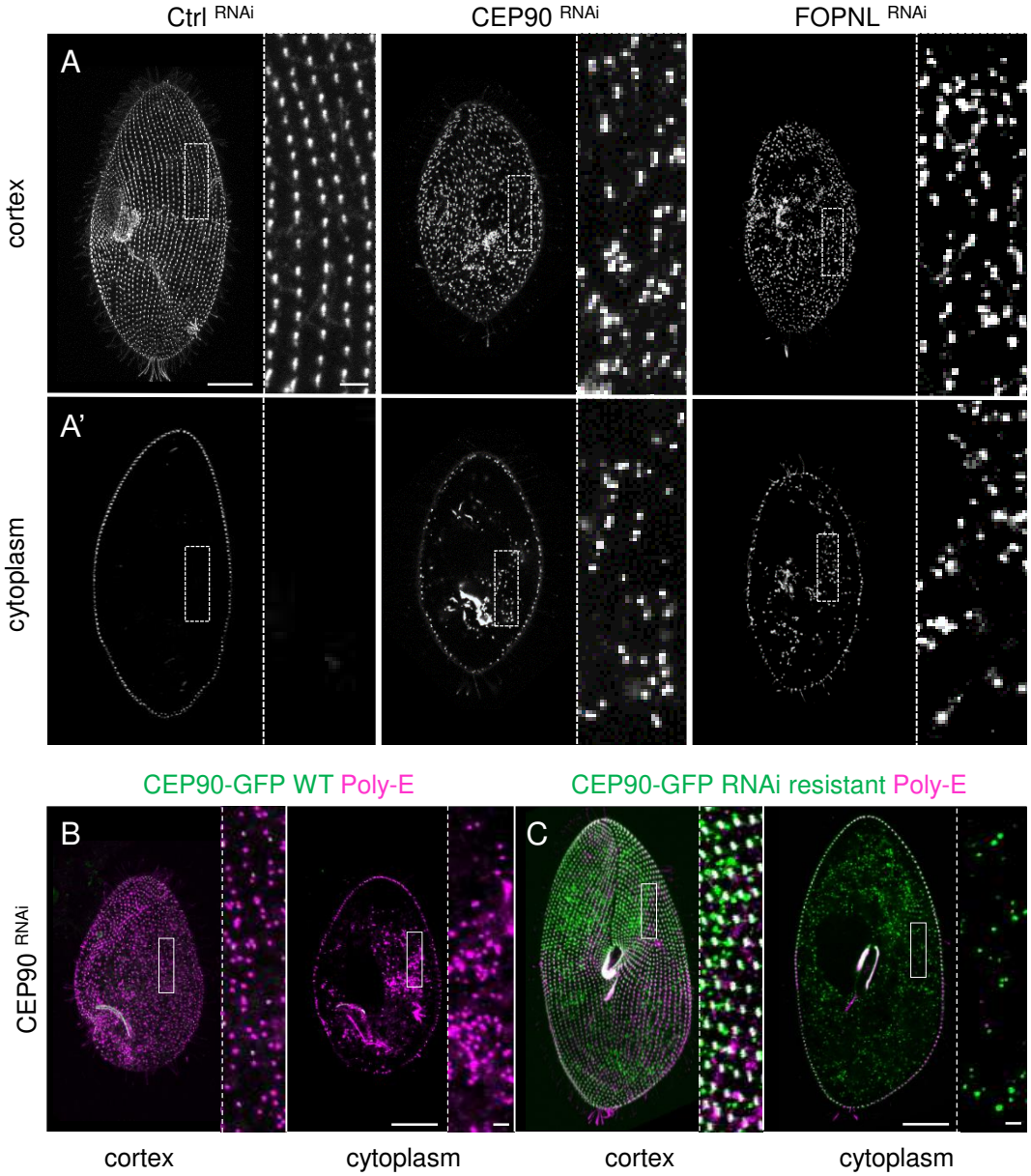

Ctrl RNAi
CEP90 RNAi
FOPNL RNAi
A
cortex
A'
cytoplasm
CEP90-GFP WT Poly-E
CEP90-GFP RNAi resistant Poly-E
B
C
CEP90 RNAi
cortex
cytoplasm
cortex
cytoplasm

Figure 2

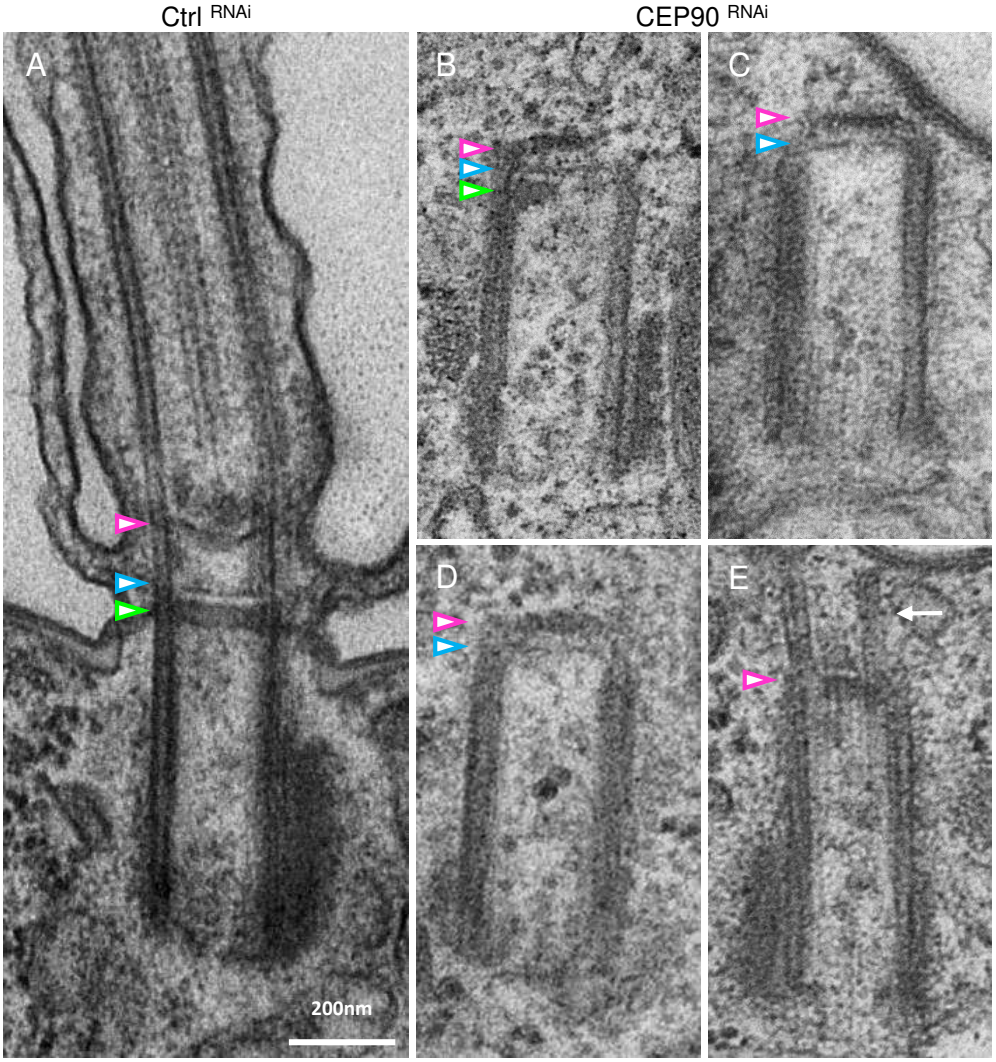


Figure 3

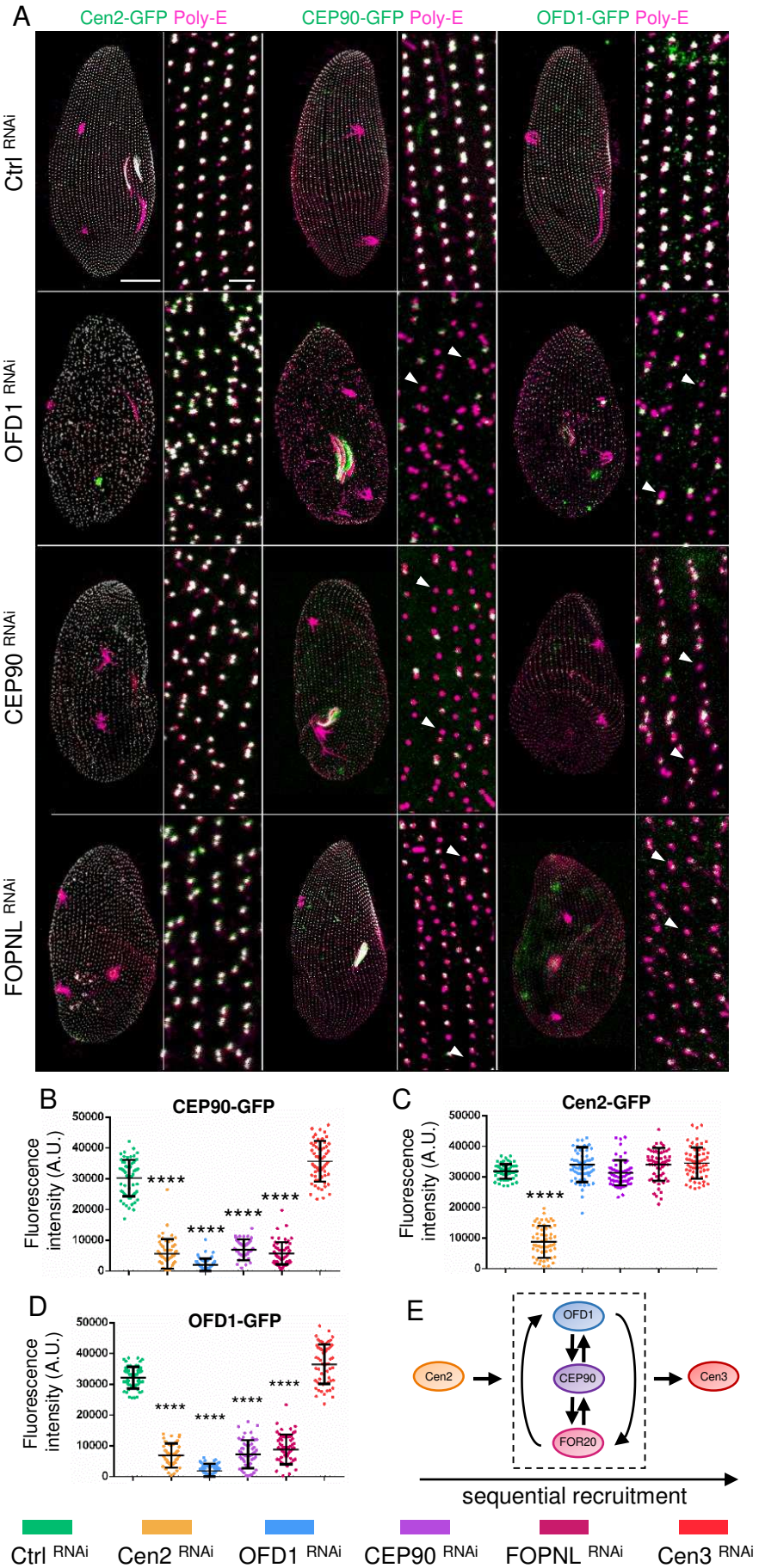

A
Cen2-GFP Poly-E
CEP90-GFP Poly-E
OFD1-GFP Poly-E
Ctrl RNAi
OFD1 RNAi
CEP90 RNAi
FOPNL RNAi
B
CEP90-GFP
Fluorescence intensity (A.U.)
50000
40000
30000
20000
10000
0
****
C
Cen2-GFP
D
OFD1-GFP
E
Cen2
OFD1
CEP90
FOR20
Cen3
sequential recruitment
Ctrl RNAi
Cen2 RNAi
OFD1 RNAi
CEP90 RNAi
FOPNL RNAi
Cen3 RNAi

Figure 4

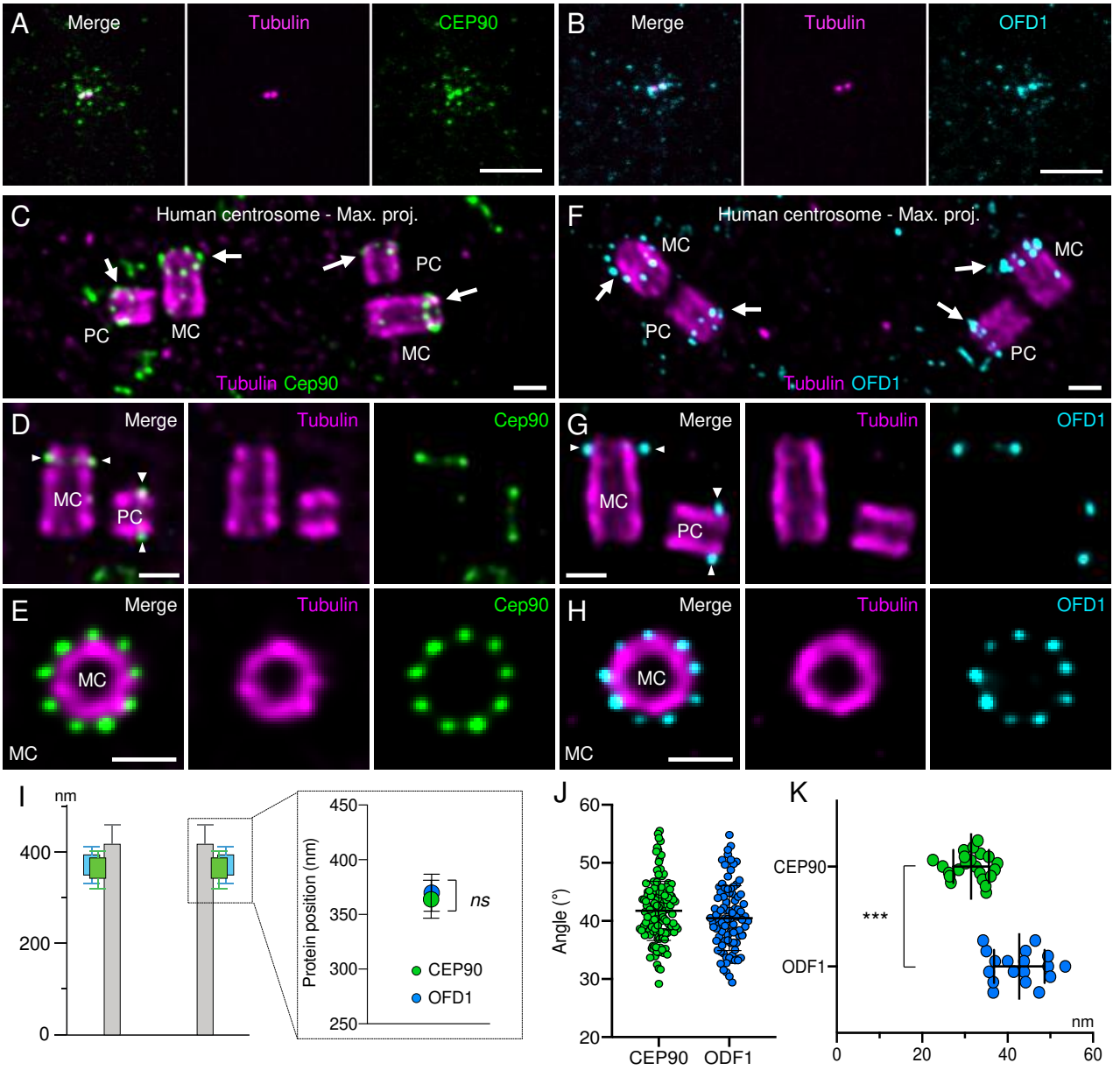

A
Merge
Tubulin
CEP90
B
Merge
Tubulin
OFD1
C
Human centrosome - Max. proj.
PC
MC
PC
MC
Tubulin Cep90
F
Human centrosome - Max. proj.
MC
MC
PC
PC
Tubulin OFD1
D
Merge
Tubulin
Cep90
MC
PC
G
Merge
Tubulin
OFD1
MC
PC
E
Merge
Tubulin
Cep90
MC
MC
H
Merge
Tubulin
OFD1
MC
MC
I
nm
400
200
0
450
400
350
300
250
Protein position (nm)
ns
CEP90
OFD1
J
60
50
40
30
20
Angle (°)
CEP90
ODF1
K
CEP90
ODF1
***
nm
0
20
40
60

Figure 5

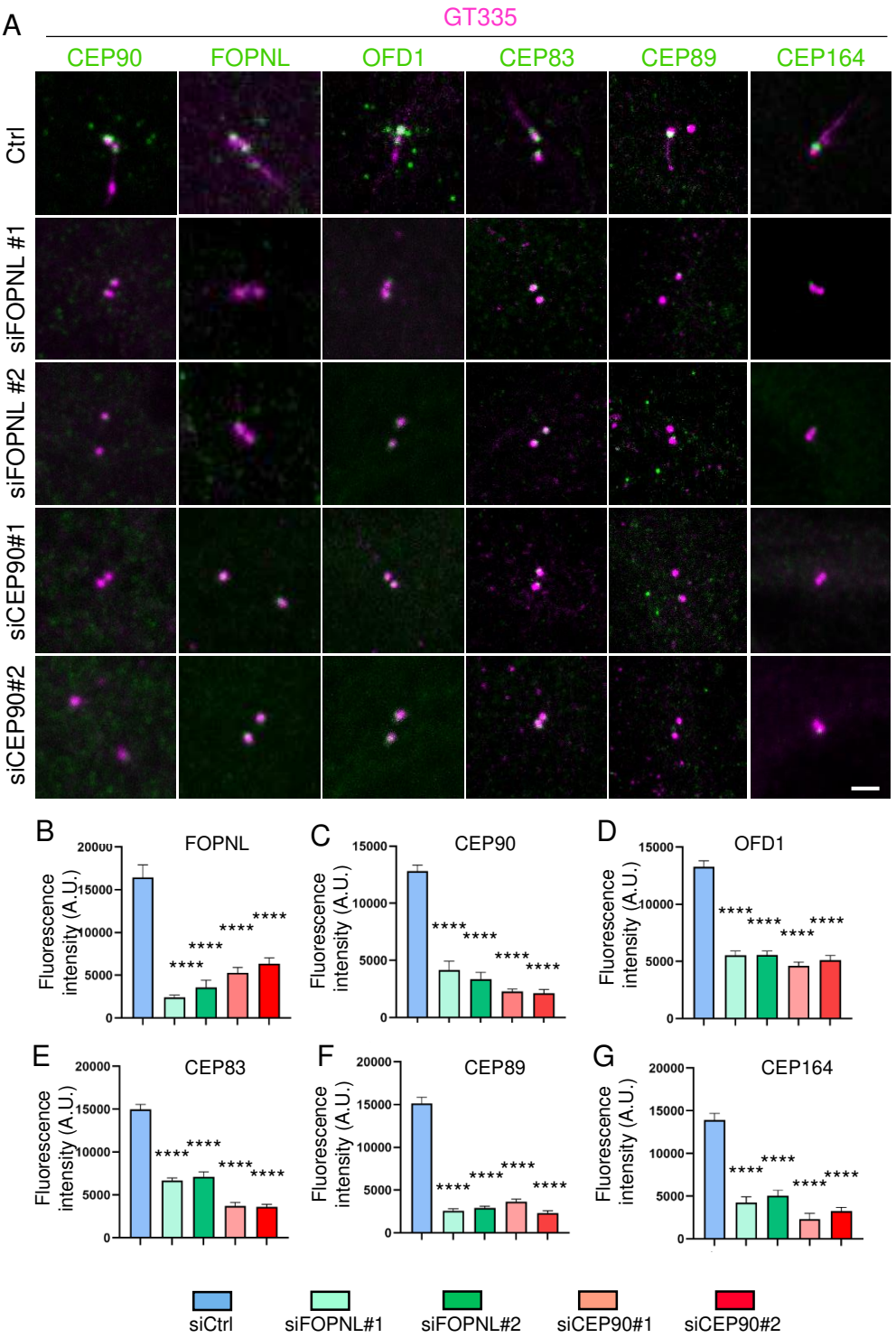

A
GT335
CEP90
FOPNL
OFD1
CEP83
CEP89
CEP164
Ctrl
siFOPNL #1
siFOPNL #2
siCEP90#1
siCEP90#2
B
FOPNL
C
CEP90
D
OFD1
E
CEP83
F
CEP89
G
CEP164
Fluorescence intensity (A.U.)
siCtrl
siFOPNL#1
siFOPNL#2
siCEP90#1
siCEP90#2

Figure 6

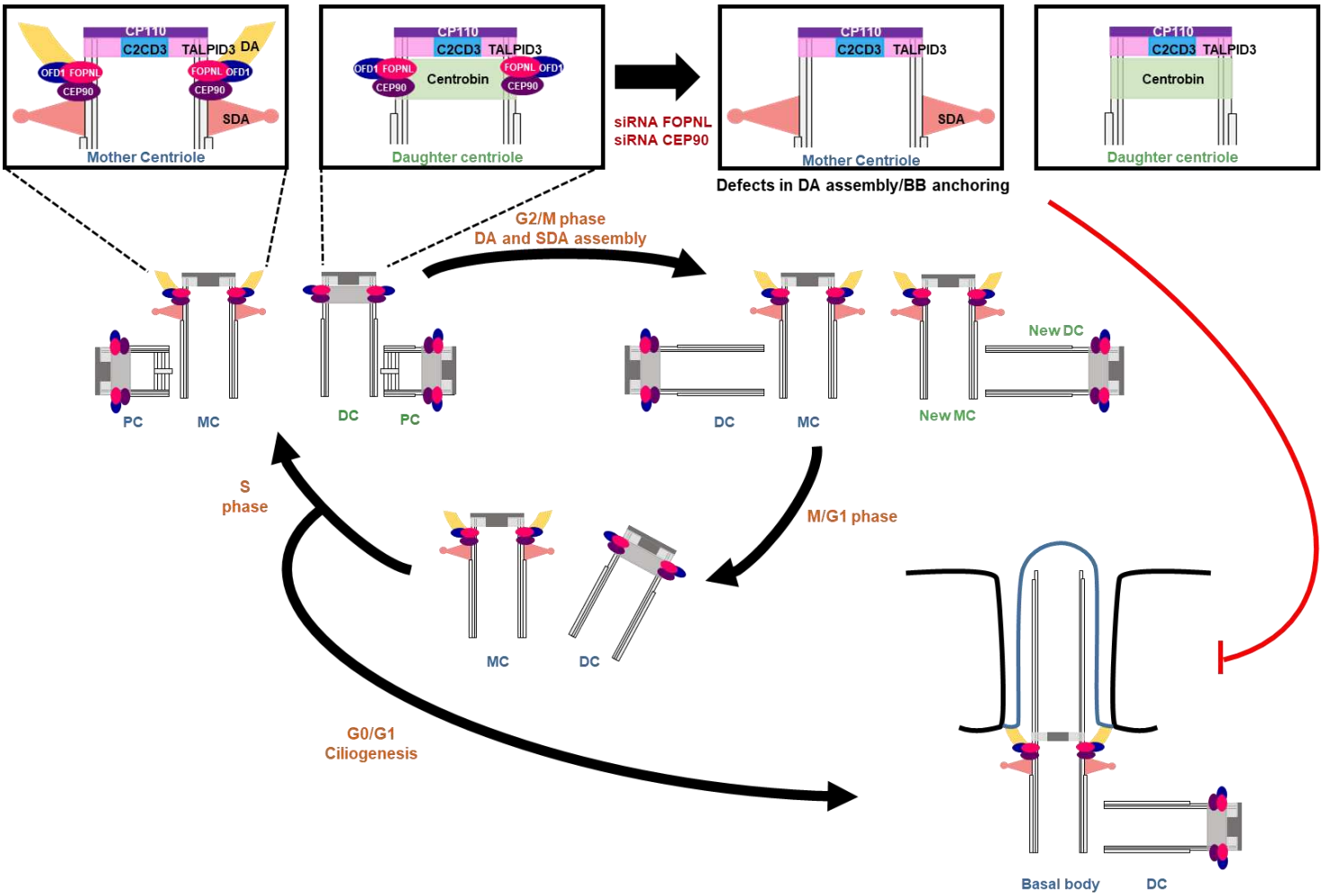

CP110
C2CD3
TALPID3
DA
OFD1
FOPNL
CEP90
SDA
Mother Centriole
Centrobin
Daughter centriole
siRNA FOPNL
siRNA CEP90
Defects in DA assembly/BB anchoring
G2/M phase
DA and SDA assembly
PC
MC
DC
New DC
New MC
S
phase
M/G1 phase
G0/G1
Ciliogenesis
Basal body

Figure 7

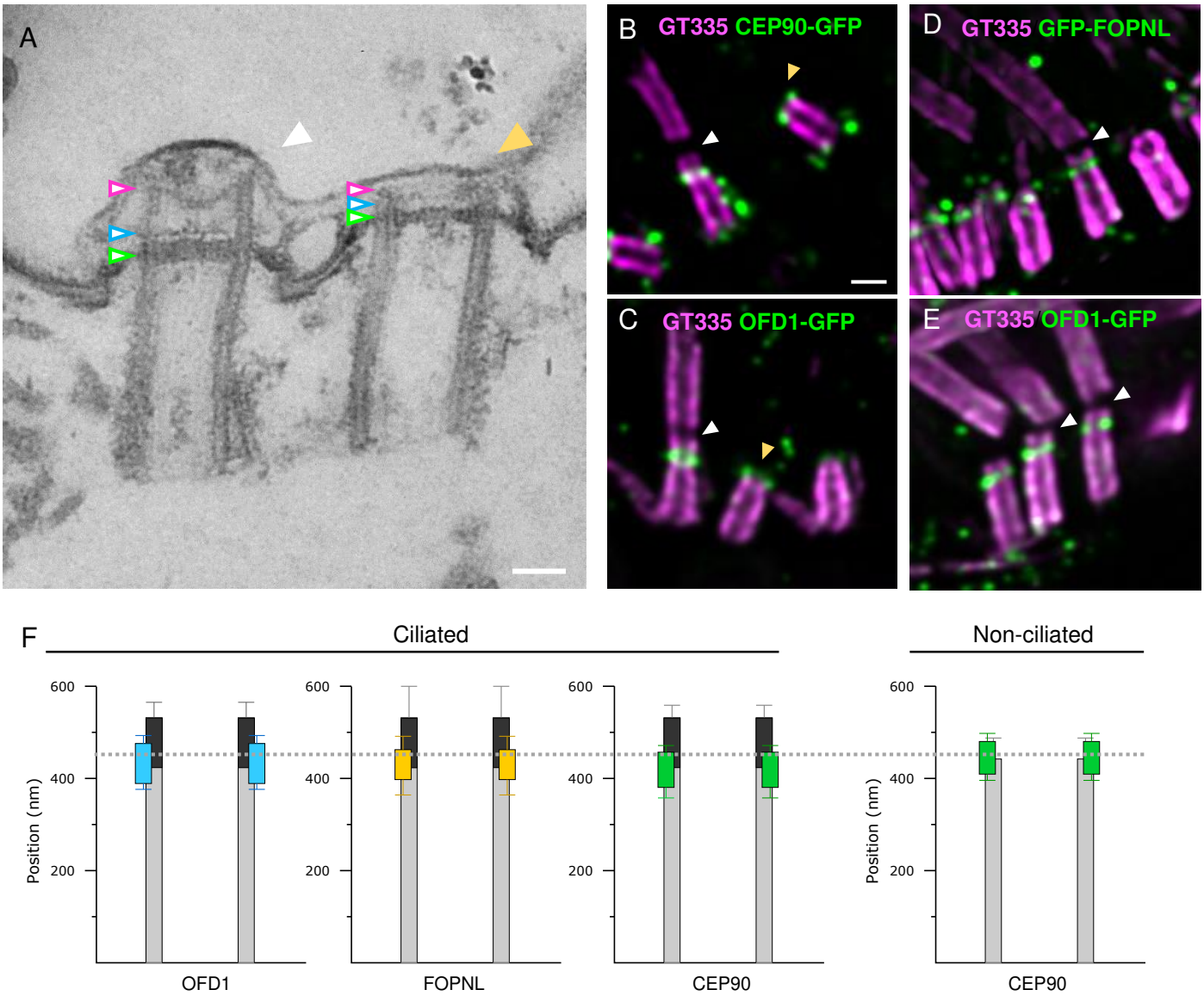

A
B GT335 CEP90-GFP
D GT335 GFP-FOPNL
C GT335 OFD1-GFP
E GT335 OFD1-GFP
F
Ciliated
Non-ciliated
Position (nm)
600
400
200
OFD1
FOPNL
CEP90
CEP90

Figure S1

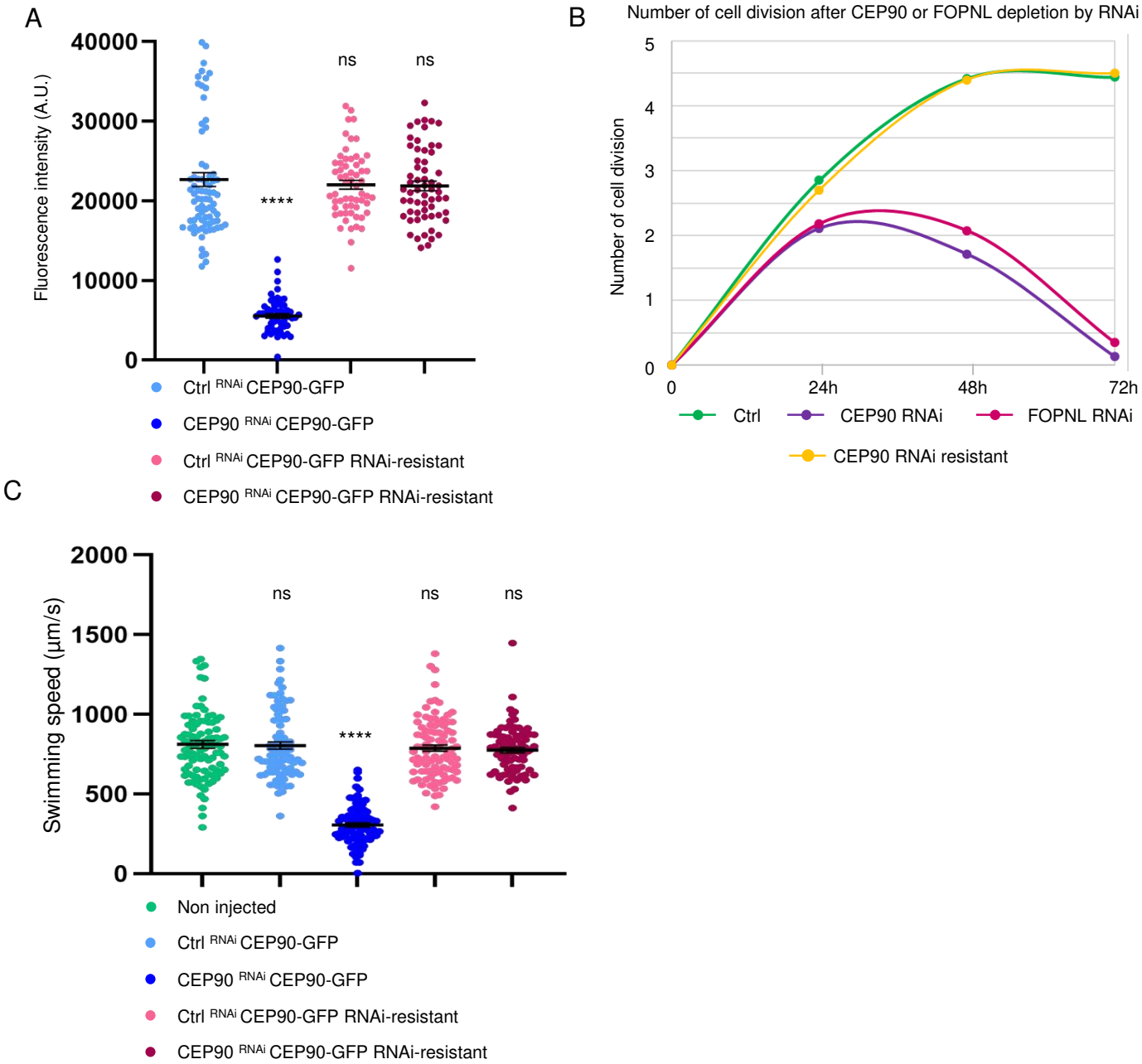

A
Fluorescence intensity (A.U.)
40000
30000
20000
10000
0
ns
ns
****
Ctrl RNAi CEP90-GFP
CEP90 RNAi CEP90-GFP
Ctrl RNAi CEP90-GFP RNAi-resistant
CEP90 RNAi CEP90-GFP RNAi-resistant
B
Number of cell division after CEP90 or FOPNL depletion by RNAi
Number of cell division
5
4
3
2
1
0
0
24h
48h
72h
Ctrl
CEP90 RNAi
FOPNL RNAi
CEP90 RNAi resistant
C
Swimming speed (µm/s)
2000
1500
1000
500
0
ns
ns
ns
****
Non injected
Ctrl RNAi CEP90-GFP
CEP90 RNAi CEP90-GFP
Ctrl RNAi CEP90-GFP RNAi-resistant
CEP90 RNAi CEP90-GFP RNAi-resistant

Figure S2

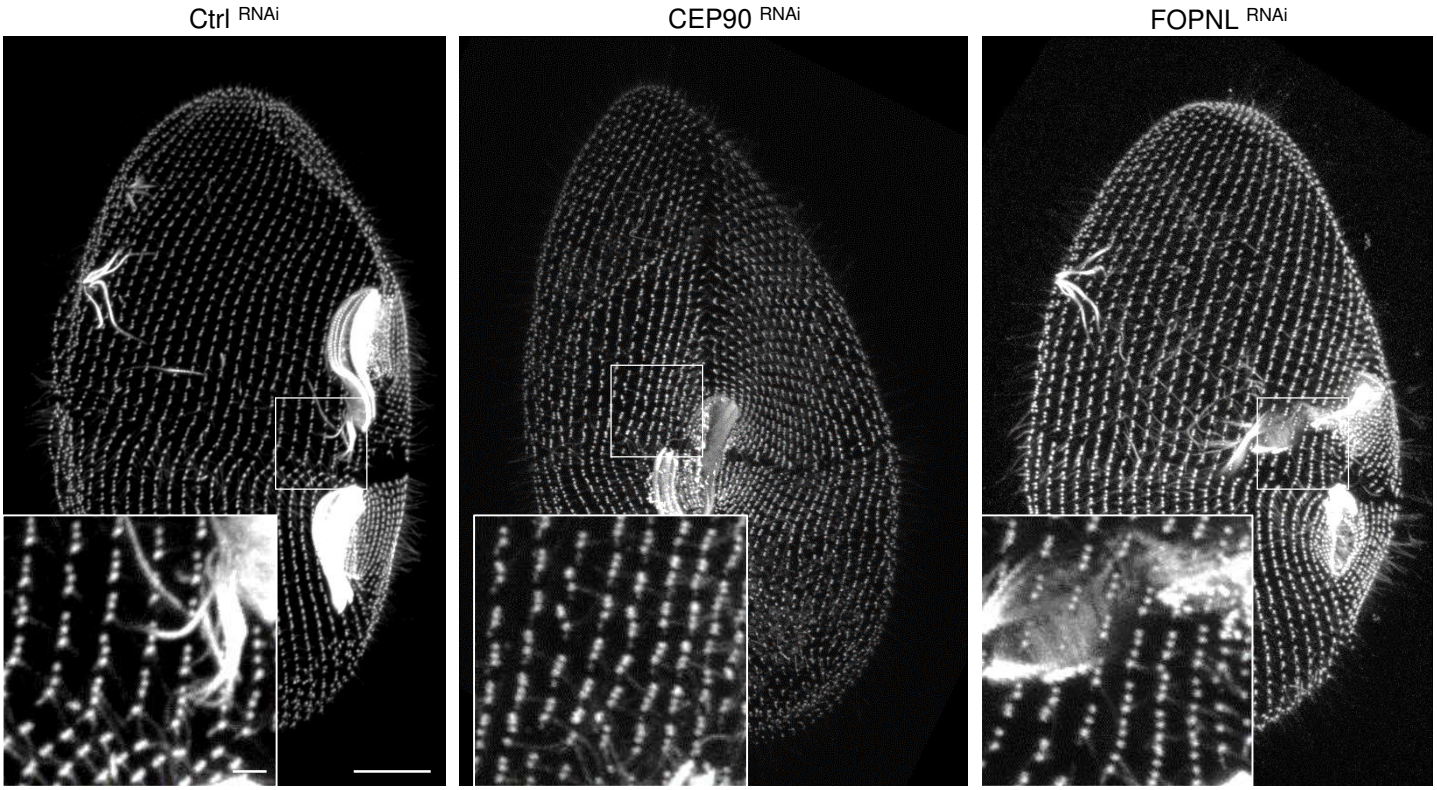


Figure S3

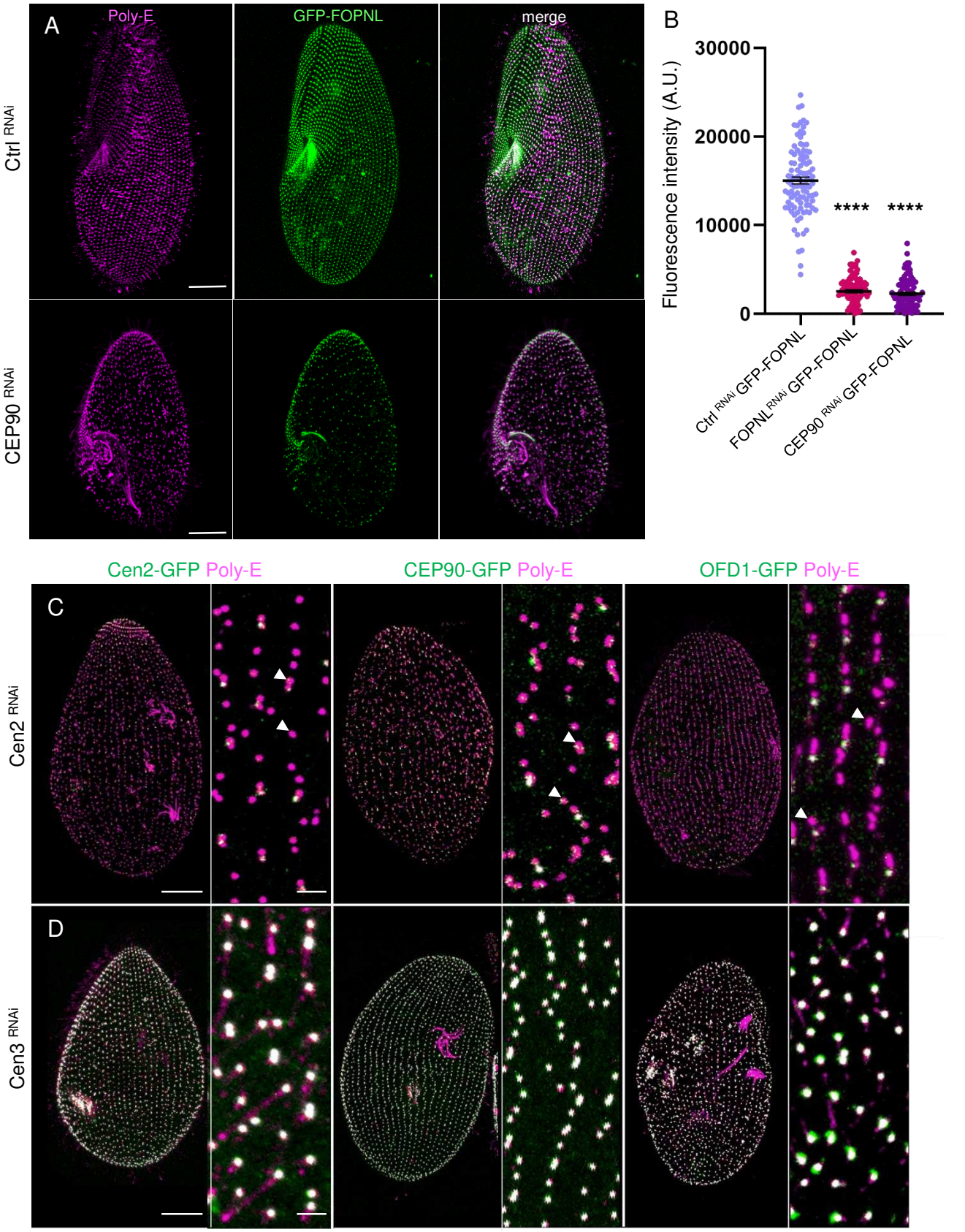
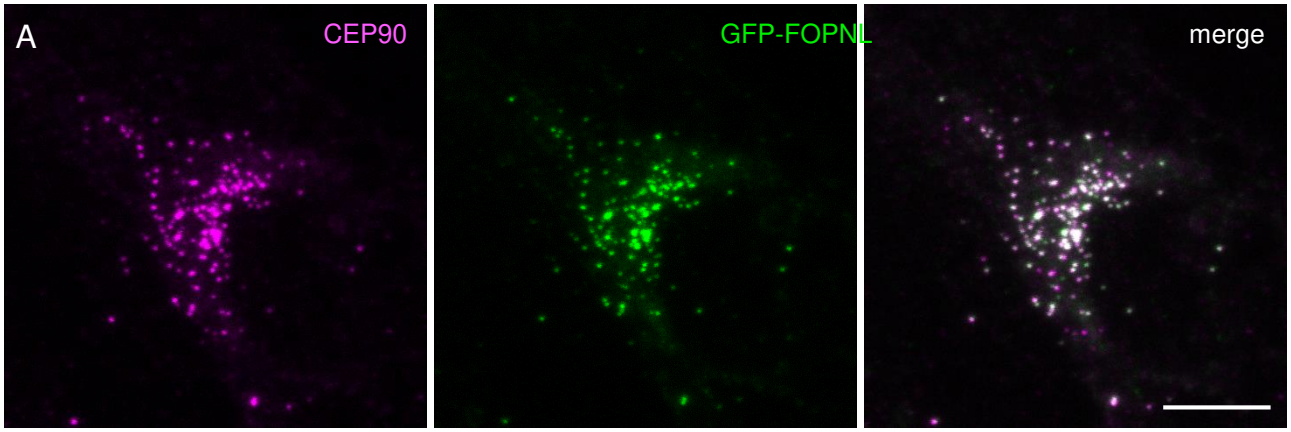

A
Poly-E
GFP-FOPNL
merge
Ctrl RNAi
CEP90 RNAi
B
Fluorescence intensity (A.U.)
30000
20000
10000
0
****
****
Ctrl RNAi GFP-FOPNL
FOPNL RNAi GFP-FOPNL
CEP90 RNAi GFP-FOPNL
Cen2-GFP Poly-E
CEP90-GFP Poly-E
OFD1-GFP Poly-E
C
Cen2 RNAi
D
Cen3 RNAi

Figure S4


A
CEP90
GFP-FOPNL
merge

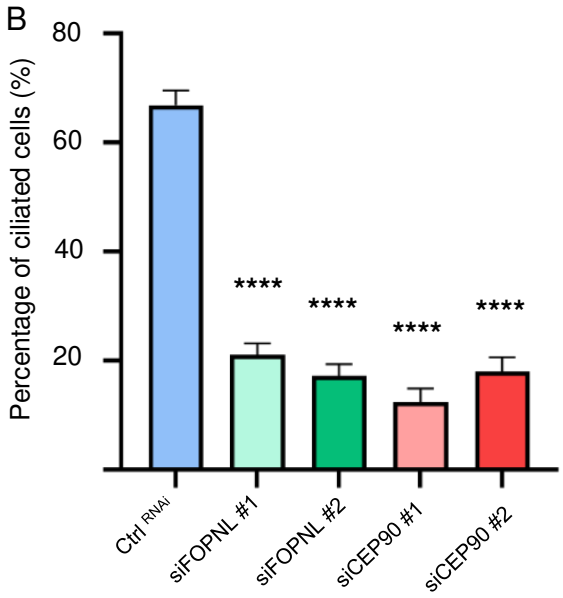

B
Percentage of ciliated cells (%)
80
60
40
20
****
****
****
****
Ctrl RNAi
siFOPNL #1
siFOPNL #2
siCEP90 #1
siCEP90 #2

Figure S5

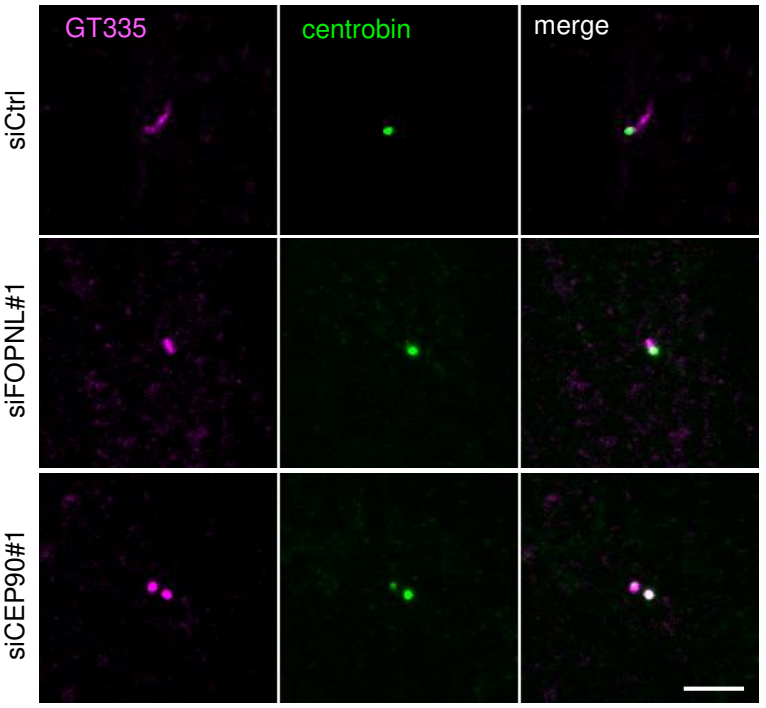


Figure S6

B. CEP90, OFD1 et FOPNL forment un complexe capable de spécifier la localisation des futurs appendices distaux.

Dans cet article nous avons mis en évidence que, chez la paramécie et les mammifères, CEP90, OFD1 et FOPNL forment un complexe fonctionnel nécessaire à l'ancrage des corps basaux. Le sens du terme « complexe fonctionnelle » tel que nous l'avons défini met en avant que ces 3 protéines (FOPNL, OFD1 et CEP90) sont recrutées de manière interdépendante au centriole/corps basal et partagent la même fonction dans l'ancrage des corps basaux. Cependant le terme « complexe » peut être critiqué dans le sens où il représente généralement un ensemble de protéines qui interagissent physiquement pour former un groupe fonctionnel. Au cours de ma thèse, mes expériences préliminaires ne m'ont pas permis de démontrer d'interaction physique entre FOPNL et CEP90.

Nous avons également démontré dans cet article que, chez les mammifères, FOPNL et CEP90 sont nécessaires aux recrutement des appendices distaux et notamment CEP83, CEP89 et CEP164. Il est aussi connu que OFD1 remplit le même rôle chez les mammifères. En couplant ces données avec les images de microscopies à expansion qui révèlent que ces protéines sont recrutées précocement au procentrioles durant la duplication, nous avons proposé l'hypothèse que le groupe ternaire CEP90 OFD1 et FOPNL pourrait servir de marqueur/de futur point d'ancrage pour l'assemblage des appendices distaux au cours de la maturation du centriole fils en centriole père. Néanmoins, nos expériences seules ne permettent pas de démontrer que ces protéines sont suffisantes pour déterminer précisément la future position des appendices distaux.

Pour répondre à ces deux critiques majeures de l'article, des expériences supplémentaires ont été réalisées par Logan Greibill avec l'aide de Khaled Bouhouch

pendant la rédaction de ce manuscrit. Les nouveaux résultats nous permettent d'aller plus loin dans la caractérisation fonctionnelle de ces protéines.

1. FOPNL, CEP90 et OFD1 sont capables d'interagir physiquement

Afin de déterminer si CEP90, OFD1 et FOPNL forment un complexe des expériences de co-immunprécipitations (Co-IP) ont été réalisées. Au cours de ma thèse j'ai pu observer que la taux d'expression de FOPNL endogène est faible dans les lignées de cellules RPE1 et HEK293 ce qui rend sa détection difficile sans enrichissement. Pour réaliser la Co-IP nous avons utilisé une lignée HeLA-Kyoto exprimant FOPNL-GFP que nous avons reçu de Olivier Rosnet. Cette lignée avait permis de mettre en évidence dans les travaux de Chevrier et collaborateur (Chevrier et al., 2016) des interactions entre FOPNL, MNR et OFD1 (Figure 22).

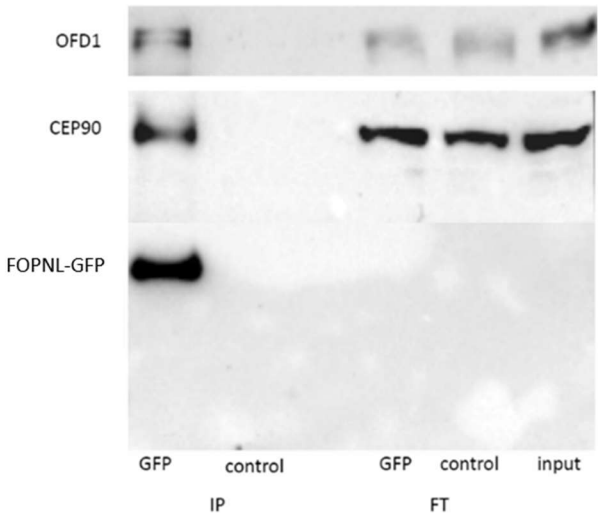


Figure 22 : Co-immunoprécitation de CEP90 et OFD1 avec FOPNL-GFP. Les protéines d'un lysat de cellules HeLa Kyoto surexprimant FOPNL-GFP ont été immunoprécipitées (IP) sur des billes anti-GFP (GFP) ou IgG (control). Les protéines qui n'ont pas été immunoprécipitées ont été chargée sur le gel (FT). Le western blot démontre que CEP90 et OFD1 sont co-immunoprécipitées avec FOPNL-GFP (IP GFP)

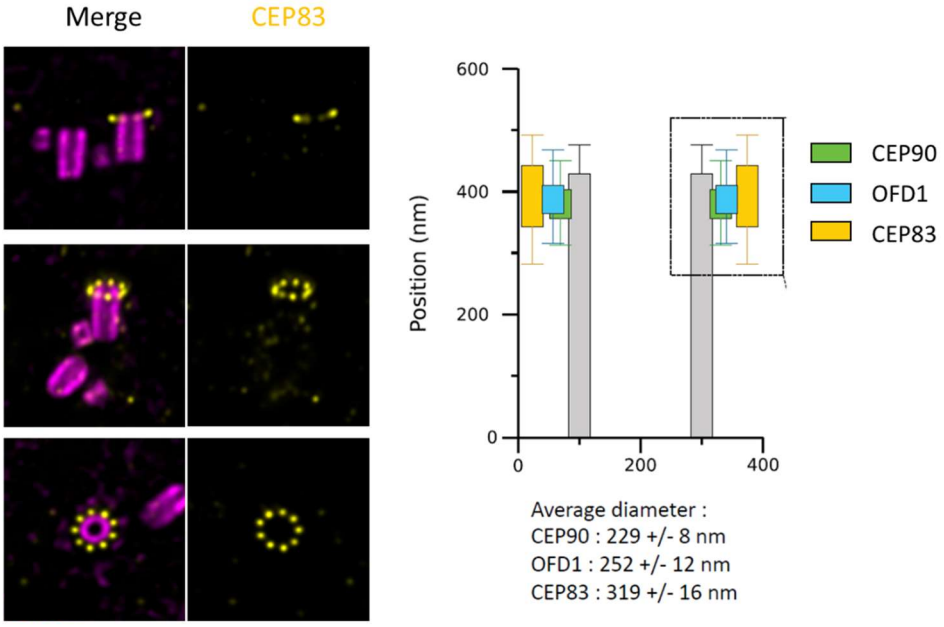
A la lumière de ces nouveaux résultats nous pouvons désormais conclure que CEP90, OFD1 et FOPNL forment un complexe dont l'intégrité est nécessaire au recrutement des appendices distaux et à l'ancrage des corps basaux.

2. CEP90, OFD1 et FOPNL permettent de déterminer la localisation de CEP83

Nous avons démontré que le complexe CEP90-OFD1-FOPNL est localisé proche du mur de microtubules en partie distale des centrioles père et fils. Le recrutement précoce de ce complexe au procentriole suggère qu'il pourrait servir de marqueur sur le centriole pour déterminer la position des appendices distaux au cours de la maturation en centriole père. Parmi les protéines des appendices distaux CEP83 est à la fois la première recrutée mais aussi la protéine la plus proche du mur de microtubules. En cellule de mammifères, la déplétion de FOPNL ou CEP90 entraine une forte diminution du signal CEP83 au centrosome. Ainsi le complexe ternaire est nécessaire au recrutement de CEP83 et pourrait servir à positionner cette protéine lors de son recrutement au centriole père. Pour tester cette hypothèse nous avons (i) mesuré la position de CEP83 sur les centrioles de mammifères pour la comparer à CEP90 et OFD1 et (ii) testé si les FOPNL, CEP90 et/OFD1 pourraient être suffisante pour recruter la protéine CEP83.

a) *CEP83 est localisée à proximité de CEP90 et OFD1 au centriole père*

Les différentes analyses de localisation des protéines des appendices distaux en super-résolution (Chong et al., 2020; Yang et al., 2018) démontrent que CEP83 est la protéine des appendices distaux la plus proche des microtubules. Nous avons alors comparé



dans les

Figure 23 : Localisation de la protéine CEP83 en super-résolution par la technique de U-ExM. Les centrioles pères et fils de cellules U2OS sont marqués par une combinaison d'anti-alpha et beta tubuline après expansion. Après acquisitions, les images sont déconvoluées grâce au logiciel Hyugens. La quantification de la position proximo-distal de CEP83 a été analysé par Marine Laporte et sa position schématique a été ajouté aux résultats de OFD1 et CEP83 (Borgne et al., 2021)

cellules U2OS la position du marquage de CEP83 à celui de CEP90 et OFD1 en utilisant la technique U-ExM. Les mesures de diamètres de CEP83 réalisées par Marine Laporte ont révélé que CEP83 est localisée à proximité de CEP90 et OFD1 (Figure 23). Les 3 protéines partagent la même localisation proximo-distale sur les centrioles pères. Alors que CEP90 et OFD1 sont plus proches du mur de microtubule (229nm et 252 nm de diamètre respectivement), le diamètre de CEP83 est plus important (316nm). Ce résultat est en accord avec le diamètre de CEP83 déterminé par STORM (318 +/- nm) par Yang et al. (2018).

La proximité seule de ces protéines ne permet pas de déterminer si CEP90 et OFD1 sont directement capables d'adresser/recruter CEP83 au centriole père, néanmoins ils démontrent que la position de la protéine la plus proximale des appendices distaux recrutée coïncide avec celle de CEP90 et OFD1.

b) La co-expression de MNR-GFP et deCEP90 permet de recruter CEP83 aux microtubules

Pour déterminer si CEP90, OFD1 et/ou FOPNL seraient capables de déterminer la localisation de CEP83 dans la cellule, nous avons cherché un moyen de délocaliser les protéines du complexe. Les travaux antérieurs ont démontré que ces trois protéines sont uniquement localisées au centrosome et que OFD1 et FOPNL forment un complexe avec MNR. Lorsque MNR est surexprimée, la protéine décore également les microtubules mais elle n'est pas suffisante pour recruter OFD1 ou FOPNL endogène aux microtubules (Figure.24 A). Ce résultat n'est pas en accord avec celui de Kumar et al., 2021. En comparaison, la surexpression seule de FOPNL ou OFD1 n'est pas suffisante pour marquer le réseau de microtubule. Seule la surexpression de MNR, FOPNL et OFD1 dans la même cellule permet de recruter ces deux dernières aux microtubules (Chevrier et al., 2016). Ces travaux suggèrent que MNR serait capable d'interagir directement avec les microtubules et de recruter FOPNL et OFD1.

En tirant parti de ces données nous avons voulu déterminer si la surexpression de MNR-GFP permet également (i) de délocaliser CEP90 au microtubules et si (ii) une combinaison de surexpression de MNR avec CEP90, OFD1 et/ou FOPNL pourrait recruter CEP83 aux microtubules.

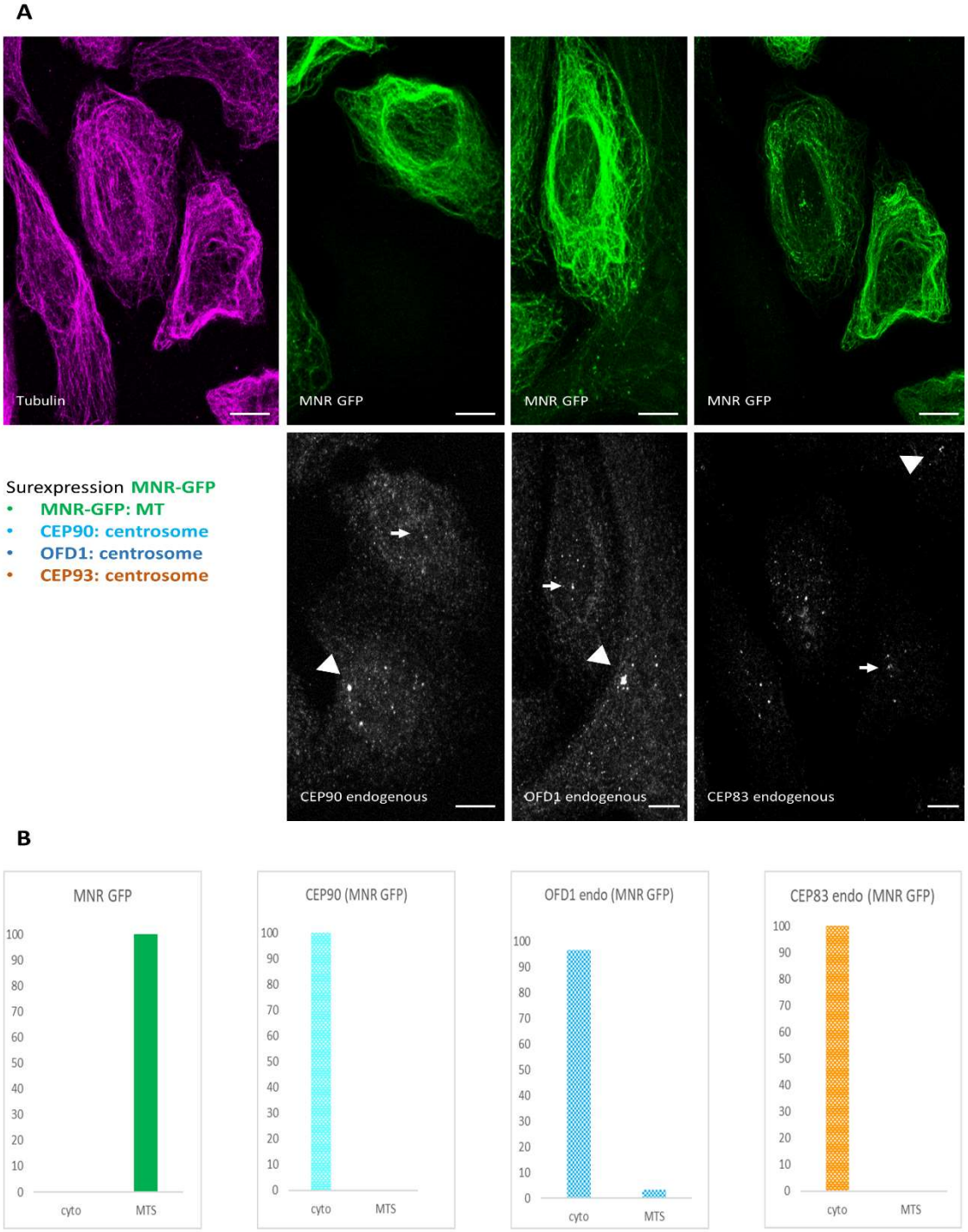


*Figure 24 : Effet de la surexpression de MNR-GFP seule sur la relocalisation de CEP90, OFD1 et CEP83 aux microtubules. (**A**) surexpression de MNR-GFP dans les cellules U2OS. Seule MNR décore les microtubules. CEP90, OFD1 et CEP83 endogènes restent au centrosome mais le marquage semble plus faible (flèche blanche) que dans les cellules non transfectées (point de flèche). (**B**) Quantification du pourcentage de cellules présentant une localisation de la protéine d'intérêt au niveau du cytoplasme (cyto) ou le long des microtubules (MTS). Barre d'échelle 15µm*

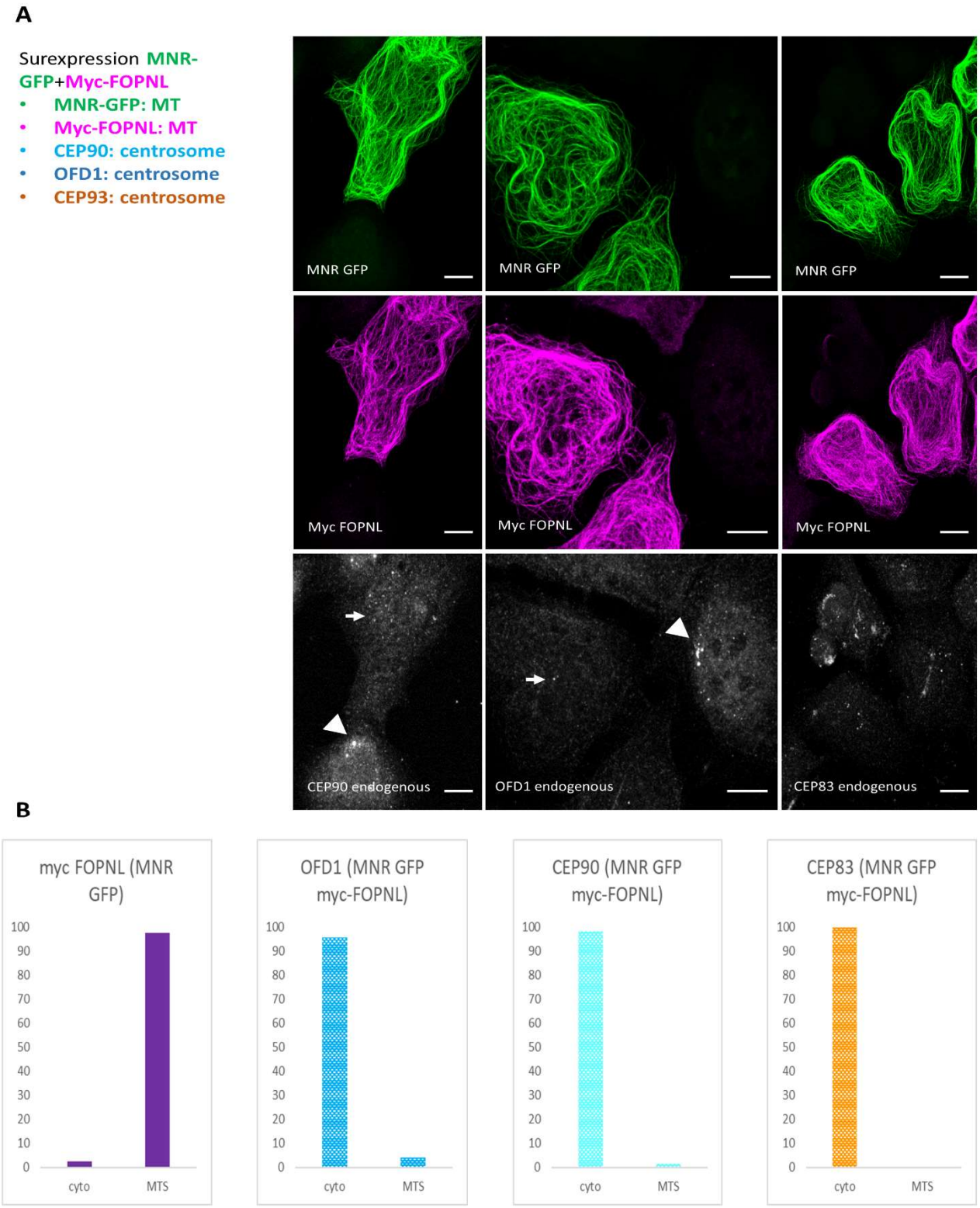


*Figure 25 : Effet de la surexpression de MNR-GFP et myc-FOPNL sur la relocalisation de CEP90, OFD1 et CEP83 aux microtubules (**A**) surexpression de MNR-GFP et myc-FOPNL dans les cellules U2OS. MNR et FOPNL décorent les microtubules. CEP90, OFD1 et CEP83 endogènes restent au centrosome mais le marquage semble plus faible dans les cellules co-transfectées (flèche blanche) que dans les cellules non transfectées (point de flèche). (**B**) Quantification du pourcentage de*

cellules présentant une localisation de la protéine d'intérêt au niveau du cytoplasme (cyto) ou le long des microtubules (MTS). Barre d'échelle 15µm

Comme attendu, la surexpression de MNR-GFP seule dans les cellules U2OS entraîne un marquage des microtubules (Figure 24). Il est envisageable que MNR-GFP soit capable, seule, de délocaliser une partie de ces protéines mais dans ces conditions aucune des 3 protéines ne marquent les microtubules. Lorsque MNR-GFP et myc-FOPNL sont toutes les deux surexprimées, elles marquent les microtubules alors que CEP90, OFD1 et CEP83 endogènes restent au centrosome (Figure 25). En revanche lorsque MNR-GFP et CEP90 sont surexprimées, non seulement CEP90 décore les microtubules, mais dans 70% des cas OFD1 et CEP83 endogène sont recrutées.

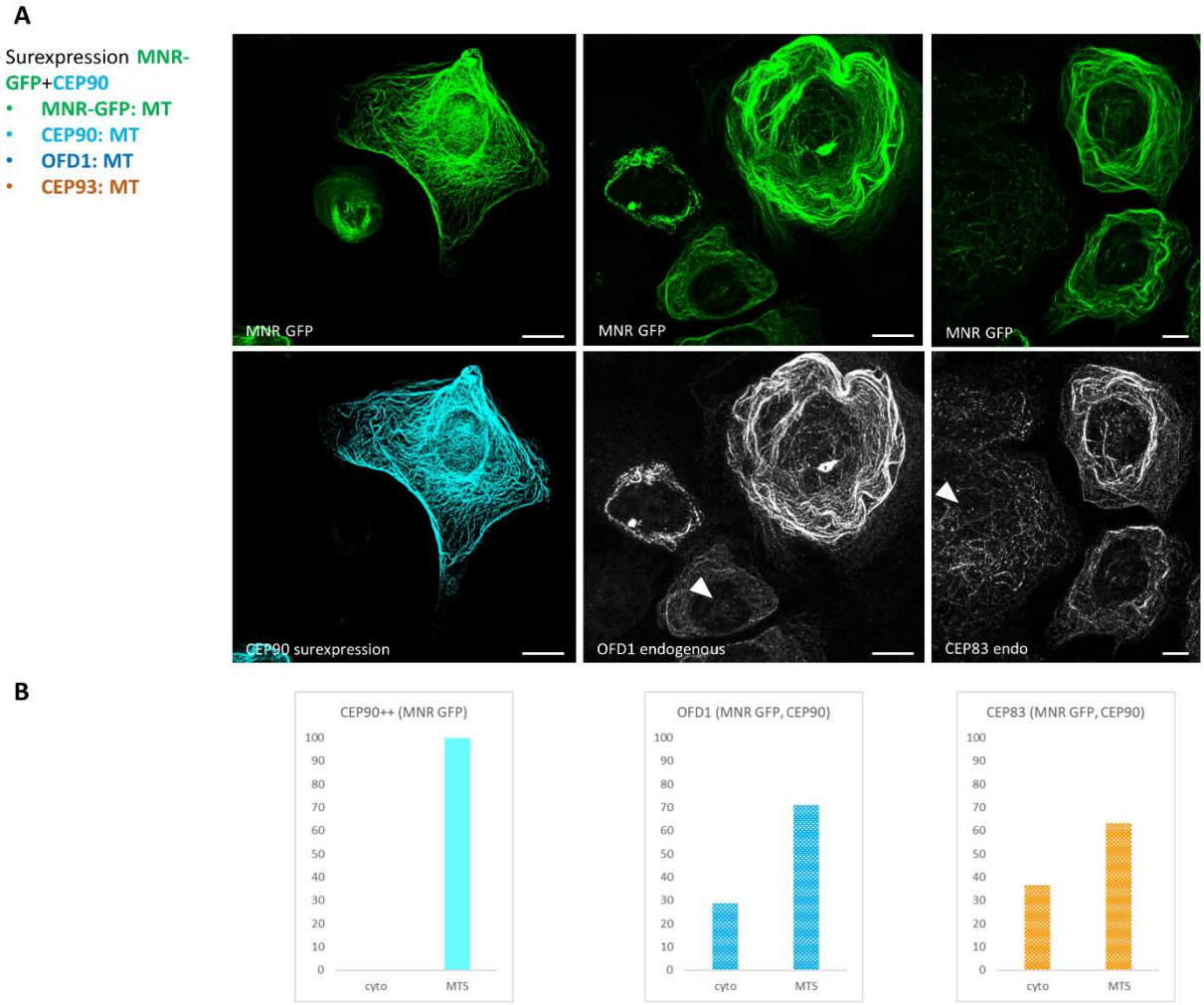


*Figure 26 : : Effet de la surexpression de MNR-GFP et CEP90L sur la relocalisation de CEP90, OFD1 et CEP83 aux microtubules. (**A**) surexpression de MNR-GFP et CEP90 dans les cellules U2OS. MNR, CEP90 ainsi que OFD1 et CEP83 endogènes décorent les microtubules. (**B**) Quantification du pourcentage de cellules présentant une localisation de la protéine d'intérêt au niveau du cytoplasme (cyto) ou le long des microtubules (MTS). Barre d'échelle 15µm*

Une première expérience de co-expression de MNR-GFP et de OFD1mcherry, suggère que ni CEP90, ni CEP83 ne sont recrutées aux microtubules. Cette expérience nécessite d'être reproduite et réalisée en parallèle avec la co-expression de CEP90 et MNR-GFP (Figure 26). Ces résultats démontrent que la co-expression de MNR-GFP et CEP90 suffit à relocaliser OFD1 et CEP83 endogène aux microtubules. Non seulement ces nouveaux résultats démontrent que le complexe CEP90-FOPNL-OFD1 est suffisant pour permettre le recrutement de CEP83 mais il permet d'enrichir notre modèle en y ajoutant la protéine MNR. Récemment, il a été démontré que (i) MNR est nécessaire au recrutement de CEP90 et OFD1 et que (ii) MNR est localisée à l'intérieur et proche du mur de microtubule (Kumar et al., 2021). L'ensemble de nos résultats associés aux travaux de Chevrier (Chevrier et al., 2016) et Kumar et al (2021) nous permet de proposer le modèle selon lequel MNR recruterait le complexe CEP90-OFD1-FOPNL précocement au cours de la duplication. La protéine CEP90 de ce complexe permettrait le recrutement de CEP83 au cours de la maturation du centriole fils en centriole père lors du cycle cellulaire suivant.

Cependant, ces expériences ne permettent pas de déterminer précisément le rôle de FOPNL au sein du complexe. Chevrier et al (2016) ont proposé que cette petite protéine de 20kDA stabiliserait le complexe MNR-OFD1.

c) La surexpression de CEP90 seule est suffisante pour recruter CEP83 dans des agrégats

Au cours de ces expériences, nous avons observé l'effet de la surexpression seule de CEP90 dans les U2OS. En absence de MNR-GFP, CEP90 ne décore pas les microtubules. En revanche, les cellules transfectées forment des agrégats/vésicules dans le cytoplasme qui sont marqués par l'anticorps CEP90 (flèche blanche Figure 27). Dans ces cellules, OFD1 et CEP83 sont aussi recrutées aux agrégats de CEP90. Cependant il est difficile de savoir si le recrutement de OFD1 et CEP83 est spécifique de ces agrégats ou si ces structures seraient capables d'agréger différentes protéines du centrosome.

Il serait nécessaire de tester si des protéines du centrosome n'interagissant pas avec CEP90, telle que γ-tubuline, sont recrutées aux agrégats pour s'assurer de la spécificité du recrutement de OFD1 et CEP83. Cette expérience sera réalisée prochainement et pourrait permettre de démontrer que CEP90 jouerait un rôle direct dans le recrutement de OFD1 et CEP90 alors que MNR permettrait d'adresser le complexe aux centrioles

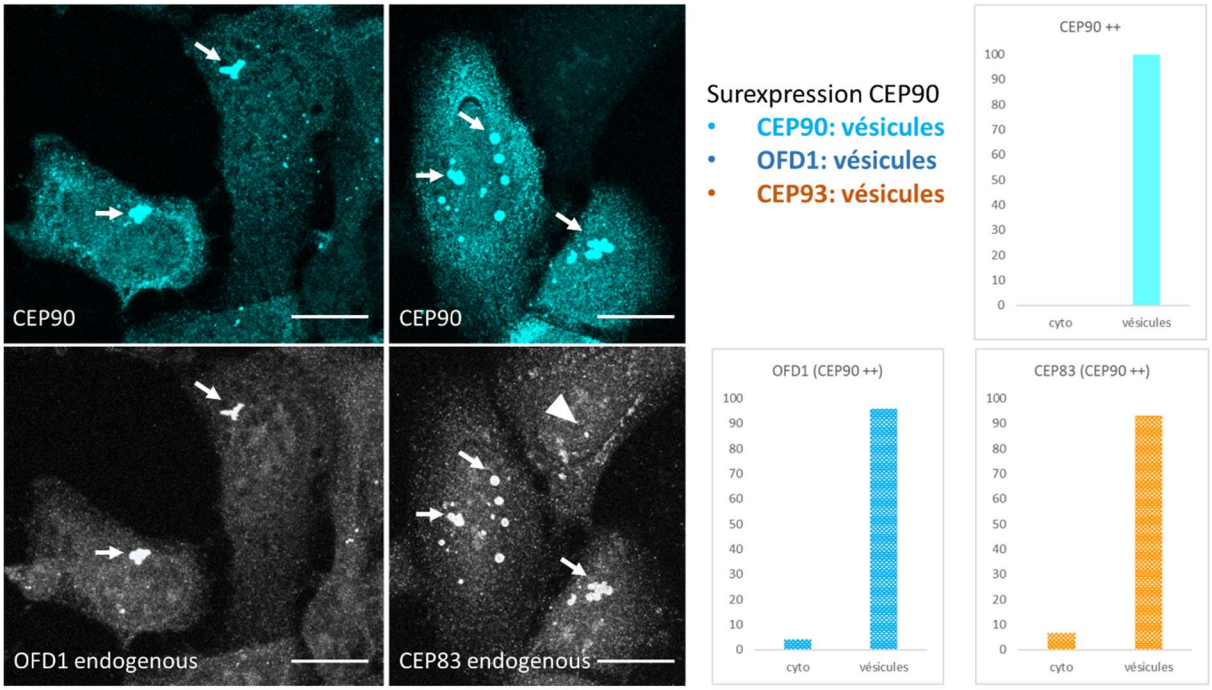


Figure27 : Effet de la surexpression de CEP90. Lorsque CEP90 est surexprimée dans les cellules U2OS, le marquage CEP90 révèle la présence d'agrégats/ vésicules dans la cellules (flèche blanche). Le marquage OFD1 et CEP83 révèle que ces deux protéines sont aussi localisées aux vésicules CEP90. (Tête de flèche : localisation de CEP83 au centrosome dans une cellule non transfectée) Barre d'échelle 15µm

III. Discussion

A. La BioID : la puissance d'un outil et ses limites

La technique de BioID a été développée en 2012 grâce à la capacité de l'enzyme bactérienne BirA à biotinyler les protéines (Roux et al., 2012). L'utilisation d'une forme mutée BirA*(portant la mutation p.R118G) permet la libération du site actif de la biotine ligase et la biotinylation promiscuitaire de toutes les protéines environnantes dans un rayon de 10-20nm. La BioID offre une nouvelle approche pour l'analyse des réseaux d'interaction en mettant en évidence l'environnement local dans lequel ces interactions se réalisent. Cette technique est largement utilisée pour identifier de nouveaux acteurs du centrosome. (Roux et al., 2012) Des protéimiques à grande échelle ont été réalisée notamment pour étudier les protéines constitutives du centrosome et du cil (Gupta et al., 2015) mais aussi pour étudier des structures moins connues telles que les satellites centriolaires (Arslanhan et al., 2020; Gheiratmand et al., 2019).

Dans mon étude nous avons décidé d'utiliser la BioID pour identifier l'environnement proche de FOPNL. Pour réaliser cette technique nous avons utilisé des lignées surexprimant myc-BirA*-FOPNL sous le contrôle de la tétracycline. L'induction de myc-BirA*-FOPNL ainsi que l'ajout de biotine ont été réalisés pendant 24h avant la récolte des cellules. J'ai pu constater dans les premières expériences sur cette lignée que malgré l'induction à la tétracycline, l'expression de la protéine myc-BirA*FOPNL restait modérée. En essayant les protocoles de purification par affinité sur lysat de cellule entière (Gupta et al., 2015; Roux et al., 2018) il était difficile de révéler la myc-BirA*-FOPNL en western blot. Dans ces conditions, nous avons opté pour l'enrichissement de la fraction centrosomale par technique de purification des noyaux centrosomes. Cette

technique a permis (i) d'enrichir suffisamment myc-BirA*-FOPNL et (ii) d'enrichir l'ensemble des protéines du centrosome parmi lequel devraient se trouver les partenaires de FOPNL. Parmi les protéines identifiées par spectrométrie de masse nous avons retrouvé MNR mais aussi des protéines des satellites centriolaires telles que PCM1 et CEP131. Trop peu de peptides de OFD1 ont été identifiés dans la fraction exprimant myc-BirA*-FOPNL pour permettre de valider statistiquement sa présence dans notre expérience. En revanche les quelques peptides identifiés portent des modifications post-traductionnelles de biotinylation ce qui montre que la protéine OFD1 a bien été biotinylée.

En 2019, une analyse par BioID de 22 protéines des satellites, incluant FOPNL, MNR, OFD1 et PIBF1, a été réalisée par l'équipe de Laurence Pelletier (Gheiratmand et al., 2019). Ces expériences ont été réalisées dans des lignées HEK293 Flp-TRex, les mêmes lignées cellulaires que celles que nous avons utilisées, exprimant les protéines des satellites étiquetées Flag-BirA*. Leur purification a été réalisée sur lysat de cellules entières après l'induction à la tétracycline pendant une durée totale de 7 jours en ajoutant la biotine 24h le 6ème jour. En comparant nos résultats de BioID avec les leurs, nous pouvons remarquer qu'ils ont un enrichissement bien supérieur au nôtre. A la lumière de ces résultats nous pouvons émettre un certain nombre de critique sur notre approche.

(i) La purification de noyaux centrosome nous permet en moyenne un rendement de 90%. Pour chaque réplicat de l'expérience 5.10^8 cellules ont été récoltées. Cependant le faible enrichissement des protéines des satellites ainsi que MNR et OFD1 dans notre expérience démontre que soit cette quantité de cellules initiales était trop faible, soit le rendement de la purification de noyaux-centrosomes était inférieur.

(ii) L'induction à la tétracycline n'était peut-être pas suffisante pour assurer une expression forte de FOPNL. D'après le protocole de Gheiratmand et al. 2019, l'induction à la tétracycline a été fait à 1µg/mL pendant 7 jours alors que

nous induisions nos cellules à 100ng/mL pendant 24h.

D'autre part la technique de BioID consiste à permettre la biotinylation de l'environnement de la protéine appât pendant 24h. C'est un temps long qui peut être à l'origine de nombreux artefacts dûs au trafic des protéines dans la cellule. La question du temps peut être réglée par l'utilisation d'autred techniques de marquages de proximité. Par exemple l'APEX, une technique proche de la BioID, oxyde le biotine-phénol en biotine-phénoxyl, un radical à demi vie courte qui va se lier de façon covalente avec des tyrosines. Cette technique va permettre des études sur des niveaux d'expression plus faibles de la protéine d'intérêt et sur des temps d'induction plus courts (Lam et al., 2015). Ainsi l'APEX propose d'identifier des interactions protéiques sur un temps un peu plus court mais elle est particulièrement adaptée à des interactions protéines-protéines transitoires. Comme la BioID, l'APEX comprend également un certain nombre d'inconvénients, notamment l'exposition au peroxyde d'hydrogène qui peut activer les voies de réponses à un stress oxydatif. Pour conclure sur les différentes techniques de marquage de proximité, en 2018, une nouvelle forme mutée de BirA* a permis de développer la technique appelée TurboID qui permet une biotinylation des protéines à proximité de l'appât très rapide et très efficace comme l'APEX avec un système biotine ligase non toxique (Branon et al., 2018).

Enfin plusieurs méthodes d'analyses statistiques des données recueillies peuvent être proposées (par exemple MaxQUANT et SAINT parmi les plus utilisées). Elles impactent directement le nombre d'interactants qui seront identifiés (Choi et al., 2011; Tyanova et al., 2016). Il est donc finalement nécessaire de s'interroger sur la méthode de sélection des interactants selon la question biologique posée.

Dans notre cas, la BioID a été l'élément de départ qui nous a permis d'identifier CEP90 comme candidat potentiel de l'ancrage des corps basaux

B. CEP90, avec FOPNL et OFD1, déterminent très tôt la position des appendices distaux après la formation du procentriole.

.

1. Un complexe nécessaire au recrutement des appendices distaux

CEP90 est une protéine localisée aux centrosomes et aux satellites centriolaires impliqués dans l'intégrité du fuseau mitotique (Kim et al., 2012) et dans la duplication des centrioles en participant au recrutement de CEP63 (Kodani et al., 2015). Le gène codant CEP90 est muté dans deux types de ciliopathies (Jeune et Joubert) et la protéine CEP90 est nécessaire à la ciliogenèse dans les cellules humaines (Kim et al., 2012). Dans ces travaux il est démontré que CEP90 interagit avec PCM1 et qu'il est nécessaire au maintien de l'intégralité des satellites, suggérant que le rôle de CEP90 dans la formation du cil passe principalement par les satellites. La conservation de CEP90 chez la paramécie, un organisme dépourvu de satellites centriolaires, n'exclut pas que le « pool » de CEP90 localisé aux satellites pourrait jouer un rôle dans la ciliogenèse mais nous a conduit à penser que la fraction de CEP90 aux centrioles/corps basaux, jouait un rôle dans l'assemblage de la partie distale du centriole /corps basal ainsi que dans la maturation du centriole fils en centriole père, comme FOPNL et OFD1

Chez la paramécie, un ensemble de 4 protéines impliquées dans l'ancrage des corps basaux a été identifié. Cen2, OFD1 et FOPNL sont localisées en partie distale du corps basal et participent directement à la maturation de cette extrémité. Cen3 est recrutée en dernièr. Elle est localisée en partie proximale et semble plutôt jouer un rôle dans le redressement du corps basal. Nous avons découvert, chez la paramécie, que CEP90 est localisée en partie distale des corps basaux et que sa déplétion affecte la maturation de l'extrémité distale de façon similaire à OFD1 et FOPNL (Aubusson-Fleury et al., 2012; Bengueddach et al., 2017). Les études réalisées précédemment dans l'équipe chez la paramécie avaient permis de déterminer la hiérarchie de recrutement de Cen2, OFD1,

FOPNL et Cen3. Ainsi Cen2 est la première protéine recrutée puis OFD1 et FOPNL et finalement Cen3 (Bengueddach et al., 2017). Dans ces travaux, une incertitude subsistait concernant l'ordre de recrutement entre OFD1 et FOPNL. En étudiant les relations entre CEP90, OFD1 et FOPNL nous avons mis en évidence que le recrutement de ces 3 protéines est interdépendant pour permettre l'ancrage des corps basaux. Dans les cellules de mammifères la déplétion de CEP90 et FOPNL a démontré des résultats similaires : le recrutement de FOPNL et CEP90 est interdépendant au centrosome et les deux protéines sont nécessaires pour recruter OFD1. Malheureusement nous n'avons pas encore réalisé l'inactivation de OFD1 dans ce modèle donc nous ne pouvons pas encore conclure sur le rôle de OFD1 dans le recrutement de FOPNL et CEP90. Néanmoins ces premiers résultats nous ont permis de proposer que CEP90, OFD1 et FOPNL forment un complexe fonctionnel. En 2014, une étude a permis d'identifier des interactions entre les domaines N-terminaux de FOPNL et OFD1 avec le domaine C-terminal de MNR (Chevrier et al., 2016). Grâce aux cellules utilisées dans cette étude et la surexpression de FOPNL-GFP, nous avons pu déterminer que CEP90 et OFD1 forment un complexe avec FOPNL.

Chez les mammifères, l'ancrage des corps basaux nécessite l'interaction des appendices distaux avec une membrane. Pour vérifier si le rôle du complexe fonctionnel est conservé entre l'homme et la paramécie nous avons observé l'effet de la déplétion de CEP90 et FOPNL sur le recrutement de 3 protéines de appendices distaux : CEP83, CEP89 et CEP164. Le recrutement des 3 protéines des appendices distaux est largement diminué suite au siRNA FOPNL ou CEP90. Il avait déjà été démontré en 2010 que OFD1 était nécessaire au recrutement des appendices distaux (Singla et al., 2010). Contrairement aux protéines des appendices distaux, CEP90, FOPNL et OFD1 sont présentes sur les deux centrioles. Une étude en 2018 (Wang et al., 2018) a révélé que 3 protéines spécifiques du centriole fils : CEP120, centrobine et Neurl4 doivent être éliminées pour permettre le recrutement des appendices distaux au cours de la maturation en centriole père. C2CD3 et Talpid3 sont nécessaires pour l'élimination des protéines spécifiques du centriole fils (Wang et al., 2018). C2CD3 et Talpid3 sont toutes

les deux localisées en partie distale des centrioles père et fils. Ces travaux nous ont conduit à proposer l'hypothèse selon laquelle FOPNL, CEP90 et OFD1 pourraient également participer à l'élimination de centrobine. Cependant, la déplétion de FOPNL et CEP90 ne conduit pas au maintien de la centrobine comme c'est le cas en absence de C2CD3 et Talpid3 (Wang et al., 2018). Un autre critère nous a également suggéré que le rôle de FOPNL-CEP90-OFD1 dans le recrutement des appendices distaux est différent de celui de C2CD3 et Talpid3. L'analyse de C2CD3 et Talpid3 en super-résolution révèle que ces deux protéines sont localisées en partie distale du centriole à l'intérieur du mur de microtubules. La localisation de CEP90, FOPNL et OFD1 avec la technique d'U-ExM a démontré que ces protéines sont localisées à l'extérieur du mur de microtubules, en partie distale des centrioles proche des appendices distaux. Ce qui suggèrerait que FOPNL, CEP90 et OFD1 pourraient avoir un rôle plus direct dans le recrutement des appendices distaux.

2. Un complexe recruté précocement pour marquer la future position des appendices distaux

L'apprentissage de la technique de microscopie à expansion au laboratoire Guichard-Hamel s'est révélé un point essentiel au cours de cette étude. La localisation en super-résolution de CEP90 et OFD1 dans les cellules U2OS nous a permis d'observer que ces deux protéines sont localisées en symétrie 9 en partie distale des centrioles. Elles sont localisées à l'extérieur des centrioles proches du mur de microtubules, légèrement plus bas que l'extrémité distale des centrioles. Ce marquage est très similaire à celui observé pour les appendices distaux en super résolution (Bowler et al., 2019; Chong et al., 2020; Viol et al., 2020; Yang et al., 2018). Nous n'avons malheureusement pas pu observer la localisation de FOPNL en microscopie à expansion dans les cellules U2OS. Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que (i) l'anticorps que nous utilisons au laboratoire ne reconnaitrait pas la forme dénaturée de FOPNL dans le gel d'expansion ou (ii) La protéine FOPNL n'est pas suffisamment abondante pour être observée. Au cours des expériences de surexpression de MNR-GFP pour délocaliser les protéines aux

microtubules nous avons pu voir que dans les cellules U2OS la protéine FOPNL endogène n'est pas détectable par nos anticorps. Cette lignée cellulaire incapable de former des cils présente un taux très bas d'expression de FOPNL. Pour observer la localisation de FOPNL en cellules de mammifères, il faudrait donc utiliser une autre lignée cellulaire comme les RPE1. Néanmoins, nous n'aurions pas la certitude que les anticorps anti-FOPNL fonctionnent en expansion. La meilleure solution pourrait être de transfecter les cellules U2OS pour surpexrimer une forme étiquetée GFP de FOPNL.

C'est cette solution que nous avons utilisée pour localiser nos protéines chez la paramécie. En dehors des protéines extrêmement conservées au cours de l'évolution comme la tubuline, les anticorps commerciaux reconnaissant les formes humaines ou mammifères des protéines ne fonctionnent pas en paramécie. Pour résoudre ce problème, nous avons injecté directement le macronoyau des paramécies avec une construction exprimant GFP-FOPNL, CEP90-GFP et OFD1-GFP. La localisation de ces protéines chez la paramécie est similaire à celle observée chez les mammifères. Elles sont localisées en symétrie 9 légèrement plus bas que l'extrémité distale des corps basaux. En comparant ces données avec un marquage au billes d'or de CEP90 en microscopie électronique nous pouvons observer que CEP90 est localisée près de la plaque intermédiaire, zone à partir de laquelle émerge les fibres de transition chez la paramécie.

Dans les cellules humaines, la localisation de CEP83 observée avec la technique U-ExM est à proximité de CEP90 et OFD1. CEP83 est au même niveau proximo-distal que CEP90 et OFD1. Cependant son diamètre est plus élevé. Alors que CEP90 et OFD1 ont un marquage ponctiforme, sur les centrioles, CEP83 présente une forme légèrement plus tubulaire comme des « bras ». Cette forme est traduite sur le graphique (figure 24) par un marquage plus étendu que CEP90 et OFD1.

Enfin nous avons pu observer en cellule de mammifères que OFD1 et CEP90 sont recrutées très précocement à l'extrémité distale des procentrioles au cours de la duplication. Leur présence à l'extrémité distale au cours de l'élongation des

procentrioles pourrait suggérer que OFD1 et CEP90 seraient impliquées dans la régulation de la croissance des microtubules. Il a été publié que OFD1 contrôle la longueur du centriole chez les mammifères. Chez la paramécie, il est possible d'observer ponctuellement l'un des triplets de microtubules anormalement long sur les corps basaux non ancrés suite à la déplétion de CEP90 ou d'OFD1. Ce phénotype suggère plus un problème de « coiffe » chez la paramécie qu'un défaut de régulation de la longueur des centrioles. Ces défauts de régulation de la croissance des microtubules peuvent être observés dans le cas de l'inactivation de *Cen2* et se traduisent par un agrandissement global de la longueur des centrioles.

A la lumière de l'ensemble des résultats, nous avons proposé que le complexe FOPNL, CEP90 et OFD1 serait recruté au centriole fils pour déterminer la future localisation des appendices distaux.

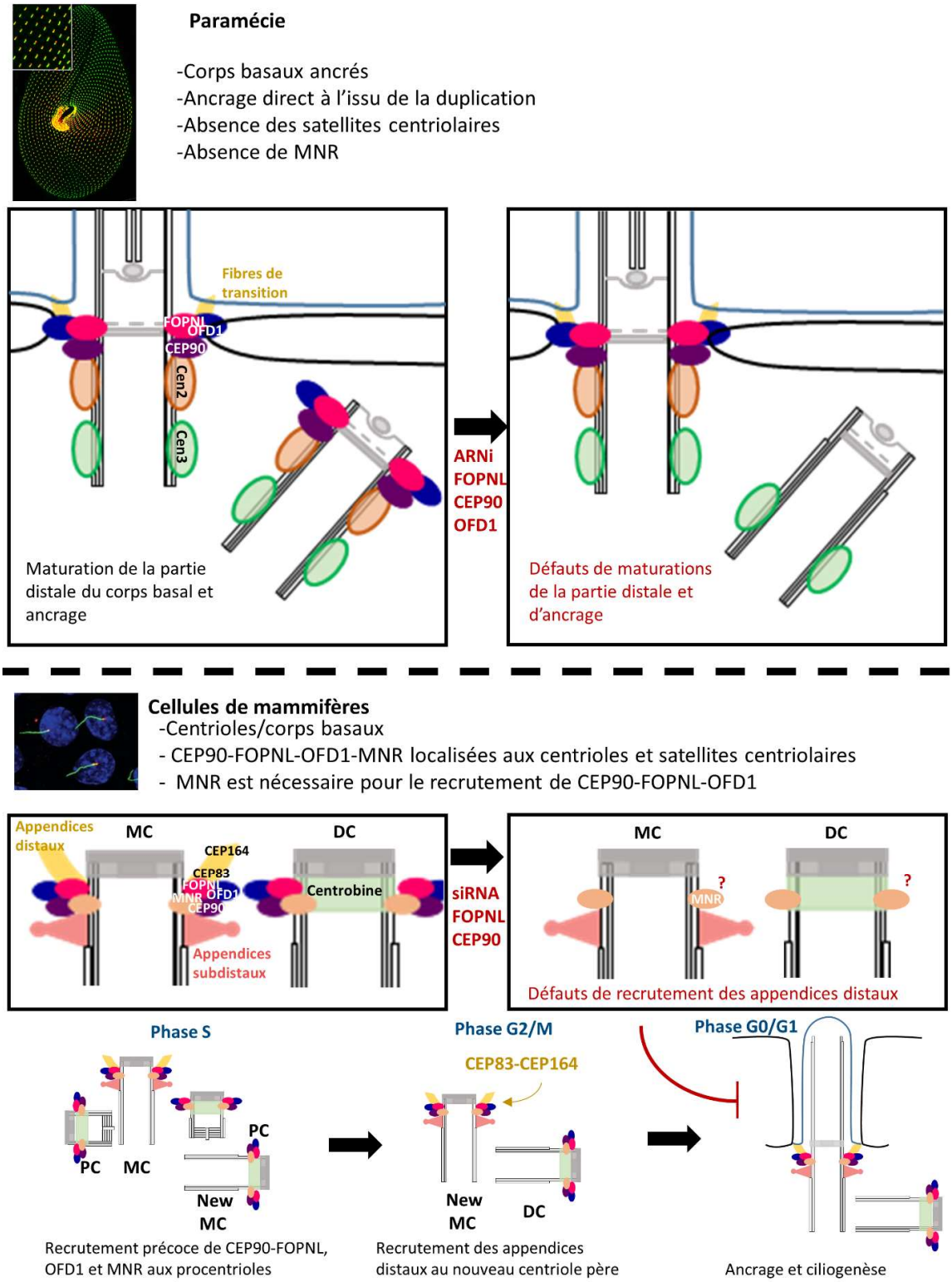
3. CEP90-OFD1-FOPNL : un complexe suffisant pour recruter CEP83

Pour déterminer si CEP90-OFD1-FOPNL est capable de déterminer la position de l'ancrage des appendices distaux, nous avons utilisé la surexpression de MNR-GFP pour délocaliser le complexe. Nous avons démontré que la co-surexpression de MNR et de CEP90 est suffisante pour recruter OFD1 et CEP83 aux microtubules. Il est très intéressant de mentionner que la surexpression seule de CEP90 est suffisante pour recruter OFD1 et CEP83 dans des structures granulaires dans la cellule. MNR servirait donc de guide pour localiser l'ensemble du complexe aux procentrioles/centrioles alors que CEP90 recruterait plus directement les appendices. Ce résultat est en accord avec la co-immunoprécipitation de CEP83 par des anticorps dirigés contre CEP90 (Kumar et al, 2021). Il serait intéressant de regarder la localisation de FOPNL dans ces différentes conditions pour permettre de mieux comprendre sa fonction. D'après nos expériences de siRNA, FOPNL et CEP90 sont nécessaires au maintien de l'ensemble du complexe. Dans le futur, il sera important d'étudier plus précisément la relation entre MNR et le reste du complexe. S'il est nécessaire au recrutement de CEP90-FOPNL-OFD1 nous

pouvons nous attendre à ce que sa déplétion affecte la localisation du reste du complexe au centrosome. A l'inverse, est-ce que la localisation de MNR est dépendante des autres protéines ?

Chevrier et al,2016 se sont intéressés à la conservation de MNR chez la paramécie. Ces travaux ont permis de mettre en évidence une protéine ne présentant qu'un petit domaine conservé de MNR. L'inactivation de cette protéine par les membres de l'équipe n'a pas permis d'observer de phénotype visible d'ancrage des corps basaux comme c'est le cas pour FOPNL, CEP90 et OFD1. Ces données suggèrent que MNR ne serait pas conservée fonctionnellement chez la paramécie. Ce résultat suggère que soit le complexe FOPNL, CEP90, OFD1 serait capable d'interagir directement avec les microtubules soit il existerait une protéine supplémentaire pas encore identifiée, qui

permettrait de recruter aux microtubules du corps basal le complexe. L'ensemble des résultats discutés dans cette partie est résumé dans ce modèle.



C. DISCO : le complexe distal des centrioles

Dans cette partie je comparerai nos résultats avec ceux publiés par l'équipe de Reiter sur le complexe « DISCO » incluant MNR, CEP90 et OFD1. Ce papier met en avant deux rôles distincts de MNR : (i) la régulation de la longueur du centriole avec OFD1 et (ii) le recrutement de CEP90 pour permettre le recrutement des appendices distaux (Kumar et al., 2021).

L'analyse en super résolution par la technique LR-ExSIM (label-retention expansion microscopy couplé à la résolution du SIM) a permis à cette équipe d'obtenir des valeurs de diamètre comparables à celles que nous avons observées dans notre étude pour les protéines CEP90 et OFD1. Ils ont également pu observer que le diamètre de MNR est plus petit que celui de CEP90, ce qui est en accord avec leur hypothèse selon laquelle MNR serait nécessaire au recrutement de CEP90 au centrioles. L'analyse de la localisation de CEP90, MNR et OFD1 au cours du cycle cellulaire par l'équipe de Reiter suggère que le complexe serait recruté aux procentrioles tardivement au cours de la phase G2. Au cours des phases G1 et S (qui correspondent à l'initiation de la duplication des centrioles) le marquage CEP90/OFD1 et MNR ne révèle que 2 points correspondant aux centrioles père et fils respectivement alors qu'en phase G2, 4 points peuvent être différentiés au microscope confocal. Contrairement à ce que propose cette équipe, nous avons pu observer très précocement en super résolution un recrutement des protéines CEP90 et OFD1 à la partie distale des procentrioles ce qui suggère que le complexe pourrait être recruté dès les phases G1-S du cycle cellulaire. Cette différence est très importante quant à l'interprétation du rôle du complexe. S'il est recruté en G2/M, ce recrutement est concomitant au recrutement des protéines des appendices distaux. Par contre, le recrutement précoce du complexe au procentriole suggère plutôt qu'il marquerait le centriole fils avant sa maturation et le recrutement des appendices distaux.

La présence au centriole fils des protéines MNR et OFD1 jouerait un rôle crucial dans le contrôle de la régulation de la longueur des centrioles. Les travaux de Singla et al (Singla et al., 2010) avaient déjà proposé un rôle de OFD1 dans la régulation de la longueur des microtubules du centriole (Kumar et al., 2021). L'expression de MNR-GFP aux microtubules entraine une relocalisation de la protéine OFD1 endogène le long des microtubules. Ces résultats suggèrent que ce serait MNR qui recruterait OFD1 au centriole pour assurer le contrôle de la longueur des centrioles.

De façon surprenante, dans les lignées CEP90-/-, la protéine OFD1 est recrutée au centriole. La quantification révèle que dans ces conditions 50% du signal OFD1 est présent comparé aux cellules contrôles ce qui suggère que dans ces lignées cellulaires, CEP90 participe au recrutement de OFD1 mais son absence est partiellement compensée par d'autres protéines du centrosome. Nous pourrions penser à FOPNL et MNR.

Enfin, en cellule de mammifère la protéine CEP90 est localisée aux deux centrioles et aux satellites centriolaires. Dans les cellules de mammifères les premières études du rôle de CEP90 ont démontré que son inactivation par siRNA disperse les satellites et cause des défauts de ciliogenèse. Ces études nous ont conduit à nous poser une question caractéristique de l'analyse de nombreuses protéines du centrosome. Est-ce que ces protéines localisées à la fois aux centrioles et aux satellites peuvent avoir des rôles différents en fonction de leur localisation ? En 2015, il a été montré que domaine 271-363 de CEP90 est suffisant pour interagir avec les satellites centriolaires (Kodani et al., 2015). Pour répondre à cette question, l'équipe de Reiter a utilisé des lignées PCM1 -/- afin d'invalider les satellites centriolaires. Dans ces conditions, l'équipe de Reiter a pu démontrer que la fraction centriolaire était nécessaire à l'assemblage des appendices distaux. Ces résultats sont similaires à nos propres résultats obtenus chez la paramécie qui est dépourvue de satellites centriolaires.

D. L'« Ultrascutural Expansion Microscopy » adaptée à l'analyse des structures centriolaires et ciliaires

La technique de microscopie à expansion a été introduite en 2015 par l'équipe de Boyden (Chen et al., 2015). Elle consiste en l'inclusion d'un échantillon biologique dans un gel d'acrylate de sodium qui est capable de grandir en présence d'eau, faisant grandir physiquement l'échantillon. Ainsi il est possible d'améliorer la résolution finale sur un microscope optique standard, généralement un microscope confocal. Toutes les techniques qui existent aujourd'hui ont dû résoudre deux question principales : (i) comment marquer l'échantillon ? (ii) comment se débarrasser des interactions protéine-protéine qui génèrent une résistance mécanique empêchant l'expansion de l'échantillon ? La technique U-ExM que nous avons utilisée et la technique LR-ExM(SIM) utilisée par l'équipe de Reiter sont deux exemples différents pour répondre à ces questions.

-La technique « label-retention exapansion microscopy » : comme son nom l'indique cette technique consiste à marquer l'échantillon avant l'expansion du gel et de « garder le marquage ». Cette technique utilise des anticorps associés à des marqueurs chimiques capables de s'ancrer et possédant un rapporteur du type biotine ou Digoxigenin (DIG). Lorsque le marqueur est ancré au gel, l'ensemble de l'échantillon est digéré à la protéinase K ne laissant dans le gel que les marqueurs chimiques. Ces marqueurs forment donc une empreinte de la protéine d'intérêt dans le gel. Suite à la digestion de l'ensemble des protéines, il n'y a plus de résistance mécanique pour empêcher l'expansion du gel. Lorsque l'expansion est terminée, les marqueurs peuvent être reconnus par la streptavidine (affinité à la biotine) ou de l'anti-DIG couplé à un fluorochrome. L'avantage principal des techniques permettant le marquage avant expansion est que la protéine ciblée par l'anticorps n'est pas dénaturée et donc, en théorie, tous les anticorps pourraient fonctionner. En revanche pour les structures très riches en protéines comme le centriole, risquent de gêner l'accès des anticorps pour

marquer l'ensemble des protéines à cause d'un trop grand « encombrement » ce qui peut détériorer la qualité du marquage.

-La technique U-ExM ne passe pas par une digestion de l'échantillon biologique. Dans cette technique les protéines inclues dans le gel son ancrées au maillage du gel et dénaturées pour supprimer les interactions protéines-protéines. Ainsi après l'expansion, l'ensemble des protéines contenu dans le gel est préservé et la distance entre chaque protéine est augmenté 4 à 5 fois. Cette technique rend possible le marquage des protéines après l'expansion ce qui rend plus accessible les épitopes et permet un meilleur recouvrement de la structure observée. En contrepartie, les protéines ont subi une forte dénaturation ce qui peut gêner la reconnaissance par certains anticorps.

Dans ce cas précis, l'équipe de Reiter a couplé l'utilisation de l'expansion avec des acquisitions sur un microscope de super-résolution SIM. La comparaison des images de centrioles et de CEP90 obtenues avec la technique d'U-ExM et de LR-ExM met en évidence l'intérêt d'utiliser la technique la plus adaptée à la structure étudiée et la question biologique posée.

Dans notre étude, les images de U-ExM en cellules de mammifères ont été réalisées par Marine Laporte. Bien que Davide Gambarotto ait réalisé des acquisitions sur la paramécie (Gambarotto et al., 2019), j'ai ajusté le protocole pour permettre une expansion plus homogène des corps basaux. La paramécie offre un réel avantage dans l'étude de la localisation des protéines le long des corps basaux. Cette espèce possède près de 4 000 corps basaux tous organisés en rangées parallèles. Pour la technique U-ExM, nous purifions des fragments de cortex que nous centrifugeons sur lamelle. Cette

technique nous permet d'observer des séries entières de corps basaux présentant tous la même orientation.

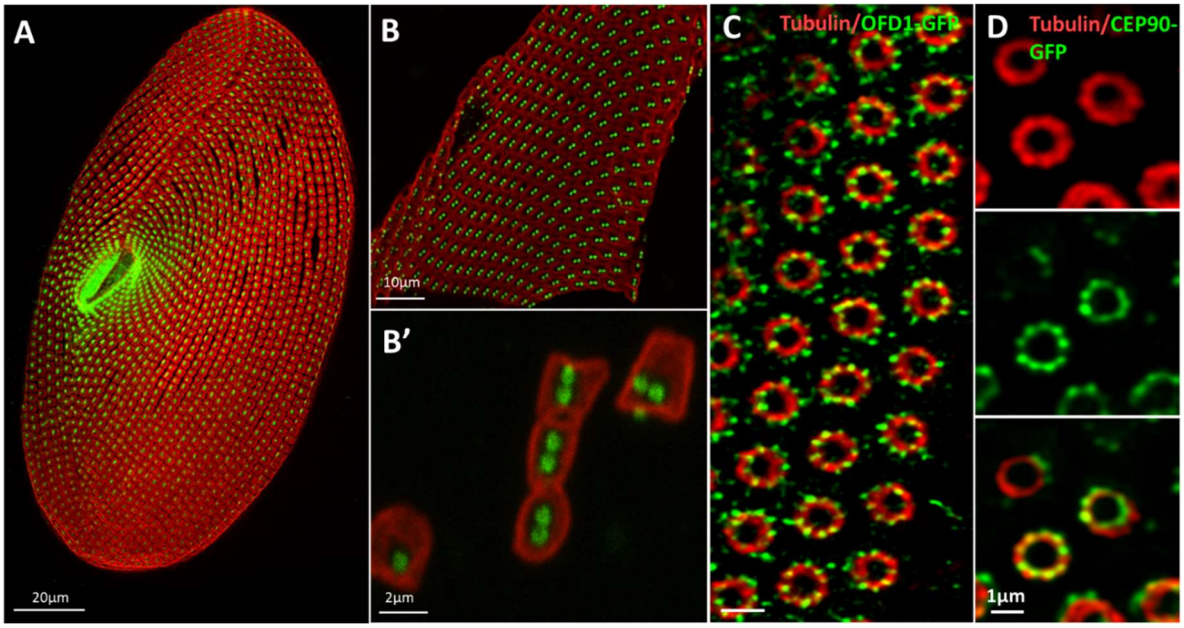


Figure 28 : (A) observation d'une paramécie au microscope confocal. Marquages des corps basaux par l'anticorps polyE (vert) et l'episplame (rouge). Purification de fragment de cortex (B) et d'unité corticale isolée (B').(C et D) U-ExM suivit de déconvolution sur purification de fragment de cortex de paramécie exprimant OFD1-GFP(C) ou CEP90-GFP(D). Les corps basaux sont marqués par une combinaison d'anticorps reconnaissant l'alpha et le beta-tubuline (rouge)

L'organisation précise du cortex de la paramécie pourrait permettre de moyenner le marquage présent sur l'ensemble des corps basaux pour améliorer la résolution. A l'avenir cette technique pourrait permettre de poursuivre les travaux de Delphine Gogendeau pour affiner la caractérisation des protéines de la zone de transition chez la paramécie (Gogendeau et al., 2020).

E. La paramécie comme modèle d'étude des cils et des ciliopathies

Au cours de ma thèse j'ai analysé la fonction du complexe FOPNL, OFD1 et CEP90 en parallèle entre la paramécie et les cellules de mammifères. Ces travaux ont permis de mettre en évidence la conservation de ce complexe entre les deux modèles et ont mis en avant les avantages de ce modèle. Comme dit précédemment ce modèle permet d'étudier directement la fonction centriolaire des protéines également localisées au

satellites centriolaires chez les mammifères. Dans le cas de mon étude, la paramécie s'est révélée être un modèle d'étude efficace pour l'étude de l'ancrage des corps basaux. Après des techniques d'ARNi rapide et efficace, les défauts d'ancrage sont observables facilement (i) à l'échelle macroscopique par une altération de la forme de la cellule ainsi que de la nage et (ii) à l'échelle microscopique par immunofluorescence qui révèle la présence de corps basaux non ancrées dans le cytoplasme. Des études plus poussées par microscopies électronique peuvent être réalisées ensuite pour déterminer les défauts de ces corps basaux non ancrées.

Précédemment, les travaux de Delphine Gogendeau ont mis en lumière une nouvelle fonction des protéines de la zone de transition. Alors qu'il est déjà connu que les protéines de la zone de transition participent à la formation des cils, cette étude révèle que ces protéines sont impliquées dans la déciliation des cils motiles par autotomie (Gogendeau et al., 2020) (cf annexe 2).

Enfin en plus de mes travaux de thèse, j'ai pu illustré le rôle de la paramécie en tant que modèlde d'étude des ciliopathie : en particulier de la dyskinésie ciliaire primitive : une ciliopathie affectant la motilité ciliaire (Cf annexe 3). L'ensemble de mon travail a laboratoire a permi de mettre en avant l'éfficacité de ce modèle pour l'étude des cils et des maladies génétiques associées.

IV. BIBLIOGRAPHIE

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.

Acquaviva, C., Chevrier, V., Chauvin, J.-P., Fournier, G., Birnbaum, D., and Rosnet, O. (2009). The centrosomal FOP protein is required for cell cycle progression and survival. Cell Cycle *8*, 1217–1227.

Akella, J.S., Silva, M., Morsci, N.S., Nguyen, K.C., Rice, W.J., Hall, D.H., and Barr, M.M. (2019). Cell type-specific structural plasticity of the ciliary transition zone in C. elegans. Biol Cell *111*, 95–107.

Al Jord, A., Lemaître, A.-I., Delgehyr, N., Faucourt, M., Spassky, N., and Meunier, A. (2014). Centriole amplification by mother and daughter centrioles differs in multiciliated cells. Nature *516*, 104–107.

Alieva, I.B., and Vorobjev, I.A. (2004). Vertebrate primary cilia: a sensory part of centrosomal complex in tissue cells, but a “sleeping beauty” in cultured cells? Cell Biology International *28*, 139–150.

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

Arnaiz, O., Malinowska, A., Klotz, C., Sperling, L., Dadlez, M., Koll, F., and Cohen, J. (2009). Cildb: a knowledgebase for centrosomes and cilia. Database (Oxford) *2009*, bap022.

Arnaiz, O., Cohen, J., Tassin, A.-M., and Koll, F. (2014). Remodeling Cildb, a popular database for cilia and links for ciliopathies. Cilia *3*, 9.

Arslanhan, M.D., Gulensoy, D., and Firat-Karalar, E.N. (2020). A Proximity Mapping Journey into the Biology of the Mammalian Centrosome/Cilium Complex. Cells *9*, E1390.

Aubusson-Fleury, A., Lemullois, M., de Loubresse, N.G., Laligné, C., Cohen, J., Rosnet, O., Jerka-Dziadosz, M., Beisson, J., and Koll, F. (2012). The conserved centrosomal protein FOR20 is required for assembly of the transition zone and basal body docking at the cell surface. J Cell Sci *125*, 4395–4404.

Azimzadeh, J., and Bornens, M. (2007). Structure and duplication of the centrosome. J. Cell. Sci. *120*, 2139–2142.

Bahtz, R., Seidler, J., Arnold, M., Haselmann-Weiss, U., Antony, C., Lehmann, W.D., and Hoffmann, I. (2012). GCP6 is a substrate of Plk4 and required for centriole duplication. J Cell Sci *125*, 486–496.

Balczon, R., Bao, L., and Zimmer, W.E. (1994). PCM-1, A 228-kD centrosome autoantigen with a distinct cell cycle distribution. J Cell Biol *124*, 783–793.

Barbelanne, M., Hossain, D., Chan, D.P., Peränen, J., and Tsang, W.Y. (2015). Nephrocystin proteins NPHP5 and Cep290 regulate BBSome integrity, ciliary trafficking and cargo delivery. Hum Mol Genet *24*, 2185–2200.

Baujat, G., Huber, C., El Hokayem, J., Caumes, R., Do Ngoc Thanh, C., David, A., Delezoide, A.-L., Dieux-Coeslier, A., Estournet, B., Francannet, C., et al. (2013). Asphyxiating thoracic dysplasia: clinical and molecular review of 39 families. J Med Genet *50*, 91–98.

Bengueddach, H., Lemullois, M., Aubusson-Fleury, A., and Koll, F. (2017). Basal body positioning and anchoring in the multiciliated cell Paramecium tetraurelia: roles of OFD1 and VFL3. Cilia *6*, 6.

Benmerah, A. (2013). The ciliary pocket. Current Opinion in Cell Biology *25*, 78–84.

Bertiaux, E., Mallet, A., Fort, C., Blisnick, T., Bonnefoy, S., Jung, J., Lemos, M., Marco, S., Vaughan, S., Trépout, S., et al. (2018). Bidirectional intraflagellar transport is restricted to two sets of microtubule doublets in the trypanosome flagellum. J Cell Biol *217*, 4284–4297.

Blanchon, S., Legendre, M., Bottier, M., Tamalet, A., Montantin, G., Collot, N., Faucon, C., Dastot, F., Copin, B., Clement, A., et al. (2020). Deep phenotyping, including quantitative ciliary beating parameters, and extensive genotyping in primary ciliary dyskinesia. Journal of Medical Genetics *57*, 237–244.

Boisvieux-Ulrich, E., Laine, M.-C., and Sandoz, D. (1987). In vitro effects of benzodiazepines on ciliogenesis in the quail oviduct. Cell Motility *8*, 333–344.

Boisvieux-Ulrich, E., Lainé, M.-C., and Sandoz, D. (1990). Cytochalasin D inhibits basal body migration and ciliary elongation in quail oviduct epithelium. Cell Tissue Res. *259*, 443–454.

Borgne, P.L., Laporte, M.H., Greibill, L., Lemullois, M., Temagoult, M., Rosnet, O., Guennec, M.L., Lignières, L., Chevreux, G., Koll, F., et al. (2021). The ternary complex CEP90, FOPNL and OFD1 specifies the future location of centriolar distal appendages, and promotes their assembly.

Bowler, M., Kong, D., Sun, S., Nanjundappa, R., Evans, L., Farmer, V., Holland, A., Mahjoub, M.R., Sui, H., and Loncarek, J. (2019). High-resolution characterization of centriole distal appendage morphology and dynamics by correlative STORM and electron microscopy. Nat Commun *10*, 993.

Branon, T.C., Bosch, J.A., Sanchez, A.D., Udeshi, N.D., Svinkina, T., Carr, S.A., Feldman, J.L., Perrimon, N., and Ting, A.Y. (2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. Nat Biotechnol *36*, 880–887.

Broekhuis, J.R., Leong, W.Y., and Jansen, G. (2013). Regulation of cilium length and intraflagellar transport. Int Rev Cell Mol Biol *303*, 101–138.

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

Budny, B., Chen, W., Omran, H., Fliegauf, M., Tzschach, A., Wisniewska, M., Jensen, L.R.,

Raynaud, M., Shoichet, S.A., Badura, M., et al. (2006). A novel X-linked recessive mental retardation syndrome comprising macrocephaly and ciliary dysfunction is allelic to oral-facial-digital type I syndrome. Hum Genet *120*, 171–178.

Burakov, A., Nadezhdina, E., Slepchenko, B., and Rodionov, V. (2003). Centrosome positioning in interphase cells. Journal of Cell Biology *162*, 963–969.

Čajánek, L., and Nigg, E.A. (2014). Cep164 triggers ciliogenesis by recruiting Tau tubulin kinase 2 to the mother centriole. Proc Natl Acad Sci U S A *111*, E2841-2850.

Chang, J., Seo, S.G., Lee, K.H., Nagashima, K., Bang, J.K., Kim, B.Y., Erikson, R.L., Lee, K.-W., Lee, H.J., Park, J.-E., et al. (2013). Essential role of Cenexin1, but not Odf2, in ciliogenesis. Cell Cycle *12*, 655–662.

Chen, F., Tillberg, P.W., and Boyden, E.S. (2015). Optical imaging. Expansion microscopy. Science *347*, 543–548.

Chevrier, V., Bruel, A.-L., Van Dam, T.J.P., Franco, B., Lo Scalzo, M., Lembo, F., Audebert, S., Baudelet, E., Isnardon, D., Bole, A., et al. (2016). OFIP/KIAA0753 forms a complex with OFD1 and FOR20 at pericentriolar satellites and centrosomes and is mutated in one individual with oral-facial-digital syndrome. Hum. Mol. Genet. *25*, 497–513.

Chiba, S., Amagai, Y., Homma, Y., Fukuda, M., and Mizuno, K. (2013). NDR2-mediated Rabin8 phosphorylation is crucial for ciliogenesis by switching binding specificity from phosphatidylserine to Sec15. EMBO J *32*, 874–885.

Chih, B., Liu, P., Chinn, Y., Chalouni, C., Komuves, L.G., Hass, P.E., Sandoval, W., and Peterson, A.S. (2011). A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain. Nat Cell Biol *14*, 61–72.

Choi, H., Larsen, B., Lin, Z.-Y., Breitkreutz, A., Mellacheruvu, D., Fermin, D., Qin, Z.S., Tyers, M., Gingras, A.-C., and Nesvizhskii, A.I. (2011). SAINT: probabilistic scoring of affinity purification-mass spectrometry data. Nat Methods *8*, 70–73.

Chong, W.M., Wang, W.-J., Lo, C.-H., Chiu, T.-Y., Chang, T.-J., Liu, Y.-P., Tanos, B., Mazo, G., Tsou, M.-F.B., Jane, W.-N., et al. (2020). Super-resolution microscopy reveals coupling between mammalian centriole subdistal appendages and distal appendages. Elife *9*, e53580.

Coene, K.L.M., Roepman, R., Doherty, D., Afroze, B., Kroes, H.Y., Letteboer, S.J.F., Ngu, L.H., Budny, B., van Wijk, E., Gorden, N.T., et al. (2009). OFD1 Is Mutated in X-Linked Joubert Syndrome and Interacts with LCA5-Encoded Lebercilin. Am J Hum Genet *85*, 465–481.

Comartin, D., Gupta, G.D., Fussner, E., Coyaud, É., Hasegan, M., Archinti, M., Cheung, S.W.T., Pinchev, D., Lawo, S., Raught, B., et al. (2013). CEP120 and SPICE1 cooperate with CPAP in centriole elongation. Curr. Biol. *23*, 1360–1366.

Cuenca, A., Insinna, C., Zhao, H., John, P., Weiss, M.A., Lu, Q., Walia, V., Specht, S., Manivannan, S., Stauffer, J., et al. (2019). The C7orf43/TRAPPC14 component links the TRAPPII complex to Rabin8 for preciliary vesicle tethering at the mother centriole during ciliogenesis. J Biol Chem *294*, 15418–15434.

Dai, J., Barbieri, F., Mitchell, D.R., and Lechtreck, K.F. (2018). In vivo analysis of outer arm dynein transport reveals cargo-specific intraflagellar transport properties. Mol Biol Cell *29*, 2553–2565.

Dammermann, A., and Merdes, A. (2002). Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. J Cell Biol *159*, 255–266.

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

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

Dobbelaere, J., Schmidt Cernohorska, M., Huranova, M., Slade, D., and Dammermann, A. (2020). Cep97 Is Required for Centriole Structural Integrity and Cilia Formation in Drosophila. Current Biology *30*, 3045-3056.e7.

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

Dyson, J.M., Conduit, S.E., Feeney, S.J., Hakim, S., DiTommaso, T., Fulcher, A.J., Sriratana, A., Ramm, G., Horan, K.A., Gurung, R., et al. (2017). INPP5E regulates phosphoinositide-dependent cilia transition zone function. J Cell Biol *216*, 247–263.

Emes, R.D., and Ponting, C.P. (2001). A new sequence motif linking lissencephaly, Treacher Collins and oral-facial-digital type 1 syndromes, microtubule dynamics and cell migration. Hum Mol Genet *10*, 2813–2820.

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.

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.

Farina, F., Ramkumar, N., Brown, L., Samandar Eweis, D., Anstatt, J., Waring, T., Bithell, J., Scita, G., Thery, M., Blanchoin, L., et al. (2019). Local actin nucleation tunes centrosomal microtubule nucleation during passage through mitosis. EMBO J *38*, e99843.

Ferrante, M.I., Barra, A., Truong, J.-P., Banfi, S., Disteche, C.M., and Franco, B. (2003). Characterization of the OFD1/Ofd1 genes on the human and mouse sex chromosomes and exclusion of Ofd1 for the Xpl mouse mutant. Genomics *81*, 560–569.

Ferrarelli, L.K. (2017). B cells prevent preterm labor. Sci Signal *10*.

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.

Fort, C., and Bastin, P. (2014). [Elongation of the axoneme and dynamics of intraflagellar transport]. Med Sci (Paris) *30*, 955–961.

Fry, A.M., Sampson, J., Shak, C., and Shackleton, S. (2017). Recent advances in pericentriolar material organization: ordered layers and scaffolding gels. F1000Res *6*, 1622.

Galvani, A., and Sperling, L. (2002). RNA interference by feeding in Paramecium. Trends Genet *18*, 11–12.

Gambarotto, D., Zwettler, F.U., Le Guennec, M., Schmidt-Cernohorska, M., Fortun, D., Borgers, S., Heine, J., Schloetel, J.-G., Reuss, M., Unser, M., et al. (2019). Imaging cellular ultrastructures using expansion microscopy (U-ExM). Nat. Methods *16*, 71–74.

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.

Gerlitz, G., Darhin, E., Giorgio, G., Franco, B., and Reiner, O. (2005). Novel functional features of the Lis-H domain: role in protein dimerization, half-life and cellular localization. Cell Cycle *4*, 1632–1640.

Gheiratmand, L., Coyaud, E., Gupta, G.D., Laurent, E.M., Hasegan, M., Prosser, S.L., Gonçalves, J., Raught, B., and Pelletier, L. (2019). Spatial and proteomic profiling reveals centrosome-independent features of centriolar satellites. EMBO J *38*, e101109.

Ghossoub, R., Molla-Herman, A., Bastin, P., and Benmerah, A. (2011). The ciliary pocket: a once-forgotten membrane domain at the base of cilia. Biol Cell *103*, 131–144.

Gogendeau, D., Lemullois, M., Le Borgne, P., Castelli, M., Aubusson-Fleury, A., Arnaiz, O., Cohen, J., Vesque, C., Schneider-Maunoury, S., Bouhouche, K., et al. (2020). MKS-NPHP module proteins control ciliary shedding at the transition zone. PLoS Biol *18*, e3000640.

Gonçalves, J., and Pelletier, L. (2017). The Ciliary Transition Zone: Finding the Pieces and Assembling the Gate. Mol Cells *40*, 243–253.

Greenan, G.A., Keszthelyi, B., Vale, R.D., and Agard, D.A. (2018). Insights into centriole geometry revealed by cryotomography of doublet and triplet centrioles. ELife *7*, e36851.

Guichard, P., Chrétien, D., Marco, S., and Tassin, A.-M. (2010). Procentriole assembly revealed by cryo-electron tomography. EMBO J *29*, 1565–1572.

Guichard, P., Hamel, V., Le Guennec, M., Banterle, N., Iacovache, I., Nemčíková, V., Flückiger, I., Goldie, K.N., Stahlberg, H., Lévy, D., et al. (2017). Cell-free reconstitution reveals centriole cartwheel assembly mechanisms. Nat Commun *8*, 14813.

Gupta, G.D., Coyaud, É., Gonçalves, J., Mojarad, B.A., Liu, Y., Wu, Q., Gheiratmand, L., Comartin, D., Tkach, J.M., Cheung, S.W.T., et al. (2015). A Dynamic Protein Interaction Landscape of the Human Centrosome-Cilium Interface. Cell *163*, 1484–1499.

Gupta, H., Rajeev, R., Sasmal, R., Radhakrishnan, R.M., Anand, U., Chandran, H., Aparna, N.R., Agasti, S., and Manna, T.K. (2020). SAS-6 Association with γ-Tubulin Ring Complex Is Required for Centriole Duplication in Human Cells. Curr Biol *30*, 2395-2403.e4.

Gurrieri, F., Franco, B., Toriello, H., and Neri, G. (2007). Oral-facial-digital syndromes:

review and diagnostic guidelines. Am J Med Genet A *143A*, 3314–3323.

Hardy, T., Lee, M., Hames, R.S., Prosser, S.L., Cheary, D.-M., Samant, M.D., Schultz, F., Baxter, J.E., Rhee, K., and Fry, A.M. (2014). Multisite phosphorylation of C-Nap1 releases it from Cep135 to trigger centrosome disjunction. J Cell Sci *127*, 2493–2506.

Homma, Y., Hiragi, S., and Fukuda, M. (2021). Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions. FEBS J *288*, 36–55.

Hori, A., and Toda, T. (2017). Regulation of centriolar satellite integrity and its physiology. Cell Mol Life Sci *74*, 213–229.

Huang, B., Faucette, A.N., Pawlitz, M.D., Pei, B., Goyert, J.W., Zhou, J.Z., El-Hage, N.G., Deng, J., Lin, J., Yao, F., et al. (2017a). Interleukin-33-induced expression of PIBF1 by decidual B cells protects against preterm labor. Nat Med *23*, 128–135.

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

Huang, N., Xia, Y., Zhang, D., Wang, S., Bao, Y., He, R., Teng, J., and Chen, J. (2017b). Hierarchical assembly of centriole subdistal appendages via centrosome binding proteins CCDC120 and CCDC68. Nat Commun *8*, 15057.

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

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

Inoue, D., Obino, D., Pineau, J., Farina, F., Gaillard, J., Guerin, C., Blanchoin, L., Lennon-Duménil, A.-M., and Théry, M. (2019). Actin filaments regulate microtubule growth at the centrosome. EMBO J *38*, e99630.

Insinna, C., Lu, Q., Teixeira, I., Harned, A., Semler, E.M., Stauffer, J., Magidson, V., Tiwari, A., Kenworthy, A.K., Narayan, K., et al. (2019). Investigation of F-BAR domain PACSIN proteins uncovers membrane tubulation function in cilia assembly and transport. Nat Commun *10*, 428.

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

Izawa, I., Goto, H., Kasahara, K., and Inagaki, M. (2015). Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle. Cilia *4*, 12.

Jackson, P.K. (2011). Do cilia put brakes on the cell cycle? Nat. Cell Biol. *13*, 340–342.

Jerka-Dziadosz, M., Koll, F., Włoga, D., Gogendeau, D., Garreau de Loubresse, N., Ruiz, F.,

Fabczak, S., and Beisson, J. (2013). A Centrin3-dependent, transient, appendage of the mother basal body guides the positioning of the daughter basal body in Paramecium. Protist *164*, 352–368.

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

Kennedy, M.P., Omran, H., Leigh, M.W., Dell, S., Morgan, L., Molina, P.L., Robinson, B.V., Minnix, S.L., Olbrich, H., Severin, T., et al. (2007). Congenital heart disease and other heterotaxic defects in a large cohort of patients with primary ciliary dyskinesia. Circulation *115*, 2814–2821.

Keppler-Noreuil, K.M., Adam, M.P., Welch, J., Muilenburg, A., and Willing, M.C. (2011). Clinical insights gained from eight new cases and review of reported cases with Jeune syndrome (asphyxiating thoracic dystrophy). Am J Med Genet A *155A*, 1021–1032.

Khire, A., Jo, K.H., Kong, D., Akhshi, T., Blachon, S., Cekic, A.R., Hynek, S., Ha, A., Loncarek, J., Mennella, V., et al. (2016). Centriole Remodeling During Spermiogenesis in Drosophila. Curr Biol *26*, 3183–3189.

Kim, J.C., Badano, J.L., Sibold, S., Esmail, M.A., Hill, J., Hoskins, B.E., Leitch, C.C., Venner, K., Ansley, S.J., Ross, A.J., et al. (2004). The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. Nat Genet *36*, 462–470.

Kim, K., Lee, K., and Rhee, K. (2012). CEP90 Is Required for the Assembly and Centrosomal Accumulation of Centriolar Satellites, Which Is Essential for Primary Cilia Formation. PLOS ONE *7*, e48196.

Kimura, K., and Kimura, A. (2011). A novel mechanism of microtubule length-dependent force to pull centrosomes toward the cell center. Bioarchitecture *1*, 74–79.

Klena, N., Le Guennec, M., Tassin, A., van den Hoek, H., Erdmann, P.S., Schaffer, M., Geimer, S., Aeschlimann, G., Kovacik, L., Sadian, Y., et al. (2020). Architecture of the centriole cartwheel-containing region revealed by cryo-electron tomography. EMBO J *39*, e106246.

Kleylein-Sohn, J., Westendorf, J., Le Clech, M., Habedanck, R., Stierhof, Y.-D., and Nigg, E.A. (2007). Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. Dev Cell *13*, 190–202.

Klotz, C., Bordes, N., Laine, M.C., Sandoz, D., and Bornens, M. (1986). A protein of 175,000 daltons associated with striated rootlets in ciliated epithelia, as revealed by a monoclonal antibody. Cell Motil Cytoskeleton *6*, 56–67.

Kobayashi, T., Tsang, W.Y., Li, J., Lane, W., and Dynlacht, B.D. (2011). Centriolar kinesin Kif24 interacts with CP110 to remodel microtubules and regulate ciliogenesis. Cell *145*, 914–925.

Kodani, A., Tonthat, V., Wu, B., and Sütterlin, C. (2010). Par6 alpha interacts with the dynactin subunit p150 Glued and is a critical regulator of centrosomal protein recruitment. Mol Biol Cell *21*, 3376–3385.

Kodani, A., Yu, T.W., Johnson, J.R., Jayaraman, D., Johnson, T.L., Al-Gazali, L., Sztriha, L., Partlow, J.N., Kim, H., Krup, A.L., et al. (2015). Centriolar satellites assemble centrosomal microcephaly proteins to recruit CDK2 and promote centriole duplication. Elife *4*.

Konno, A., Setou, M., and Ikegami, K. (2012). Chapter three - Ciliary and Flagellar Structure and Function—Their Regulations by Posttranslational Modifications of Axonemal Tubulin. In International Review of Cell and Molecular Biology, K.W. Jeon, ed. (Academic Press), pp. 133–170.

Kubo, A., Sasaki, H., Yuba-Kubo, A., Tsukita, S., and Shiina, N. (1999). Centriolar satellites: molecular characterization, ATP-dependent movement toward centrioles and possible involvement in ciliogenesis. J Cell Biol *147*, 969–980.

Kumar, D., Mains, R.E., Eipper, B.A., and King, S.M. (2019). Ciliary and cytoskeletal functions of an ancient monooxygenase essential for bioactive amidated peptide synthesis. Cell Mol Life Sci *76*, 2329–2348.

Kumar, D., Rains, A., Herranz-Pérez, V., Lu, Q., Shi, X., Swaney, D.L., Stevenson, E., Krogan, N.J., Huang, B., Westlake, C., et al. (2021). A ciliopathy complex builds distal appendages to initiate ciliogenesis. J Cell Biol *220*, e202011133.

Kurtulmus, B., Yuan, C., Schuy, J., Neuner, A., Hata, S., Kalamakis, G., Martin-Villalba, A., and Pereira, G. (2018). LRRC45 contributes to early steps of axoneme extension. J Cell Sci *131*, jcs223594.

Lam, S.S., Martell, J.D., Kamer, K.J., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Mootha, V.K., and Ting, A.Y. (2015). Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. Nat Methods *12*, 51–54.

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

Le Guennec, M., Klena, N., Gambarotto, D., Laporte, M.H., Tassin, A.-M., van den Hoek, H., Erdmann, P.S., Schaffer, M., Kovacik, L., Borgers, S., et al. (2020). A helical inner scaffold provides a structural basis for centriole cohesion. Sci Adv *6*, eaaz4137.

Leigh, M.W., Pittman, J.E., Carson, J.L., Ferkol, T.W., Dell, S.D., Davis, S.D., Knowles, M.R., and Zariwala, M.A. (2009). Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/Kartagener syndrome. Genet Med *11*, 473–487.

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.

Lemullois, M., Boisvieux-Ulrich, E., Laine, M.C., Chailley, B., and Sandoz, D. (1988). Development and functions of the cytoskeleton during ciliogenesis in metazoa. Biol Cell *63*, 195–208.

Li, S., Fernandez, J.-J., Marshall, W.F., and Agard, D.A. (2012). Three-dimensional structure

of basal body triplet revealed by electron cryo-tomography. EMBO J *31*, 552–562.

Lo, C.-H., Lin, I.-H., Yang, T.T., Huang, Y.-C., Tanos, B.E., Chou, P.-C., Chang, C.-W., Tsay, Y.-G., Liao, J.-C., and Wang, W.-J. (2019). Phosphorylation of CEP83 by TTBK2 is necessary for cilia initiation. Journal of Cell Biology *218*, 3489–3505.

Logarinho, E., Maffini, S., Barisic, M., Marques, A., Toso, A., Meraldi, P., and Maiato, H. (2012). CLASPs prevent irreversible multipolarity by ensuring spindle-pole resistance to traction forces during chromosome alignment. Nat Cell Biol *14*, 295–303.

Lopes, C.A.M., Prosser, S.L., Romio, L., Hirst, R.A., O'Callaghan, C., Woolf, A.S., and Fry, A.M. (2011). Centriolar satellites are assembly points for proteins implicated in human ciliopathies, including oral-facial-digital syndrome 1. Journal of Cell Science *124*, 600–612.

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.

Mahjoub, M.R., and Stearns, T. (2012). Supernumerary centrosomes nucleate extra cilia and compromise primary cilium signaling. Curr Biol *22*, 1628–1634.

Marconi, C., Canobbio, I., Bozzi, V., Pippucci, T., Simonetti, G., Melazzini, F., Angori, S., Martinelli, G., Saglio, G., Torti, M., et al. (2017). 5'UTR point substitutions and N-terminal truncating mutations of ANKRD26 in acute myeloid leukemia. J Hematol Oncol *10*, 18.

Maria, B.L., Quisling, R.G., Rosainz, L.C., Yachnis, A.T., Gitten, J., Dede, D., and Fennell, E. (1999). Molar tooth sign in Joubert syndrome: clinical, radiologic, and pathologic significance. J Child Neurol *14*, 368–376.

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.

Mazo, G., Soplop, N., Wang, W.-J., Uryu, K., and Tsou, M.F.B. (2016). Spatial Control of Primary Ciliogenesis by Subdistal Appendages Alters Sensation-Associated Properties of Cilia. Dev. Cell *39*, 424–437.

Meehl, J.B., Bayless, B.A., Giddings, T.H., Pearson, C.G., and Winey, M. (2016). Tetrahymena Poc1 ensures proper intertriplet microtubule linkages to maintain basal body integrity. Mol Biol Cell *27*, 2394–2403.

Mennella, V., Agard, D.A., Huang, B., and Pelletier, L. (2014). Amorphous no more: subdiffraction view of the pericentriolar material architecture. Trends Cell Biol *24*, 188–197.

Mercey, O., Al Jord, A., Rostaing, P., Mahuzier, A., Fortoul, A., Boudjema, A.-R., Faucourt, M., Spassky, N., and Meunier, A. (2019). Dynamics of centriole amplification in centrosome-depleted brain multiciliated progenitors. Sci Rep *9*, 13060.

Mitchison, H.M., and Valente, E.M. (2017). Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. The Journal of Pathology *241*, 294–309.

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.

Molla-Herman, A., Ghossoub, R., Blisnick, T., Meunier, A., Serres, C., Silbermann, F., Emmerson, C., Romeo, K., Bourdoncle, P., Schmitt, A., et al. (2010). The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. J Cell Sci *123*, 1785–1795.

Moritz, M., Braunfeld, M.B., Fung, J.C., Sedat, J.W., Alberts, B.M., and Agard, D.A. (1995a). Three-dimensional structural characterization of centrosomes from early Drosophila embryos. J Cell Biol *130*, 1149–1159.

Moritz, M., Braunfeld, M.B., Sedat, J.W., Alberts, B., and Agard, D.A. (1995b). Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome. Nature *378*, 638–640.

Nanjundappa, R., Kong, D., Shim, K., Stearns, T., Brody, S.L., Loncarek, J., and Mahjoub, M.R. (2019). Regulation of cilia abundance in multiciliated cells. ELife *8*, e44039.

Obino, D., Farina, F., Malbec, O., Sáez, P.J., Maurin, M., Gaillard, J., Dingli, F., Loew, D., Gautreau, A., Yuseff, M.-I., et al. (2016). Actin nucleation at the centrosome controls lymphocyte polarity. Nat Commun *7*, 10969.

Odabasi, E., Gul, S., Kavakli, I.H., and Firat-Karalar, E.N. (2019). Centriolar satellites are required for efficient ciliogenesis and ciliary content regulation. EMBO Rep *20*, e47723.

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.

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.

Parisi, M.A. (2009). Clinical and molecular features of Joubert syndrome and related disorders. Am J Med Genet C Semin Med Genet *151C*, 326–340.

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.

Pazour, G.J., Wilkerson, C.G., and Witman, G.B. (1998). A dynein light chain is essential for the retrograde particle movement of intraflagellar transport (IFT). J Cell Biol *141*, 979–992.

Pazour, G.J., Dickert, B.L., and Witman, G.B. (1999). The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly. J Cell Biol *144*, 473–481.

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.

Pejskova, P., Reilly, M.L., Bino, L., Bernatik, O., Dolanska, L., Ganji, R.S., Zdrahal, Z., Benmerah, A., and Cajanek, L. (2020). KIF14 controls ciliogenesis via regulation of Aurora A

and is important for Hedgehog signaling. J Cell Biol *219*, e201904107.

Pitaval, A., Senger, F., Letort, G., Gidrol, X., Guyon, L., Sillibourne, J., and Théry, M. (2017). Microtubule stabilization drives 3D centrosome migration to initiate primary ciliogenesis. J. Cell Biol. *216*, 3713–3728.

Plessner, M., Knerr, J., and Grosse, R. (2019). Centrosomal Actin Assembly Is Required for Proper Mitotic Spindle Formation and Chromosome Congression. IScience *15*, 274–281.

Popovici, C., Zhang, B., Grégoire, M.J., Jonveaux, P., Lafage-Pochitaloff, M., Birnbaum, D., and Pébusque, M.J. (1999). The t(6;8)(q27;p11) translocation in a stem cell myeloproliferative disorder fuses a novel gene, FOP, to fibroblast growth factor receptor 1. Blood *93*, 1381–1389.

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

Prosser, S.L., and Pelletier, L. (2020). Centriolar satellite biogenesis and function in vertebrate cells. J Cell Sci *133*, jcs239566.

Qu, W., Yuan, S., Quan, C., Huang, Q., Zhou, Q., Yap, Y., Shi, L., Zhang, D., Guest, T., Li, W., et al. (2020). The essential role of intraflagellar transport protein IFT81 in male mice spermiogenesis and fertility. Am J Physiol Cell Physiol *318*, C1092–C1106.

Quarantotti, V., Chen, J., Tischer, J., Gonzalez Tejedo, C., Papachristou, E.K., D'Santos, C.S., Kilmartin, J.V., Miller, M.L., and Gergely, F. (2019). Centriolar satellites are acentriolar assemblies of centrosomal proteins. EMBO J *38*, e101082.

Rapaport, D., Lugassy, Y., Sprecher, E., and Horowitz, M. (2010). Loss of SNAP29 impairs endocytic recycling and cell motility. PLoS One *5*, e9759.

Reiter, J.F., Blacque, O.E., and Leroux, M.R. (2012). The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. EMBO Rep. *13*, 608–618.

Romio, L., Fry, A.M., Winyard, P.J.D., Malcolm, S., Woolf, A.S., and Feather, S.A. (2004). OFD1 is a centrosomal/basal body protein expressed during mesenchymal-epithelial transition in human nephrogenesis. J Am Soc Nephrol *15*, 2556–2568.

Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M., and Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. J Cell Biol *196*, 801–810.

Roux, K.J., Kim, D.I., Burke, B., and May, D.G. (2018). BioID: A Screen for Protein-Protein Interactions. Curr Protoc Protein Sci *91*, 19.23.1-19.23.15.

Saal, S., Faivre, L., Aral, B., Gigot, N., Toutain, A., Van Maldergem, L., Destree, A., Maystadt, I., Cosyns, J.-P., Jouk, P.-S., et al. (2010). Renal insufficiency, a frequent complication with age in oral-facial-digital syndrome type I. Clin Genet *77*, 258–265.

Sang, L., Miller, J.J., Corbit, K.C., Giles, R.H., Brauer, M.J., Otto, E.A., Baye, L.M., Wen, X., Scales, S.J., Kwong, M., et al. (2011). Mapping the NPHP-JBTS-MKS Protein Network

Reveals Ciliopathy Disease Genes and Pathways. Cell *145*, 513–528.

Scheer, U. (2014). Historical roots of centrosome research: discovery of Boveri's microscope slides in Würzburg. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci *369*, 20130469.

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.

Schmidt, T.I., Kleylein-Sohn, J., Westendorf, J., Le Clech, M., Lavoie, S.B., Stierhof, Y.-D., and Nigg, E.A. (2009). Control of Centriole Length by CPAP and CP110. Current Biology *19*, 1005–1011.

Schmidts, M., Arts, H.H., Bongers, E.M.H.F., Yap, Z., Oud, M.M., Antony, D., Duijkers, L., Emes, R.D., Stalker, J., Yntema, J.-B.L., et al. (2013). Exome sequencing identifies DYNC2H1 mutations as a common cause of asphyxiating thoracic dystrophy (Jeune syndrome) without major polydactyly, renal or retinal involvement. J Med Genet *50*, 309–323.

Schnackenberg, B.J., Khodjakov, A., Rieder, C.L., and Palazzo, R.E. (1998). The disassembly and reassembly of functional centrosomes in vitro. PNAS *95*, 9295–9300.

Schouteden, C., Serwas, D., Palfy, M., and Dammermann, A. (2015). The ciliary transition zone functions in cell adhesion but is dispensable for axoneme assembly in C. elegans. J Cell Biol *210*, 35–44.

Schweizer, N., Haren, L., Dutto, I., Viais, R., Lacasa, C., Merdes, A., and Lüders, J. (2021). Sub-centrosomal mapping identifies augmin-γTuRC as part of a centriole-stabilizing scaffold. Nat Commun *12*, 6042.

Sedjaï, F., Acquaviva, C., Chevrier, V., Chauvin, J.-P., Coppin, E., Aouane, A., Coulier, F., Tolun, A., Pierres, M., Birnbaum, D., et al. (2010). Control of ciliogenesis by FOR20, a novel centrosome and pericentriolar satellite protein. J. Cell. Sci. *123*, 2391–2401.

Shakya, S., and Westlake, C.J. (2021). Recent advances in understanding assembly of the primary cilium membrane. Fac Rev *10*, 16.

Shapiro, A.J., Davis, S.D., Ferkol, T., Dell, S.D., Rosenfeld, M., Olivier, K.N., Sagel, S.D., Milla, C., Zariwala, M.A., Wolf, W., et al. (2014). Laterality defects other than situs inversus totalis in primary ciliary dyskinesia: insights into situs ambiguus and heterotaxy. Chest *146*, 1176–1186.

Siller, S.S., Sharma, H., Li, S., Yang, J., Zhang, Y., Holtzman, M.J., Winuthayanon, W., Colognato, H., Holdener, B.C., Li, F.-Q., et al. (2017). Conditional knockout mice for the distal appendage protein CEP164 reveal its essential roles in airway multiciliated cell differentiation. PLoS Genet. *13*, e1007128.

Singla, V., Romaguera-Ros, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Reiter, J.F. (2010). Ofd1, a human disease gene, regulates the length and distal structure of centrioles. Dev. Cell *18*, 410–424.

Sirajuddin, M., Rice, L.M., and Vale, R.D. (2014). Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. Nat Cell Biol *16*, 335–344.

Sorokin, S.P. (1968). Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. J Cell Sci *3*, 207–230.

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

Stepanek, L., and Pigino, G. (2016). Microtubule doublets are double-track railways for intraflagellar transport trains. Science *352*, 721–724.

Takao, D., Yamamoto, S., and Kitagawa, D. (2019). A theory of centriole duplication based on self-organized spatial pattern formation. Journal of Cell Biology *218*, 3537–3547.

Tang, T.K. (2013). Centriole biogenesis in multiciliated cells. Nat Cell Biol *15*, 1400–1402.

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

Tanos, B.E., Yang, H.-J., Soni, R., Wang, W.-J., Macaluso, F.P., Asara, J.M., and Tsou, M.-F.B. (2013). Centriole distal appendages promote membrane docking, leading to cilia initiation. Genes Dev. *27*, 163–168.

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

Torres, V.E. (1998). New insights into polycystic kidney disease and its treatment. Curr Opin Nephrol Hypertens *7*, 159–169.

Tyanova, S., Temu, T., and Cox, J. (2016). The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. Nat Protoc *11*, 2301–2319.

Uzbekov, R., and Alieva, I. (2018). Who are you, subdistal appendages of centriole? Open Biol *8*, 180062.

Valente, E.M., Dallapiccola, B., and Bertini, E. (2013). Joubert syndrome and related disorders. Handb Clin Neurol *113*, 1879–1888.

Vasquez-Limeta, A., and Loncarek, J. (2021). Human centrosome organization and function in interphase and mitosis. Seminars in Cell & Developmental Biology *117*, 30–41.

Vieillard, J., Paschaki, M., Duteyrat, J.-L., Augière, C., Cortier, E., Lapart, J.-A., Thomas, J., and Durand, B. (2016). Transition zone assembly and its contribution to axoneme formation in Drosophila male germ cells. J Cell Biol *214*, 875–889.

Viol, L., Hata, S., Pastor-Peidro, A., Neuner, A., Murke, F., Wuchter, P., Ho, A.D., Giebel, B., and Pereira, G. (2020). Nek2 kinase displaces distal appendages from the mother centriole prior to mitosis. J Cell Biol *219*, e201907136.

Walentek, P., Quigley, I.K., Sun, D.I., Sajjan, U.K., Kintner, C., and Harland, R.M. (2016). Ciliary transcription factors and miRNAs precisely regulate Cp110 levels required for ciliary adhesions and ciliogenesis. Elife *5*.

Wang, L., Failler, M., Fu, W., and Dynlacht, B.D. (2018). A distal centriolar protein network controls organelle maturation and asymmetry. Nat Commun *9*, 3938.

Westlake, C.J., Baye, L.M., Nachury, M.V., Wright, K.J., Ervin, K.E., Phu, L., Chalouni, C., Beck, J.S., Kirkpatrick, D.S., Slusarski, D.C., et al. (2011). Primary cilia membrane assembly is initiated by Rab11 and transport protein particle II (TRAPPII) complex-dependent trafficking of Rabin8 to the centrosome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *108*, 2759–2764.

Wiegering, A., Dildrop, R., Kalfhues, L., Spychala, A., Kuschel, S., Lier, J.M., Zobel, T., Dahmen, S., Leu, T., Struchtrup, A., et al. (2018). Cell type-specific regulation of ciliary transition zone assembly in vertebrates. EMBO J *37*, e97791.

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.

Wu, C.-T., Chen, H.-Y., and Tang, T.K. (2018). Myosin-Va is required for preciliary vesicle transportation to the mother centriole during ciliogenesis. Nat Cell Biol *20*, 175–185.

Xie, S., Farmer, T., Naslavsky, N., and Caplan, S. (2019). MICAL-L1 coordinates ciliogenesis by recruiting EHD1 to the primary cilium. J Cell Sci *132*, jcs233973.

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. Development *143*, 1491–1501.

Yang, H., and Huang, K. (2020). Dissecting the Vesicular Trafficking Function of IFT Subunits. Front Cell Dev Biol *7*, 352.

Yang, T.T., Chong, W.M., Wang, W.-J., Mazo, G., Tanos, B., Chen, Z., Tran, T.M.N., Chen, Y.-D., Weng, R.R., Huang, C.-E., et al. (2018). Super-resolution architecture of mammalian centriole distal appendages reveals distinct blade and matrix functional components. Nat Commun *9*, 2023.

Yee, L.E., Garcia-Gonzalo, F.R., Bowie, R.V., Li, C., Kennedy, J.K., Ashrafi, K., Blacque, O.E., Leroux, M.R., and Reiter, J.F. (2015). Conserved Genetic Interactions between Ciliopathy Complexes Cooperatively Support Ciliogenesis and Ciliary Signaling. PLoS Genet *11*, e1005627.

Zhang, W., Kim, P.J., Chen, Z., Lokman, H., Qiu, L., Zhang, K., Rozen, S.G., Tan, E.K., Je, H.S., and Zeng, L. (2016). MiRNA-128 regulates the proliferation and neurogenesis of neural precursors by targeting PCM1 in the developing cortex. ELife *5*, e11324.

Zhang, Y., Seo, S., Bhattarai, S., Bugge, K., Searby, C.C., Zhang, Q., Drack, A.V., Stone, E.M., and Sheffield, V.C. (2014). BBS mutations modify phenotypic expression of CEP290-related ciliopathies. Hum Mol Genet *23*, 40–51.

Annexe 1:

Anticorps	espèce	source	dilution
IF paramécie			
polyE	lapin	Carsten Jancke	1/500
epiplasmin (V_3E_2)	souris	CTS32 (Nahon et al., 1993)	1/50
IF mammifère			
GT335	souris	Carsten Jancke	1/10 000
FOPNL	rat	Olivier Rosnet	1/200
CEP90	lapin	Proteintech 14413-1-AP	1/500
OFD1	lapin	Sigma HPA031103	1/500
CEP83	lapin	Proteintech 26013-1AP	1/500
CEP89	lapin	Proteintech 24002-1AP	1/800
Cep164	lapin	Proteintech 22227-1AP,	1/1000
Centrobin	souris	Abcam-Ab70448	1/500
U-ExM			
α-tubuline	souris	AA345 laboratoire Guichard et Hamel	1/250
β-tubuline	souris	AA344 laboratoire Guichard et Hamel	1/250
anti-GFP	lapin	Torrey Pines TP401	1/200
CEP90	lapin	Proteintech 14413-1-AP	1/250
OFD1	lapin	Sigma HPA031103	1/250
CEP83	lapin	Proteintech 26013-1AP	1/250

Annexe 2:

MKS-NPHP module proteins control ciliary shedding at the transition zone

PLOS BIOLOGY

SHORT REPORTS

MKS-NPHP module proteins control ciliary shedding at the transition zone

Delphine Gogendeau[1], Michel Lemullois[1], Pierrick Le Borgne[1], Manon Castelli[1], Anne Aubusson-Fleury[1], Olivier Arnaiz[1], Jean Cohen[1], Christine Vesque[2], Sylvie Schneider-Maunoury[2], Khaled Bouhouche[1], France Koll[1☯], Anne-Marie Tassin[1☯]*

1 Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Gif-sur-Yvette, France, **2** Sorbonne Université, CNRS UMR7622, INSERM U1156, Developmental Biology Laboratory—Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), Paris, France

☯ These authors contributed equally to this work.
* anne-marie.tassin@i2bc.paris-saclay.fr

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Gogendeau D, Lemullois M, Le Borgne P, Castelli M, Aubusson-Fleury A, Arnaiz O, et al. (2020) MKS-NPHP module proteins control ciliary shedding at the transition zone. PLoS Biol 18(3): e3000640. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000640

Academic Editor: Dagmar Wachten, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universitat Bonn, GERMANY

Received: July 19, 2019

Accepted: February 24, 2020

Published: March 12, 2020

Copyright: © 2020 Gogendeau et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The metadata will be found in European Nucleotide Archive (https://www.ebi.ac.uk/ena) under the following accession numbers: PRJEB33299 for controls and IFT57 and PRJEB33300 for MKS2.

Funding: The project has been funded by ANR ANR-10-BLAN-1122 FOETOCILPATH to J C BASAL BODY ANCHORING IN CILIOGENESIS: STRUCTURE-FUNCTION ANALYSIS: ANR-15-CE11-0002-01 to AMT: https://aap.agencerecherche.fr/. PLB was supported by PhD

Abstract

Ciliary shedding occurs from unicellular organisms to metazoans. Although required during the cell cycle and during neurogenesis, the process remains poorly understood. In all cellular models, this phenomenon occurs distal to the transition zone (TZ), suggesting conserved molecular mechanisms. The TZ module proteins (Meckel Gruber syndrome [MKS]/Nephronophtysis [NPHP]/Centrosomal protein of 290 kDa [CEP290]/Retinitis pigmentosa GTPase regulator-Interacting Protein 1-Like Protein [RPGRIP1L]) are known to cooperate to establish TZ formation and function. To determine whether they control deciliation, we studied the function of 5 of them (Transmembrane protein 107 [TMEM107], Transmembrane protein 216 [TMEM216], CEP290, RPGRIP1L, and NPHP4) in *Paramecium*. All proteins are recruited to the TZ of growing cilia and localize with 9-fold symmetry at the level of the most distal part of the TZ. We demonstrate that depletion of the MKS2/TMEM216 and TMEM107 proteins induces constant deciliation of some cilia, while depletion of either NPHP4, CEP290, or RPGRIP1L prevents Ca2+/EtOH deciliation. Our results constitute the first evidence for a role of conserved TZ proteins in deciliation and open new directions for understanding motile cilia physiology.

Introduction

Cilia are conserved cell appendages endowed with motility and sensory functions acting as "cellular antennae." The cilia that emanate from the surface of most cells in multicellular organisms are key organelles in numerous developmental and physiological processes [1]. Their architecture consists of 3 structural regions: basal body (BB) at their proximal part, the axoneme composed of 9 microtubule doublets covered by the ciliary membrane at the distal part and in between, and the transition zone (TZ). The TZ is characterized by (i) Y-shaped linkers connecting the microtubule doublets of the axoneme to the ciliary membrane, the so-called Y-links, and (ii) the transition fibers. These two structures are thought to function together as a gate [2], ensuring a specific ciliary composition. Genetic studies

fellowships from Université Paris-Sud (https://www.u-psud.fr/). 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.

Abbreviations: BB, basal body; Bug22, Basal body up-regulated protein 22; CEP290, Centrosomal protein of 290 kDa; DAG, Diacylglycerol; DNAH2, dynein axonemal heavy chain 2; Fa1p, Flagellar automy 1p; Fa2p, Flagellar automy 2p; FAP16, Flagellar associated protein 16; GFP, green fluorescent protein; I(1,4,5)P3, inositol 1,4,5 triphosphate; IF, immunofluorescence; IFT57, intraflagellar transport 57; IMCD3, inner medullary collecting duct 3; INPP5E, inositol polyphosphate 5-phosphatase; MKS, Meckel Gruber syndrome; NEK, Never in mitosis A related kinase; NIMA, Never in mitosis gene A; NPHP, Nephronophtysis; PEG, Polyethylene glycol; PI, Phosphatidylinositol; PIP, Phosphatidylinositol phosphate; PIP2, phosphatidyl inositol 4,5 biphosphate; RNAi, RNA interference; RPGR, Retinitis pigmentosa GTPase regulator; RPGRIP1L, RPGR-Interacting Protein 1-Like Protein; STED, Stimulated Emission Depletion; TEM, transmission electron microscopy; TMEM107, Transmembrane protein 107; TRP, transient receptor potential; TZ, transition zone.

along with protein-protein interaction data and proteomics analyses led to the identification of various components of TZ [3,4,5,6,7,8] (for review see [2,9]). Some of them are assembled in two distinct protein complexes, defined as the Meckel Gruber syndrome (MKS) and the Nephronophtysis (NPHP) modules, which cooperate in biogenesis and function of the TZ [3]. Centrosomal protein of 290 kDa (CEP290) and Retinitis pigmentosa GTPase regulator- Interacting Protein 1-Like Protein (RPGRIP1L) play a crucial function in TZ assembly [10,11,12,13], where they have been proposed to be associated with the Y-links [14]. Importantly, many genes encoding TZ proteins are mutated in human ciliopathies [15].

While much is known about the multistep processes involved in ciliogenesis (from BB duplication to cilia elongation), ciliary shedding (also called deciliation, flagellar excision, or autotomy) is still poorly understood. Deciliation is different from cilia resorption/involution and is characterized by the shedding of cilia or flagella at the distal end of the TZ [16,17,18,19]. Deciliation occurs in unicellular organisms as well as in vertebrate multiciliated epithelia. In the oviduct, cilia autotomy has been observed both in birds and in mammals during the luteal phase of the menstrual cycle [20,21,22,23]. This process is more pronounced after progesterone therapy [24]. Smoke and nitrogen dioxide inhalation [25] were shown to induce deciliation in the upper airway. Disorganization of the ciliary necklace, and in some cases its absence, have been observed [26,27,28] during upper airway infection, suggesting a strong effect of bacterial infection on the TZ leading to subsequent loss of cilia. Although deciliation in metazoans has been mostly studied in motile multiciliated cells, the shedding of primary cilia during the cell cycle was recently demonstrated by long-term video recording of cultured inner medullary collecting duct 3 (IMCD3) cells [29]. Similarly, ciliary shedding seems to occur during neurogenesis to allow the newly born neuron to migrate out of the ventricle [30].

Mechanisms of deciliation have been studied using the unicellular organism *Chlamydomonas* [19,31]. In this organism, deflagellation is triggered by an increase in intracellular calcium near the base of the flagella [32,33,34] and involves microtubule-severing proteins such as katanin [35,36,37]. Interestingly, proteins involved in this process—such as Flagellar automy 1p (Fa1p), Flagellar automy 2p (Fa2p) belonging to the Never in mitosis A related kinase (Nek) kinase family, and Flagellar associated protein 16 (FAP16)—have been shown to localize at the TZ [37,38,39].

To evaluate a possible involvement of the conserved MKS/NPHP proteins in the deciliation process of motile cilia, we used *Paramecium* to study 5 proteins: two belonging to the MKS module (MKS2/Transmembrane protein 216 [TMEM216] and TMEM107), one belonging to the NPHP module (NPHP4), and the regulators of TZ assembly CEP290 and RPGRIP1L.

We show using super-resolution microscopy and transmission electron microscopy (TEM) that all 5 proteins localize with 9-fold symmetry at the distal part of the TZ, which is consistent with their localization in non-motile and motile cilia of various organisms [9,40]. In *Paramecium*, the TZ displays 3 plates, from proximal to distal: the terminal plate, the intermediate plate, and the axosomal plate, which appears adjacent to the ciliary necklace [41]. We show using functional RNA interference (RNAi) studies that the depletion of TZ proteins induces only minor defects in TZ structure that do not impair ciliary growth [42]. Most interestingly, the depletion of any of these proteins impacts the deciliation process. While the depletion of the two MKS protein modules induces constant ciliary autotomy, the depletion of either NPHP4, CEP290, or RPGRIP1L increases resistance to deciliation. Our results constitute the first evidence for a role of these TZ proteins in deciliation and open new directions for understanding cilia physiology.

Results

We performed this study in *Paramecium tetraurelia*, a unicellular organism that bears at its surface about 4,000 motile cilia. Paramecia display a precise BB and cilia organization [43,44] (for review see [45], Fig 1A). In the anterior part of the cell, the invariant field shows cortical units with two ciliated BBs, while the posterior part displays units with a single BB. In between, the mixed field exhibits units with either a single or two BBs. In the latter case, both BBs are anchored at the cell surface, but only the posterior one is ciliated (Fig 1B). As in *Tetrahymena* [46], single BBs can be either ciliated or not, according to the cell cycle stage ([47]). Interestingly, ultrastructural analysis of the TZ of unciliated or ciliated BBs reveals that they have a distinct morphology. The ciliated BBs have longer TZs, suggesting that the process of structural modification may occur during ciliation (Fig 1B and 1C, [44,45]).

Bioinformatic analyses showed that CEP290 and RPGRIP1L as well as most MKS and NPHP module proteins are conserved in *Paramecium* (Table 1; [11,48]). We focused on 5 of them: two belonging to the MKS module and interacting together [43] (TMEM216/MKS2 and TMEM107), one representative of the NPHP complex (NPHP4), and the two pivotal proteins CEP290/NPHP6 and RPGRIP1L/MKS5/NPHP8. We will refer to them as a whole as "TZ proteins." As a result of whole genome duplications during evolution of this lineage [49], several paralogs of each protein are encoded in the *P. tetraurelia* genome (See S1 Table).

TZ proteins are recruited at the axosomal plate at the onset of ciliogenesis

We assessed whether the candidate proteins localized at the TZ, like their counterparts in other organisms, by expressing one green fluorescent protein (GFP)-tagged paralog of each protein. After detergent extraction and fixation, microscopic analysis performed on each GFP-transformed cell line detected GFP fluorescence only on ciliated BBs (Fig 1D and S1A Fig). Fluorescence localized between the BB and the cilium, which is compatible with TZ labelling. In addition to this common localization, NPHP4-GFP and CEP290-GFP were also present on the proximal part of all BBs (Fig 1D, S1A Fig). Additional cortical staining associated with all BB for TMEM216-GFP was observed on living or fixed cells after mild detergent extraction (S1A Fig). In subsequent analyses, we focused on the putative TZ labelling of each of the 5 proteins.

We used super-resolution microscopy (Stimulated Emission Depletion [STED] microscopy) to increase localization accuracy (Fig 1E and 1F). All proteins were organized with a 9-fold symmetry. Quantification of the mean diameters of the rings revealed that both CEP290-GFP and RPGRIP1L-GFP localized most centrally, close to the microtubules, whereas NPHP4-GFP was detected outside the ring of microtubule doublets. TMEM216-GFP and TMEM107-GFP were found more externally (Fig 1E and 1F). Immuno-electron microscopy confirmed these observations and suggested that TMEM216-GFP as well as TMEM107-GFP are more closely localized to the TZ ciliary membrane whereas CEP290-GFP and RPGRIP1L-GFP are localized close to the tubulin scaffold. Interestingly, a clear restriction of all these proteins to the axosomal plate (arrowheads on Fig 1G) is found. This localization in *Paramecium* corresponds to the localization of the ciliary necklace [41] and the Y-links, which connect transition fibers to the ciliary membrane.

To decipher the timing of recruitment of proteins at the TZ, we analyzed their localization during ciliary growth (see Materials and Methods). Each protein is recruited to the TZ as soon as the growing cilium is detected by the antibodies (S1B Fig).

Altogether, these results indicate that all 5 proteins are localized at the TZ, as in other organisms [3,9,11,14,40,42,50]. In addition, the protein recruitment at the TZ strongly suggests that molecular maturation of the TZ accompanies structural maturation.

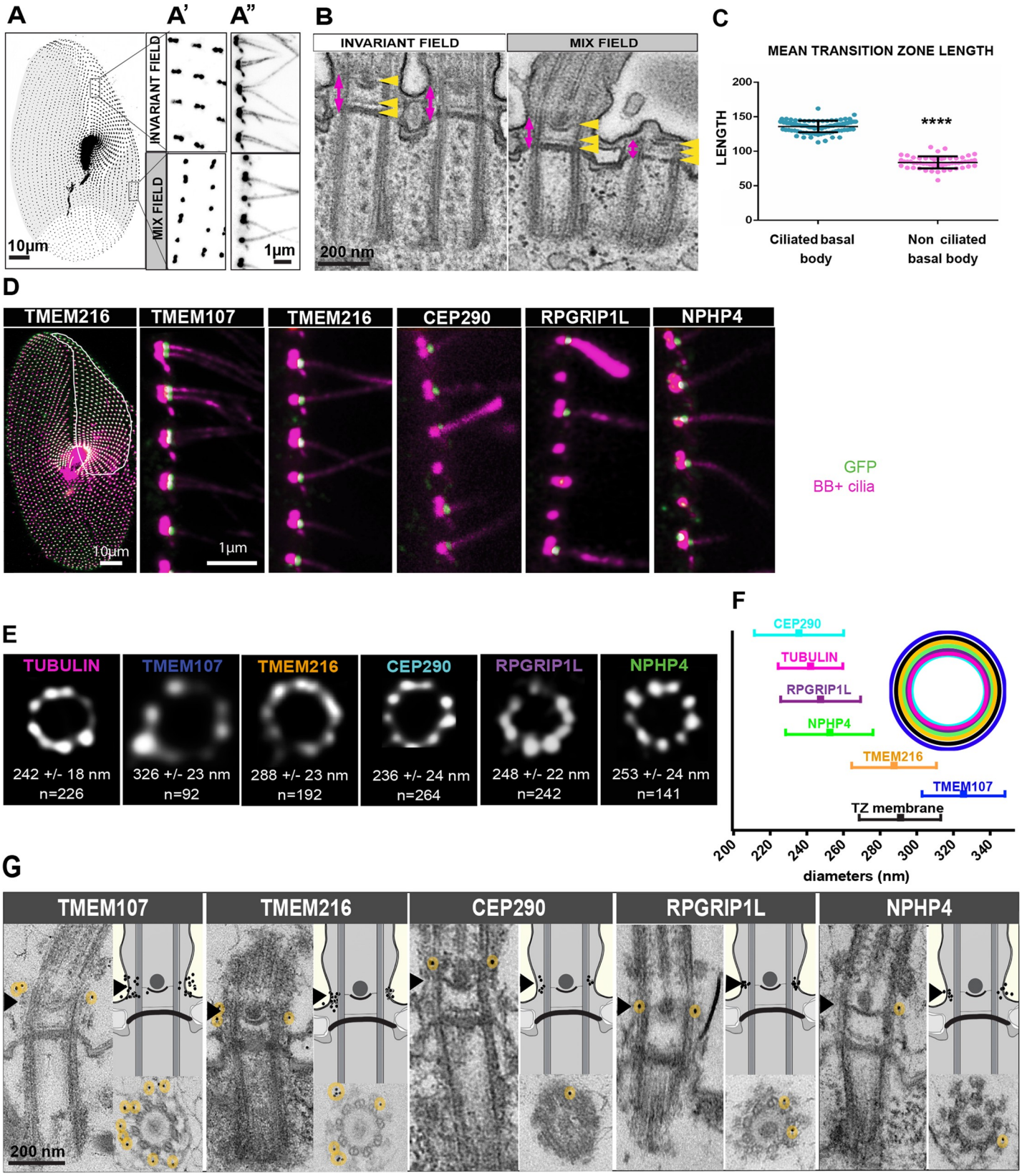

A
A'
A"
INVARIANT FIELD
MIX FIELD
10µm
1µm
B
INVARIANT FIELD
MIX FIELD
200 nm
C
MEAN TRANSITION ZONE LENGTH
LENGTH
200
150
100
50
0
****
Ciliated basal body
Non ciliated basal body
D
TMEM216
TMEM107
TMEM216
CEP290
RPGRIP1L
NPHP4
10µm
1µm
GFP
BB+ cilia
E
TUBULIN
TMEM107
TMEM216
CEP290
RPGRIP1L
NPHP4
242 +/- 18 nm
n=226
326 +/- 23 nm
n=92
288 +/- 23 nm
n=192
236 +/- 24 nm
n=264
248 +/- 22 nm
n=242
253 +/- 24 nm
n=141
F
CEP290
TUBULIN
RPGRIP1L
NPHP4
TMEM216
TMEM107
TZ membrane
200
220
240
260
280
300
320
340
diameters (nm)
G
TMEM107
TMEM216
CEP290
RPGRIP1L
NPHP4
200 nm

Fig 1. Localization of TZ proteins in *Paramecium*. (A–C) Ciliation status in *Paramecium*. (A) Paramecia labelled by the monoclonal anti-glutamylated tubulin ID5 (decorating BB and cilia). Paramecium cortex presents different regions in which the BB pattern differs. BBs are organized in doublets in the invariant field region. The mixed field, highlighted here in light grey, presents interspersed BB singlets and doublets. The posterior region, in white, only possesses singlet BBs. A′ is a magnification of the surface view. A″ is a transverse section showing that in the invariant field each BB of the doublet is ciliated, while in the mixed field only the posterior BB bears a cilium. Bars = 10 μm and 1 μm, respectively. (B) EM images showing a longitudinal section of two-BB units in the invariant field (left) and mixed field (right). The TZ (magenta arrow) is characterized by the presence of 3 successive layers indicated by yellow arrowheads. From bottom to top: the terminal plate, the intermediate plate, and the axosomal plate. Note that the unciliated BB in the mixed field shows a reduced TZ compared to ciliated ones. Bar = 200 nm. (C) Graph showing the mean length of the TZ of ciliated and unciliated basal bodies (>4 replicates). Ciliated BB counted: 100, nonciliated BB counted: 56. Ciliated TZ length: 136 nm and unciliated TZ length: 84 nm. Unpaired two-sided *t* test, $^{****}p < 0.0001$. Source data can be found in S1 Data. (D–G) Localization of *Paramecium* TZ proteins. (D) Paramecia expressing different TZ proteins fused with GFP. Cells were permeabilized before proceeding to immunostaining by ID5 (decorating BB and cilia in magenta) and a polyclonal anti-GFP (in green). Left panel: surface view of a Paramecium expressing TMEM216-GFP. Ciliated basal bodies of the invariant field (encircled in white) are stained by both GFP antibodies and ID5. In the other part of the cells, some basal bodies are labelled only by ID5. Right panels: confocal Z projections of ciliary rows, at the cell margin from TZ protein transformants. TMEM107-GFP, TMEM216-GFP, CEP290-GFP, and RPGRIP1L-GFP are localized only on the distal part of ciliated BBs. In addition, NPHP4-GFP can be observed at the BB proximal part. Note that ID5 antibodies better recognize short cilia. Bars = 10 μm and 1 μm. (E) Representative STED images revealing distinct localization patterns of several GFP-tagged TZ proteins. Cells were labelled with anti-GFP or ID5 (tubulin). A single ring differing in diameter is observed according to the observed protein. The mean diameters (distance between intensity maxima) and the number of BBs analyzed are given beneath each image, 2 replicates. (F) Graph (left) showing the mean diameter ± SD of each toroid labeled by each GFP tagged TZ protein (see B). Top right, schema representing the relative position of all toroids with respect to the position of tubulin and the ciliary membrane. Each TZ protein is shown in a different color. Source data can be found in S1 Data. (G) Representative EM images of the immunolocalization of the different GFP fusion proteins revealed by anti-GFP antibodies. Left panels: longitudinal views. Lower right panels: transverse sections of BBs at the level of the axosomal plate. Upper right panels: BB diagrams recapitulating the localization of gold beads. All these proteins, although they occupy different diameters in transverse views, are localized at the level of the axosomal plate indicated by a black arrowhead. TMEM107: 35 gold beads on 16 BB; TMEM216: 36 gold beads on 21 BB; CEP290: 11 gold beads on 10 BB; RPGRIP1L: 24 gold beads on 18 BB; NPHP4: 14 gold beads on 8 BB. Gold beads are highlighted in yellow. Bars: 200 nm. BB, basal body; CEP290, centrosomal protein of 290 kDa; EM, electron microscopy; GFP, green fluorescent protein; NPHP4, Nephronophtysis 4; RPGRIP1L, Retinitis pigmentosa GTPase regulator-Interacting Protein 1-Like Protein; STED, Stimulated Emission Depletion; TMEM216, Transmembrane protein 216; TZ, transition zone.

https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000640.g001

Depletion of TZ proteins affects proliferation rate and swimming velocity

To ascertain the function of these TZ proteins, all paralogs of each protein family were depleted concomitantly by inactivating all the corresponding genes using the feeding method

Table 1. Conservation of TZ proteins in *Paramecium*.

	NAME	PRESENCE IN *PARAMECIUM*
MKS MODULE	MKS1	Yes
	MKS2/TMEM216	Yes
	MKS3/TMEM67/Meckelin	Yes
	Ahi1	Yes
	B9D1	Yes
	B9D2	Yes
	Tectonic (1,2,3)	Yes
	TMEM17	Yes
	TMEM107	Yes
	TMEM218	-
	TMEM231	Yes
	TMEM237	-
NPHP MODULE	NPHP1	-
	NPHP4/POC10	Yes
	NPHP5/IQCB1	-
OTHERS	NPHP3	-
	CEP290/NPHP6/MKS4	Yes
	RPGRIP1L/NPHP8/MKS5	Yes

In *Paramecium*, most of the TZ proteins are conserved.

Abbreviations: CEP290, Centrosomal protein of 290 kDa; MKS, Meckel Gruber syndrome; NPHP, Nephronophtysis; RPGRIP1L, Retinitis pigmentosa GTPase regulator-Interacting Protein 1-Like Protein; TMEM, Transmembrane protein; TZ, transition zone

https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000640.t001

(TZ^{RNAi}) [51,52]. The efficiency of silencing was tested by analyzing either the mRNA level or by controlling the effective depletion of the GFP-tagged protein by quantification of the BB fluorescence (S2 Fig, Materials and Methods). Within the first 24 h, depleted cells showed abnormal swimming behavior associated with a slower growth rate (S3A Fig). These phenotypes were stably maintained for several days in the RNAi media except for TMEM216/MKS2-depleted cells, which stopped dividing after 72 h.

To better characterize the motility defects in silenced cells, we video-recorded paramecia. Control cells had an average swimming velocity of 683 μm per second (S3B Fig). Depletion of TZ proteins resulted in a severe reduction (by about one-third) of this velocity (S3B Fig). Such a reduction has already been observed in paramecia after depleting Basal body up-regulated protein 22 (Bug22) [53], dynein axonemal heavy chain 9 (DNAH9), or C11orf70, these last two proteins being required for dynein arm assembly [54,55].

Depletion of TMEM107 and TMEM216 leads to an accumulation of stretches of short cilia

To determine whether the swimming alterations could be due to defects in ciliation or in BB organization, we analyzed their patterns by immunolabelling. In all silenced cells, the BB pattern was normal (S4 Fig), indicating that TZ protein depletion did not affect BB duplication or anchoring processes. $Cep290^{RNAi}$, $RPGRIP1L^{RNAi}$, and $NPHP4^{RNAi}$ cells displayed a ciliary pattern essentially identical to the control cells (Fig 2A). In contrast, interphasic $TMEM107^{RNAi}$ or $TMEM216^{RNAi}$ cells displayed an accumulation of stretches of short cilia, measuring about 4 μm (Fig 2B). Such stretches of short cilia were never observed in control cells. Quantification of these short cilia (Fig 2C) confirmed a dramatic increase in their number (control cells [9.92% ± 0.5%], $TMEM107^{RNAi}$ [25.8% ± 2%], and $TMEM216^{RNAi}$ [26.55% ± 1.7%]). Several hypotheses may explain this phenotype such as slow ciliary growth, ciliary involution, or constant ciliary breakage (i.e., some cilia deciliate) followed by ciliary regrowth.

$TMEM107^{RNAi}$ and $TMEM216^{RNAi}$ induce constant ciliary breakage

To first assess whether the ciliary phenotype observed in $TMEM107^{RNAi}$ or $TMEM216^{RNAi}$ cells could be caused by constant cilia breakage/regeneration, we looked for the presence of free detached cilia in the culture medium (see Materials and Methods). Although no cilia were found in the medium of either control, $CEP290^{RNAi}$, $RPGRIP1L^{RNAi}$, or $NPHP4^{RNAi}$ cells, numerous cilia were detected in $TMEM107^{RNAi}$ (about 15 cilia per field, 2 independent replicates) or $TMEM216^{RNAi}$ (about 12 cilia, 2 independent replicates) (Fig 2D). These results support the hypothesis that the short cilia observed after depletion of TMEM107 or TMEM216 result from constant ciliary breakage followed by reciliation.

Modification of the ciliary beating force influences ciliary shedding in TMEM107- and TMEM216-depleted cells

We hypothesized that the depletion of TMEM107 or TMEM216 weakened the cilia, which consequently did not resist the forces exerted to sustain ciliary beating or bending. One might expect that, in this situation, an increase of ciliary beating forces would intensify the deciliation phenotype while a decrease would alleviate it. To test this hypothesis, we first increased the standard-medium viscosity, known to induce an elevation of the ciliary force. After culture in 10% Polyethylene glycol (PEG)-containing medium, the ciliation pattern of $TMEM107^{RNAi}$, $TMEM216^{RNAi}$, or control cells was analyzed by immunofluorescence (IF). Number of bald cells (defined as less than 25% remaining cilia) was counted (Fig 2E). In contrast to the modest

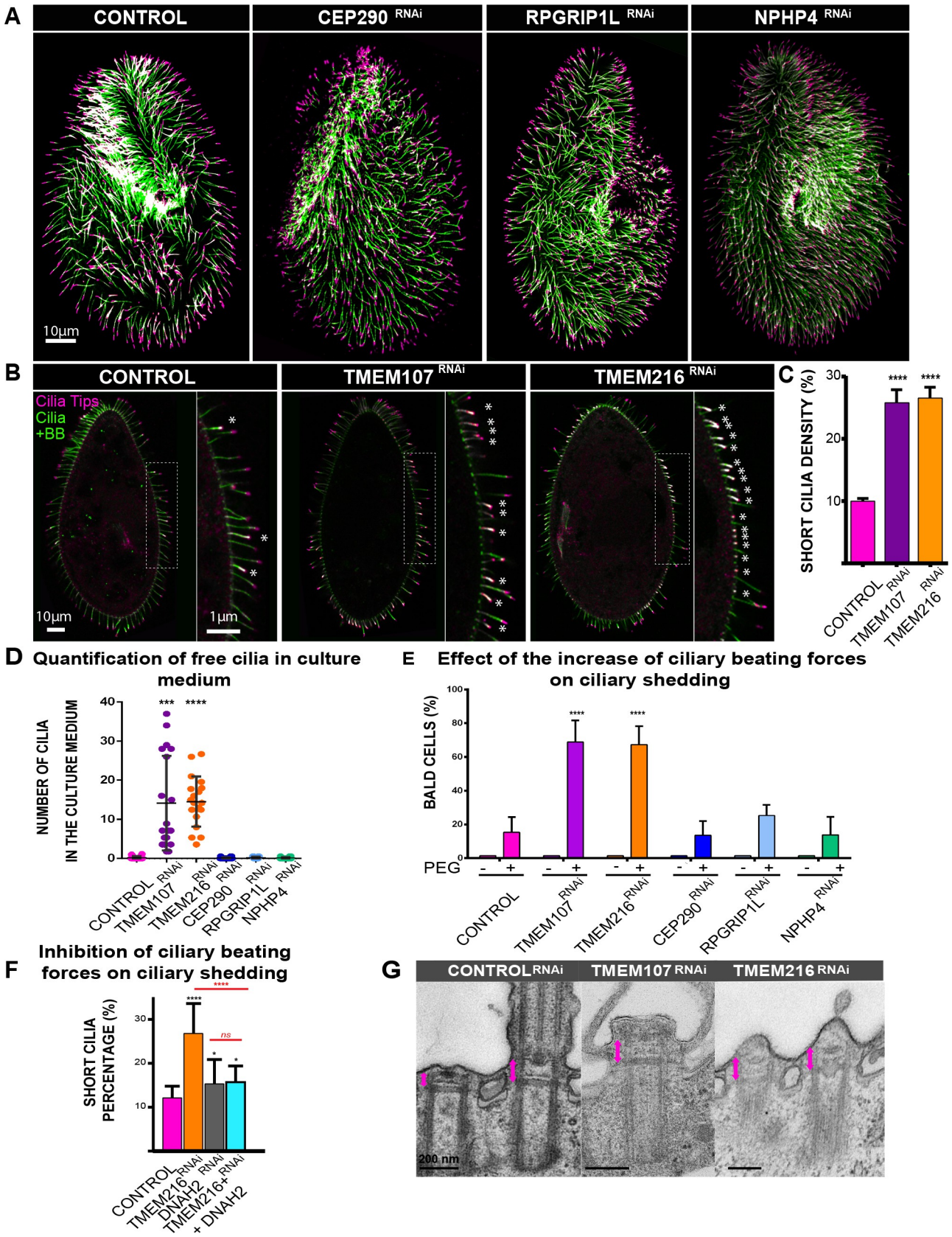

A
CONTROL
CEP290 RNAi
RPGRIP1L RNAi
NPHP4 RNAi
10µm
B
CONTROL
TMEM107 RNAi
TMEM216 RNAi
Cilia Tips
Cilia
+BB
10µm
1µm
C
SHORT CILIA DENSITY (%)
CONTROL
TMEM107 RNAi
TMEM216 RNAi
D
Quantification of free cilia in culture medium
NUMBER OF CILIA IN THE CULTURE MEDIUM
CONTROL
TMEM107 RNAi
TMEM216 RNAi
CEP290 RNAi
RPGRIP1L RNAi
NPHP4 RNAi
E
Effect of the increase of ciliary beating forces on ciliary shedding
BALD CELLS (%)
PEG
CONTROL
TMEM107 RNAi
TMEM216 RNAi
CEP290 RNAi
RPGRIP1L RNAi
NPHP4 RNAi
F
Inhibition of ciliary beating forces on ciliary shedding
SHORT CILIA PERCENTAGE (%)
ns
CONTROL
TMEM216 RNAi
DNAH2 RNAi
TMEM216 RNAi + DNAH2
G
CONTROL RNAi
TMEM107 RNAi
TMEM216 RNAi
200 nm

Fig 2. Ciliary pattern of paramecia depleted for TZ proteins. (A) Ciliary pattern of paramecia treated with control RNAi or TZ^{RNAi} (CEP290, RPGRIP1L, and NPHP4). Cells were immunostained by the monoclonal anti-mono-glycylated tubulin TAP952 (magenta, cilia tip labelling) and the polyclonal anti-poly-glutamylated tubulin (polyE) antibodies (green, decorating BB and cilia). These TZ-protein–depleted paramecia display a ciliary pattern similar to that of control paramecia. (B) Control, TMEM107-depleted, and TMEM216-depleted paramecia stained for cilia using TAP952 (magenta) and the poly-E tubulin (green). Control paramecia show the usual ciliary pattern with long cilia (10 μm) and a few short growing cilia indicated by asterisks. A large increase in short (about 4 μm) or tiny cilia is observed in TMEM107- and TMEM216-depleted cells. Bar = 10 μm. (C) Bar plot showing the mean percentage of short cilia in Control (n = 60 cells, 3 independent replicates), TMEM107 (n = 50 cells, 3 independent replicates), and TMEM216-depleted (n = 42 cells, 3 independent replicates) cells. Error bars show the SEM. Statistical significance was assessed by an unpaired t test, two-sided $p < 0.0001^{****}$. Source data can be found in S2 Data. (D–G) Ciliary shedding in TMEM107- or TMEM216-depleted cells. (D) Quantification of free cilia in culture medium: dot plot showing the number of free cilia found in the culture medium (about 10 microscope fields were analyzed per experiment; see Materials and Methods). Two independent replicates. Cilia were labelled using ID5 and poly-E antibodies. Error bars represent the standard deviation. Statistical significance was assessed by an unpaired t test. $^{***}p = 0.0004$, $^{****}p < 0.0001$. Source data can be found in S2 Data. (E) Effect of the increase of ciliary beating forces on ciliary shedding quantification of the mean number of bald cells (<25% cilia per cell) after 1 h in 10% PEG for control (n = 410 cells, 8 independent replicates), TMEM107^{RNAi} (n = 316, 5 independent replicates), TMEM216^{RNAi} (n = 303 cells, 5 independent replicates), CEP290^{RNAi} (n = 291, 4 independent replicates), RPGRIP1L^{RNAi} (n = 204, 3 independent replicates), and NPHP4^{RNAi} (n = 196, 3 independent replicates). Errors bars represent the standard deviation. Statistical significance was assessed by unpaired two-sided χ^2 test, $^{****}p < 0.0001$. Confidence interval 95% source data can be found in S2 Data. (F) Effect of inhibition of ciliary beating on ciliary shedding; quantification of the mean percentage of short cilia in Control (n = 60 cells, 2 independent replicates), TMEM216^{RNAi} (n = 42 cells, 2 independent replicates), DNAH2^{RNAi} (n = 15 cells, 2 independent replicates), and TMEM216-DNAH2^{RNAi} (n = 16 cells, 2 independent replicates) paramecia. DNAH2^{RNAi} cells present a percentage of short cilia slightly higher than the controls. Impairing ciliary beating of TMEM216^{RNAi} cells by DNAH2 decreases this percentage. Statistical significance was assessed by unpaired two-sided t test. p-Values: $^{*}p = 0.0306$, $^{****}p < 0.0001$. Source data can be found in S2 Data. (G) EM images of ciliary defects induced by TMEM107^{RNAi} and TMEM216^{RNAi}. Control^{RNAi} basal bodies showing a two-BB unit, with one unciliated and one ciliated BB. The length of the TZ is indicated by a red arrow. Cilia are either severed at the level of the axosomal plate as shown in TMEM107^{RNAi} or have been severed and are in a regrowth process as in TMEM216^{RNAi}. Note that the length of the TZ corresponds to the length of TZ of ciliated BB. BB, basal body; CEP290, centrosomal protein of 290 kDa; DNAH2, dynein axonemal heavy chain 2; NPHP4, Nephronophtysis 4; ns, nonsignificant; PEG, Polyethylene glycol; polyE, anti-poly-glutamylated tubulin; RNAi, RNA interference; RPGRIP1L, Retinitis pigmentosa GTPase regulator-Interacting Protein 1-Like Protein; TMEM216, Transmembrane protein 216; TZ, transition zone.

https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000640.g002

increase in cell number that became bald in control, CEP290^{RNAi}, RPGRIP1L^{RNAi}, and NPHP4 ^{RNAi} cells (17%, 15%, 21%, and 14%, respectively), there was a dramatic increase in this cell number in TMEM107^{RNAi} (71%) and TMEM216^{RNAi} (73%) conditions.

Conversely, we blocked the ciliary beating in TMEM216^{RNAi} cells by inactivating the gene encoding DNAH2, required for ciliary beating [56]. As expected, the depletion of DNAH2 alone as well as co-depletion of DNAH2/TMEM216 led to a complete immobilization of the cells within 48 h. As predicted, the co-depletion of TMEM216 and DNAH2 reduced ciliary breakage from 27% in TMEM216^{RNAi} to 15% (Fig 2F). Moreover, bald cells were never observed in the co-depletion conditions. DNAH2 depletion alone induces a slight increase in the percentage of short cilia compared to control cells (15% versus 12%, Fig 2F).

Altogether, these results demonstrate that TMEM107 and TMEM216 may reduce ciliary breakage by the forces generated during ciliary beating.

Cilia shedding occurs at the distal part of the TZ, precisely at the axosomal plate level

To determine the site of cilia breakage in TMEM107^{RNAi} and TMEM216^{RNAi} cells, electron microscopy experiments were carried out. Control cells displayed the usual pattern of cortical two-BB units showing a ciliated and an unciliated BB (see Fig 1B). In cells depleted for TMEM107 or TMEM216, most of the cilia showed a normal morphology, as expected from the IF staining. Nevertheless, BBs harboring an extended severed TZ above the axosomal plate (Fig 2G TMEM107^{RNAi}, S5 Fig) were seen typical of deciliated ones [57]. Interestingly, two-BB units with 2 short-growing cilia, characterized by the presence of electron dense material and extended TZ, were also observed (Fig 2G, TMEM216^{RNAi}, S5 Fig). Such a situation is never observed in control cells. Two-BB units, either in the invariant field or in the mixed field (Fig 1), never grow their cilia simultaneously. Therefore, this feature suggests that at least one of them has been broken. Altogether, these results are in favor of a breaking point just above the distal end of the TZ, at the level of the axosomal plate.

TMEM216 depletion affects ciliary and membrane fusion gene expression

Ciliary regeneration following the deciliation process is correlated with a modification of the ciliary gene expression profile [58,59]. We expected that the depletion of TMEM107 or TMEM216 would also modify ciliary gene expression. We thus undertook a transcriptomic analysis of TMEM216-depleted paramecia by RNA deep sequencing. A total of 4,295 genes present a significant modification of their expression profile compared to controls (fold change of ± 2, S2 Table). The specific effect of silencing *TMEM216* on the transcriptome was confirmed by comparison with the transcriptome of intraflagellar transport 57 (IFT57^{RNAi}) cells characterized by total disappearance of cilia [60]. The two transcriptomes showed no overlap (Fig 3A and 3B). Concerning TMEM216^{RNAi}, one-fourth of the deregulated genes (1,079/4,295) correspond to genes identified as potential ciliary genes by transcriptomic, proteomic [58,61], and comparative genomic analyses (see S2 Table, sheets 2 and 3). This corresponds to an enrichment of ciliary genes compared to their representation in the complete genome (4,585/39,642). Remarkably, 535 genes identified in our RNA sequencing screen are also differentially expressed during the reciliation process, 95% of them (507) being up- or down-regulated in the same direction (426 genes are up-regulated both in response to TMEM216 ^{RNAi} and during reciliation and 81 are down-regulated, Fig 3C and 3D). These results suggest that the depletion of TMEM216 mimics a reciliation process as expected, a phenotype completely different from the IFT57^{RNAi} phenotype [60].

We specifically searched for different genes involved in ciliogenesis processes after TMEM216^{RNAi}. Except for the down-regulation of the gene encoding the *Paramecium B9D2* orthologs or *IFT46* (fold change 0.48, $p = 3.54 \times 10^{-4}$, fold change 0.21, $p = 3.8 \times 10^{-3}$, respectively, S2 Table), the expression of genes belonging to the *MKS*, *NPHP*, *BBS*, or *IFT* complexes identified in *Paramecium* was not affected. Expression of a *VPS4* homolog and of a gene belonging to the *SNF7* family, both encoding proteins involved in membrane fusion and associated with the TZ in *Chlamydomonas* and mammalian cells [7,62], were significantly up-regulated (fold change 14.6, $p = 3.17 \times 10^{-16}$ and fold change 21.8, $p = 8 \times 10^{-11}$, respectively). In addition, the expression of another gene, *NSF*, whose encoded protein is involved in membrane fusion, is also greatly up-regulated (fold change 40.59, $p = 4.79 \times 10^{-58}$). These results suggest that these proteins may act to remodel the cell membrane after axoneme severing. In contrast, microtubule-severing proteins, such as katanin or spastin, are not differentially expressed after TMEM216 depletion or chemical deciliation.

Depletion of CEP290, RPGRIP1L, or NPHP4 affects the deciliation process

Although the depletion of CEP290, RPGRIP1L, and NPHP4 did not modify the ciliary pattern, we wanted to assess whether the deciliation process induced by Ca2+/EtOH buffer might be affected. Ca2+/EtOH induces a massive Ca2+ entry into cells, which activates the molecular machinery that results in the severing of cilia [19]. CEP290^{RNAi}, RPGRIP1L^{RNAi}, or NPHP4^{RNAi} cells continued to swim after treatment, while control cells immediately stopped moving, suggesting that deciliation was inefficient in these 3 RNAi conditions. Cilia immunostaining confirmed this assumption, since control cells were bald while CEP290-, RPGRIP1L-, or NPHP4-depleted cells remained mostly ciliated (Fig 4A and 4B).

Studies in *Chlamydomonas* showed that the deflagellation process requires both a transient increase of intraciliary Ca2+ and functional microtubule-severing proteins such as katanins and spastins [31,63]. To determine whether the deciliation defects observed after depletion of CEP290 or RPGRIP1L were due to defective Ca2+ signal transduction or to inability of microtubule-severing proteins to break the axoneme, we turned to a dibucaine treatment. This drug is known to increase intracellular and intraciliary calcium concentration by blocking Ca2+ ion

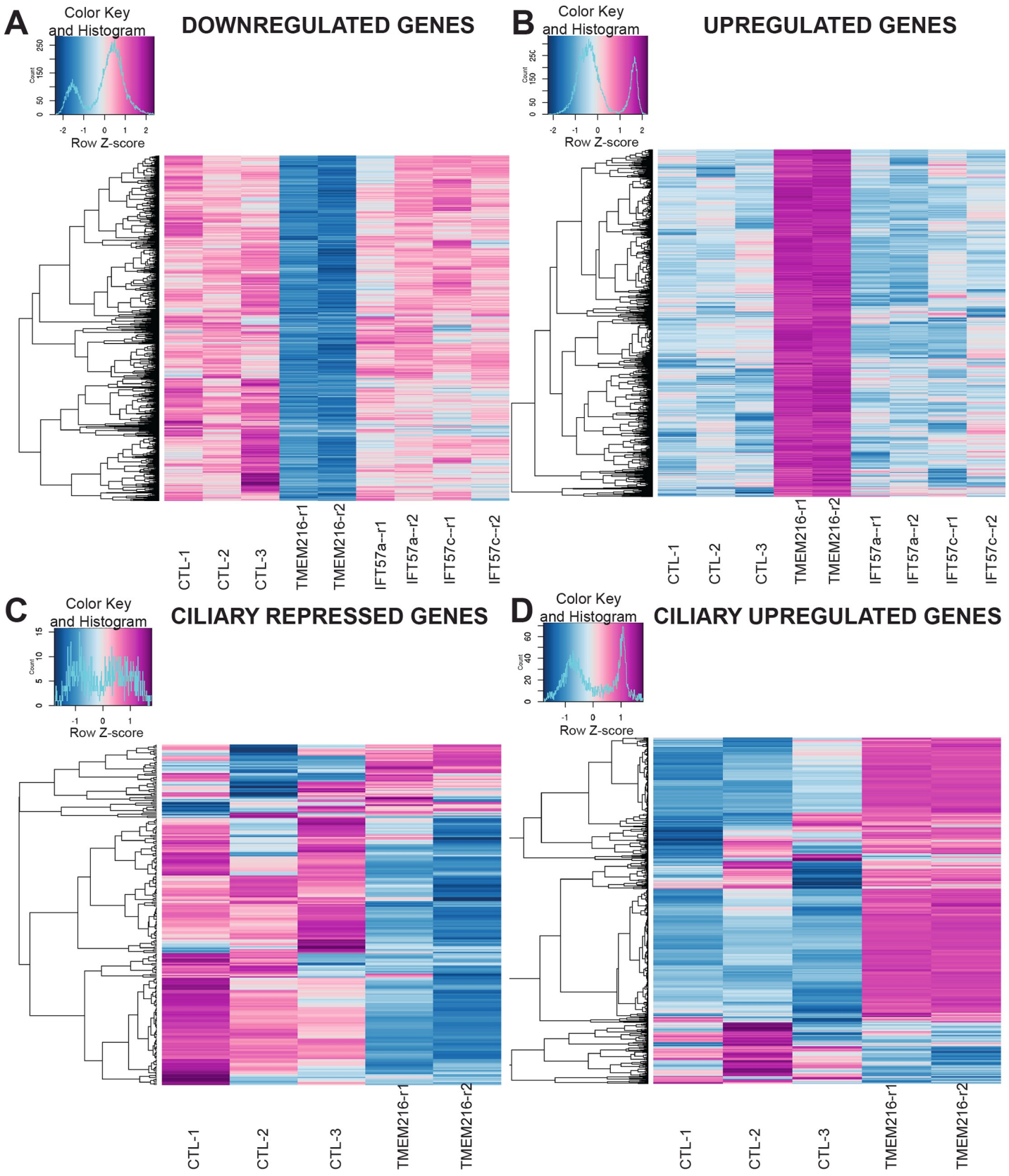

A
Color Key and Histogram
Count
Row Z-score
DOWNREGULATED GENES
CTL-1
CTL-2
CTL-3
TMEM216-r1
TMEM216-r2
IFT57a--r1
IFT57a--r2
IFT57c--r1
IFT57c--r2
B
Color Key and Histogram
Count
Row Z-score
UPREGULATED GENES
CTL-1
CTL-2
CTL-3
TMEM216-r1
TMEM216-r2
IFT57a--r1
IFT57a--r2
IFT57c--r1
IFT57c--r2
C
Color Key and Histogram
Count
Row Z-score
CILIARY REPRESSED GENES
CTL-1
CTL-2
CTL-3
TMEM216-r1
TMEM216-r2
D
Color Key and Histogram
Count
Row Z-score
CILIARY UPREGULATED GENES
CTL-1
CTL-2
CTL-3
TMEM216-r1
TMEM216-r2

Fig 3. Transcriptomic analysis of TMEM216-depleted cells. The heatmaps were generated by the "heatmaps.2" R function using the log2 normalized gene expression levels in the different conditions. The color keys are presented at the top left corner of each heatmap and show a color variation from dark blue to dark red according to the gene expression level. (A–B) Each line represents the expression level variation for one down-regulated gene (A) or up-regulated gene (B) when TMEM216 is depleted. The differential expression level of the genes between control biological replicates (first three columns) and TMEM216^{RNAi} biological replicates (fourth and fifth column) is highlighted by the color variation. It is remarkable that these genes are not affected in IFT57-depleted cells (last four columns corresponding to the 4 biological replicates). (C–D) Comparison of the expression of genes differentially expressed (repressed [C] or up-regulated [D]) during the reciliation process [59] (called ciliary genes) with their expression in TMEM216^{RNAi} and control cells. In C, the vast majority of the ciliary repressed genes are also repressed when TMEM216 is depleted. Likewise, the ciliary up-regulated genes are up-regulated in TMEM216^{RNAi}. IFT57, intraflagellar transport 57; RNAi, RNA interference; TMEM216, Transmembrane protein 216.

https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000640.g003

extruding channels or by releasing Ca2+ from destabilizing calcium binding proteins and lipids [64]. When exposing RNAi-treated paramecia to 5 mM dibucaine, they rapidly stopped swimming and became bald (Fig 4C). These results indicate that CEP290^{RNAi} or RPGRIP1L^{RNAi} cells possess functional microtubule-severing agents necessary for cilia shedding and that the defects observed can be due to either a defective Ca2+ influx or to the signaling induced by this influx.

To distinguish between these two hypotheses, cells under CEP290^{RNAi}, RPGRIP1L^{RNAi}, or NPHP4 ^{RNAi} conditions were detergent permeabilized before deciliation. In those permeabilized cells, the Ca2+ present in the deciliation buffer enters the cell and could trigger the transduction signal only if active, resulting in deciliation. Presence or absence of cilia was then determined by IF. Detergent-permeabilized cells deciliate very efficiently using Ca2+/EtOH deciliation buffer (Fig 4D). Altogether, these results suggest that the depletion of CEP290, RPGRIP1L, or NPHP4 leads to defective Ca2+ influx, which may prevent deciliation.

The conserved domains (coiled-coil region and C2 domains) of RPGRIP1L are required for the deciliation process

In addition to the conserved N-terminal coiled-coil region and central C2 domains [65], *Paramecium* RPGRIP1L displays extra EF-hand domains in the C-terminal part of the protein in place of the RPGR binding domain found in vertebrate RPGRIP1L. The EF-hand domains are known to undergo conformational changes upon calcium binding [66]. We wanted to determine whether cilia autotomy might depend on the conserved coiled-coil and C2 domains or on *Paramecium*-specific C-terminal EF-hand domains. For this, we asked whether a version of RPGRIP1L lacking its EF-hand domains (RPGRIP1LΔEF) but localized like the full-length protein (S6A Fig) could rescue RPGRIP1L depletion. Transformants expressing GFP-tagged RPGRIP1LΔEF were treated with RNAi sequences specifically targeting the endogenous gene (see Schema S6B Fig). As a control, we used transformants expressing the full-length RPGRIP1L-GFP, which is depleted by RNAi treatment and should behave as RPGRIP1L^{RNAi} cells (S6B Fig). Complementation was observed only for transformants expressing GFP-tagged RPGRIP1LΔEF since these cells deciliated like wild-type cells (S6C Fig). Our results confirm that the conserved N-terminal domain is required for the deciliation process and suggest that this function could therefore be conserved in metazoans.

Depletion of both RPGRIP1L and TMEM107 behaves like the RPGRIP1L^{RNAi}

The antagonistic effect of the inactivation of TMEM216/TMEM107 versus RPGRIP1L/NPHP4/CEP290 on the deciliation process led us to study the effect of the double depletion of TMEM107 and RPGRIP1L on this process. The percentage of bald cells observed after Ca2+/EtOH treatment in double inactivated paramecia (TMEM107^{RNAi}; RPGRIP1L^{RNAi}) is reduced compared to the control (Fig 4B).

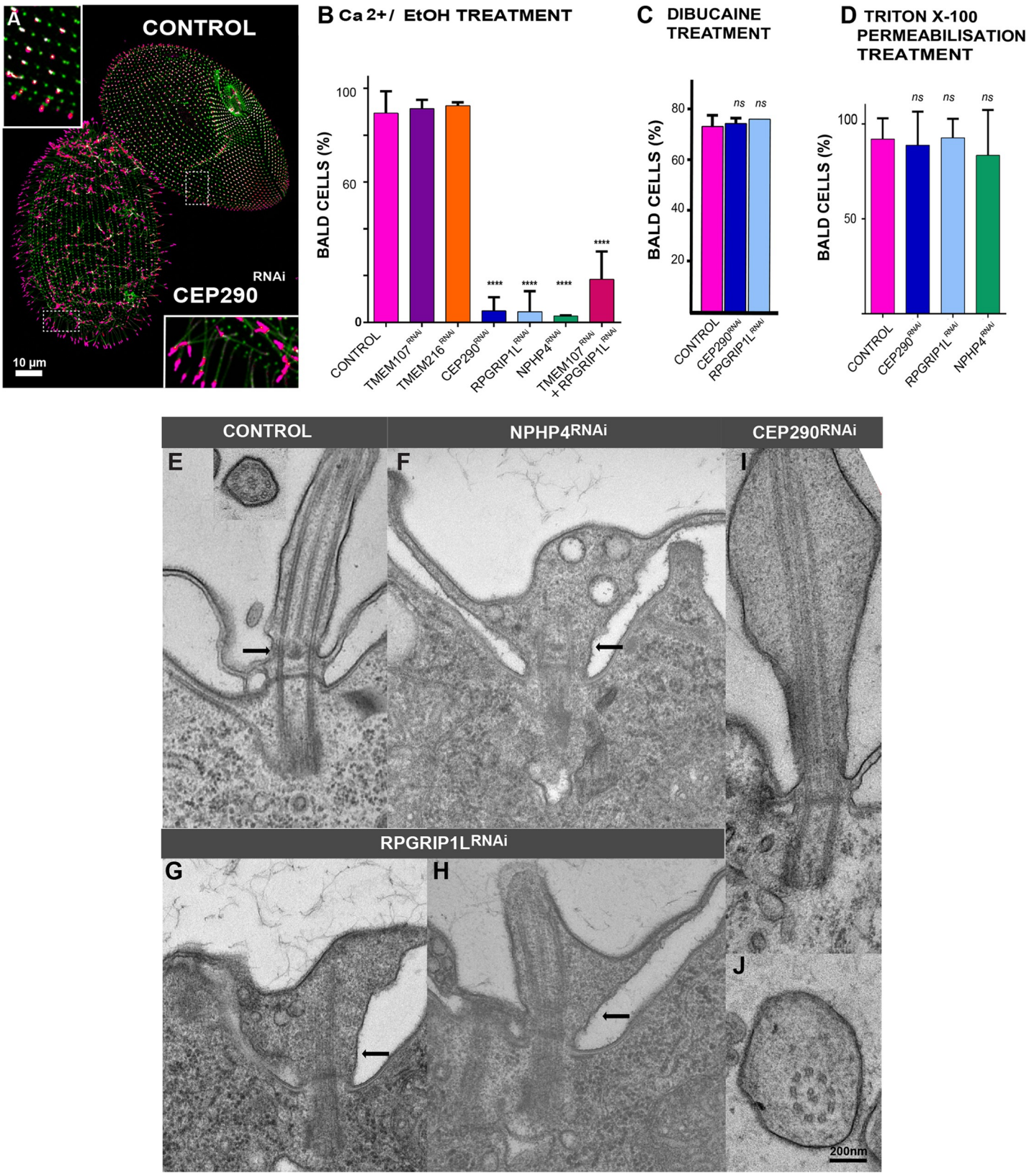


Fig 4. Depletion of CEP290, NPHP4, or RPGRIP1L affects deciliation ability and ciliary shape. (A–D) Depletion of CEP290, NPHP4, or RPGRIP1L affects deciliation ability. (A) Control and CEP290-depleted cells were simultaneously submitted to deciliation treatment (5% EtOH, 1 mM Ca2+) prior to labelling cilia

(TAP952 in magenta, polyE in green). Control cells were previously marked by India ink ingestion allowing their identification. Cep290^{RNAi} cells bear cilia, whereas control cells are completely bald. Bar = 10 μm. (B) Bar plot showing the mean percentages of bald cells (less than 25% of cilia) after deciliation for control (n = 421 cells), TMEM107^{RNAi} (n = 290 cells), TMEM216^{RNAi} (n = 258 cells), CEP290^{RNAi} (n = 98 cells), RPGRIP1L^{RNAi} (n = 302 cells), NPHP4^{RNAi} (n = 82 cells), and the double TMEM107/RPGRIP1L^{RNAi} (n = 141 cells; error bars represent the standard deviation); >3 independent replicates per condition. Statistical significance was assessed by unpaired χ^2 test. ****Two-sided $p < 0.0001$. Source data can be found in S3 Data. (C) Bar plot showing the mean percentages of bald cells (less than 25% of cilia) for control (n = 53 cells), CEP290^{RNAi} (n = 47 cells), and RPGRIP1L^{RNAi} (n = 68 cells) after deciliation with 5 mM dibucaine. Error bars represent the standard deviation. Three replicates per condition. Statistical significance was assessed by unpaired χ^2 test two-sided p-value. Source data can be found in S3 Data. (D) Bar plot showing the mean percentages of bald cells (less than 25% of cilia) for control (n = 222 cells), CEP290^{RNAi} (n = 77 cells), RPGRIP1L^{RNAi} (n = 77 cells), and NPHP4^{RNAi} (n = 76 cells) after detergent extraction using 0.01% Triton X-100. Note that in these conditions, more than 80% of cells deciliate. Three replicates per condition. Source data can be found in S3 Data. (E–J) Depletion of CEP290, NPHP4, and RPGRIP1L affects ciliary shape. EM images of abnormal cilia found in NPHP4^{RNAi} (F), RPGRIP1L^{RNAi} (G, H), and CEP290^{RNAi} (I, J). A control cilium is shown in longitudinal and transverse sections in panel A. In NPHP4- and RPGRIP1L-depleted cells, the link between the axoneme and the ciliary membrane is missing at the level of the TZ. Abnormal cilia present extension defects, and vesicles accumulate inside the cilia, probably resulting from a defective TZ gate function. In CEP290-depleted cells, abnormal cilia present a strikingly enlarged lumen, resulting most probably from altered ciliary gate function. Bar: 200 nm. CEP290, centrosomal protein of 290 kDa; EM, electron microscopy; NPHP4, Nephronophtysis 4; polyE, anti-poly-glutamylated tubulin; RNAi, RNA interference; RPGRIP1L, Retinitis pigmentosa GTPase regulator-Interacting Protein 1-Like Protein; TMEM107, Transmembrane protein 107; TZ, transition zone.

https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000640.g004

To determine whether the hierarchy of incorporation of different proteins in the TZ is compatible with the results of the double depletion of TMEM107 and RPGRIP1L, we examined the fate of fluorescence at the basal bodies in transformants expressing one TZ-GFP protein after knockdown of the other ones (S7 Fig). In keeping with a TZ organizing role, localizations of TMEM107-GFP and TMEM216-GFP are perturbed in CEP290^{RNAi} and clearly diminished in RPGRIP1L^{RNAi} conditions (S7 Fig). These results are in agreement with the epistatic effect of *RPGRIP1L* on *TMEM107* observed in the double knockdown experiment. They are consistent with observations made in *Caenorhabditis elegans*, in which MKS5 (the functional homolog of RPGRIP1L) and CEP290 are required for the localization of MKS module components. An interdependence was observed between TMEM107 and TMEM216 (S7 Fig). Surprisingly, and in contrast with what happens in *C. elegans*, CEP290 is required for the proper localization of RPGRIP1L-GFP, but CEP290-GFP localization was not affected by RPGRIP1L depletion.

Depletion of RPGRIP1L, NPHP4, or CEP290 affects TZ structure

In order to determine whether ultrastructural defects are associated with RPGRIP1L, NPHP4, or CEP290 depletion, we undertook electron microscopy analyses. Even if most of the cilia appeared normal, rare atypical cilia were observed in all types of depleted cells (Fig 4F and 4J). In the case of NPHP4, this is reminiscent of the minor ultrastructural defects observed in mutants of other cell model organisms [3,42]. RPGRIP1L-depleted cells also displayed some aberrant cilia showing developed TZ with clear lack of connections between the TZ region and the membrane (Fig 4G and 4H arrow). Cilia displaying an amazingly enlarged lumen in CEP290-depleted cells (Fig 4I and 4J) were sometimes observed as in *Chlamydomonas* [14] or multiciliated cells of nonsyndromic Leber congenital amaurosis patients harboring *Cep290* mutations [67]. In agreement with IF data, BB anchoring was achieved normally. Altogether, these data suggest that these electron microscopy phenotypes are similar to the ones observed in other cellular models, suggesting that the function of these proteins at the TZ for proper ciliary gating is conserved in *Paramecium*.

Discussion

The present study of the localization and function of TZ proteins in *Paramecium* is consistent with their known conserved role in ciliary gate structure and function. However, this study also shows—for the first time to our knowledge—that some MKS and NPHP complex proteins, as well as the scaffolding proteins RPGRIP1L and CEP290, have crucial and antagonistic functions in ciliary shedding.

As in other species [40,50,68], the studied *Paramecium* TZ proteins localize with a 9-fold symmetry in several concentric rings located between the tubulin scaffold and the ciliary membrane. All localize along the same axial axis at the level of the axosomal plate, a region closely associated to the ciliary necklace [41]. Such localization is in agreement with the assumption that CEP290, in association with MKS and NPHP modules, organizes the Y-links and the ciliary necklace at the TZ [3,14]. This is reminiscent of the localization on the same axial plane of RPGRIP1L and members of the MKS complex observed in RPE1 primary cilia, whereas, in this case, CEP290 is found below these components [68]. However, it contrasts with the observations performed on cilia/flagella in *Chlamydomonas* [14,42], *Drosophila* [40], and *C. elegans* [50], in which CEP290, TMEM107, and TMEM216 extend along the longitudinal length of the TZ. These differences already noticed [9] might reflect the differences in organization of the TZ, which could vary even from one cell type to another in the same organism [69]. In contrast to some other species, only 2 rows constitute the ciliary necklace in *Paramecium*, explaining the localization of the proteins at the same axial level [41].

In the case of RPGRIP1L or NPHP4 gene silencing, the lack of connections between the TZ region and the membrane are clearly observed in some cilia, indicating that these proteins could have a role in tethering the axonemal microtubules to the ciliary membrane. As observed previously in nasal cilia of some nonsyndromic Leber congenital amaurosis patients [67], CEP290-depleted cells display some enlarged cilia, consistent with aberrant gating at the TZ.

By contrast, the depletion of the two MKS complex proteins TMEM216 and TMEM107 does not seem to severely affect the ciliary or the TZ structures. This result is similar to the one observed in other systems such as *C. elegans*, in which loss of function of *Tmem107* or *Tmem216* does not lead to gross structural or functional defects as judged by normal dye filling [4,50].

Interestingly, we discovered a novel important function of these proteins in the deciliation process. This was established by the fact that TMEM216- and TMEM107-depleted cells constantly shed their cilia into the extracellular medium by autotomy, followed by ciliary regrowth, whereas RPGRIP1L, CEP290, and NPHP4 by contrast are resistant to deciliation induced by Ca2+/EtOH buffer. Although we cannot exclude a contribution of ciliary involution, our data are consistent with a process of constant deciliation: (i) numerous stretches of tiny or short cilia in the process of growth were observed on the surface of depleted cells (see Fig 2B); (ii) detached cilia were recovered in the culture medium in which depleted cells were grown (graph Fig 2D); and (iii) transcriptomic analysis revealed that one-fourth of the genes differentially regulated after TMEM216 depletion are ciliary genes, half of them also being differentially regulated during the reciliation process (see Fig 3). Together with the results of modulation of ciliary beating experiments (Fig 2E and 2F), these data lead us to propose that the depletion of either TMEM107 or TMEM216 induces a weakening of the distal part of the TZ, which does not resist the shear stress induced by ciliary movements. Interestingly, this finding is consistent with the TZ weakening observed in primary cilia depleted for TCTN2, another TZ protein [70], necessary for the localization of both TMEM216 and TMEM107. The microtubule-severing proteins katanin and spastin have been shown to be involved in ciliary shedding [35,29]. Therefore, we analyzed the expression level of katanin and spastin in our transcriptomic analysis after the depletion of TMEM216/MKS2 or chemical deciliation. No differences were observed in their expression profile in either case, whereas genes encoding proteins involved in membrane fusion—such as *NSF* (an *SNF7* family member) and *VPS4*—were up-regulated. These data reinforce those of Lohret and colleagues [35], who suggested that microtubule-severing proteins are not the primary target of this process but require a Ca2+ dependent activation. By contrast, cilia of RPGRIP1L-, NPHP4-, or CEP290-depleted cells are resistant to Ca2+/EtOH-induced deciliation but shed their cilia either by dibucaine

treatment or by detergent permeabilization prior to deciliation. Altogether, these data demonstrate that microtubule severing is not affected in these cells and suggest that the Ca2+ influx, required for deciliation, is deficient in these cells.

Little is known about the deflagellation process that requires both outer microtubule severing and membrane pinch-off at the distal part of the TZ. However, work in *Chlamydomonas* [19] shed some light on this process. Several screens using acidic stress have allowed selection of deflagellation-defective mutants that can be separated into 2 groups [36,39]. The first one consists of mutants supposed to be defective in microtubule-severing events. It includes mutants in the *Fa1* and *Fa2* genes that encode, respectively, a Ca2+/calmodulin-containing protein [37] and a Never in mitosis gene A (NIMA)-related kinase [38]. The second class of mutants (*ADF*) consists of strains that are supposed to be affected in the pathway that activates a calcium influx involved in deflagellation [32,71]: *ADF1* encodes a transient receptor potential (TRP) Ca2+ channel and *ADF3* a conserved microtubule-binding protein, FAP16 [39]. Interestingly, these proteins localized either to the TZ or just above. Since the depletion of CEP290, RPGRIP1L, or NPHP4 disturbs TZ integrity in *Paramecium*, this defect might be accompanied by a mislocalization of proteins involved in the deciliation process such as the TRP calcium channel or FAP16 as described in *Chlamydomonas*. Calcium channel mislocalization is a hypothesis compatible with our results, whereby defective Ca2+ influx would be responsible for the absence of deciliation in CEP290^{RNAi}, RPGRIP1L^{RNAi}, or NPHP4^{RNAi} cells, as in the *ADF1* mutant of *Chlamydomonas*.

The regulation of phosphoinositide levels at the TZ has also been implicated in flagellar excision. In *Chlamydomonas*, Ca2+ entry during the deflagellation process induces the activation of phospholipase C that triggers the hydrolysis of phosphatidyl inositol 4,5 biphosphate (PIP2) into inositol 1,4,5 triphosphate (I(1,4,5)P3) and Diacylglycerol (DAG) [32,72,73], and the *ADF2* gene might encode an inositol 1,3,4-triphosphate 5,6 kinase, although this is not fully demonstrated [39].

Studies in mammalian cells point to the accumulation of PIP2 in cilia as a "cut here signal," which leads to cilia decapitation upon mitotic entry [74]. Enriched at the ciliary base in resting cells, the concentration of PIP2 progressively decreases along the TZ and is excluded from the cilia due to its conversion to PIP by an inositol polyphosphate 5-phosphatase (INPP5E), localized in the cilia [75,76]. INPP5E enrichment relies on the integrity of the TZ [77]. The position of this cilia excision signal is correlated with the maximal ciliary PIP2 accumulation. Based on these observations, we propose that a modification of the PIP2 concentration within the TZ could trigger the ciliary autotomy process as already suggested during primary cilium shedding [29]. Inositol lipids are found in *Paramecium* ciliary membranes together with the kinase and phosphatase that interconvert Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylinositol phosphate (PIP), and PIP2 [78]. One can thus suppose that TMEM216 and TMEM107 depletion could affect the distribution of INPP5E, which in turn leads to accumulation of PIP2 and membrane scission. A differential modification of the PIP2 content along the cilia in CEP290-, NPHP4-, or RPGRIP1L-depleted cells compared to the TMEM216- or TMEM107-depleted ones might explain the difference in the resistance to deciliation observed between the different cells.

In metazoans, deciliation has been observed in various mammalian species during the menstrual cycle as, for example, shown in the monkey oviduct [20] and following castration in rabbit [79]. Boisvieux-Ulrich [23], studying deciliation in quail oviduct after progesterone treatment, described two mechanisms responsible for the process. The first is a resorption of the entire axoneme into the cell, and the second is the shedding of cilia into the magnum lumen, which arises by an alteration of the TZ neck region. The latter mechanism occurs on individual or fused cilia, in which the TZ remains individual while the ciliary membrane fuses along the entire length, producing a polyaxoneme within a single membrane. Deciliation in

metazoans is not a specific fate of multiciliated cells. Epithelial cells could be reversibly deciliated by diverse agents [80,81]. Recently, an analysis of primary cilium disassembly in IMCD3 by long-term live cell imaging indicated that it occurs predominantly by processes involving ciliary shedding [29]. Finally, apical abscission separating the centrosome from the cilium has been observed during neurogenesis, allowing the detachment of the neurons from the ventricle in order to allow them to migrate to the lateral neural tube [30].

All these results demonstrate that cilia autotomy is a general process occurring in numerous eukaryotes either physiologically or under stress or pharmacological conditions. Our results lead us to propose that, in mammals, the regulation of distal TZ molecular content by MKS/NPHP genes may also be crucial for the cells to trigger cilia autotomy with appropriate timing.

Materials and methods

Strains and culture conditions

Stock d4-2 of *P. tetraurelia*, the wild-type reference strain, was used in all feeding experiments. The nd7-1 mutant, carrying a recessive monogenic mutation preventing trichocyst discharge [82], was used for the expression of GFP fusions. Cells were grown at 27˚C in a wheatgrass infusion (BHB, GSE Vertrieb, Germany), bacterized with *Klebsiella pneumoniae*, and supplemented with 0.8 μg/ml β-sitosterol according to standard procedures [83].

Gene cloning

Genomic DNA was amplified by PCR, using specific primers (given in S3 Table) in order to fuse the TZ genes to the GFP coding sequence in the pPXV vector, between *Spe*I and *Xho*I restriction sites. If these restriction sites were present in the sequence to be cloned, we used the Gibson cloning method [84]. For gene silencing constructs, sequences of interest were designed for their ability to inactivate all the paralogs, if possible with the help of RNAi off-target tools in ParameciumDB [85] to prevent RNAi off-target. The sequences were cloned into the feeding vector, L4440, between two T7 promoters [86].

Bioinformatic analyses

Genes were identified using CilDB (http://cildb.i2bc.paris-saclay.fr/) [58,87] and by BLAST search in ParameciumDB (https://paramecium.i2bc.paris-saclay.fr/) [59]. The complete list of genes identified is given in S1 Table. Tophat2 (version 2.0.12 –min-intron-length 15 –max-intron-length 100) was used to map paired-end reads (2 replicates) on the *P. tetraurelia* MAC reference (ptetraurelia_mac_51.fa).

Differential gene expression analysis was done with the DESeq2 (version 1.4.1) package. Raw reads were deposited in the ENA under project accession numbers PRJEB33299 and PRJEB33300.

Paramecium transformation

Nd7-1 cells were transformed by microinjection into their macronucleus [88]. DNA contained a mixture of the plasmid of interest (5 μg/μl) with the DNA directing the expression of the *ND7* gene. Microinjection was made under an inverted Nikon phase-contrast microscope, using a Narishige micromanipulation device and an Eppendorf air pressure microinjector. Transformants were screened for their ability to discharge their trichocysts and further analyzed for GFP.

Gene silencing

Plasmids used in RNAi silencing experiments were obtained by cloning PCR products about 500 bp, amplified from each gene, in L4440 vector. These plasmids were then transformed in HT115 DE3 *Escherichia coli* strain to produce T7Pol-driven double-stranded RNA as previously described [51]. Paramecia were fed with these bacteria (TZ^{RNAi}) and refed daily with fresh feeding medium at 27˚C. Control cells were fed with HT115 bacteria carrying the L4440 vector containing the *ND7* gene. Phenotypes were analyzed after 48 h of feeding. In these conditions, most of the mRNA of silenced genes are knocked down leading to the depletion of proteins. After the first division upon silencing, parental basal bodies and new basal bodies assembled during the inactivation are mixed within the rows of each daughter cells. Only new basal bodies are affected by the depletion, since TZ components are no longer introduced. In contrast, they are still correctly located in the parental basal bodies.

Efficiency of RNAi was quantified by northern blot for *CEP290*, *RPGRIP1L*, and *NPHP4*. However, it was not possible to perform this experiment for *TMEM107* and *TMEM216* because the double-stranded RNA used for silencing covered the targeted genes in their entirety. This is because, in *Paramecium*, RNAi is done by feeding the cells with bacteria producing long (>500 bp) double-stranded RNA complementary to all or part of the target mRNA. The double-stranded RNA produces numerous different 23 nt siRNA [52]. In the case of *TMEM107* and *TMEM216*, the produced double-stranded RNA corresponds to the entire gene. This prevents the test of efficiency by northern blot. In these cases, we quantified the decrease of BB fluorescence in transformed cell lines expressing the GFP-tagged transgene after silencing.

In *Paramecium*, the phenotype of silenced cells is highly reproducible from one experiment to another and from one cell to another. In each experiment, more than 50 cells are analyzed in at least 2 or 3 independent experiments.

Paramecia fixation for IF

Fixation and IF techniques are performed on cells in suspension. The amount of 50–100 cells were collected in the smallest volume possible and were permeabilized in 200 μl PHEM (Pipes 60 mM, Hepes 25 mM, EGTA 10 mM, $MgCl_2$ 2 mM, adjusted to pH 6.9) with 0.5% saponin (PHEM-saponin) or with 0.5% Triton-X100 (PHEM-Triton) for 30 s. After using saponin for cell permeabilization, 0.5% of saponin was added to each buffer afterwards. Cells were fixed for 15 min after adding an equal volume of PHEM, 2% PFA. Buffer was then aspirated, and cells were rinsed 3 times for 10 min in PHEM, 0.5% saponin.

In order to ascertain that our immunostaining protocol was not affecting the ciliation pattern, ink-labeled controls were always mixed with RNAi-treated cells and all cells treated simultaneously within the same dish. India or red ink was added to control cultures at least 30 min before staining. India ink or red ink particles are nontoxic for the cells but are absorbed in the feeding vacuoles, which allows detection of control cells by their black or red vacuoles using phase contrast. The unlabeled cells are referred to TZ^{RNAi}.

Cilia are often more fragile when paramecia are taken directly from 27˚C, the usual growth temperature, so cells had to be kept 1 or 2 h at room temperature before proceeding to fixation.

IF

All antibodies, diluted in PHEM, 0.5% saponin, were incubated for 15 min. After 3 washes, cells were incubated with the appropriate secondary antibodies from Thermofisher at a dilution of 1:500 together with DAPI. Two final washes were done, and cells were mounted in

citifluor AF1 (EMS, Hatfield, PA). The following antibodies were used: the monoclonal anti-tubulin ID5 (1:100; recognizes poly-glutamylation of α-tubulin [89,90] [a gift from J. Wehland], stained the basal bodies, and slightly stained the cilia); the monoclonal TAP952 (which stained the tip of cilia) and AXO49 (from Callen and colleagues [91], which labeled the cilia [culture supernatant 1/50]), recognize, respectively, the monoglycylated and the polyglycylated tubulins [92]; the polyclonal PolyE (1:100) anti-tubulin [93] (which stained cilia and was provided generously by C. Janke); and polyclonal anti-GFP antibodies (1:1000, Interchim, Montlucon, France; stained GFP-flagged proteins). For more details on IF methods and antibody specificity, see Aubusson-Fleury and colleagues [92].

Confocal acquisitions were made with a Leica SP8 equipped with a UV diode (line 405), 3 laser diodes (lines 488, 552 and 635) for excitation, and 2 PMT detectors. Image stacks were processed with ImageJ and Photoshop. Confocal acquisition parameters were kept identical (same laser intensity, same gain, and same resolution) for quantification of BB fluorescence intensity in control and $RNAi^{TZ}$-treated cells. Average pixel fluorescence intensity of GFP at the BB was then measured within a defined and constant circular area of the size of the BB, using the measurement tools of Image J. Quantification data were compiled from measurements of 100 BB on 5 paramecia from 2 different experiments.

STED analysis

STED imaging was performed using a Leica TCS SP8 STED 3X (Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Germany). The system was equipped with a WLL ranging from 470 to 670 nm for excitation and with three-dimensional STED lasers at 592, 660, and 775 nm. A 100× 1.4 Oil STED white objective was used to acquire the images. GFP, AF568, and Cy5 were excited at 488, 561, and 643 nm, respectively. Detection ranges were 500–550, 575–625, and 660–700 nm, respectively. A pixel size of 25 nm was used. For deconvolution, SVI Huygens was used. Diameters were measured using the plot profile tool in ImageJ to obtain the distance between the 2 maximum intensity peaks.

Electron microscopy

For ultrastructural observations, cells were fixed in 1% (v/v) glutaraldehyde and 1% OsO4 (v/v) in 0.05 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 30 min. After rinsing, cells were embedded in 2% agarose. Agarose blocks were then dehydrated in graded series of ethanol and propylene oxide and embedded in Epon812 (TAAB, Aldermaston, Berkshire, UK). For pre-embedding immunolocalization, the immunostaining process was carried out as described for IF using gold-coupled instead of fluorochrome-coupled secondary antibodies (gold-labeled anti-rabbit IgG-GAR G10, Aurion) diluted 1/50 for 30 min. Cells were then treated as described earlier.

All ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The sections were examined with a Jeol transmission electron microscope 1,400 (at 120 kV).

Swimming analysis

Four to eight paramecia were transferred in 10 μl drops of conditioned BHB (bacterized BHB solution, then depleted of bacteria after their growth and sterilized) for 15 min before being tracked for 10 s every 0.3 s. We used a Zeiss Steni 2000-C dissecting microscope with 1-min time-lapse acquisitions at 7 frames per second with a Roper Coolsnap-CF camera and Metamorph software (Universal Imaging). Stacks were analyzed using the Manual tracking tool in ImageJ.

Quantification of free cilia in culture medium

After 24 h of gene silencing, cells were transferred into fresh medium in order to obtain 10 cells per 300 μl well at t = 48 h. The number of cells was adjusted according to the dividing capacity of the RNAi condition. At 48 h of RNAi treatment, all the cells were carefully aspirated from the culture wells in order to collect the amount of medium corresponding to 300 cells (approximately 30–35 wells per condition). The culture medium was then centrifuged onto a microscopy coverslip as previously described for centrosomes [94]. Cilia were fixed with Methanol-20˚C for 6 min and stained using TAP952 and polyE antibodies. The number of cilia per microscope field (184.7 × 184.7 μm) was quantified (10 fields).

Deciliation experiments

Standard protocol. Paramecia (RNAi-treated and ink-labelled controls) were transferred to 1 mL Ca2+/EtOH deciliation buffer (10 mM Tris, 1 mM Ca2+, 5% EtOH) and vigorously vortexed for 2 min to allow the cilia to shed.

Dibucaine treatment. Cells were resuspended in a solution containing 5 mM MgSO4, 4% sucrose, and 25 mM Hepes. Dibucaine-HCl (Sigma) 25 mM was added to obtain a final concentration of 5 mM according to Nelson [95].

TritonX-100 treatment. Cells were first permeabilized with 0.01% Triton in DRYL buffer (2 mM sodium citrate, 1 mM NaH2PO4, 1 mM Na2HPO4, 1.5 mM CaCl2) [96] for 1 min and then transferred in the deciliation buffer and treated as in the standard protocol.

PEG treatment. Cells were grown for 1 h in 10% PEG6000 (Merck) (diluted in conditioned BHB).

After deciliation treatment, cells were rinsed and immunostained for cilia and observed under the epifluorescence microscope. Cells were classified into 4 categories according to their ciliation state: normal, 75% cilia (= few holes in the ciliation), 50% cilia, and bald (less than 25% of cilia).

Northern blot analysis

Northern blots were carried out as follows: total RNA samples (20 μg) were denatured in Glyoxal load Dye (Ambion) for 30 min at 50˚C before loading on 1% agarose gels for electrophoresis. Gels were transferred to Hybond N+membrane in 20XSSC buffer and UV cross-linked. Hybridization was carried out overnight in 7% SDS, 0.5 M sodium phosphate, 1% BSA, and 1 mM EDTA (pH 7.4) at 65˚C or 50˚C. Double-stranded probes were labelled by random priming with [α-32P] dATP (3000 Ci/mmol, PerkinElemer) and DNA polymerase I Large (Klenow) fragment (Promega). The 17S rRNA oligonucleotide probe, used as loading control, was labelled with [γ-32P] ATP (5,000 Ci/mmol; HARTMANN ANALYTIC) and T4 polynucleotide kinase (Biolabs). Membranes were then washed successively in 20XSSC, 0.1% SDS and 0.2XSSC, 0.1% SDS for 30 min at 60˚C or 50˚C prior to exposure on storage phosphor screen and scan on Typhoon biomolecule imager (GE Healthcare).

Statistical analyses

For determining ciliated versus bald cells, we obtained paired observations on 2 variables for which we wanted to assess the independence of 2 populations. In those cases, the events being considered were mutually exclusive, and the total probability was 1. All observations were independent. Therefore, we used the χ^2 test. All calculations were made with GraphPad Prism 6. All error bars show SD.

For BB fluorescence quantification and swimming velocity experiment, statistical significance was assessed using a *t* test. All calculations were made with GraphPad Prism 6. All error bars show SD.

Supporting information

S1 Fig. *Paramecium* TZ proteins are recruited when cilia extend. (A) Localization of TZ protein–GFP fusions in paramecia fixed before permeabilization. Labelling using both 2 monoclonal antibodies ID5 (decorating BB and cilia in magenta) and Axo49 (decorating cilia, also in magenta) and a polyclonal anti-GFP (in green). TMEM216-GFP localizes both at the TZ of ciliated basal bodies and at the proximal side of nonciliated ones. This proximal signal completely disappears in cells permeabilized before fixation (see Fig 2A). Bar = 1 μm. (B) Cilia at different steps of their growth are observed in dividing transformed TZ-GFP cells, which harbor numerous growing cilia. Cells are stained using GFP and ID5 antibodies. To avoid fluctuations in fluorescence intensity due to variations in expression level, all the cilia were taken within a same cell for each expressing TZ-GFP as indicated. Cilia were classified according to their length, and the presence of GFP signal at the TZ was observed. The GFP signal is detected at the TZ as soon as the growing cilium is detected by ID5 antibodies.
(TIF)

S2 Fig. Efficiency of inactivation of the different RNAi vectors. (A) Northern blot analysis (left) of expression levels of CEP290, NPHP4, and RPGRIP1L genes in $ND7^{RNAi}$ (Control) and $CEP290^{RNAi}$, $NPHP4^{RNAi}$, and $RPGRIP1L^{RNAi}$. Signals were quantified and normalized with the 17S rRNA signal used as loading control. CEP290 and RPGRIP1L probes target the mRNAs of the 2 paralogs of each gene, since the genes are nearly identical. Three different probes (noted NPHP4 sc2, NPHP4 sc13, and NPHP4 sc29) were used for NPHP4 since paralogs are divergent. Right panel: histogram showing the decrease of each mRNA compared to the control. For each gene family, RNAi triggers a decrease of at least 40% of mRNA. Source data can be found in S4 Data. (B) Quantification of the GFP fluorescence remaining at the BB after 24 h of $TMEM107^{RNAi}$ observed in TMEM107 GFP transformants compared to the control RNAi. BB counted: 100 on 5 paramecia from 2 different experiments. Unpaired two-sided *t* test, $^{****}p < 0.0001$. Source data can be found in S4 Data. (C) Quantification of the GFP fluorescence remaining at the BB after 24 h of $TMEM216^{RNAi}$ observed in TMEM216 GFP transformants compared to the control RNAi. BB counted: 100 on 5 paramecia from 2 different experiments. Unpaired two-sided *t* test $^{****}p < 0.0001$. Source data can be found in S4 Data. a. u., arbitrary units.
(TIF)

S3 Fig. Cell division number and swimming velocity after TZ protein depletion. (A) Curves depicting the cell division number observed after 24 h, 48 h, and 72 h of TZ^{RNAi} compared to controlRNAi. Source data can be found in S5 Data. (B) Dot plot graph depicting the mean swimming speeds of control paramecia and depleted cells after 24 h and 48 h of feeding. Each dot shows the mean velocity of 1 cell ($n \geq 120$ cells per condition performed in 3 independent replicates). Mean velocity after 48 h of depletion: Control 770 μm/s, TMEM107RNAi 341 μm/s, TMEM216 RNAi 307 μm/s, CEP290 RNAi 319 μm/s, RPGRIP1L RNAi 385 μm/s, NPHP4 RNAi 493 μm/s. The lines represent the mean and the error bars the standard deviation. Statistical significance was assessed by unpaired two-sided *t* test, $^{****}p < 0.0001$. Source data can be found in S5 Data.
(TIF)

S4 Fig. Depletion of TZ proteins does not affect BB positioning. Paramecia were decorated for basal bodies and cilia using the polyclonal poly-glutamylated tubulin (poly-E) antibodies. Basal bodies are perfectly aligned along ciliary rows indicating an absence of BB duplication or anchoring defects. Bar = 15 μm.
(TIF)

S5 Fig. TMEM107- and TMEM216-depleted cells shed their cilia distally of the TZ. Other examples of basal bodies harboring an extended TZ specific of ciliated ones and severed above the axosomal plate, observed after the depletion of either TMEM107 or TMEM216. The TZ is indicated by a red arrow. This indicates that the cilia have been shed. Bar = 200 nm.
(TIF)

S6 Fig. RPGRIP1L EF-hand domains are not involved in the deciliation signal. (A) Localization of RPGRIP1L-GFP full-length (FL; left) and RPGRIP1L short form-GFP (RPGRIP1LΔEFhands). These two proteins localize similarly. Bar = 10 μm. (B) Experimental design: paramecia cell lines expressing transgenes encoding either the RPGRIP1L-GFP full-length or the RPGRIP1LΔEF-hands-GFP were generated. The 2 different transformed cell lines were then inactivated by RNAi sequences specifically targeting the endogenous gene (EF-hand domain). As a control, expressed RPGRIP1L-GFP full-length RNAi degradable was used while RPGRIP1LΔEF-hands-GFP resistant to RNAi might complement the depletion of RPGRIP1L. The black cross on the protein schemas indicate that the protein will not be produced due to the RNAi. (C) Bar plot showing the quantification of ciliated cells observed after Ca2+/EtOH treatment of RPGRIP1L-FL expressing cells (FL) or RPGRIP1LΔEF expressing cells (Δ) after silencing (controlRNAi or EF-hand domain^{RNAi}). Source data can be found in S6 Data. For FL, number of analyzed cells: Control^{RNAi} (n = 126 cells), EF-Hand^{RNAi} (n = 94 cells). For ΔΔ number of analyzed cells: Control^{RNAi} (n = 90 cells), EF-Hand^{RNAi} (n = 158 cells). Error bars represent the standard deviation. >2 independent replicates per condition. Statistical significance was assessed by unpaired two-sided χ^2 test, $^{****}p < 0.0001$. Source data can be found in S6 Data.
(TIF)

S7 Fig. Hierarchy of incorporation of TZ proteins. (A) TMEM107-GFP transformants were treated with Control^{RNAi}, TMEM216^{RNAi}, RPGRIP1L^{RNAi}, and CEP290^{RNAi}. Control^{RNAi} and TMEM107^{RNAi} were used to quantify the efficiency of the silencing (see S2B Fig). Note that either CEP290^{RNAi}, RPGRIP1L^{RNAi}, or TMEM 216^{RNAi} prevent the localization of TMEM107-GFP at the BB. (B) TMEM216-GFP transformants were treated with Control^{RNAi}, TMEM107^{RNAi}, RPGRIP1L^{RNAi}, and CEP290^{RNAi}. Control^{RNAi} and TMEM216^{RNAi} were used to quantify the efficiency of the silencing (see S2B Fig). Note that either CEP290^{RNAi}, RPGRIP1L^{RNAi}, or TMEM 216^{RNAi} prevent the localization of TMEM216-GFP at BB. (C) CEP290-GFP transformants were treated with Control^{RNAi}, TMEM107^{RNAi}, TMEM216^{RNAi}, and RPGRIP1L^{RNAi}. CEP290^{RNAi} is used as a control. Note that the depletion of TMEM107, TMEM216, and RPGRIP1L do not modify the CEP290-GFP pattern, while depletion of CEP290 is greatly diminished, which demonstrates the silencing efficiency. (D) RPGRIP1L-GFP transformants were treated with Control^{RNAi}, TMEM107^{RNAi}, TMEM216^{RNAi}, and CEP290^{RNAi}. RPGRIP1L^{RNAi} is used as a control. Note that only CEP290^{RNAi} prevents the localization of RPGRIP1L-GFP at the BB, while the depletion of TMEM107 and TMEM216 do not modify the RPGRIP1L-GFP pattern. See also the disappearance of the fluorescence after RPGRIP1L^{RNAi}, which shows the silencing efficiency. Left panels: entire cell; right panels: magnification of BB rows. Bar: 10 μm.
(TIF)

S1 Table. TZ proteins identified in *Paramecium*. ID of TZ proteins in *Paramecium*.
(PDF)

S2 Table. List of genes differentially expressed in silenced TMEM216 cells. Sheet 1: *Paramecium* genes whose expression was significantly modified in TMEM216^{RNAi} cells. The genes mentioned in the text are highlighted in yellow. Sheet 2: *Paramecium* genes whose expression is significantly modified both in TMEM216^{RNAi} cells and during reciliation. Sheet 3: Potential ciliary genes identified by proteomic and comparative genomic analyses whose expression is significantly modified in TMEM216^{RNAi} cells. Sheet 4: *Paramecium* genes, not identified as ciliary genes, whose expression is significantly modified in TMEM216^{RNAi} cells. ID: ParameciumDB accession number. FC_TMEM216: Fold change value compared to the control. NB_ciliary_evidence: number of high-throughput ciliary studies in which the gene or its homologs were identified as a potential ciliary gene. NB_PEP_Yano: number of peptides assigned to the encoded *protein* identified in the proteome of the ciliary membrane in *Paramecium* [61] NA: no peptide identified. Ciliary proteome: peptides assigned to the protein encoded by the gene were identified in the *Paramecium* ciliary proteome [58]. Reciliation_transcriptome_significant: expression of the gene was significantly modified during the reciliation process [59]. Reciliation_transcriptome_cluster_att. The genes differentially expressed during reciliation were clustered according to their expression profile [59]. This column indicates the cluster to which the gene was assigned. No cluster indicates that its expression was not significantly modified. ANNOTATION: predicted function of the protein interpro_desc_terms: InterPro predicted function of the protein.
(XLSX)

S3 Table. Primer sequences. Primer sequences used in this study.
(XLSX)

S1 Data. Mean TZ length of ciliated and unciliated BB, including raw data from individual TZ and mean TZ diameter corresponding to the 5 studied proteins as well as tubulin, including raw data. Data corresponding with Fig 1C and Fig 1F.
(XLSX)

S2 Data. Mean percentage of short cilia and free cilia in the supernatant after normalization, as well as the effect of beating forces on ciliary shedding. All raw data are included. Data corresponding with Fig 2C–2F.
(XLSX)

S3 Data. Mean percentage of bald cells after deciliation with Ca2+/EtOH or dibucaine, or after permeabilization with Triton X-100. All raw data are included. Data corresponding with Fig 4C and 4D.
(XLSX)

S4 Data. Quantification of mRNA levels and BB fluorescence intensity after RNAi silencing. For the blots shown in S2 Fig, the histogram shows the signals measured for each mRNA gene after normalization with the signals from the 17S rRNA probe, relatively to the signal obtained in the Nd7 control silencing. All raw data are included. Data corresponding with S2A, S2B and S2C Fig.
(XLSX)

S5 Data. Growth and swimming velocity after RNAi depletion. All raw data are included. Data corresponding with S3A and S3B Fig.
(XLSX)

S6 Data. Quantification of ciliated cells observed after Ca2+/EtOH treatment of RPGRIP1L-FL expressing cells (FL) or RPGRIP1LΔEF expressing cells (Δ) after silencing (control RNAi or EF-hand domain RNAi). All raw data are included. Data corresponding with S6C Fig.
(XLSX)

Acknowledgments

We acknowledge the high-throughput sequencing facility of I2BC for its sequencing and bioinformatics expertise. The present work has benefited from Imagerie-Gif core facility supported by l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-EQPX-0029/Morphoscope, ANR-10-INBS-04/FranceBioImaging; ANR-11-IDEX-0003-02/ Saclay Plant Sciences). We thank Cindy Mathon for maintaining the *Paramecium* cell cycle and her great help in molecular biology and immunofluorescence staining and Pascaline Tirand for excellent technical assistance. We also acknowledge Mireille Bétermier and all members of the Bétermier lab and Tassin lab for stimulating discussions, Paul Guichard, Virginie Hamel, and Thibaut Eguether for the critical reading of the manuscript and their suggestions.

Author Contributions

Conceptualization: Delphine Gogendeau, Michel Lemullois, Jean Cohen, Khaled Bouhouche, France Koll, Anne-Marie Tassin.

Data curation: Delphine Gogendeau, Michel Lemullois, Anne Aubusson-Fleury, Jean Cohen, Khaled Bouhouche, France Koll, Anne-Marie Tassin.

Formal analysis: Delphine Gogendeau, Michel Lemullois, Pierrick Le Borgne, Manon Castelli, Anne Aubusson-Fleury, Christine Vesque, Sylvie Schneider-Maunoury, Khaled Bouhouche, France Koll, Anne-Marie Tassin.

Funding acquisition: Jean Cohen, France Koll, Anne-Marie Tassin.

Investigation: Delphine Gogendeau, Michel Lemullois, Anne Aubusson-Fleury, France Koll, Anne-Marie Tassin.

Methodology: Delphine Gogendeau, Michel Lemullois, Anne Aubusson-Fleury, Jean Cohen, Khaled Bouhouche, France Koll, Anne-Marie Tassin.

Project administration: France Koll, Anne-Marie Tassin.

Resources: Olivier Arnaiz.

Software: Olivier Arnaiz.

Supervision: France Koll.

Validation: Delphine Gogendeau, Michel Lemullois, Anne Aubusson-Fleury, Christine Vesque, Khaled Bouhouche, France Koll, Anne-Marie Tassin.

Visualization: Delphine Gogendeau, Michel Lemullois, Anne Aubusson-Fleury, Christine Vesque, France Koll, Anne-Marie Tassin.

Writing – original draft: Delphine Gogendeau, Michel Lemullois, Christine Vesque, France Koll, Anne-Marie Tassin.

References

1. Goetz SC, Anderson KV. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. Nat Rev Genet. 2010 May; 11(5):331–44. https://doi.org/10.1038/nrg2774 PMID: 20395968
2. Reiter JF, Blacque OE, Leroux MR. The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. EMBO Rep. 2012 Jun 29; 13(7):608–18. https://doi.org/10.1038/embor.2012.73 PMID: 22653444
3. Williams CL, Li C, Kida K, Inglis PN, Mohan S, Semenec L, et al. MKS and NPHP modules cooperate to establish basal body/transition zone membrane associations and ciliary gate function during ciliogenesis. J Cell Biol. 2011 Mar 21; 192(6):1023–41. https://doi.org/10.1083/jcb.201012116 PMID: 21422230
4. Huang L, Szymanska K, Jensen VL, Janecke AR, Innes AM, Davis EE, et al. 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. 2011 Dec 9; 89(6):713–30. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.11.005 PMID: 22152675
5. Garcia-Gonzalo FR, Corbit KC, Sirerol-Piquer MS, Ramaswami G, Otto EA, Noriega TR, et al. A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. Nat Genet. 2011 Jul 3; 43(8):776–84. https://doi.org/10.1038/ng.891 PMID: 21725307
6. Sang L, Miller JJ, Corbit KC, Giles RH, Brauer MJ, Otto EA, et al. Mapping the NPHP-JBTS-MKS protein network reveals ciliopathy disease genes and pathways. Cell. 2011 May 13; 145(4):513–28. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.019 PMID: 21565611
7. Diener DR, Lupetti P, Rosenbaum JL. Proteomic analysis of isolated ciliary transition zones reveals the presence of ESCRT proteins. Curr Biol CB. 2015 Feb 2; 25(3):379–84. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.066 PMID: 25578910
8. Dean S, Moreira-Leite F, Varga V, Gull K. Cilium transition zone proteome reveals compartmentalization and differential dynamics of ciliopathy complexes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 30; 113(35): E5135–5143. https://doi.org/10.1073/pnas.1604258113 PMID: 27519801
9. Gonçalves J, Pelletier L. The Ciliary Transition Zone: Finding the Pieces and Assembling the Gate. Mol Cells. 2017 Apr; 40(4):243–53. https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0054 PMID: 28401750
10. Li C, Jensen VL, Park K, Kennedy J, Garcia-Gonzalo FR, Romani M, et al. MKS5 and CEP290 Dependent Assembly Pathway of the Ciliary Transition Zone. PLoS Biol. 2016 Mar 16; 14(3):e1002416. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002416 PMID: 26982032
11. Schouteden C, Serwas D, Palfy M, Dammermann A. The ciliary transition zone functions in cell adhesion but is dispensable for axoneme assembly in C. elegans. J Cell Biol. 2015 Jul 6; 210(1):35–44. https://doi.org/10.1083/jcb.201501013 PMID: 26124290
12. Basiri ML, Ha A, Chadha A, Clark NM, Polyanovsky A, Cook B, et al. A migrating ciliary gate compartmentalizes the site of axoneme assembly in Drosophila spermatids. Curr Biol CB. 2014 Nov 17; 24(22):2622–31. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.047 PMID: 25447994
13. Wiegering A, Rüther U, Gerhardt C. The ciliary protein Rpgrip1l in development and disease. Dev Biol. 2018 01; 442(1):60–8. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.07.024 PMID: 30075108
14. Craige B, Tsao C-C, Diener DR, Hou Y, Lechtreck K-F, Rosenbaum JL, et al. CEP290 tethers flagellar transition zone microtubules to the membrane and regulates flagellar protein content. J Cell Biol. 2010 Sep 6; 190(5):927–40. https://doi.org/10.1083/jcb.201006105 PMID: 20819941
15. Mitchison HM, Valente EM. Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. J Pathol. 2017; 241(2):294–309. https://doi.org/10.1002/path.4843 PMID: 27859258
16. Blum JJ. Existence of a breaking point in cilia and flagella. J Theor Biol. 1971 Nov 1; 33(2):257–63. https://doi.org/10.1016/0022-5193(71)90065-8 PMID: 5002756
17. Adoutte A, Ramanathan R, Lewis RM, Dute RR, Ling KY, Kung C, et al. Biochemical studies of the excitable membrane of Paramecium tetraurelia. III. Proteins of cilia and ciliary membranes. J Cell Biol. 1980 Mar 1; 84(3):717–38. https://doi.org/10.1083/jcb.84.3.717 PMID: 7358796
18. Satir B, Sale WS, Satir P. Membrane renewal after dibucaine deciliation of Tetrahymena. Freeze-fracture technique, cilia, membrane structure. Exp Cell Res. 1976 Jan; 97:83–91. https://doi.org/10.1016/0014-4827(76)90657-1 PMID: 812711
19. Quarmby LM. Cellular deflagellation. Int Rev Cytol. 2004; 233:47–91. https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)33002-0 PMID: 15037362
20. Brenner RM. Renewal of oviduct cilia during the menstrual cycle of the rhesus monkey. Fertil Steril. 1969 Aug; 20(4):599–611. https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)37086-8 PMID: 4978530

21. Verhage HG, Bareither ML, Jaffe RC, Akbar M. Cyclic changes in ciliation, secretion and cell height of the oviductal epithelium in women. Am J Anat. 1979 Dec; 156(4):505–21. https://doi.org/10.1002/aja.1001560405 PMID: 525625

22. Odor DL, Gaddum-Rosse P, Rumery RE, Blandau RJ. Cyclic variations in the oviuductal ciliated cells during the menstrual cycle and after estrogen treatment in the pig-tailed monkey, Macaca nemestrina. Anat Rec. 1980 Sep; 198(1):35–57. https://doi.org/10.1002/ar.1091980104 PMID: 7457930

23. Boisvieux-Ulrich E, Sandoz D, Chailley B. A thin and freeze-fracture study of deciliation in bird oviduct. Biol Cell. 1980; 37:261–8.

24. Donnez J, Casanas-Roux F, Caprasse J, Ferin J, Thomas K. Cyclic changes in ciliation, cell height, and mitotic activity in human tubal epithelium during reproductive life. Fertil Steril. 1985 Apr; 43(4):554–9. https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)48496-7 PMID: 3987924

25. Heller RF, Gordon RE. Chronic effects of nitrogen dioxide on cilia in hamster bronchioles. Exp Lung Res. 1986; 10(2):137–52. https://doi.org/10.3109/01902148609061489 PMID: 3956447

26. Carson JL, Collier AM, Hu SC. Ultrastructural observations on cellular and subcellular aspects of experimental Mycoplasma pneumoniae disease. Infect Immun. 1980 Sep; 29(3):1117–24. PMID: 6776060

27. Muse KE, Collier AM, Baseman JB. Scanning electron microscopic study of hamster tracheal organ cultures infected with Bordetella pertussis. J Infect Dis. 1977 Dec; 136(6):768–77. https://doi.org/10.1093/infdis/136.6.768 PMID: 200679

28. Wilson R, Read R, Thomas M, Rutman A, Harrison K, Lund V, et al. Effects of Bordetella pertussis infection on human respiratory epithelium in vivo and in vitro. Infect Immun. 1991 Jan; 59(1):337–45. PMID: 1987048

29. Mirvis M, Siemers KA, Nelson WJ, Stearns TP. Primary cilium loss in mammalian cells occurs predominantly by whole-cilium shedding. PLoS Biol. 2019 Jul 17; 17(7):e3000381. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000381 PMID: 31314751

30. Das RM, Storey KG. Apical abscission alters cell polarity and dismantles the primary cilium during neurogenesis. Science. 2014 Jan 10; 343(6167):200–4. https://doi.org/10.1126/science.1247521 PMID: 24408437

31. Quarmby LM. Chapter 3—Deflagellation. In: Harris EH, Stern DB, Witman GB, editors. The Chlamydomonas Sourcebook (Second Edition) [Internet]. London: Academic Press; 2009 [cited 2019 May 27]. p. 43–69. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012370873100040X

32. Quarmby LM, Hartzell HC. Two distinct, calcium-mediated, signal transduction pathways can trigger deflagellation in Chlamydomonas reinhardtii. J Cell Biol. 1994 Mar; 124(5):807–15. https://doi.org/10.1083/jcb.124.5.807 PMID: 8120101

33. Quarmby LM. Ca2+ influx activated by low pH in Chlamydomonas. J Gen Physiol. 1996 Oct; 108(4):351–61. https://doi.org/10.1085/jgp.108.4.351 PMID: 8894983

34. Wheeler GL, Joint I, Brownlee C. Rapid spatiotemporal patterning of cytosolic Ca2+ underlies flagellar excision in Chlamydomonas reinhardtii. Plant J Cell Mol Biol. 2008 Feb; 53(3):401–13.

35. Lohret TA, McNally FJ, Quarmby LM. A role for katanin-mediated axonemal severing during Chlamydomonas deflagellation. Mol Biol Cell. 1998 May; 9(5):1195–207. https://doi.org/10.1091/mbc.9.5.1195 PMID: 9571249

36. Finst RJ, Kim PJ, Quarmby LM. Genetics of the deflagellation pathway in Chlamydomonas. Genetics. 1998 Jun; 149(2):927–36. PMID: 9611203

37. Finst RJ, Kim PJ, Griffis ER, Quarmby LM. Fa1p is a 171 kDa protein essential for axonemal microtubule severing in Chlamydomonas. J Cell Sci. 2000 Jun; 113 (Pt 11):1963–71.

38. Mahjoub MR, Montpetit B, Zhao L, Finst RJ, Goh B, Kim AC, et al. The FA2 gene of Chlamydomonas encodes a NIMA family kinase with roles in cell cycle progression and microtubule severing during deflagellation. J Cell Sci. 2002 Apr 15; 115(Pt 8):1759–68.

39. Hilton LK, Meili F, Buckoll PD, Rodriguez-Pike JC, Choutka CP, Kirschner JA, et al. A Forward Genetic Screen and Whole Genome Sequencing Identify Deflagellation Defective Mutants in Chlamydomonas, Including Assignment of ADF1 as a TRP Channel. G3 Bethesda Md. 2016 13; 6(10):3409–18.

40. Jana SC, Mendonça S, Machado P, Werner S, Rocha J, Pereira A, et al. Differential regulation of transition zone and centriole proteins contributes to ciliary base diversity. Nat Cell Biol. 2018; 20(8):928–41. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0132-1 PMID: 30013109

41. Dute R, Kung C. Ultrastructure of the proximal region of somatic cilia in Paramecium tetraurelia. J Cell Biol. 1978 Aug; 78(2):451–64. https://doi.org/10.1083/jcb.78.2.451 PMID: 690175

42. Awata J, Takada S, Standley C, Lechtreck KF, Bellvé KD, Pazour GJ, et al. NPHP4 controls ciliary trafficking of membrane proteins and large soluble proteins at the transition zone. J Cell Sci. 2014 Nov 1; 127(Pt 21):4714–27.

43. Iftode francine, Cohen J, Ruiz F, Torres-Rueda A, Chen-Sban L, Adoutte A, et al. Development of surface pattern during division in Paramecium. I. Mapping of duplication and reorganization of cortical cytoskeletal structures in the wild type. development. 1989; 105:191–211.

44. Aubusson-Fleury A, Lemullois M, de Loubresse NG, Laligné C, Cohen J, Rosnet O, et al. The conserved centrosomal protein FOR20 is required for assembly of the transition zone and basal body docking at the cell surface. J Cell Sci. 2012 Sep 15; 125(Pt 18):4395–404.

45. Tassin A-M, Lemullois M, Aubusson-Fleury A. Paramecium tetraurelia basal body structure. Cilia. 2015; 5:6. https://doi.org/10.1186/s13630-016-0026-4 PMID: 26862393

46. Nelsen EM, Frankel J, Martel E. Development of the ciliature of Tetrahymena thermophila. I. Temporal coordination with oral development. Dev Biol. 1981 Nov; 88(1):27–38. https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90216-5 PMID: 7286446

47. Fleury A, Callen A-M, Bré M-H, Iftode F, Jeanmaire-Wolf R, Levilliers N, et al. Where and when is microtubule diversity generated inParamecium? Immunological properties of microtubular networks in the interphase and dividing cells. Protoplasma. 1995 Mar 1; 189(1):37–60.

48. Barker AR, Renzaglia KS, Fry K, Dawe HR. Bioinformatic analysis of ciliary transition zone proteins reveals insights into the evolution of ciliopathy networks. BMC Genomics. 2014 Jun 26; 15:531. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-531 PMID: 24969356

49. Aury J-M, Jaillon O, Duret L, Noel B, Jubin C, Porcel BM, et al. Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate Paramecium tetraurelia. Nature. 2006 Nov 9; 444(7116):171–8. https://doi.org/10.1038/nature05230 PMID: 17086204

50. Lambacher NJ, Bruel A-L, van Dam TJP, Szymańska K, Slaats GG, Kuhns S, et al. TMEM107 recruits ciliopathy proteins to subdomains of the ciliary transition zone and causes Joubert syndrome. Nat Cell Biol. 2016 Jan; 18(1):122–31. https://doi.org/10.1038/ncb3273 PMID: 26595381

51. Galvani A, Sperling L. RNA interference by feeding in Paramecium. Trends Genet TIG. 2002 Jan; 18 (1):11–2. https://doi.org/10.1016/s0168-9525(01)02548-3 PMID: 11750689

52. Carradec Q, Götz U, Arnaiz O, Pouch J, Simon M, Meyer E, et al. Primary and secondary siRNA synthesis triggered by RNAs from food bacteria in the ciliate Paramecium tetraurelia. Nucleic Acids Res. 2015 Feb 18; 43(3):1818–33. https://doi.org/10.1093/nar/gku1331 PMID: 25593325

53. Laligné C, Klotz C, de Loubresse NG, Lemullois M, Hori M, Laurent FX, et al. Bug22p, a conserved centrosomal/ciliary protein also present in higher plants, is required for an effective ciliary stroke in Paramecium. Eukaryot Cell. 2010 Apr; 9(4):645–55. https://doi.org/10.1128/EC.00368-09 PMID: 20118210

54. Fassad MR, Shoemark A, le Borgne P, Koll F, Patel M, Dixon M, et al. C11orf70 Mutations Disrupting the Intraflagellar Transport-Dependent Assembly of Multiple Axonemal Dyneins Cause Primary Ciliary Dyskinesia. Am J Hum Genet. 2018 03; 102(5):956–72. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.03.024 PMID: 29727692

55. Fassad MR, Shoemark A, Legendre M, Hirst RA, Koll F, le Borgne P, et al. Mutations in Outer Dynein Arm Heavy Chain DNAH9 Cause Motile Cilia Defects and Situs Inversus. Am J Hum Genet. 2018 Dec 6; 103(6):984–94. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.10.016 PMID: 30471717

56. Perrone CA, Myster SH, Bower R, O'Toole ET, Porter ME. Insights into the structural organization of the I1 inner arm dynein from a domain analysis of the 1beta dynein heavy chain. Mol Biol Cell. 2000 Jul; 11(7):2297–313. https://doi.org/10.1091/mbc.11.7.2297 PMID: 10888669

57. Adoutte A, Ramanathan R, Lewis RM, Dute RR, Ling KY, Kung C, et al. Biochemical studies of the excitable membrane of Paramecium tetraurelia. III. Proteins of cilia and ciliary membranes. J Cell Biol. 1980 Mar; 84(3):717–38. https://doi.org/10.1083/jcb.84.3.717 PMID: 7358796

58. Arnaiz O, Malinowska A, Klotz C, Sperling L, Dadlez M, Koll F, et al. Cildb: a knowledgebase for centrosomes and cilia. Database J Biol Databases Curation. 2009; 2009:bap022.

59. Arnaiz O, Goût J-F, Bétermier M, Bouhouche K, Cohen J, Duret L, et al. Gene expression in a paleopolyploid: a transcriptome resource for the ciliate Paramecium tetraurelia. BMC Genomics. 2010 Oct 8; 11:547. https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-547 PMID: 20932287

60. Shi L, Koll F, Arnaiz O, Cohen J. The Ciliary Protein IFT57 in the Macronucleus of Paramecium. J Eukaryot Microbiol. 2018; 65(1):12–27. https://doi.org/10.1111/jeu.12423 PMID: 28474836

61. Yano J, Rajendran A, Valentine MS, Saha M, Ballif BA, Van Houten JL. Proteomic analysis of the cilia membrane of Paramecium tetraurelia. J Proteomics. 2013 Jan 14; 78:113–22. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.09.040 PMID: 23146917

62. Ott C, Nachmias D, Adar S, Jarnik M, Sherman S, Birnbaum RY, et al. VPS4 is a dynamic component of the centrosome that regulates centrosome localization of γ-tubulin, centriolar satellite stability and ciliogenesis. Sci Rep. 2018 Feb 20; 8(1):3353. https://doi.org/10.1038/s41598-018-21491-x PMID: 29463826

63. Lohret TA, Zhao L, Quarmby LM. Cloning of Chlamydomonas p60 katanin and localization to the site of outer doublet severing during deflagellation. Cell Motil Cytoskeleton. 1999; 43(3):221–31. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(1999)43:3<221::AID-CM5>3.0.CO;2-E PMID: 10401578

64. Quarmby LM. Cellular deflagellation. Int Rev Cytol. 2004; 233:47–91. https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)33002-0 PMID: 15037362

65. Zhang D, Aravind L. Novel transglutaminase-like peptidase and C2 domains elucidate the structure, biogenesis and evolution of the ciliary compartment. Cell Cycle Georget Tex. 2012 Oct 15; 11 (20):3861–75.

66. Ikura M. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. Trends Biochem Sci. 1996 Jan; 21(1):14–7. PMID: 8848832

67. Papon JF, Perrault I, Coste A, Louis B, Gérard X, Hanein S, et al. Abnormal respiratory cilia in non-syndromic Leber congenital amaurosis with CEP290 mutations. J Med Genet. 2010 Dec; 47(12):829–34. https://doi.org/10.1136/jmg.2010.077883 PMID: 20805370

68. Yang TT, Su J, Wang W-J, Craige B, Witman GB, Tsou M-FB, et al. Superresolution Pattern Recognition Reveals the Architectural Map of the Ciliary Transition Zone. Sci Rep. 2015 Sep 14; 5:14096. https://doi.org/10.1038/srep14096 PMID: 26365165

69. Wiegering A, Dildrop R, Kalfhues L, Spychala A, Kuschel S, Lier JM, et al. Cell type-specific regulation of ciliary transition zone assembly in vertebrates. EMBO J. 2018 15; 37(10).

70. Weng RR, Yang TT, Huang C-E, Chang C-W, Wang W-J, Liao J-C. Super-Resolution Imaging Reveals TCTN2 Depletion-Induced IFT88 Lumen Leakage and Ciliary Weakening. Biophys J. 2018 Jul 17; 115 (2):263–75. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.04.051 PMID: 29866362

71. Quarmby LM. Ca2+ influx activated by low pH in Chlamydomonas. J Gen Physiol. 1996 Oct; 108 (4):351–61. https://doi.org/10.1085/jgp.108.4.351 PMID: 8894983

72. Quarmby LM, Yueh YG, Cheshire JL, Keller LR, Snell WJ, Crain RC. Inositol phospholipid metabolism may trigger flagellar excision in Chlamydomonas reinhardtii. J Cell Biol. 1992 Feb; 116(3):737–44. https://doi.org/10.1083/jcb.116.3.737 PMID: 1309818

73. Yueh YG, Crain RC. Deflagellation of Chlamydomonas reinhardtii follows a rapid transitory accumulation of inositol 1,4,5-trisphosphate and requires Ca2+ entry. J Cell Biol. 1993 Nov; 123(4):869–75. https://doi.org/10.1083/jcb.123.4.869 PMID: 8227146

74. Phua SC, Chiba S, Suzuki M, Su E, Roberson EC, Pusapati GV, et al. Dynamic Remodeling of Membrane Composition Drives Cell Cycle through Primary Cilia Excision. Cell. 2017 Jan 12; 168(1–2):264–279.e15. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.032 PMID: 28086093

75. Chávez M, Ena S, Van Sande J, de Kerchove d'Exaerde A, Schurmans S, Schiffmann SN. Modulation of Ciliary Phosphoinositide Content Regulates Trafficking and Sonic Hedgehog Signaling Output. Dev Cell. 2015 Aug 10; 34(3):338–50. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.06.016 PMID: 26190144

76. Garcia-Gonzalo FR, Phua SC, Roberson EC, Garcia G, Abedin M, Schurmans S, et al. Phosphoinositides Regulate Ciliary Protein Trafficking to Modulate Hedgehog Signaling. Dev Cell. 2015 Aug 24; 34 (4):400–9. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.08.001 PMID: 26305592

77. Roberson EC, Dowdle WE, Ozanturk A, Garcia-Gonzalo FR, Li C, Halbritter J, et al. TMEM231, mutated in orofaciodigital and Meckel syndromes, organizes the ciliary transition zone. J Cell Biol. 2015 Apr 13; 209(1):129–42. https://doi.org/10.1083/jcb.201411087 PMID: 25869670

78. Suchard SJ, Rhoads DE, Kaneshiro ES. The inositol lipids of Paramecium tetraurelia and preliminary characterizations of phosphoinositide kinase activity in the ciliary membrane. J Protozool. 1989 Apr; 36 (2):185–90. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1989.tb01072.x PMID: 2542540

79. Rumery RE, Eddy EM. Scanning electron microscopy of the fimbriae and ampullae of rabbit oviducts. Anat Rec. 1974 Jan; 178(1):83–101. https://doi.org/10.1002/ar.1091780108 PMID: 4808767

80. Praetorius HA, Spring KR. Removal of the MDCK cell primary cilium abolishes flow sensing. J Membr Biol. 2003 Jan 1; 191(1):69–76. https://doi.org/10.1007/s00232-002-1042-4 PMID: 12532278

81. Overgaard CE, Sanzone KM, Spiczka KS, Sheff DR, Sandra A, Yeaman C. Deciliation is associated with dramatic remodeling of epithelial cell junctions and surface domains. Mol Biol Cell. 2009 Jan; 20 (1):102–13. https://doi.org/10.1091/mbc.E08-07-0741 PMID: 19005211

82. Skouri F, Cohen J. Genetic approach to regulated exocytosis using functional complementation in Paramecium: identification of the ND7 gene required for membrane fusion. Mol Biol Cell. 1997 Jun; 8 (6):1063–71. https://doi.org/10.1091/mbc.8.6.1063 PMID: 9201716

83. Sonneborn TM. Chapter 12 Methods in Paramecium Research**With contributed sections by: S. Dryl, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland; E. D. Hanson, Connecticut Wesleyan University, Middletown, Connecticut; K. Hiwatashi, Tôhoku University, Sendai, Japan; S. Koizumi, University of Iwate, Ueda Morioka, Japan; A. Miyake, Kyoto University, Kyoto, Japan; J. R. Preer, Jr., Indiana University, Bloomington, Indiana; A. Reisner, CSIRO, division of Animal Genetics, Epping, New South

Wales; E. Steers, Department of Health, Education and Welfare, National Institute of Health, Bethesda, Maryland; S. Taub, Princeton University, Princeton, New Jersey. In: Prescott DM, editor. Methods in Cell Biology [Internet]. Academic Press; 1970 [cited 2019 May 28]. p. 241–339. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091679X08617586.

84. Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nat Methods. 2009 May; 6(5):343–5. https://doi.org/10.1038/nmeth.1318 PMID: 19363495

85. Arnaiz O, Cain S, Cohen J, Sperling L. ParameciumDB: a community resource that integrates the Paramecium tetraurelia genome sequence with genetic data. Nucleic Acids Res. 2007 Jan; 35(Database issue):D439–444. https://doi.org/10.1093/nar/gkl777 PMID: 17142227

86. Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. Nature. 1998 Oct 29; 395(6705):854. https://doi.org/10.1038/27579 PMID: 9804418

87. Arnaiz O, Cohen J, Tassin A-M, Koll F. Remodeling Cildb, a popular database for cilia and links for ciliopathies. Cilia. 2014; 3:9. https://doi.org/10.1186/2046-2530-3-9 PMID: 25422781

88. Gilley D, Preer JR, Aufderheide KJ, Polisky B. Autonomous replication and addition of telomerelike sequences to DNA microinjected into Paramecium tetraurelia macronuclei. Mol Cell Biol. 1988 Nov; 8(11):4765–72. https://doi.org/10.1128/mcb.8.11.4765 PMID: 3211128

89. Wehland J, Weber K. Turnover of the carboxy-terminal tyrosine of alpha-tubulin and means of reaching elevated levels of detyrosination in living cells. J Cell Sci. 1987 Sep;88 (Pt 2):185–203.

90. Rüdiger AH, Rüdiger M, Wehland J, Weber K. Monoclonal antibody ID5: epitope characterization and minimal requirements for the recognition of polyglutamylated alpha- and beta-tubulin. Eur J Cell Biol. 1999 Jan; 78(1):15–20. https://doi.org/10.1016/s0171-9335(99)80003-x PMID: 10082420

91. Callen AM, Adoutte A, Andrew JM, Baroin-Tourancheau A, Bré MH, Ruiz PC, et al. Isolation and characterization of libraries of monoclonal antibodies directed against various forms of tubulin in Paramecium. Biol Cell. 1994; 81(2):95–119. https://doi.org/10.1016/s0248-4900(94)80002-2 PMID: 7531532

92. Aubusson-Fleury A, Cohen J, Lemullois M. Ciliary heterogeneity within a single cell: the Paramecium model. Methods Cell Biol. 2015; 127:457–85. https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2014.12.007 PMID: 25837404

93. Janke C, Bulinski JC. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. Nat Rev Mol Cell Biol. 2011 Nov 16; 12(12):773–86. https://doi.org/10.1038/nrm3227 PMID: 22086369

94. Gogendeau D, Guichard P, Tassin A-M. Purification of centrosomes from mammalian cell lines. Methods Cell Biol. 2015; 129:171–89. https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.03.004 PMID: 26175439

95. Nelson DL. Chapter 4 Preparation of Cilia and Subciliary Fractions from Paramecium. In: Dentler W, Witman G, editors. Methods in Cell Biology [Internet]. Academic Press; 1995 [cited 2019 Jun 18]. p. 17–24. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091679X08607852. https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)60785-2 PMID: 7476483

96. Dryl S. Antigenic transformation in Paramecium aurelia after homologous antiserum treatment during autogamy and conjugation. J Protozool. 6th ed. 1959.

Annexe 3:

La paramécie, un organisme modèle pour étudier la ciliogenèse et les maladies ciliaires

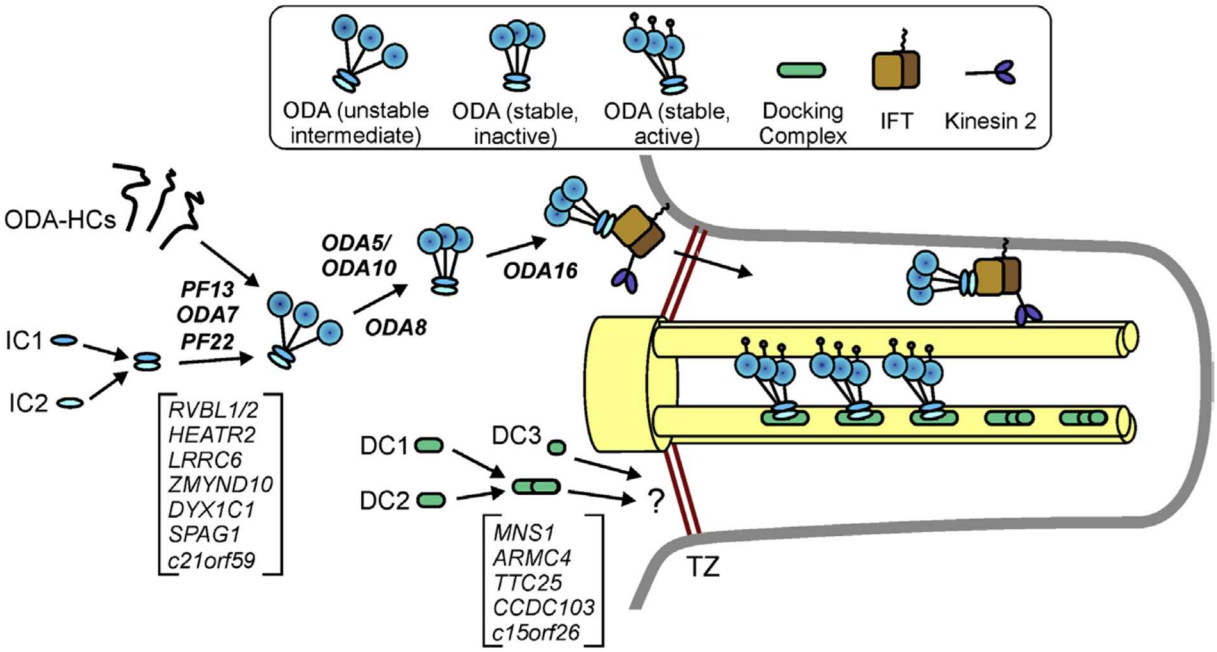


Figure 29 : Etapes d'assemblage des brass de dynéines externes (ODA), des facteurs d'assemblage et des complexes d'ancrage des bras. Les facteurs d'assemblage sont nécessaires à l'organisation et la stabilisation des bras de dynéines dans le cytoplasme. Le transport intraflagellaire permet le transport des ODA (ainsi qu'un parti des facteur d'assemblage) dans le cil où ils s'ancreront aux doublet de microtubules par le biais des complexes d'ancrage pour permettre le battement ciliaire par l'hydrolyse de l'ATP (Dai et al., 2018)

La motilité ciliaire est permise majoritairement par la présence des bras de dynéines, de larges complexes de dynéines axonemales qui permettent le glissement des microtubules adjacents pour générer le battement des cils et des flagelles. L'absence d'une seule des nombreuses isoformes de ces dynéines chez l'homme conduit à des symptômes pléiotropes associé à une perte de motilité ciliaire. Les bras de dynéines sont pré-assemblés dans le cytoplasme par une famille de protéine chaperonnes appelées les facteurs d'assemblage (cf figure 29). Ces facteurs d'assemblage peuvent être libérés à la base du cil ou s'associer avec les bras de dynéines ou à la machinerie des IFT pour traverser la zone de transition. Dans le cil, les bras de dynéines s'associent

aux doublets de microtubules grâce à la présence de sites d'ancrage à haute affinité. Des mutations dans les gènes codant les sous unités des bras de dynéines ainsi que les facteurs qui permettent leur assemblage sont retrouvé mutés chez des patients atteints de dyskinésie ciliaire primitive. La sévérité des symptômes peut varier en fonction des individus pouvant se traduire par une atteinte partiel ou complète des tissus présentant des cils motiles. Que les mutations affectent directement les sous unité des bras de dynéines ou les facteurs cytoplasmiques nécessaires à leur assemblage, elles conduisent toutes à la perte partielle ou totale des bras de dynéine (internes et/ou externes) dans le cil. Ces défauts peuvent être facilement observables par microscopie électronique sur des prélèvements de la trachée des patients. Cependant la difficulté d'accès à ces tissus chez l'homme et leur difficulté de culture rend généralement nécessaire l'utilisation de modèle d'étude pour réaliser l'analyse fonctionnelle des gènes mutés chez la patients.

La paramécie est un excellent modèle pour l'étude de la motilité ciliaire. Le déplacement et la prise de nourritures est permise par une battement finement coordonné de ses 4 000 cils. Ce modèle permet l'identification rapide de candidat par inactivation génique caractérisés par une diminution de la vitesse de nage et/ou un amaigrissement.

Au cours de mon Master 2 j'ai utilisé le modèle de la paramécie pour réaliser l'analyse fonctionnelle de la protéine C11ORF70 dont le gène a été retrouvé muté chez deux familles de patients atteints de PCD. Ce travail illustre l'ensemble des techniques mises au point pour caractériser la fonction d'un gène impliqué dans le battement ciliaire.

Résumé de l'article : **C11orf70 mutations disrupting the intraflagellar transport-dependent assembly of multiple axonemal dyneines cause primary ciliary dyskinesia.**

Un crible génétique réalisé par l'équipe de Hannah Mitchsison sur une cohorte de patient atteint de PCD a permis d'identifié une mutation dans le gène c11orf70/CFAP300 chez 3 enfants issus de 2 familles différentes. Les trois enfants sont

atteints du syndrome de Kartagener, une entité particulière parmi les dyskinésies ciliaires primitives (DCP) caractérisée par une triade clinique sinusite, bronchectasie et situs inversus complet ou incomplet. Des prélevements des épitheliums de la trachée ont révélé une immobilité des cils expliquée en microscopie électronique par une perte partielle de bras externes et internes de dynéines. Chez la paramécie, la déplétion de C11ORF70 conduit à une réduction de la vitesse de nage et la motilité ciliaire associé à une perte de bras internes et externes de dynéine en accord avec le phénotype observé chez les patients. L'expression de protéines C11ORF70 étiquetée chez *Chlamydomonas* et la paramécie a démontré que la protéine est majoritairement localisée dans le cytoplasme mais est aussi capable d'entrer dans le cil. La déplétion de composant des IFT-A : IFT139 (paramécie) et FLA10 (une kynésine des IFT-A chez *Chlamydomonas*) inhibe l'entrée de C11ORF70 dans les deux modèles. De plus C11ORF70 est accumulé à l'extrémité des cils de manière similaire à IFT46 (IFT-B) au cours de la ciliogenèse. Les résultats obtenu dans ces deux organismes ont permis de proposer le modèle selon lequel C11ORF70 serait un facteur d'assemblage nécessaire au l'assemblage des bras de dynéine internes et externes ainsi que leur acheminement dans le cil par le transport IFT.

Ma participation dans cette étude regroupe la majorité des travaux effectués chez la paramécie :

-analyse fonctionnelle de l'effet de l'inactivation de C11ORF70 et de la localisation de C11ORF70-GFP

-adaptation au laboratoire d'une protocole d'immobilisation des paramécies dans le but de réalisé des acquisitions du battement ciliaire à très haute vitesse pour quantifié la fréquence du battement ciliaire.

Au cours de ce travail j'ai aussi participé à l'analyse fonctionnelle de DNAH9 et le protocole d'immobilisation des paramécies a pu être également appliqué au cours

d’analyse préliminaire dans l’étude de protéines de la zone de transition chez la paramécie.

ARTICLE

C11orf70 Mutations Disrupting the Intraflagellar Transport-Dependent Assembly of Multiple Axonemal Dyneins Cause Primary Ciliary Dyskinesia

Mahmoud R. Fassad,[1,2] Amelia Shoemark,[3,4,9] Pierrick le Borgne,[5,9] France Koll,[5] Mitali Patel,[1] Mellisa Dixon,[3] Jane Hayward,[1] Charlotte Richardson,[3] Emily Frost,[3] Lucy Jenkins,[6] Thomas Cullup,[6] Eddie M.K. Chung,[7] Michel Lemullois,[5] Anne Aubusson-Fleury,[5] Claire Hogg,[3] David R. Mitchell,[8] Anne-Marie Tassin,[5] and Hannah M. Mitchison[1,*]

Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a genetically and phenotypically heterogeneous disorder characterized by destructive respiratory disease and laterality abnormalities due to randomized left-right body asymmetry. PCD is mostly caused by mutations affecting the core axoneme structure of motile cilia that is essential for movement. Genes that cause PCD when mutated include a group that encode proteins essential for the assembly of the ciliary dynein motors and the active transport process that delivers them from their cytoplasmic assembly site into the axoneme. We screened a cohort of affected individuals for disease-causing mutations using a targeted next generation sequencing panel and identified two unrelated families (three affected children) with mutations in the uncharacterized *C11orf70* gene (official gene name CFAP300). The affected children share a consistent PCD phenotype from early life with laterality defects and immotile respiratory cilia displaying combined loss of inner and outer dynein arms (IDA+ODA). Phylogenetic analysis shows *C11orf70* is highly conserved, distributed across species similarly to proteins involved in the intraflagellar transport (IFT)-dependant assembly of axonemal dyneins. *Paramecium C11orf70* RNAi knockdown led to combined loss of ciliary IDA+ODA with reduced cilia beating and swim velocity. Tagged C11orf70 in *Paramecium* and *Chlamydomonas* localizes mainly in the cytoplasm with a small amount in the ciliary component. IFT139/TTC21B (IFT-A protein) and FLA10 (IFT kinesin) depletion experiments show that its transport within cilia is IFT dependent. During ciliogenesis, C11orf70 accumulates at the ciliary tips in a similar distribution to the IFT-B protein IFT46. In summary, C11orf70 is essential for assembly of dynein arms and *C11orf70* mutations cause defective cilia motility and PCD.

Introduction

Cilia are complex organelles that form a distinct cellular compartment projecting from the surface of non-dividing cells. They have a microtubular-based axoneme core structure, contained within a specialized membrane that extends from the plasma membrane. This basic structure is highly conserved across species to serve various physiological functions.[1] Motile and non-motile types of cilia in the human body have differences in their axoneme structural arrangement and motilities.[2,3] Non-motile primary cilia present on most cells contain nine pairs of microtubules forming a circular scaffold of nine-fold symmetry termed 9+0. Nodal cilia of the embryonic left-right organizer (node) have a similar structure but with dynein "arm" motor subunits attached to the peripheral microtubules that provide motility machinery for ciliary beating.[4] Motile cilia of the respiratory epithelium, fallopian tubes, and brain ependyma (which lines the ventricular system) have a 9+2 arrangement, where the peripheral microtubules attached to dynein arm motors surround a central pair of microtubules. The sperm flagellum has the same structure as motile cilia with subtle differences in the distribution of dynein arms along the axoneme.[5] Lastly, kinocilia of the inner ear hair cells have a 9+2 organization but lack beating motility, containing outer but not inner dynein arms.

The main function of cilia/flagella motility is in generating fluid flow or movement within fluids. Defective cilia motility leads to primary ciliary dyskinesia (PCD [MIM: 244400]), a genetic disorder in which left-right positioning of body organs is randomized such that laterality problems affect about half of affected individuals. Such laterality defects may in some cases be associated with cardiac, spleen, and other organ problems.[6] Children with PCD suffer from chronic, widespread upper and lower airway infections and congestion, progressing toward bronchiectasis. Symptoms often present early in life with neonatal respiratory distress syndrome. Affected individuals can have hydrocephalus, hearing defects, retinal dystrophy, and infertility in adults especially in males due to sperm dysmotility.[7,8]

[1]Genetics and Genomic Medicine Programme, University College London, UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, London WC1N 1EH, UK; [2]Department of Human Genetics, Medical Research Institute, Alexandria University, 165 El-Horreya Avenue, El-Hadra 21561, Alexandria, Egypt; [3]PCD Diagnostic Team and Department of Paediatric Respiratory Medicine, Royal Brompton and Harefield NHS Trust, London SW3 6NP, UK; [4]School of Medicine, University of Dundee, Dundee, UK; [5]Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris Sud, Université Paris-Saclay, 1 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette, France; [6]Regional Molecular Genetics Laboratory, Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust, Queen Square, London WC1N 3BH, UK; [7]Population, Policy and Practice Programme, University College London, UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, London WC1N 1EH, UK; [8]Department of Cell and Developmental Biology, SUNY Upstate Medical University, 750 E. Adams St., Syracuse, NY 13210, USA
[9]These authors contributed equally to this work
*Correspondence: h.mitchison@ucl.ac.uk
https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.03.024.
© 2018 American Society of Human Genetics.

PCD is inherited as an autosomal-recessive or X-linked disease. The genetic cause of PCD, where known, has mainly been mutations affecting one of the hundreds of genes encoding essential components of the complex motile ciliary machinery. PCD is dominated by mutations affecting the axonemal dynein arm motors, for example in subunits of the outer dynein arm (ODA) such as *DNAH5* (MIM: 603335)[9] or in proteins involved in ODA targeting and anchoring such as *CCDC103* (MIM: 614677), *ARMC4* (MIM: 615408), and ODA docking complex (ODA-DC) components such as *CCDC151* (MIM: 615956).[10–16]

Perhaps more surprising than the finding that mutations in cilia structural components are a frequent cause of PCD has been a growing number of PCD loci that do not encode parts of the cilium *per se* but rather encode proteins that act in the apparently complicated process of the assembly and transport of ciliary dynein motors.[17,18] Many such assembly factors work strictly in the cytoplasm in a chaperoning step and cause PCD when mutated, such as *DNAAF1* (MIM: 613190),[19–21] *DNAAF2* (MIM: 612517),[22] *DNAAF3* (MIM: 614566),[23] *DYX1C1* (*DNAAF4* [MIM: 608706]),[24,25] *HEATR2* (*DNAAF5* [MIM: 61486]),[26,27] *LRRC6* (MIM: 614930),[28–30] and *PIH1D3* (MIM: 300933).[31,32] Other factors, identified in both the human population through analysis of individuals with PCD and in genetic screens for cilia motility defects in model organisms, resemble chaperones in that they affect the assembly of multiple ciliary dynein isoforms but also resemble transport factors based on their presence in a detergent-soluble ciliary compartment. These include *ZMYND10* (MIM: 607070)[33,34] and *C21orf59* (MIM: 615494).[35,36]

A number of additional proteins involved in dynein assembly have been identified from non-human studies including *ODA8*, *ODA5*, and *ODA10* of the flagellated model organism *Chlamydomonas reinhardtii*. *ODA5* and *ODA10* directly interact as a complex required for formation of an assembly-competent outer dynein arm in the cytoplasm, participating along with *ODA8* in the later stages of cytoplasmic ODA assembly.[37,38] ODAs are then trafficked into cilia for assembly onto the ODA-DC using the internal cargo transport system, intraflagellar transport (IFT), and subsequent steps involve proteins thought to be involved in an IFT-dependent trafficking step, such as ODA16 (*DAW1* or *WDR69* in human), which has so far not been linked to disease in humans.[39–41] The anterograde or base-tip direction of cilia cargo transport involves members of the IFT-B subcomplex, one of which (IFT46) interacts with ODA16. ODA16 therefore seems to function as an adaptor between IFT-B and the ODA, required for the IFT-based transport of ODAs into the cilia/flagella compartment.[40]

To reach a genetic diagnosis of PCD, bi-allelic mutations in autosomal-recessive or hemizygous state in an X-linked gene should be identified. Reported mutations in known genes account for only about 70% of PCD cases, so additional genes are still to be identified.[17] Here we describe mutations in a gene, *C11orf70*, that cause PCD and demonstrate that *C11orf70* encodes a protein needed for assembly of both outer and inner arm axonemal dyneins in respiratory cilia, a hallmark of the axonemal dynein assembly co-chaperones. Using model organisms, we show that *C11orf70* orthologs perform a conserved dynein assembly function and are present in both the cytoplasm and in cilia. Furthermore, ciliary abundance of this protein is detergent sensitive and dependent on continued IFT trafficking, as expected for a factor important for late steps in ciliary dynein assembly.

Material and Methods

Subjects and Families

The study was ethically approved by the London Bloomsbury Research Ethics Committee (08/H0713/82). Written informed consent was obtained from all participants or their guardians prior to enrollment in the study. Affected individuals were diagnosed with PCD through standard diagnostic screening by the Royal Brompton Hospital PCD diagnostic service, according to European Respiratory Society diagnostic guidelines.[42]

Next Generation Sequencing

Genomic DNA was extracted from whole blood samples using a standard phenol-chloroform protocol. Genetic screening was done as previously described using a targeted next generation sequencing panel including all genes that are recognized to cause isolated heterotaxy or PCD when mutated and other candidate genes that are predicted to play a role in cilia motility.[31] The panel was designed using the Agilent SureDesign tool (Agilent Technologies) to capture all coding regions of the included genes and 25 bp at the exon-intron boundaries. Library preparation was done using the SureSelectQXT Target Enrichment Kit (Agilent Technologies). Paired end sequencing (2 × 75 cycles) was performed using the NextSeq 500/550 High Output v2 kit and NextSeq platform (Illumina). A multiplex of 48 samples from affected individuals with PCD were sequenced per flow cell in each run using barcoding indices. Sequencing data were subjected to quality control and further analysis using an in-house pipeline as previously described.[43] Alignment of Fastq sequence files with the human genome reference (GRCh37/hg19) used BWA (0.6.1-r104),[44] with variant calling performed using Freebayes[45] and variant annotation using Alamut Batch (Interactive Biosoftware) softwares. VCF files were then converted into Excel format to enable manual variant filtration and prioritization. Only coding nonsynonymous and splicing variants (±5 bp from exon-intron boundary) were retained for further analysis. Common sequence variants were then filtered out based on their minor-allele frequency (MAF) to exclude all variants with MAF $\geq$ 0.01 in the dbSNP build 141, ExAC, Exome Variant Server, and 1000 Genomes databases. Retained variants were evaluated and prioritized based on their predicted impact at the protein level and predicted pathogenicity scores using a number of *in silico* softwares: Human Splicing Finder, SIFT, PolyPhen-2, Mutation Taster, Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) score, and Multivariate Analysis of Protein Polymorphism (MAPP). Conservation across species was studied using PhastCons, PhyloP, and the BLOSUM62 matrix within BLAST.

Sanger Sequencing

Prioritized variants in *C11orf70* were further confirmed in the probands and segregated within other family members by Sanger sequencing. Primers flanking the exon harboring the mutations were designed using the NCBI Primer-BLAST tool with genomic sequence amplification performed using standard PCR conditions and annealing temperatures based on the primer Tm temperature. Primers are listed in Table S1. Analysis of the sequencing data used SnapGene software (GSL Biotech).

Air-Liquid Interface (ALI) Culture

BMI1 transformed normal human bronchial epithelial cells (BMI1 NHBE) were cultured at air liquid interface on collagen-coated transwell inserts (passage 7) for 4 weeks as previously described.[46,47]

Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted using Trizol Reagent (QIAGEN). cDNA was produced using Omniscript RT kit (QIAGEN). Real-time qPCR reactions were done in triplicate using the CFX96 touch real-time PCR system and iQ SYBR green Supermix and data analysis using Bio-Rad CFX Manager 3.1 software (Bio-Rad Labs). Primers used for qPCR in human and *Paramecium* cells are listed in Table S1.

Transmission Electron Microscopy (TEM) and Immunofluorescence in Human Subjects

Nasal brushings from affected individuals were fixed in 4% glutaraldehyde for transmission electron microscopy. Processing and quantification was as previously described.[48] Briefly, samples were bound in agar, post fixed in osmium tetroxide, dehydrated, and embedded in araldite before being cut into thin sections for analysis. Sections were stained with 2% methanolic uranyl acetate and lead citrate to provide contrast and assessed on a Jeol 1400+ transmission electron microscope. Images of cilia cross-sections were acquired with a digital camera (AMT 16X, Deben UK). To calculate the percentage loss of dynein arms, we divided the observed number of cilia cross sections with absent arms on all nine microtubular doublets by the total number of cilia examined. Immunofluorescence for PCD diagnosis was conducted as previously described.[49] All antibodies used in this study are listed in Tables S2 and S3.

High-Speed Video Microscopy Analysis (HSVM)

Nasal epithelial cells were re-suspended in Medium 199 (pH7.2, Sigma-Aldrich Co.) and assessed by light microscopy at 37°C in a 1 mm chamber. Well-ciliated continuous epithelial strips were selected for assessment by high-speed video. Cilia were recorded using a 63× oil immersion lens on an upright DM60 Leica microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) at 500 frames per second (Troubleshooter, Fastec Imaging). Ciliary beat pattern was assessed and ciliary beat frequency calculated according to the number of frames required to complete 10 full beats.[50]

Paramecium Gene Silencing

We identified the *Paramecium C11orf70* ortholog as *GSPATG00011350001* (GenBank: XM_001443078.1) using public databases CILDB and ParameciumDB. A 561 bp long DNA segment corresponding to the N terminus of the gene was cloned in L4440 plasmid between the two convergent T7 promotors.[51] Possible RNAi off-target effects were assessed using the ParameciumDB RNAi off-target tool. *E. coli* HT115 bacteria (lacking RNAase III activity) were transformed with this silencing vector and grown in Lysogeny broth (LB) medium. Paramecia (*Paramecium tetraurelia d4-2* strain) were fed with the transformed bacteria over 3 days as previously described.[52] The RNAi experiment was repeated several times to ensure reproducibility of the results ($n > 10$). RNAi of the *ND7* gene,[53] which affects trichocyst exocytosis without affecting cilia motility, was used as a negative control. Knockdown of *ND7* was attested by trichocyst retention after picric acid treatment, as described previously[53] and the RNAi conditions that we used for ND7 ablation were published previously.[53,54] To assess the degree of gene knockdown at the RNA level, a mass culture protocol was used to get sufficient quantities of paramecia for RNA extraction as previously described.[55] Total RNA was extracted using the RNAeasy Micro kit (QIAGEN). cDNA was produced using 1 μg RNA, Superscript IIII (Invitrogen), and random hexanucleotides (Invitrogen). qPCR was performed to assess the degree of knockdown at the RNA level (primers listed in Table S1).

Paramecium Cilia Function Tests

Paramecium velocity was tested using 3–5 paramecia per test transferred into a drop of conditioned BHB solution and tracked for 10 s every 0.3 s to assess the swimming pattern under dark field microscopy, using MetaVue software. ImageJ software was used for image analysis and measurement of the swimming velocity.[56] For *Paramecium* cilia beating analysis, knockdown cells were adhered to a slide covered with Cell-TakTM (BD Bioscience) after silencing for 72 hr as previously described.[57] Cilia beating was recorded using a 63× oil immersion lens on an upright DM60 Leica microscope the same as for the nasal epithelia cells, at 500 frames per second at 37°C. The CiliaFA plugin in ImageJ was used for assessment of cilia beat frequency in *Paramecium*.[58]

Paramecium TEM and Immunofluorescence Analysis

The sample fixation and processing protocol for TEM in *Paramecium* was as previously described.[59] Images of cilia cross-sections were acquired with a digital camera (AMT 16X, Deben UK). The numbers of the missing IDA and ODA arms were recorded per cross-section by an observer blinded to the condition. For immunofluorescence studies, paramecia were fixed in 2% paraformaldehyde in PHEM buffer (Pipes 60 mM, HEPES 25 mM, EGTA 10 mM, $MgCl_2$ 2 mM, adjusted to pH 6.9 with NaOH) for 15 min. After fixation, cells were permeabilized for 15 min in 1% Triton X-100 in PHEM. Cells were washed 3 times in PBS/BSA 3%. Immunostaining used polyglutamylated tubulin antibodies (1/500) as previously described.[60]

Phylogenetic Comparisons

The presence or absence of *C11orf70* orthologs was determined by searches of selected organism genomes (at the genus level) using BLASTp at NCBI with the *Chlamydomonas* ortholog protein *FBB5* sequence (GenBank: XP_001694050) as query. Apparent hits were confirmed only if they also gave *FBB5* as the top hit in a reciprocal BLAST search. This procedure was also used to establish the presence or absence of two ODA subunits (HCgamma and IC2), two IDA subunits (I1HCalpha and IC140), two IFTA subunits (*IFT122* and *IFT140*), four IFTB subunits (*IFT46*, *IFT52*, *IFT88*, and *IFT172*), ODA-DC2, and *ODA16*. Retention of additional IFT subunits by selected organisms was taken from van Dam et al.[61]

Functional Characterizations of *C11orf70* in *Paramecium*

The *Paramecium C11orf70* ortholog (*GSPATT00011350001*) was cloned upstream of GFP into the *Spe*I-*Xho*I sites of pPXV-GFP plasmid which contains the constitutive regulators of the *Paramecium* calmodulin gene.[62] Three glycine codons were added between *C11orf70* and the *GFP* sequence. The *IFT46*-tagged *GFP* gene was expressed under its own regulators. The *IFT46* (*GSPATG00024708001*) putative promotor was cloned between the *BamH*I and *Sph*I sites of pPZZ-GFP02, a modified pPXV-GFP vector (gift of J. Cohen), upstream of the *GFP* sequence. The full-length *IFT46* was cloned between KpnI and SmaI sites of pZZ-GFP02 after the *GFP* sequence. Individual *ND7*-1 mutant cells unable to discharge their trichocysts were then transformed with the expression vectors, by micro-injection into their macronucleus, with filtered and concentrated DNA containing a mixture of the linearized plasmids of interest (5 μg/μL) and of plasmid DNA directing the expression of wild-type *ND7*. 3/4 divisions after the injections, the cell lines issued from the injected cells were screened for their ability to discharge their trichocysts and to express the fluorescent protein. Microinjection was made under an inverted Nikon phase-contrast microscope, using a Narishige micromanipulation device and an Eppendorf air pressure microinjector. Transformants with the same growth rate as untransformed cells and various plasmid DNA copy numbers were selected for experiments. Knockdown of *IFT139* in transformants expressing *C11orf70-GFP* was performed by the feeding method, using bacteria expressing double-strand RNA homologous to 536 bp of *IFT139* sequence (*PTET.51.1.G0310064*) from base 40 to 576. After 2 or 3 divisions (24 hr) on feeding medium, the cells were fixed in 2% paraformaldehyde in PHEM buffer for 15 min. To deciliate the paramecia, they were placed in 10 mM Tris (pH 7.4), 1 mM $CaCl_2$, 5% ethanol for 30 s with vortexing. To allow ciliary regrowth, cells were incubated in growth medium for various times from 15 to 30 min. Ciliary growth was stopped by fixation and the cells processed for IF. For biochemistry, paramecia were deciliated according to Adoutte et al.[63] Cilia were recovered by centrifugation at 28,000 × *g* for 30 min and either dissolved in SDS-Laemmli buffer or extracted in 20 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA, and 0.2% Triton X-100. Soluble proteins were precipitated using 9 volumes of methanol before resuspension in SDS-Laemmli buffer. Insoluble proteins were directly solubilized in the same volume of SDS-Laemmli buffer.

Functional Characterization of C11orf70 in *Chlamydomonas*

Genomic sequences for *Chlamydomonas C11orf70* ortholog *FBB5* (*Cre12.g556300*; GenBank: XM_001693998.1) and intron/exon boundaries were based on genome assembly annotation version 5.5 and obtained from the Phytozome server. Alignments with FBB5 protein (GenBank: XP_001694050) orthologs were generated with MEGA version 6.[64] The expression vector pDIC2linkerHA was created by replacing the *Chlamydomonas* PsaD promoter and 5′ UTR in pGenDlinkerHA[19] with the promoter and 5′ UTR of the *Chlamydomonas* ODA-IC2 gene.[65] The resulting expression vector retains a unique *EcoR*I site between the IC2 ATG start codon and sequences that encode three copies of an HA epitope tag. Two overlapping gBlocks Gene Fragments (Integrated DNA Technologies) of 464 and 458 bp were used to insert *FBB5* coding sequences at this *EcoR*I site. The resulting *FBB5::HA* minigene retains the first intron of the endogenous *FBB5* gene. In the resulting protein, the first three amino acids of native FBB5 are replaced with vector-encoded amino acids (MTA -> MVG) and the C-terminal residue (W) is followed immediately by a 9 amino acid linker (AFPRGGISR) and the three HA tag sequences. This expression construct, pFBB5::HA, was co-transformed with *ARG* plasmid pJD67 into an *arg2* mutant *Chlamydomonas* strain. Of 72 randomly selected *ARG* colonies, 8 expressed an HA tagged protein of the expected size (35 kDa), as seen by blots of whole cell samples probed with rat anti-HA McAb 3F10 (Roche), and one strain was selected for all subsequent work. Mutant strains expressing FBB5::HA were generated by standard genetic crosses, using blots of whole cell samples to select tetrad products that expressed the *FBB5::HA* transgene.

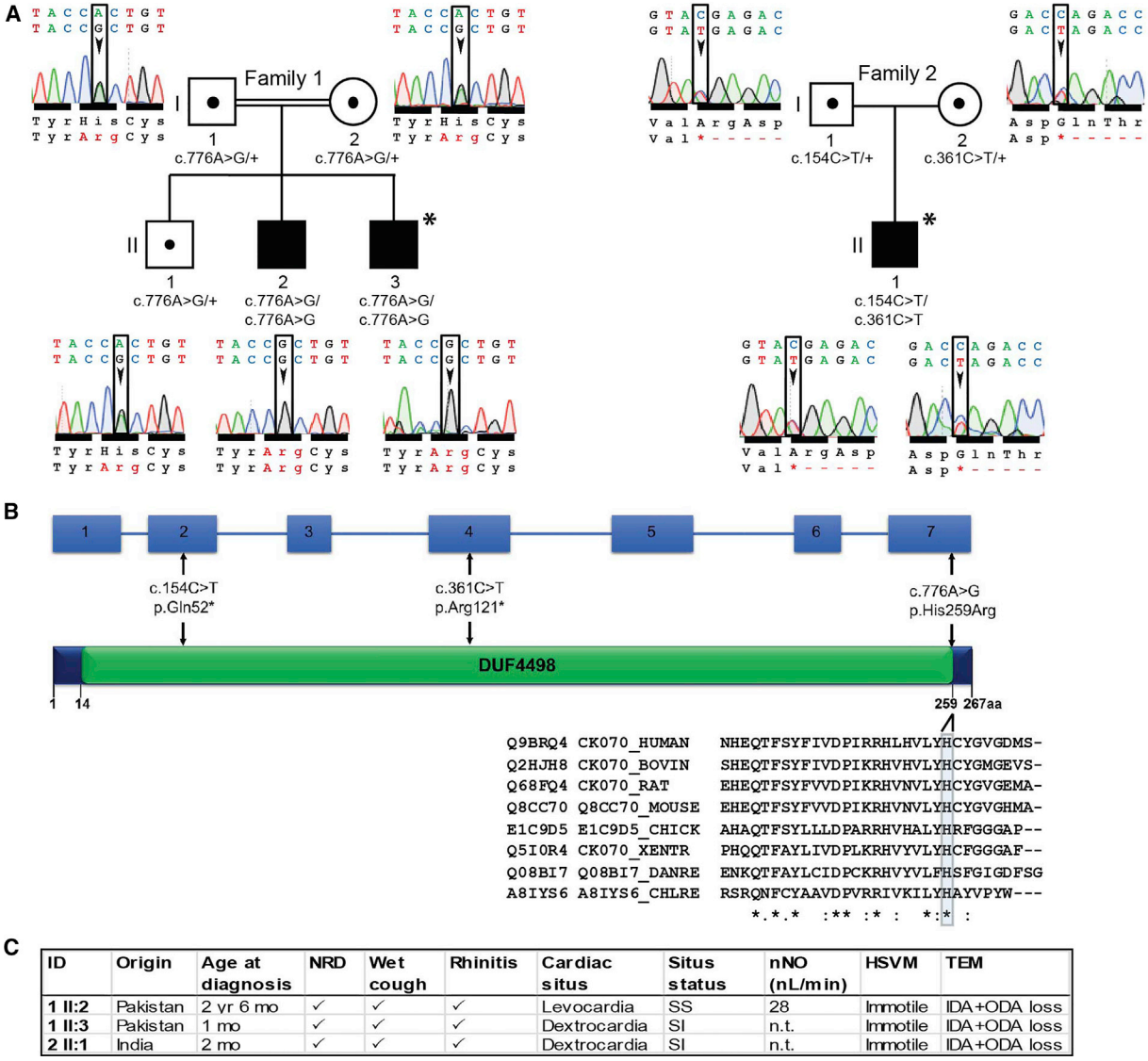
Chlamydomonas flagellar isolation by dibucaine deflagellation and flagellar fractionation by detergent followed methods previously described by Mitchell et al.[66] *Chlamydomonas* strains *ida1*, *oda3*, *oda6*, *oda8*, *oda10*, *oda16*, and *fla10-1*^{ts}[67] are available from the *Chlamydomonas* Resource Centre, University of Minnesota. An *ift46* mutant strain expressing an N-terminally truncated *IFT46* transgene and a Guinea pig antibody that recognizes the IFT46 C terminus were generously provided by George Witman, UMASS Medical School, Worcester, MA.[68] To test the effects of loss of IFT proteins from flagella, wild-type and temperature-sensitive IFT kinesin mutant *fla10*^{ts} strains expressing FBB5::HA were incubated at 31°C for 1.5 hr prior to flagellar isolation. For flagellar growth experiments, a wild-type strain expressing FBB5::HA was deflagellated by pH shock, allowed to regenerate for 60 min, and deflagellated a second time. Flagellar samples were adjusted to identical protein concentrations before loading onto gels. Anti-IC2 mouse McAb C11.4[69] and anti-ODA16 rabbit sera[40] have been previously characterized.

Results

Targeted Next Generation Sequencing Identifies *C11orf70* Mutations in Individuals with PCD

A targeted next-generation sequencing gene panel was used for mutational analysis in a cohort of affected individuals with PCD. As previously described, the panel contains all the currently known genes which, when mutated, cause PCD in addition to a set of other candidate genes predicted to play a role in cilia motility, based upon collaborative information derived from past PCD genetic mutation screening projects and a number of ciliate organism genome and proteome projects.[31] Screening of 161 unrelated individuals with a confirmed or presumed diagnosis of PCD revealed variants in a previously uncharacterized candidate gene, *C11orf70* (GenBank: NM_032930.2, NP_116319), in two unrelated case subjects where PCD diagnosis had been confirmed by a number of diagnostic clinical testing modalities.[42]

First, we identified a homozygous *C11orf70* missense variant (GenBank: NM_032930.2; c.776A>G [p.His259Arg]) in one of two affected siblings in a Pakistani consanguineous family where the parents are first cousins. Sanger sequencing confirmed the homozygous status of this mutation in the affected individual and in their affected sibling as well as the carrier status of both parents and an unaffected sibling (Figure 1A). This variant is found only once in the ExAC control exome database in a heterozygous carrier from the South Asian population, showing an overall



ID	Origin	Age at diagnosis	NRD	Wet cough	Rhinitis	Cardiac situs	Situs status	nNO (nL/min)	HSVM	TEM
1 II:2	Pakistan	2 yr 6 mo	✓	✓	✓	Levocardia	SS	28	Immotile	IDA+ODA loss
1 II:3	Pakistan	1 mo	✓	✓	✓	Dextrocardia	SI	n.t.	Immotile	IDA+ODA loss
2 II:1	India	2 mo	✓	✓	✓	Dextrocardia	SI	n.t.	Immotile	IDA+ODA loss

Figure 1. Bi-allelic *C11orf70* Mutations Identified in Individuals with Primary Ciliary Dyskinesia

(A) Pedigree structures of affected family 1 and 2. Electropherograms show variant regions in family 1 individual I-1 and I-2 (carrier father and mother), II-1 (carrier sibling), II-2 and I-3 (affected siblings), family 2 individual I-1 and I-2 (carrier father and mother), II-1 (affected). Familial segregation shows recessive inheritance in the affected siblings in family 1 (II-2 and II-3) both of whom carry a homozygous missense mutation c.776A>G (p.His259Arg) and in the affected child in family 2 (II-1) who carries compound heterozygous nonsense mutations c.154C>T (p.Gln52*) and c.361C>T (p.Arg121*).

(B) The genomic structure of *C11orf70* and the C11orf70 protein shows the locations of the identified disease variants. The only known conserved domain is a "domain of unknown function" (DUF4498). The phylogenetic conservation of the mutated amino acid histidine 259 across different mammalian and other ciliate species is highlighted in blue below the protein. Uniprot accession numbers are indicated; XENTR, *Xenopus tropicalis*; DANRE, *Danio rerio*; CHLRE, *Chlamydomonas reinhardtii*.

(C) Clinical characteristics of individuals carrying biallelic *C11orf70* mutations. NRD, neonatal respiratory distress; SS, situs solitus; SI, situs inversus totalis; nNO, nasal nitric oxide level (normal cutoff is >77 nL/min); HSVM, high-speed video microscopy; n.t., not tested as subject too young; IDA, inner dynein arm; ODA, outer dynein arm.

allele frequency in unaffected controls of 8.242e−06. It is absent from the EVS, 1000G, and dbSNP control databases. Phylogenetic analysis revealed that the His259 amino acid is a highly conserved residue, located within the DUF4498 domain of *C11orf70* (Figures 1B and S1). Using PolyPhen-2 software, this mutation is predicted to be damaging, with a score of 0.997 (sensitivity: 0.27; specificity: 0.98). It is also predicted to have a damaging effect on the protein using the SIFT tool. MutationTaster predicts it to be a disease-causing mutation and it has a CADD score of 23.9 (CADD score of ≥20 indicates a variant is among the top 1% of deleterious variants in the genome).

Second, we identified two compound heterozygous *C11orf70* stop-gain (nonsense) variants in an affected child from an Indian non-consanguineous family (GenBank: NM_032930.2; c.154C>T [p.Gln52*] inherited from the father and GenBank: NM_032930.2; c.361C>T [p.Arg121*] inherited from the mother) (Figure 1A). Sanger sequencing

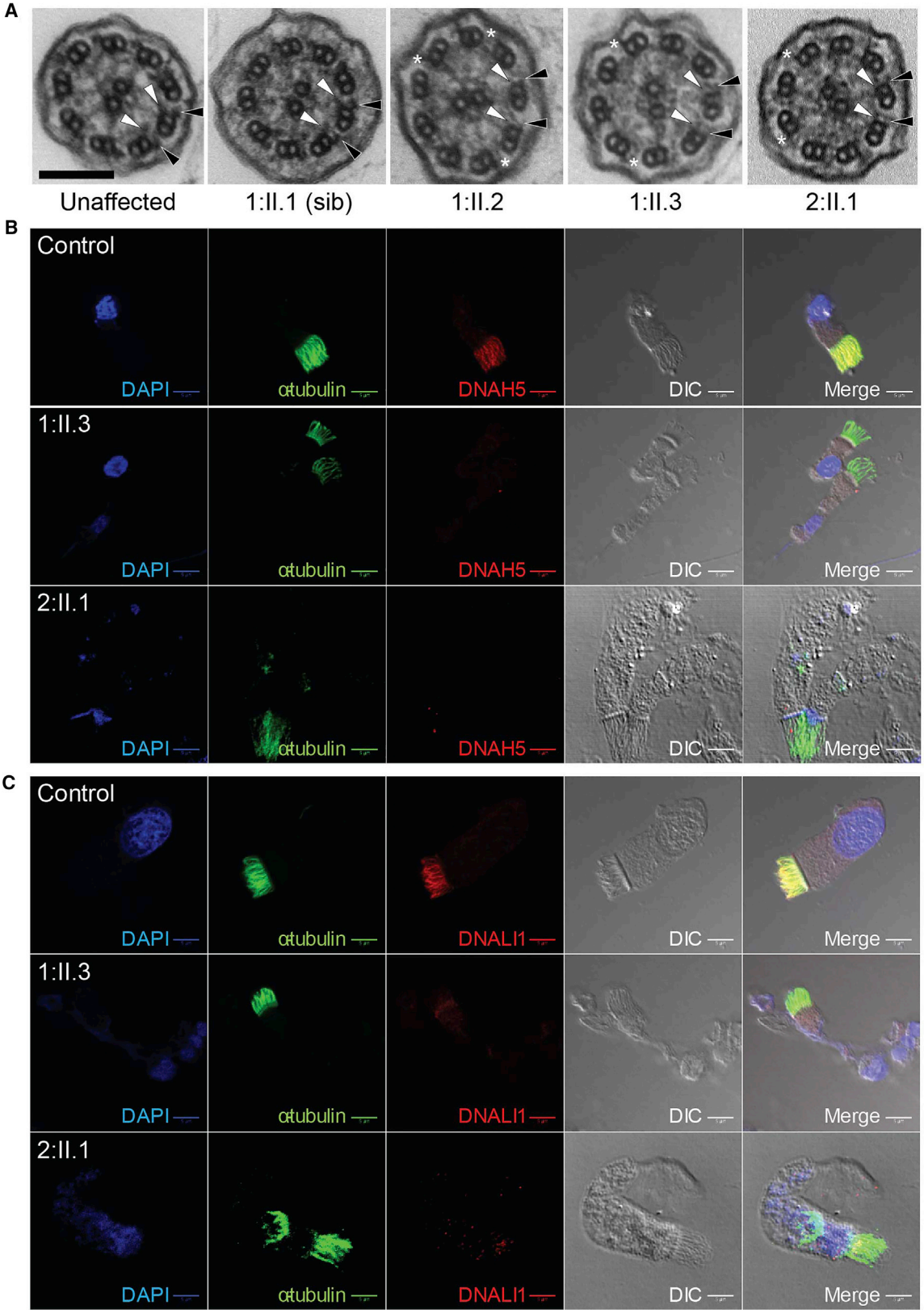


Figure 2. Affected Individuals with *C11orf70* Mutations Display Loss of the Cilia Outer and Inner Dynein Arms in Respiratory Cells
(A) Representative images of transmission electron micrographs of respiratory cilia in cross-section reveals a normal 9+2 pattern of the axoneme but with a loss of both the outer (black arrowheads) and inner (white arrowheads) dynein arms from the affected individuals in family 1 and 2 (right three panels), compared to a healthy control (far left) and the unaffected carrier sibling in family 1 (second left). Asterisks indicate remnants of short outer dynein arms that were observed to be retained in some cross sections. Scale bar, 100 nm.

(legend continued on next page)

confirmed the mutations in the affected individual's DNA and the carrier status of the parents. In the ExAC database, the p.Gln52* mutation (rs767760877) is found in two heterozygote carriers from the South Asian population with a total allele frequency of 1.653e−05 and the p.Arg121* mutation (rs561237622) is found only once in a heterozygote carrier from the South Asian population with a total allele frequency of 8.254e−06. Both stop-gain variants are also located within the *C11orf70* DUF4498 domain (Figure 1B) and are expected to cause a major deleterious effect on the protein. Their respective CADD scores are 36 (c.154C>T [p.Gln52*]) and 39 (c.361C>T [p.Arg121*]).

C11orf70 Mutations Cause PCD with Combined Loss of Outer and Inner Dynein Arms

The affected individuals from both families presented with typical PCD symptoms from early life, including a positive history of neonatal respiratory distress, and displayed other disease features of chronic wet cough and rhinitis (Figure 1C). Only the eldest affected child in family 1 was of an age appropriate for measurement of nasal nitric oxide levels, which were highly reduced (below the diagnostic cut off of 77 nL/min).[70] Dextrocardia or situs inversus were observed in both the affected families. High-speed video microscopy (HSVM) examination of nasal brushing biopsies of the affected individuals showed that the respiratory epithelium cells had completely immotile cilia (Movies S1, S2, and S3) compared to the effective ciliary beating observed in both the unaffected sibling II-3 from family 1 (Movie S4) and control subjects (Movie S5).

Ultrastructural studies using transmission electron microscopy (TEM) analysis of nasal brushing biopsies, with quantification of outer and inner dynein arms, was performed within a formal clinical diagnostic setting, typically evaluating 50–70 cilia per individual. The 9+2 microtubule pattern of the cilia appeared to be undisturbed overall but the survey revealed a significant loss of both the inner and outer dynein arm structures from respiratory epithelial cell cilia that affected both families equivalently. Outer dynein arms were absent in 67% and 69% of cross-sections in family 1 individuals II-2 and II-3 and in 94% of cross-section in the family 2 case II-1. The inner dynein arms were lost in 75% and 95% of cilia cross-sections in family 1 II-2 and II-3 and in 89% of cilia cross-sections in family 2 II-1. These data are shown in Figure S2, with representative images shown in Figure 2A.

The composition of the cilia in the respiratory epithelial cell samples in these affected individuals was also examined by immunofluorescence (IF) analysis compared to control subjects. Respiratory epithelial cells were double-labeled with antibodies directed against the axoneme (acetylated alpha-tubulin) and markers of the outer dynein and inner dynein arms. This showed a significantly reduced level (absence) of staining for the established diagnostic outer dynein arm marker DNAH5 (Figure 2B) and inner dynein arm marker DNALI1 (MIM: 602135) (Figure 2C) in the affected individual's respiratory cilia compared to control samples from an unaffected healthy individual. In agreement with the TEM ultrastructure results, immunofluorescent staining with markers of other cilia structures including the radial spokes (RSPH4A [MIM: 612647] antibody[71]) and nexin-dynein regulatory complexes (GAS8 [MIM; 605178] antibody[72]) did not display altered distribution in the cilia (data not shown).

C11orf70 Has a Characteristic Transcriptional Profile during Mucociliary Differentiation

Previous gene expression profiling studies on human tissues showed higher expression of *C11orf70* in multiciliated tissues compared to tissues with just primary, nonmotile cilia.[73,74] We analyzed the transcriptional profile of *C11orf70* during human motile ciliogenesis, by quantitative PCR of mRNA isolated from air-liquid interface cultures of human ciliated epithelial cells using qPCR primers listed in Table S1. We found that the *C11orf70* has a similar expression profile to *DNAH5* (Figure 3A) encoding the DNAH5 ODA heavy chain dynein, which is the gene most commonly mutated in PCD.[9,75] The expression of both genes increased over the time of culture in parallel, with a sharp rise around day 19 at the point when the cells start to ciliate, then falling to a plateau phase around day 24.

C11orf70 Is Highly Conserved and Expressed in Species that Require Dynein Arms for Cilia Motility

C11orf70 is a highly conserved protein across species (Figure S1). Cross species phylogenetic analysis showed that C11orf70 orthologs are retained in most species that have motile cilia with a few notable exceptions (Figure 3B). C11orf70 is not found in the genomes of nematode and lower plants that lack outer arms (e.g., *Caenorhabditis*, *Selaginella*, *Physcomitrella*) and is also lost from organisms that have outer dynein arms but that do not use IFT for flagellar assembly (e.g., *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Thalassiosira*). ODA16, an IFT-interacting protein involved in dynein trafficking, shows a similar distribution. Most of the genomes contained a single C11orf70 copy, with the exception of genomes such as *Xenopus tropicalis* that have undergone duplications. Although *Paramecium tetraurelia* has undergone at least three whole-genome duplications, its C11orf70 gene is unique (duplications could be followed by deletion).

(B and C) Immunofluorescence staining of respiratory epithelial cells for an antibody marker of the ciliary axoneme (acetylated alpha-tubulin, green) and the outer dynein arm antibody marker DNAH5 (red) shows highly reduced staining in affected individuals from both families indicating a loss of the outer dynein arms in agreement with the TEM data (B). Double antibody staining for acetylated alpha-tubulin (green) and the inner dynein arm antibody marker DNALI1 (red) shows a highly reduced staining in affected individuals from both families for DNALI1, indicating also a loss of the inner dynein arms (C). Differential interference contrast (DIC) imaging shows the outline of the cell and cilia in each case and the nuclei are in blue (4′,6-diamidino-2-phenylindole stain, DAPI). Scale bars, 5 μM.

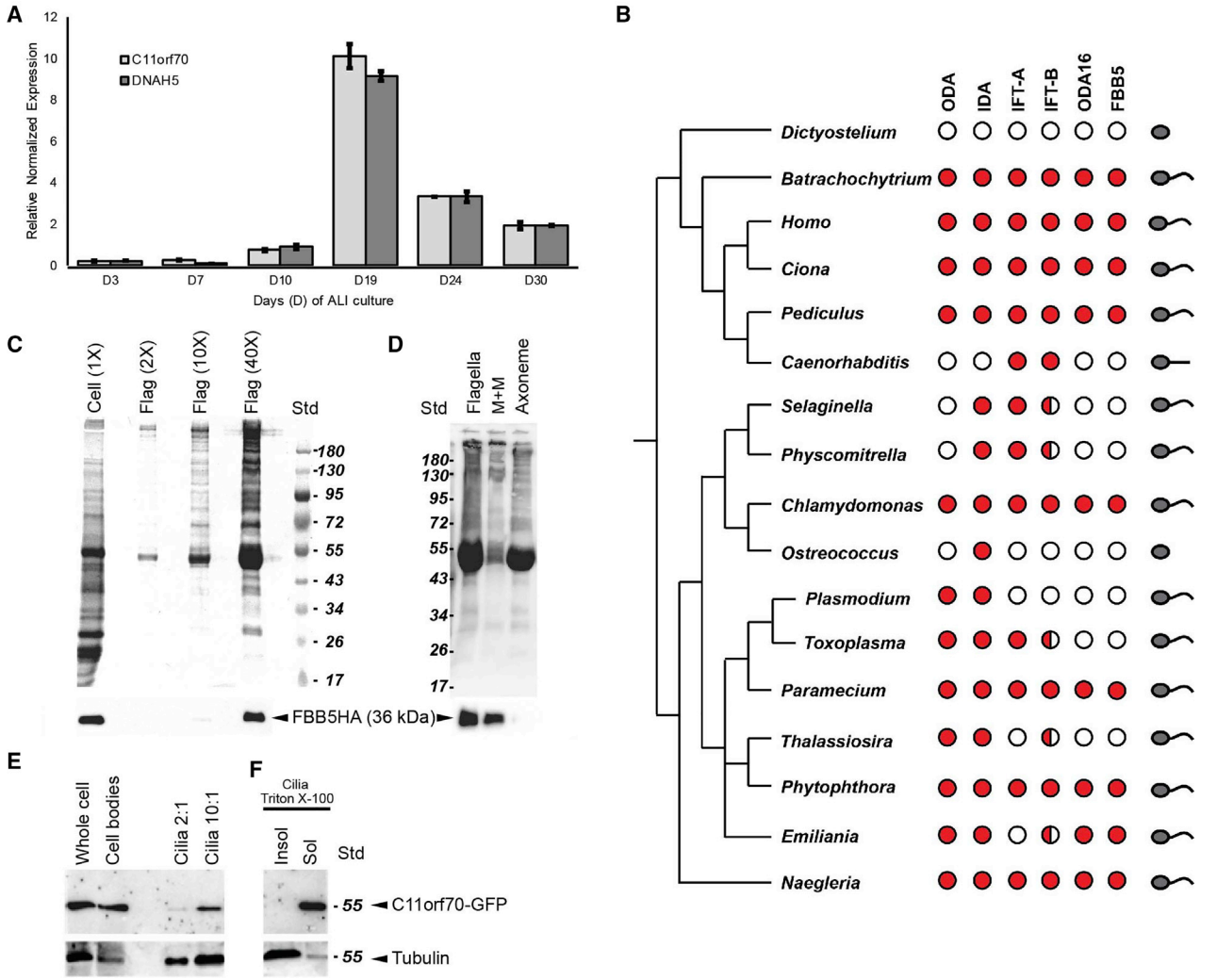


Figure 3. C11orf70 Is Widely Conserved and Distributed in Both the Cytoplasm and Cilia

(A) Quantitative RT-PCR analysis of *C11orf70* expression during multi-ciliogenesis in ALI culture over 30 days (D) in culture. The qPCR analysis compared expression of *C11orf70* to that of *DNAH5*. A similar transcriptional profile was seen over time in ALI culture, from around day 10 with a peak at day 19 followed by a plateau from day 24. Error bars indicate SEM.

(B) Phylogenomic distribution of C11orf70 orthologs compared with axonemal dyneins and dynein trafficking proteins. A single C11orf70 copy is retained (filled circles) in organisms with motile cilia (last column, curved organelle) that use outer dynein arms (ODA column) unless IFT-B complexes are also completely missing (open circles) or compromised by missing subunits (half-filled circles). Each circle represents the results of reciprocal BLAST searches of two or more proteins in each complex, starting with the *Chlamydomonas* sequences (see Material and Methods for details).

(C) Stained gels (top) and blot probed for HA (bottom) of cell body and flagellar fractions of *Chlamydomonas* cells expressing tagged C11orf70 ortholog FBB5-HA. More than 90% of FBB5-HA is cytoplasmic, but a small fraction is present in flagella.

(D) Gel (top) and blot (bottom) showing fractionation of isolated *Chlamydomonas* flagella by detergent. FBB5-HA is quantitatively released into the detergent-soluble membrane-matrix fraction.

(E) Western blot of deciliated wild-type paramecia (Cell body) expressing C11orf70-GFP as well as cilia fraction of the same cells loaded with a 2- or 10-fold excess of cilia, probed with anti-GFP and anti-PolyE tubulin antibodies. C11orf70 is enriched in the cytoplasm, despite 2% is found in the cilia fraction.

(F) Cilia fraction in *Paramecium* solubilized using Triton X-100 buffer. The Triton X-100 soluble (Sol) and insoluble (Insol) fractions were loaded at equal stoichiometry. C11orf70 is found in the soluble fraction corresponding to the matrix and membrane fraction, while PolyE tubulin is highly enriched in the axonemal fraction.

C11orf70 Localizes to Both the Cilia and Cell Body in Both *Chlamydomonas* and *Paramecium*

Since C11orf70 is a previously uncharacterized human protein, we next proceeded to investigate its wider biological role in cilia motility. Two unicellular model organisms were employed for this analysis: *Chlamydomonas*, a biflagellate alga commonly used to model PCD disease processes,[19,22,23] and the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Paramecium* is a unicellular multiciliated organism that is easy to cultivate and, like *Chlamydomonas*, allows for ciliary molecular and biochemical analyses. Moreover, RNAi by feeding in *Paramecium* is a very robust and easy

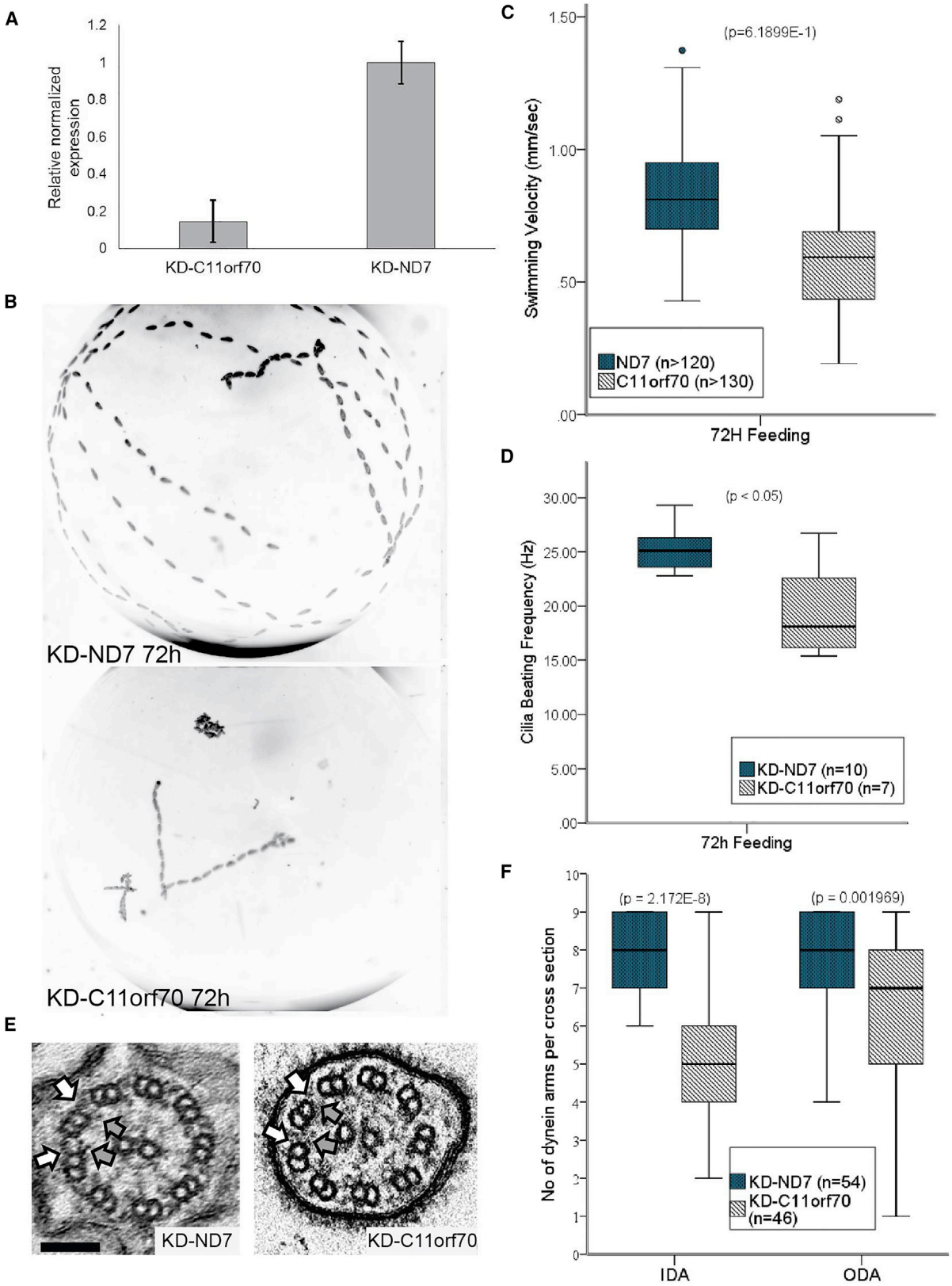


Figure 4. *Paramecium* Gene Knockdown Shows a Conserved Function for C11orf70 in Dynein Arm Assembly
(A) Quantitative RT-PCR analysis of *C11orf70* expression in both the *C11orf70* knockdown cells and the *ND7* knockdown control. The expression level of *Paramecium C11orf70* is reduced by about 80% in the *C11orf70* knockdown cells compared to its expression in the control *ND7* knockdown cells.

(legend continued on next page)

method for functional characterization of potential candidate PCD proteins.[76]

Both the *Chlamydomonas* and *Paramecium* genomes encode a single, well-conserved C11orf70 ortholog. In *Chlamydomonas*, it was previously designated as FBB5 based on its phylogenomic distribution with other genes encoding flagellar and basal body proteins.[77,78] *FBB5* is upregulated following deflagellation[79,80] but is not present in any published ciliary proteomes. To explore the function of C11orf70 in *Chlamydomonas* and *Paramecium*, we expressed a C-terminal hemagglutinin (HA)-tagged version in wild-type *Chlamydomonas* and a C-terminal GFP-tagged version of the *Paramecium* C11orf70 ortholog in wild-type *Paramecium*. Western blots of deflagellated cells and isolated flagella from *Chlamydomonas* revealed that FBB5::HA is predominantly cytoplasmic, with only about 2% appearing in the flagellar fraction (Figure 3C). Consistent with these results, GFP-tagged *Paramecium* C11orf70 is present mostly in the cytoplasm with about 2% in cilia (Figure 3E). *Chlamydomonas* flagellar FBB5::HA was quantitatively released by detergent treatment, which placed it in the soluble membrane and matrix fraction (Figure 3D). Similarly, cilia purification followed by Triton X-100 extraction in *Paramecium* released the ciliary C11orf70 into the soluble fraction (Figure 3F).

C11orf70 Has a Conserved Role in Dynein Arm Assembly in *Paramecium*

We further assessed the involvement of *C11orf70* as a gene that may be associated with PCD etiology and its role in cilia motility by gene silencing in *Paramecium*. RNAi knockdown of the *Paramecium C11orf70* reduced the expression of *C11orf70* by >80% (Figures 4A and S3). As a control, the *ND7* gene,[53] which plays no role in cilia motility, was subjected to RNAi in parallel. *C11orf70* knockdown led to an evident phenotypic defect in the *Paramecium* swimming pattern with severely reduced velocity after 72 hr (Figure 4B). The average swimming velocity of the *C11orf70*-RNAi cells (0.58 ± 0.22 mm/s) was reduced to 68% of the control *ND7*-RNAi cells (0.85 ± 0.20 mm/s) (Figure 4C). This decrease in the *Paramecium* swimming speed after *C11orf70* RNAi was confirmed not to be a consequence of an alteration in cell size, cilia length, or number of cilia per cell (Figure S4). When HSVM analysis of the cilia motility of *C11orf70* RNAi-silenced *Paramecium* was performed, a significant decrease in cilia beat frequency (CBF) was observed in the *C11orf70* knockdown cells compared to the control *ND7* knockdown cells (Figure 4D). The mean CBF of the control ND7-RNAi *Paramecium* was 24.3 ± 2 Hz while the cilia of the *C11orf70*-RNAi *Paramecia* were beating at a frequency averaging 20.3 ± 4 Hz. Despite the modest reduction of cilia beat frequency, a close examination of the movies showed that some cilia were not beating. The cilia waveform was also affected by *C11orf70* knockdown with a variable phenotype ranging from a slight reduction in amplitude to a half-beat (Movies S6 and S7).

These results led us to examine the presence of cilia ODA and IDA by TEM after *C11orf70* knockdown, since ODA are supposed to be involved in the beat frequency and IDA in the waveform.[68,69] TEM examination of cilia cross-sections showed a similar phenotype to that seen in individuals carrying *C11orf70* mutations (Figure 4E), with a statistically significant reduction of both IDA and ODA numbers per cilia cross-section observed in the *C11orf70* knockdown cells compared to the ND7 knockdown strain. The mean numbers of IDA and ODA were 7.8 ± 1.1 and 7.9 ± 1.3 in the control *Paramecium* cilia cross-sections compared to 4.9 ± 1.8 and 7.2 ± 2.2 in the *C11orf70*-silenced *Paramecium* cilia cross-sections, respectively (Figure 4F).

Overall, these phenotypic findings in *Paramecium* after *C11orf70* ortholog silencing indicate the high level of evolutionary conservation of its gene function across ciliated species, with cilia defects that are consistent with the diagnostic findings in individuals affected with PCD that carry mutations in *C11orf70*.

C11orf70 Has a Conserved Intracellular Distribution Pattern Similar to IFT-Associated Proteins

To gain insight into the mechanism by which C11orf70 might behave like an IFT-associated protein and potentially interact with the ciliary IFT system to affect inner and outer dynein arm assembly, we next studied its behavior in *Paramecium* after ablation of IFT and also during cilia re-growth. We expressed GFP-tagged C11orf70 in cells, generating several transformant clones showing a

(B) *Paramecium* swimming motility captured by dark-field microscopy, shown by the Z projection of track recordings, captured using a 10× objective after 72 hr of RNAi treatment. Wider spaced dots mark quicker moving *Paramecium*, dots tighter together mark slower moving or immobile *Paramecium*. *C11orf70* silenced cells (bottom) show a severe motility phenotype compared to the control *ND7* silenced cells (top).
(C) Analysis of the swimming velocity of *C11orf70* and *ND7* knockdown cells. The swimming velocity of *C11orf70* knockdown cells is reduced by 32% of that of the control *ND7* knockdown cells. At least 90 organisms evaluated per condition; $p < 0.001$, independent samples t test.
(D) At 72 hr, of RNAi the ciliary beat frequency of *C11orf70* knockdown cells is reduced by about 20% compared to *ND7* control knockdown cells. 7–10 paramecia evaluated per condition; $p < 0.05$, Mann-Whitney U test.
(E) Transmission electron micrographs of *Paramecium* cilia in cross-section showing normal 9+2 arrangement for the control *ND7* knockdown (left) and absence of the outer (white arrows) and inner (gray arrows) dynein arms in the *C11orf70* knockdown cells (right). Scale bar, 100 nm.
(F) Quantification of TEM dynein arms counts across >40 cross-sections per strain showed significant alteration of numbers of ODA and IDA in *C11orf70* knockdown cells compared to ND7 control knockdown cells. $p > 0.001$, independent samples t test.
All error bars indicate SEM.

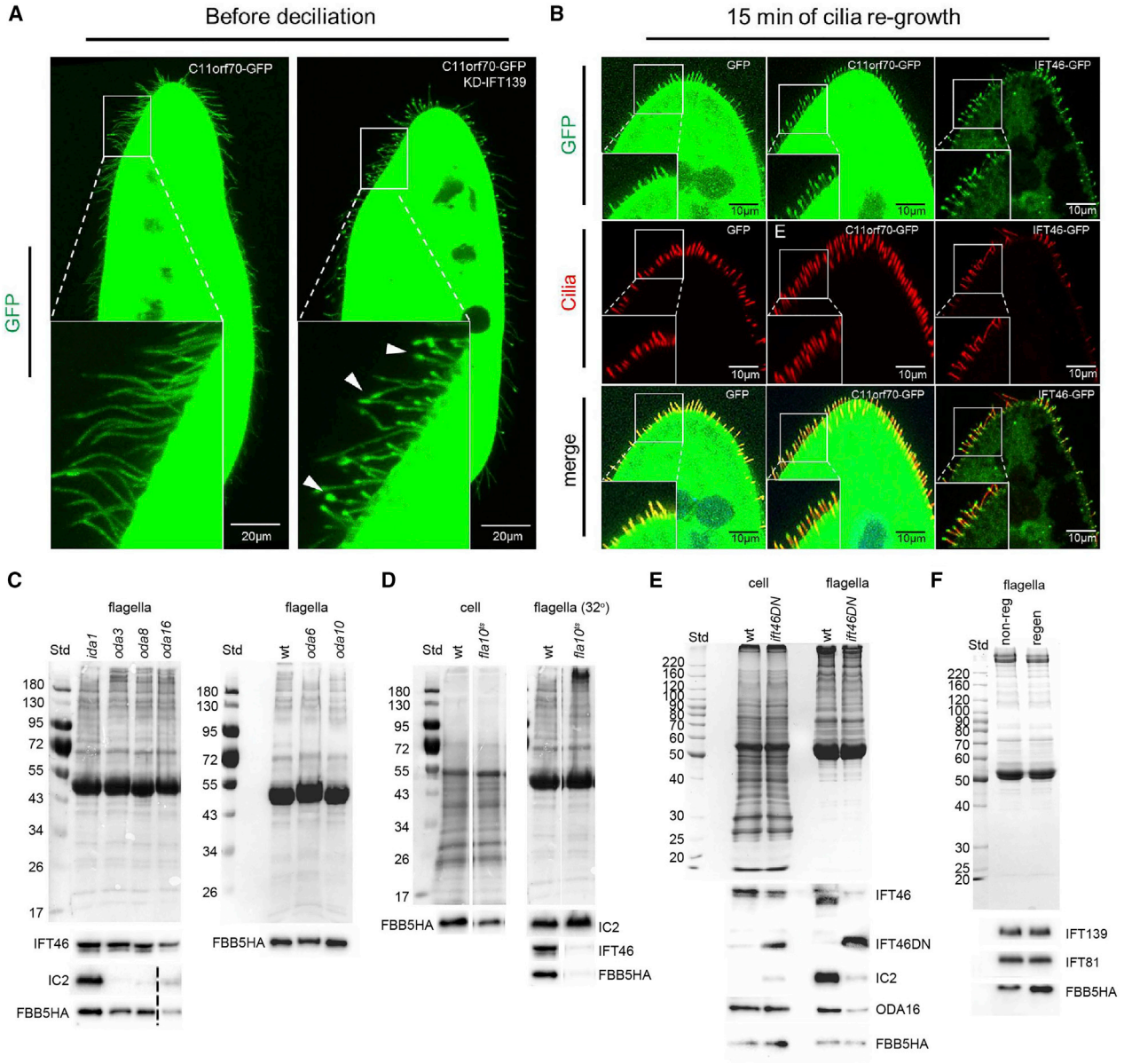


Figure 5. C11orf70-GFP Accumulates at the Ciliary Tip during Reciliation and Its Flagellar Abundance Is IFT Dependent

(A) Left: paramecia expressing the *Paramecium* C11orf70-GFP show a very high level of cytoplasmic GFP staining with protein also present in the cilia. The cell body was overexposed in order to allow the detection of cilia. Right: RNAi knockdown of IFT139/TTC21B disrupting intraflagellar transport, causes the overexpressed C11orf70 protein to accumulate aberrantly in the cilia toward the tip regions, as shown also in higher magnification in the white boxes. Scale bars, 20 µm.

(B) *Paramecium* expressing either GFP alone (left), C11orf70-GFP (middle), or IFT46-GFP (right) were subject to deciliation after which the cilia were allowed to regrow for 15 min, in order to study the localization of the tagged proteins during reciliation. Direct GFP fluorescence (green, top) and monoclonal antibody staining against polyglutamylated tubulin (red, middle) are shown along with the merge (bottom). Paramecia expressing GFP are used as a negative control since the GFP protein enters the cilia passively (<27 kDA). The GFP staining is found distributed homogeneously along the entire length of the cilia. In contrast, IFT46-GFP accumulates at the ciliary tips during ciliary regrowth, as expected for an IFT-B family member. C11orf70-GFP is found at much higher levels in the cytoplasm than IFT46-GFP and is also present in the cilia. Upon ciliary regrowth, C11orf70- GFP behaves in a similar fashion to IFT46 GFP in cilia with an accumulation of both proteins observed at the ciliary tips. Scale bars, 10 µm. White boxes show higher magnification.

(C) Coomassie-stained gels (above) and western blots (below) show that the flagellar fraction abundance of *Chlamydomonas* FBB5 is similar in strains carrying mutations in components of the outer or inner dynein arms (*oda6*, *ida1*), the ODA-DC (*oda3*) and late-stage ODA assembly factors (*oda8*, *oda10*). However, its abundance is reduced by 75% in the absence of ODA16, an IFT-associated dynein transport factor (left). Blots of IFT46 used as a marker of flagellar IFT, shows that IFT is reduced by 50% in *oda16*. Dotted line indicates removal of an intervening lane on the blot.

(D) Gels (top) and blots (bottom) of whole cells and flagella from wild-type and *fla10*^{ts} strains of *Chlamydomonas*. Similar levels of FBB5-HA are expressed in both strains (left panels, whole cells). Flagella from *fla10*^{ts} cells incubated at the restrictive temperature lack IFT46 and have also lost FBB5-HA, whereas elevated temperature has no effect on wild-type flagella (right panels).

(legend continued on next page)

wild-type growth phenotype that expressed various levels of C11orf70-GFP. All of them showed the same results, with C11orf70-GFP protein found mostly in the cytoplasm with a small amount found in cilia (Figure 5A, left), in agreement with the *Chlamydomonas* and *Paramecium* cell fractionation experiments in Figures 3C and 3E. We then applied RNAi to the C11orf70-GFP transformed cells, to knock down the function of IFT139 (TTC21B), one member of the IFT-A complex (involved in IFT-associated retrograde transport out of cilia). Depletion of IFT139 led to a strikingly aberrant accumulation of C11orf70 protein at the tips of the cilia, suggesting that it behaves like an IFT protein with its ciliary transport governed by IFT-A trafficking (Figure 5A, right).

We next compared C11orf70-GFP behavior to GFP alone, which enters cilia by diffusion, and IFT46-GFP, an IFT-B anterograde transport protein involved in IFT-associated anterograde transport of ODA into cilia, using transformant clones expressing these proteins individually. We assessed their localization compared to C11orf70, after deciliation followed by cilia re-growth of the transformed *Paramecium* cells. After 15 min of cilia re-growth, when IFT transport is particularly active, we observed that IFT-46 GFP accumulates at the ciliary tips (Figure 5B, right panels) compared to a uniform distribution of fluorescence in the cilia of cells expressing GFP alone (Figure 5B, left panels). Similarly to IFT46-GFP, the C11orf70-GFP protein showed a comparable cilia tip accumulation during ciliogenesis (Figure 5B, middle panels). These findings suggest that C11orf70 is actively transported in cilia and recycled back to the cell, in a fashion consistent with involvement in IFT-based transport.

Flagellar C11orf70 Abundance Is IFT Dependent

We next took advantage of *Chlamydomonas* genetics to further investigate the functional role of *C11orf70* in IFT-related cilia motility by expressing the HA-tagged FBB5 ortholog in various axonemal assembly mutant strains. We found that flagellar FBB5::HA levels were not affected by mutations in outer or inner dynein arm subunits (*oda6*, *ida1* mutant strains),[81,82] the ODA-DC (*oda3*),[83] or late-stage cytoplasmic assembly factors (*oda8*, *oda10*).[38,83] However, FBB5::HA levels were found to be decreased by a loss of IFT-associated dynein transport factor ODA16 (*oda16*)[40,41,84] (Figure 5C), with confirmation in the *oda16* strain that FBB5::HA was expressed at equivalent levels to the other tested strains (Figure S5). Since this suggests a role for FBB5 in IFT-dependent dynein transport, we further tested the role of IFT in transport of FBB5 to the flagellar matrix by expressing FBB5::HA in the temperature-sensitive IFT kinesin mutant deficient in anterograde IFT, *fla10*^{ts}.[67] After shifting to the restrictive temperature (32°C) for 1.5 hr, the *fla10*^{ts} flagella were found to be depleted of IFT complexes (monitored by the abundance of IFT46) and of FBB5::HA (Figure 5D). Since ODA transport factor ODA16 (human ortholog DAW1) interacts with *IFT46*[40] and specifically depends on an interaction with the N-terminal domain of IFT46 for ODA transport,[68,84] we tested the effects of deleting the IFT46 N terminus on flagellar abundance of FBB5. Flagella of an *ift46* mutant strain that also expressed an N-terminally truncated IFT46 protein[68] had reduced levels of ODA16 and greatly reduced assembly of ODAs (as monitored by the abundance of ODA intermediate chain IC2) but showed no reduction in FBB5::HA (Figure 5E). As an additional test of the role of FBB5 in assembly-related processes, we tested the relative abundance of FBB5::HA in non-regenerating full-length flagella and in regenerating half-length flagella. Although the abundance of IFT139 (IFT-A subunit) and IFT81 (IFT-B subunit) did not change, the abundance of FBB5::HA increased in the assembling flagella, as expected of a factor associated with ciliary precursors during transport (Figure 5F).

Discussion

Here we report mutations in a previously uncharacterized gene, *C11orf70*, in individuals with PCD and situs inversus, demonstrating the potential power of using a targeted NGS approach for discovery of PCD-causing mutations in previously unrecognized disease genes. *C11orf70* mutations give rise to immotile respiratory cilia that have a normal 9+2 ultrastructure with a combined lack of both inner and outer dynein arms.

Cilia axonemal structure is highly conserved across species and various model organisms have been used in the past to characterize candidate genes for PCD. Phylogenetic analysis showed that C11orf70 is a highly conserved protein across anciently diverging species, being present today only in organisms with motile cilia/flagella. It is lost in organisms that do not use IFT assembly of their cilia/flagella. It has a specific distribution across different species, following a similar pattern to that of IFT-associated dynein assembly factors like *ODA16* (*WDR69*).[40,41,68] Together these findings support the importance of C11orf70 in the cytoplasmic assembly, maturation, and IFT-B-based transport into cilia of dynein arm motors that are required for cilia motility in multiciliated cells.

Transcriptional profiling of *C11orf70* shows that it is enriched in tissues bearing motile cilia,[73,74] although it

(E) Gels (top) and blots (bottom) of whole cells and flagella from FBB5-HA-expressing wild-type *Chlamydomonas* and an *ift46* mutant strain that also express an N-terminally truncated IFT46 transgene. Similar levels of IFT46, IFT46ΔN, ODA-IC2, ODA16, and FBB5-HA are expressed in whole cells of both strains (left). The truncated IFT46 supports IFT-dependent flagellar assembly, but the flagella show reduced levels of ODAs (IC2) and ODA16. FBB5-HA levels, however, are not affected (right).
(F) Gel (top) and blots (bottom) of non-regenerating flagella, and regenerating flagella isolated 60 min after deflagellation, show no change in abundance of IFT proteins, but increased abundance of FBB5::HA in the growing flagella.

was not identified in proteomic profiling of human respiratory cilia.[85] Microarray-based gene expression profiling has shown that *C11orf70* expression is upregulated during mucociliary differentiation.[86] This is consistent with our finding that the *C11orf70* expression profile follows a similar pattern during ciliogenesis to that of other genes that cause PCD when mutated, with a peak around the time of cilia emergence that reaches a plateau afterward. Interestingly, the *Chlamydomonas C11orf70* ortholog, *FBB5*, has been identified as among the flagellar-basal body group of genes,[77,78] upregulated following deflagellation,[79,80] but it is not present in any ciliary proteomes. The *Paramecium C11orf70* ortholog, *GSPATG00011350001*, was also not detected within the cilium proteome[87] or during cilia regrowth after deciliation of *Paramecium*.[88]

To study the role of *C11orf70* in cilia motility, we knocked down its ortholog in *Paramecium*. We first confirmed the efficiency of silencing at the RNA level and then studied the phenotypic consequences of gene silencing on cilia motility and ultrastructure. We found that *C11orf70* RNAi knockdown led to a significant reduction in swimming velocity as a secondary effect of a decrease in cilia beating frequency. Analysis of the ciliary ultrastructural phenotype demonstrated the highly conserved, ancient function of C11orf70 in dynein arm assembly since *C11orf70*-silenced *Paramecium* cells mimic the combined outer and inner dynein arm loss of affected individuals with PCD carrying *C11orf70* mutations, consistent with their immotile respiratory cilia. This provides evidence that C11orf70 plays a role in the dynein arm assembly/transport process. This work highlights the utility of *Paramecium* for studies of cilia motility and its emergence as a suitable organism to model the cell biology of disease mechanisms underlying PCD.

In *Chlamydomonas* we found that the distribution of the C11orf70 ortholog FBB5 between the cytoplasm and cilia/flagella was similar to other IFT-associated dynein assembly proteins such as ODA16[40] and ODA8.[38] A similar distribution was seen for *Paramecium* C11orf70. Our expression studies in both *Chlamydomonas* and *Paramecium* showed that C11orf70 is a soluble, mainly cytoplasmic protein, with a small amount also present in the matrix fraction of cilia/flagella. The protein was around 40× more abundant in the cytoplasm than the cilia/flagella in both organisms. This is similar to ODA16, which is concentrated around the basal bodies with ~2% found in flagella.[40,41] The anterograde IFT partner of ODA16, IFT-B family member IFT46, shows a similar pattern, also concentrated around basal bodies with ~5% present in flagella. ODA16 and IFT46 are known to interact together to mediate the transport of outer dynein arms into the cilia.[68] Among the other PCD-associated dynein assembly factors, the distribution of C11orf70 is reminiscent of two, ZMYND10 and C21orf59, that are considered predominantly cytoplasmic with a small component potentially also detectable within cilia.[33,35]

The flagellar localization of *Chlamydomonas* FBB5-HA was unaffected by most mutations that disrupt ODA assembly but was reduced by loss of the IFT46-associated transport factor ODA16, although we found that its abundance in the axoneme was not dependent on the N terminus of IFT46 (we note that this effect could result from a general reduced abundance of IFT in *oda16* flagella rather than being a direct consequence of ODA16 mutation). Flagellar localization was dependent on IFT, and FBB5::HA abundance increased during flagellar growth, a time when high levels of precursor transport are needed.[89] *Paramecium* work supported these findings, since after deciliation followed by cilia regrowth C11orf70 accumulates in the cilia tips in *Paramecium* in the same way as IFT46. IFT46 is an IFT-B family component that governs anterograde (cilia base to tip) transport in the cilium and is very active during ciliation. IFT46 is released at the tip of the cilium where it accumulates during active IFT and C11orf70 may behave similarly. We further found in *Paramecium* that depletion of an IFT-A retrograde (cilia tip to base) transport component, IFT139/TTC21B, affected the ciliary localization of C11orf70, causing it to accumulate abnormally at the ciliary tips. This is to be expected if the protein, like IFT components, is recycled out of cilia by the IFT-A transport system.

Overall, our data implicate C11orf70 as playing a role within the chaperone-mediated sequential protein folding and trafficking pathways that are required for the cytoplasmic preassembly of dynein arm motors and their subsequent import into the motile ciliary axoneme.[18,23,31,82,90] As is the case for other putative dynein assembly factors acting to correctly assemble the dynein motor complexes responsible for cilia motility, it is not yet clear how a protein can act as an adaptor for both ODA and IDA cilia assembly and whether it would need to recognize a component of both inner and outer dynein arms. Since we find that C11orf70 is transported into cilia, interacts with IFT-A, and behaves similarly to an IFT component, we propose that it could provide chaperone-related functions within the cytoplasm, continuing until the dynein arm complex is anchored in cilia, then being recycled back to the cytoplasm via retrograde IFT (IFT-A).

Together, these data identify mutations in *C11orf70* as a cause of PCD with combined outer and inner dynein loss, cilia immotility, and situs inversus. This has important clinical implications for improved understanding of the genetic basis of the disease and counselling of affected families. The combined evidence from human and distantly related unicellular organisms support a role for C11rof70 as an additional dynein assembly/transport factor, its abundance in the cilium dependent upon IFT.

Supplemental Data

Supplemental Data include five figures, three tables, and seven movies and can be found with this article online at https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.03.024.

Acknowledgments

We are very grateful to the families who participated in this study and thank the UK PCD Family Support Group for their continued support. We thank Ms. Dani Lee and Prof. Chris O'Callaghan (UCL Great Ormond Street Institute of Child Health) for help with assessment of *Paramecium* motility and Dr. Dale Moulding (GOS-ICH Confocal Microscopy Core Facility) for experimental assistance. Funding for this study was provided by Action Medical Research (GN2101; H.M.M.) and Great Ormond Street Children's Charity grant (V4515; H.M.M.) and Leadership awards (V1299, V2217; H.M.M.). M.R.F. is supported by the British Council Newton-Mosharafa Fund and the Ministry of Higher Education in Egypt. We acknowledge support from the NIHR Biomedical Research Centre at Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust and University College London (Doctoral Trainee Support Award; M.R.F.). Work by A.S. is independent research funded by a postdoctoral research fellowship from the National Institute of Health Research and Health Education England. The views expressed in this publication are those of the authors and not necessarily those of the NHS, the National Institute of Health Research, or the Department of Health. We would like to thank C. Mathon for generating plasmid constructs, L. Shi for the IFT46 construct, J. Bonaventure for his help in RNA isolation, and C. Janke for his generous gift of PolyE antibodies. The authors acknowledge the contribution of the BEAT-PCD COST Action. The authors participate in the COST Action BEAT-PCD: Better Evidence to Advance Therapeutic options for PCD network (BM1407) and this work was supported by two BM1407 COST Action STSM Grants awarded to M.R.F. and P.L.B. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Received: October 28, 2017
Accepted: March 23, 2018
Published: May 3, 2018

Web Resources

1000 Genomes, http://www.internationalgenome.org/
BLAST/BLOSUM62, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
CADD, http://cadd.gs.washington.edu/
Chlamydomonas Resource Center, http://chlamycollection.org/
CilDB, http://cildb.cgm.cnrs-gif.fr/
dbSNP, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/
Ensembl Genome Browser, http://www.ensembl.org/index.html
ExAC Browser, http://exac.broadinstitute.org/
Human Splicing Finder, http://www.umd.be/HSF3/
MAPP, http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/MAPP/index.html
MutationTaster, http://www.mutationtaster.org/
NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server, http://evs.gs.washington.edu/EVS/
OMIM, http://www.omim.org/
ParameciumDB, http://paramecium-archive.i2bc.paris-saclay.fr/
PhastCons, http://compgen.cshl.edu/phast/
PhyloP, http://compgen.cshl.edu/phast/help-pages/phyloP.txt
Phytozome, https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html
PolyPhen-2, http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
Primer-BLAST, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
RefSeq, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq
SIFT, http://sift.bii.a-star.edu.sg/

References

1. Mitchison, H.M., and Valente, E.M. (2017). Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. J. Pathol. *241*, 294–309.
2. Satir, P., and Christensen, S.T. (2008). Structure and function of mammalian cilia. Histochem. Cell Biol. *129*, 687–693.
3. Milla, C.E. (2016). The evolving spectrum of ciliopathies and respiratory disease. Curr. Opin. Pediatr. *28*, 339–347.
4. Pennekamp, P., Menchen, T., Dworniczak, B., and Hamada, H. (2015). Situs inversus and ciliary abnormalities: 20 years later, what is the connection? Cilia *4*, 1.
5. Fliegauf, M., Olbrich, H., Horvath, J., Wildhaber, J.H., Zariwala, M.A., Kennedy, M., Knowles, M.R., and Omran, H. (2005). Mislocalization of DNAH5 and DNAH9 in respiratory cells from patients with primary ciliary dyskinesia. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *171*, 1343–1349.
6. Lucas, J.S., Chetcuti, P., Copeland, F., Hogg, C., Kenny, T., Moya, E., O'Callaghan, C., and Walker, W.T. (2014). Overcoming challenges in the management of primary ciliary dyskinesia: the UK model. Paediatr. Respir. Rev. *15*, 142–145.
7. Hosie, P.H., Fitzgerald, D.A., Jaffe, A., Birman, C.S., Rutland, J., and Morgan, L.C. (2015). Presentation of primary ciliary dyskinesia in children: 30 years' experience. J. Paediatr. Child Health *51*, 722–726.
8. Noone, P.G., Leigh, M.W., Sannuti, A., Minnix, S.L., Carson, J.L., Hazucha, M., Zariwala, M.A., and Knowles, M.R. (2004). Primary ciliary dyskinesia: diagnostic and phenotypic features. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *169*, 459–467.
9. Hornef, N., Olbrich, H., Horvath, J., Zariwala, M.A., Fliegauf, M., Loges, N.T., Wildhaber, J., Noone, P.G., Kennedy, M., Antonarakis, S.E., et al. (2006). DNAH5 mutations are a common cause of primary ciliary dyskinesia with outer dynein arm defects. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *174*, 120–126.
10. Hjeij, R., Lindstrand, A., Francis, R., Zariwala, M.A., Liu, X., Li, Y., Damerla, R., Dougherty, G.W., Abouhamed, M., Olbrich, H., et al. (2013). ARMC4 mutations cause primary ciliary dyskinesia with randomization of left/right body asymmetry. Am. J. Hum. Genet. *93*, 357–367.
11. Onoufriadis, A., Shoemark, A., Munye, M.M., James, C.T., Schmidts, M., Patel, M., Rosser, E.M., Bacchelli, C., Beales, P.L., Scambler, P.J., et al.; UK10K (2014). Combined exome and whole-genome sequencing identifies mutations in ARMC4 as a cause of primary ciliary dyskinesia with defects in the outer dynein arm. J. Med. Genet. *51*, 61–67.
12. Panizzi, J.R., Becker-Heck, A., Castleman, V.H., Al-Mutairi, D.A., Liu, Y., Loges, N.T., Pathak, N., Austin-Tse, C., Sheridan, E., Schmidts, M., et al. (2012). CCDC103 mutations cause primary ciliary dyskinesia by disrupting assembly of ciliary dynein arms. Nat. Genet. *44*, 714–719.
13. King, S.M., and Patel-King, R.S. (2015). The oligomeric outer dynein arm assembly factor CCDC103 is tightly integrated within the ciliary axoneme and exhibits periodic binding to microtubules. J. Biol. Chem. *290*, 7388–7401.
14. Hjeij, R., Onoufriadis, A., Watson, C.M., Slagle, C.E., Klena, N.T., Dougherty, G.W., Kurkowiak, M., Loges, N.T., Diggle, C.P., Morante, N.F., et al.; UK10K Consortium (2014). CCDC151 mutations cause primary ciliary dyskinesia by disruption of the outer dynein arm docking complex formation. Am. J. Hum. Genet. *95*, 257–274.
15. Onoufriadis, A., Paff, T., Antony, D., Shoemark, A., Micha, D., Kuyt, B., Schmidts, M., Petridi, S., Dankert-Roelse, J.E.,

Haarman, E.G., et al.; UK10K (2013). Splice-site mutations in the axonemal outer dynein arm docking complex gene CCDC114 cause primary ciliary dyskinesia. Am. J. Hum. Genet. *92*, 88–98.
16. Knowles, M.R., Leigh, M.W., Ostrowski, L.E., Huang, L., Carson, J.L., Hazucha, M.J., Yin, W., Berg, J.S., Davis, S.D., Dell, S.D., et al.; Genetic Disorders of Mucociliary Clearance Consortium (2013). Exome sequencing identifies mutations in CCDC114 as a cause of primary ciliary dyskinesia. Am. J. Hum. Genet. *92*, 99–106.
17. Horani, A., Ferkol, T.W., Dutcher, S.K., and Brody, S.L. (2016). Genetics and biology of primary ciliary dyskinesia. Paediatr. Respir. Rev. *18*, 18–24.
18. Desai, P.B., Dean, A.B., and Mitchell, D.R. (2018). Cytoplasmic preassembly and trafficking of axonemal dyneins. In Dyneins, Second Edition, S. King, ed. (Academic Press), pp. 140–161.
19. Duquesnoy, P., Escudier, E., Vincensini, L., Freshour, J., Bridoux, A.M., Coste, A., Deschildre, A., de Blic, J., Legendre, M., Montantin, G., et al. (2009). Loss-of-function mutations in the human ortholog of *Chlamydomonas reinhardtii* ODA7 disrupt dynein arm assembly and cause primary ciliary dyskinesia. Am. J. Hum. Genet. *85*, 890–896.
20. Sullivan-Brown, J., Schottenfeld, J., Okabe, N., Hostetter, C.L., Serluca, F.C., Thiberge, S.Y., and Burdine, R.D. (2008). Zebrafish mutations affecting cilia motility share similar cystic phenotypes and suggest a mechanism of cyst formation that differs from pkd2 morphants. Dev. Biol. *314*, 261–275.
21. Loges, N.T., Olbrich, H., Becker-Heck, A., Häffner, K., Heer, A., Reinhard, C., Schmidts, M., Kispert, A., Zariwala, M.A., Leigh, M.W., et al. (2009). Deletions and point mutations of LRRC50 cause primary ciliary dyskinesia due to dynein arm defects. Am. J. Hum. Genet. *85*, 883–889.
22. Omran, H., Kobayashi, D., Olbrich, H., Tsukahara, T., Loges, N.T., Hagiwara, H., Zhang, Q., Leblond, G., O'Toole, E., Hara, C., et al. (2008). Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. Nature *456*, 611–616.
23. Mitchison, H.M., Schmidts, M., Loges, N.T., Freshour, J., Dritsoula, A., Hirst, R.A., O'Callaghan, C., Blau, H., Al Dabbagh, M., Olbrich, H., et al. (2012). Mutations in axonemal dynein assembly factor DNAAF3 cause primary ciliary dyskinesia. Nat. Genet. *44*, 381–389, S1–S2.
24. Chandrasekar, G., Vesterlund, L., Hultenby, K., Tapia-Páez, I., and Kere, J. (2013). The zebrafish orthologue of the dyslexia candidate gene DYX1C1 is essential for cilia growth and function. PLoS ONE *8*, e63123.
25. Tarkar, A., Loges, N.T., Slagle, C.E., Francis, R., Dougherty, G.W., Tamayo, J.V., Shook, B., Cantino, M., Schwartz, D., Jahnke, C., et al.; UK10K (2013). DYX1C1 is required for axonemal dynein assembly and ciliary motility. Nat. Genet. *45*, 995–1003.
26. Diggle, C.P., Moore, D.J., Mali, G., zur Lage, P., Ait-Lounis, A., Schmidts, M., Shoemark, A., Garcia Munoz, A., Halachev, M.R., Gautier, P., et al. (2014). HEATR2 plays a conserved role in assembly of the ciliary motile apparatus. PLoS Genet. *10*, e1004577.
27. Horani, A., Druley, T.E., Zariwala, M.A., Patel, A.C., Levinson, B.T., Van Arendonk, L.G., Thornton, K.C., Giacalone, J.C., Albee, A.J., Wilson, K.S., et al. (2012). Whole-exome capture and sequencing identifies HEATR2 mutation as a cause of primary ciliary dyskinesia. Am. J. Hum. Genet. *91*, 685–693.
28. Horani, A., Ferkol, T.W., Shoseyov, D., Wasserman, M.G., Oren, Y.S., Kerem, B., Amirav, I., Cohen-Cymberknoh, M., Dutcher, S.K., Brody, S.L., et al. (2013). LRRC6 mutation causes primary ciliary dyskinesia with dynein arm defects. PLoS ONE *8*, e59436.
29. Inaba, Y., Shinohara, K., Botilde, Y., Nabeshima, R., Takaoka, K., Ajima, R., Lamri, L., Takeda, H., Saga, Y., Nakamura, T., and Hamada, H. (2016). Transport of the outer dynein arm complex to cilia requires a cytoplasmic protein Lrrc6. Genes Cells *21*, 728–739.
30. Kott, E., Duquesnoy, P., Copin, B., Legendre, M., Dastot-Le Moal, F., Montantin, G., Jeanson, L., Tamalet, A., Papon, J.F., Siffroi, J.P., et al. (2012). Loss-of-function mutations in LRRC6, a gene essential for proper axonemal assembly of inner and outer dynein arms, cause primary ciliary dyskinesia. Am. J. Hum. Genet. *91*, 958–964.
31. Olcese, C., Patel, M.P., Shoemark, A., Kiviluoto, S., Legendre, M., Williams, H.J., Vaughan, C.K., Hayward, J., Goldenberg, A., Emes, R.D., et al.; UK10K Rare Group (2017). X-linked primary ciliary dyskinesia due to mutations in the cytoplasmic axonemal dynein assembly factor PIH1D3. Nat. Commun. *8*, 14279.
32. Paff, T., Loges, N.T., Aprea, I., Wu, K., Bakey, Z., Haarman, E.G., Daniels, J.M.A., Sistermans, E.A., Bogunovic, N., Dougherty, G.W., et al. (2017). Mutations in PIH1D3 cause X-linked primary ciliary dyskinesia with outer and inner dynein arm defects. Am. J. Hum. Genet. *100*, 160–168.
33. Moore, D.J., Onoufriadis, A., Shoemark, A., Simpson, M.A., zur Lage, P.I., de Castro, S.C., Bartoloni, L., Gallone, G., Petridi, S., Woollard, W.J., et al. (2013). Mutations in ZMYND10, a gene essential for proper axonemal assembly of inner and outer dynein arms in humans and flies, cause primary ciliary dyskinesia. Am. J. Hum. Genet. *93*, 346–356.
34. Zariwala, M.A., Gee, H.Y., Kurkowiak, M., Al-Mutairi, D.A., Leigh, M.W., Hurd, T.W., Hjeij, R., Dell, S.D., Chaki, M., Dougherty, G.W., et al. (2013). ZMYND10 is mutated in primary ciliary dyskinesia and interacts with LRRC6. Am. J. Hum. Genet. *93*, 336–345.
35. 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.
36. Jaffe, K.M., Grimes, D.T., Schottenfeld-Roames, J., Werner, M.E., Ku, T.S., Kim, S.K., Pelliccia, J.L., Morante, N.F., Mitchell, B.J., and Burdine, R.D. (2016). c21orf59/kurly controls both cilia motility and polarization. Cell Rep. *14*, 1841–1849.
37. Dean, A.B., and Mitchell, D.R. (2015). Late steps in cytoplasmic maturation of assembly-competent axonemal outer arm dynein in *Chlamydomonas* require interaction of ODA5 and ODA10 in a complex. Mol. Biol. Cell *26*, 3596–3605.
38. Desai, P.B., Freshour, J.R., and Mitchell, D.R. (2015). *Chlamydomonas* axonemal dynein assembly locus ODA8 encodes a conserved flagellar protein needed for cytoplasmic maturation of outer dynein arm complexes. Cytoskeleton *72*, 16–28.
39. Li, Y., Klena, N.T., Gabriel, G.C., Liu, X., Kim, A.J., Lemke, K., Chen, Y., Chatterjee, B., Devine, W., Damerla, R.R., et al. (2015). Global genetic analysis in mice unveils central role for cilia in congenital heart disease. Nature *521*, 520–524.
40. Ahmed, N.T., Gao, C., Lucker, B.F., Cole, D.G., and Mitchell, D.R. (2008). ODA16 aids axonemal outer row dynein assembly through an interaction with the intraflagellar transport machinery. J. Cell Biol. *183*, 313–322.

41. Gao, C., Wang, G., Amack, J.D., and Mitchell, D.R. (2010). Oda16/Wdr69 is essential for axonemal dynein assembly and ciliary motility during zebrafish embryogenesis. Dev. Dyn. *239*, 2190–2197.
42. Lucas, J.S., Barbato, A., Collins, S.A., Goutaki, M., Behan, L., Caudri, D., Dell, S., Eber, E., Escudier, E., Hirst, R.A., et al. (2017). European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. Eur. Respir. J. *49*, 49.
43. Trump, N., McTague, A., Brittain, H., Papandreou, A., Meyer, E., Ngoh, A., Palmer, R., Morrogh, D., Boustred, C., Hurst, J.A., et al. (2016). Improving diagnosis and broadening the phenotypes in early-onset seizure and severe developmental delay disorders through gene panel analysis. J. Med. Genet. *53*, 310–317.
44. Li, H., and Durbin, R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics *26*, 589–595.
45. Garrison, E., and Marth, G. (2012). Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. arXiv 1207.3907.
46. Munye, M.M., Shoemark, A., Hirst, R.A., Delhove, J.M., Sharp, T.V., McKay, T.R., O'Callaghan, C., Baines, D.L., Howe, S.J., and Hart, S.L. (2017). BMI-1 extends proliferative potential of human bronchial epithelial cells while retaining their mucociliary differentiation capacity. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. *312*, L258–L267.
47. Hirst, R.A., Rutman, A., Williams, G., and O'Callaghan, C. (2010). Ciliated air-liquid cultures as an aid to diagnostic testing of primary ciliary dyskinesia. Chest *138*, 1441–1447.
48. Shoemark, A., Dixon, M., Corrin, B., and Dewar, A. (2012). Twenty-year review of quantitative transmission electron microscopy for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. J. Clin. Pathol. *65*, 267–271.
49. Shoemark, A., Frost, E., Dixon, M., Ollosson, S., Kilpin, K., Patel, M., Scully, J., Rogers, A.V., Mitchison, H.M., Bush, A., and Hogg, C. (2017). Accuracy of immunofluorescence in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *196*, 94–101.
50. Chilvers, M.A., Rutman, A., and O'Callaghan, C. (2003). Functional analysis of cilia and ciliated epithelial ultrastructure in healthy children and young adults. Thorax *58*, 333–338.
51. Timmons, L., and Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. Nature *395*, 854.
52. Beisson, J., Bétermier, M., Bré, M.H., Cohen, J., Duharcourt, S., Duret, L., Kung, C., Malinsky, S., Meyer, E., Preer, J.R., Jr., and Sperling, L. (2010). Silencing specific *Paramecium tetraurelia* genes by feeding double-stranded RNA. Cold Spring Harb. Protoc. *2010*, t5363.
53. Skouri, F., and Cohen, J. (1997). Genetic approach to regulated exocytosis using functional complementation in *Paramecium*: identification of the ND7 gene required for membrane fusion. Mol. Biol. Cell *8*, 1063–1071.
54. Ruiz, F., Vayssié, L., Klotz, C., Sperling, L., and Madeddu, L. (1998). Homology-dependent gene silencing in Paramecium. Mol. Biol. Cell *9*, 931–943.
55. Beisson, J., Bétermier, M., Bré, M.H., Cohen, J., Duharcourt, S., Duret, L., Kung, C., Malinsky, S., Meyer, E., Preer, J.R., Jr., and Sperling, L. (2010). Mass culture of Paramecium tetraurelia. Cold Spring Harb. Protoc. *2010*, t5362.
56. Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat. Methods *9*, 671–675.
57. Bell, W.E., Hallworth, R., Wyatt, T.A., and Sisson, J.H. (2015). Use of a novel cell adhesion method and digital measurement to show stimulus-dependent variation in somatic and oral ciliary beat frequency in Paramecium. J. Eukaryot. Microbiol. *62*, 144–148.
58. Smith, C.M., Djakow, J., Free, R.C., Djakow, P., Lonnen, R., Williams, G., Pohunek, P., Hirst, R.A., Easton, A.J., Andrew, P.W., and O'Callaghan, C. (2012). ciliaFA: a research tool for automated, high-throughput measurement of ciliary beat frequency using freely available software. Cilia *1*, 14.
59. Bengueddach, H., Lemullois, M., Aubusson-Fleury, A., and Koll, F. (2017). Basal body positioning and anchoring in the multiciliated cell *Paramecium tetraurelia*: roles of OFD1 and VFL3. Cilia *6*, 6.
60. Aubusson-Fleury, A., Cohen, J., and Lemullois, M. (2015). Ciliary heterogeneity within a single cell: the *Paramecium* model. Methods Cell Biol. *127*, 457–485.
61. van Dam, T.J., Townsend, M.J., Turk, M., Schlessinger, A., Sali, A., Field, M.C., and Huynen, M.A. (2013). Evolution of modular intraflagellar transport from a coatomer-like progenitor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *110*, 6943–6948.
62. Hauser, K., Haynes, W.J., Kung, C., Plattner, H., and Kissmehl, R. (2000). Expression of the green fluorescent protein in *Paramecium tetraurelia*. Eur. J. Cell Biol. *79*, 144–149.
63. Adoutte, A., Ramanathan, R., Lewis, R.M., Dute, R.R., Ling, K.Y., Kung, C., and Nelson, D.L. (1980). Biochemical studies of the excitable membrane of *Paramecium tetraurelia*. III. Proteins of cilia and ciliary membranes. J. Cell Biol. *84*, 717–738.
64. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. *30*, 2725–2729.
65. Kang, Y., and Mitchell, D.R. (1998). An intronic enhancer is required for deflagellation-induced transcriptional regulation of a *Chlamydomonas reinhardtii* dynein gene. Mol. Biol. Cell *9*, 3085–3094.
66. Mitchell, B.F., Pedersen, L.B., Feely, M., Rosenbaum, J.L., and Mitchell, D.R. (2005). ATP production in *Chlamydomonas reinhardtii* flagella by glycolytic enzymes. Mol. Biol. Cell *16*, 4509–4518.
67. 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.
68. Hou, Y., and Witman, G.B. (2017). The N-terminus of IFT46 mediates intraflagellar transport of outer arm dynein and its cargo-adaptor ODA16. Mol. Biol. Cell *28*, 2420–2433.
69. Mitchell, D.R., and Rosenbaum, J.L. (1985). A motile *Chlamydomonas* flagellar mutant that lacks outer dynein arms. J. Cell Biol. *100*, 1228–1234.
70. Leigh, M.W., Hazucha, M.J., Chawla, K.K., Baker, B.R., Shapiro, A.J., Brown, D.E., Lavange, L.M., Horton, B.J., Qaqish, B., Carson, J.L., et al. (2013). Standardizing nasal nitric oxide measurement as a test for primary ciliary dyskinesia. Ann. Am. Thorac. Soc. *10*, 574–581.
71. Castleman, V.H., Romio, L., Chodhari, R., Hirst, R.A., de Castro, S.C., Parker, K.A., Ybot-Gonzalez, P., Emes, R.D., Wilson, S.W., Wallis, C., et al. (2009). Mutations in radial spoke head protein genes RSPH9 and RSPH4A cause primary ciliary dyskinesia with central-microtubular-pair abnormalities. Am. J. Hum. Genet. *84*, 197–209.
72. Olbrich, H., Cremers, C., Loges, N.T., Werner, C., Nielsen, K.G., Marthin, J.K., Philipsen, M., Wallmeier, J., Pennekamp,

P., Menchen, T., et al. (2015). Loss-of-function GAS8 mutations cause primary ciliary dyskinesia and disrupt the nexin-dynein regulatory complex. Am. J. Hum. Genet. *97*, 546–554.
73. Fagerberg, L., Hallström, B.M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpoor, S., Danielsson, A., Edlund, K., et al. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. Mol. Cell. Proteomics *13*, 397–406.
74. Geremek, M., Bruinenberg, M., Ziętkiewicz, E., Pogorzelski, A., Witt, M., and Wijmenga, C. (2011). Gene expression studies in cells from primary ciliary dyskinesia patients identify 208 potential ciliary genes. Hum. Genet. *129*, 283–293.
75. Lucas, J.S., Burgess, A., Mitchison, H.M., Moya, E., Williamson, M., Hogg, C.; and National PCD Service, UK (2014). Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. Arch. Dis. Child. *99*, 850–856.
76. Galvani, A., and Sperling, L. (2002). RNA interference by feeding in *Paramecium*. Trends Genet. *18*, 11–12.
77. Li, J.B., Gerdes, J.M., Haycraft, C.J., Fan, Y., Teslovich, T.M., May-Simera, H., Li, H., Blacque, O.E., Li, L., Leitch, C.C., et al. (2004). Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. Cell *117*, 541–552.
78. Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Maréchal-Drouard, L., et al. (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. Science *318*, 245–250.
79. Stolc, V., Samanta, M.P., Tongprasit, W., and Marshall, W.F. (2005). Genome-wide transcriptional analysis of flagellar regeneration in *Chlamydomonas reinhardtii* identifies orthologs of ciliary disease genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *102*, 3703–3707.
80. Albee, A.J., Kwan, A.L., Lin, H., Granas, D., Stormo, G.D., and Dutcher, S.K. (2013). Identification of cilia genes that affect cell-cycle progression using whole-genome transcriptome analysis in *Chlamydomonas reinhardtti*. G3 (Bethesda) *3*, 979–991.
81. Kamiya, R., Kurimoto, E., and Muto, E. (1991). Two types of *Chlamydomonas* flagellar mutants missing different components of inner-arm dynein. J. Cell Biol. *112*, 441–447.
82. Fowkes, M.E., and Mitchell, D.R. (1998). The role of preassembled cytoplasmic complexes in assembly of flagellar dynein subunits. Mol. Biol. Cell *9*, 2337–2347.
83. Koutoulis, A., Pazour, G.J., Wilkerson, C.G., Inaba, K., Sheng, H., Takada, S., and Witman, G.B. (1997). The *Chlamydomonas reinhardtii* ODA3 gene encodes a protein of the outer dynein arm docking complex. J. Cell Biol. *137*, 1069–1080.
84. Taschner, M., Mourão, A., Awasthi, M., Basquin, J., and Lorentzen, E. (2017). Structural basis of outer dynein arm intraflagellar transport by the transport adaptor protein ODA16 and the intraflagellar transport protein IFT46. J. Biol. Chem. *292*, 7462–7473.
85. Blackburn, K., Bustamante-Marin, X., Yin, W., Goshe, M.B., and Ostrowski, L.E. (2017). Quantitative proteomic analysis of human airway cilia identifies previously uncharacterized proteins of high abundance. J. Proteome Res. *16*, 1579–1592.
86. Ross, A.J., Dailey, L.A., Brighton, L.E., and Devlin, R.B. (2007). Transcriptional profiling of mucociliary differentiation in human airway epithelial cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *37*, 169–185.
87. Arnaiz, O., Malinowska, A., Klotz, C., Sperling, L., Dadlez, M., Koll, F., and Cohen, J. (2009). Cildb: a knowledgebase for centrosomes and cilia. Database (Oxford) *2009*, bap022.
88. Arnaiz, O., Goût, J.F., Bétermier, M., Bouhouche, K., Cohen, J., Duret, L., Kapusta, A., Meyer, E., and Sperling, L. (2010). Gene expression in a paleopolyploid: a transcriptome resource for the ciliate *Paramecium tetraurelia*. BMC Genomics *11*, 547.
89. Wren, K.N., Craft, J.M., Tritschler, D., Schauer, A., Patel, D.K., Smith, E.F., Porter, M.E., Kner, P., and Lechtreck, K.F. (2013). A differential cargo-loading model of ciliary length regulation by IFT. Curr. Biol. *23*, 2463–2471.
90. King, S.M. (2016). Axonemal dynein arms. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *8*, 8.

Annexe 4:

La paramécie, un organisme modèle pour étudier la ciliogenèse et les maladies ciliaires.

médecine/sciences 2021 ; 37 : 632-8

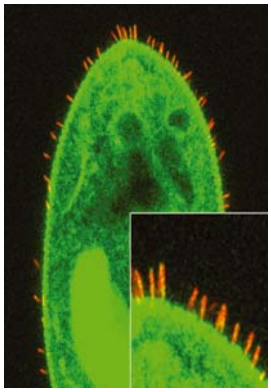
Modèles alternatifs (10)

Une série animée par Thierry Jouault

La paramécie, un organisme modèle pour étudier la ciliogenèse et les maladies ciliaires

Khaled Bouhouche, Pierrick Le Borgne, Michel Lemullois, Anne-Marie Tassin

> Le cil est une extension présente à la surface de la quasi-totalité des cellules eucaryotes. Conservé au cours de l'évolution, il assure des fonctions sensorielles et/ou motiles. Chez l'homme, le dysfonctionnement ciliaire est à l'origine de différentes maladies regroupées sous le nom de ciliopathies. Grâce à sa ciliature complexe, la paramécie constitue un modèle de choix pour étudier non seulement la structure, l'assemblage et les fonctions des cils, mais aussi pour valider les mutations de gènes associées à ces ciliopathies. <



Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institut de biologie intégrative de la cellule (I2BC), 1 avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France.
anne-marie.tassin@i2bc.paris-saclay.fr

Le cil est un organite essentiel qui est présent à la surface de la plupart des cellules eucaryotes, depuis les protistes jusqu'aux mammifères [1]. Chez les mammifères, deux grandes catégories de cils existent : les cils motiles et les cils non motiles. Le cil primaire, localisé à la surface de la quasi-totalité des cellules quiescentes (en phase G0 du cycle cellulaire), est un cil non motile, généralement présent en une seule copie, et doté de fonctions sensorielles impliquées dans la communication intercellulaire [2]. Le cil motile peut, quant à lui, être présent en copie unique, comme dans les spermatozoïdes, ou en plusieurs copies à la surface de certaines cellules épithéliales, comme les cellules des ventricules cérébraux. Grâce à leurs battements coordonnés, ces cils sont capables de produire un mouvement de fluide, afin de permettre l'évacuation du mucus, la circulation d'un liquide, ou le mouvement des ovocytes [3]. Que les cils soient motiles ou pas, leur structure est conservée au cours de l'évolution. D'architecture cylindrique, composée de neuf doublets ou triplets de microtubules, le cil est constitué de trois parties distinctes : le corps basal (dérivé du centriole père), ancré à la membrane plasmique[1] ; la zone de transition ; et l'axonème, qui forme une projection externe à la cellule et qui est entouré de sa propre membrane [4]. La zone de transition, située à la base de l'axonème, constitue une véritable barrière physique qui contrôle les échanges bidirectionnels de protéines et de lipides entre cytoplasme et compartiment ciliaire [4]. Les cils motiles se distinguent essentiellement des cils non-motiles par la présence de bras de dynéines, des moteurs moléculaires dépendant de l'ATP et associés aux microtubules, qui assurent leur battement.

La formation de ces cils, ou ciliogenèse, est une succession d'étapes cytoplasmiques, coordonnées dans le temps et dans l'espace. Elle comprend plusieurs phases clés communes à tous les cils : maturation, migration et ancrage du corps basal à une membrane (membrane vésiculaire ou membrane plasmique), puis croissance [4]. Une fois le cil formé, le corps basal nécessite d'être convenablement orienté [4]. Chez l'homme, chaque étape de la ciliogenèse peut présenter des anomalies qui sont à l'origine d'altérations des fonctions ciliaires se traduisant par un spectre d'atteintes cliniques large et complexe. Les maladies qui en découlent, à hérédité mendélienne, sont regroupées sous le terme de ciliopathies [5]. Le nombre de ces maladies témoigne de l'importance de ces structures dans le fonctionnement cellulaire des eucaryotes. Plus de 180 gènes, dont des mutations ont été associées à une ciliopathie, ont été identifiés [5]. Les nouveaux gènes détectés concernent désormais un nombre restreint de familles de patients, ce qui pose le problème de l'identification de la mutation causale parmi le polymorphisme génétique des individus. L'utilisation d'organismes modèles, dont la paramécie, permettant de

Vignette © Anne-Marie Tassin.

[1] Les cils sont assemblés à partir d'un centriole qui prend alors le nom de corps basal. Celui-là peut correspondre au centriole parental du centrosome (cil primaire) ou à des centrioles amplifiés (cils motiles). Ces centrioles s'ancrent aux membranes cellulaires.

m/s n° 6-7, vol. 37, juin-juillet 2021
https://doi.org/10.1051/medsci/2021087

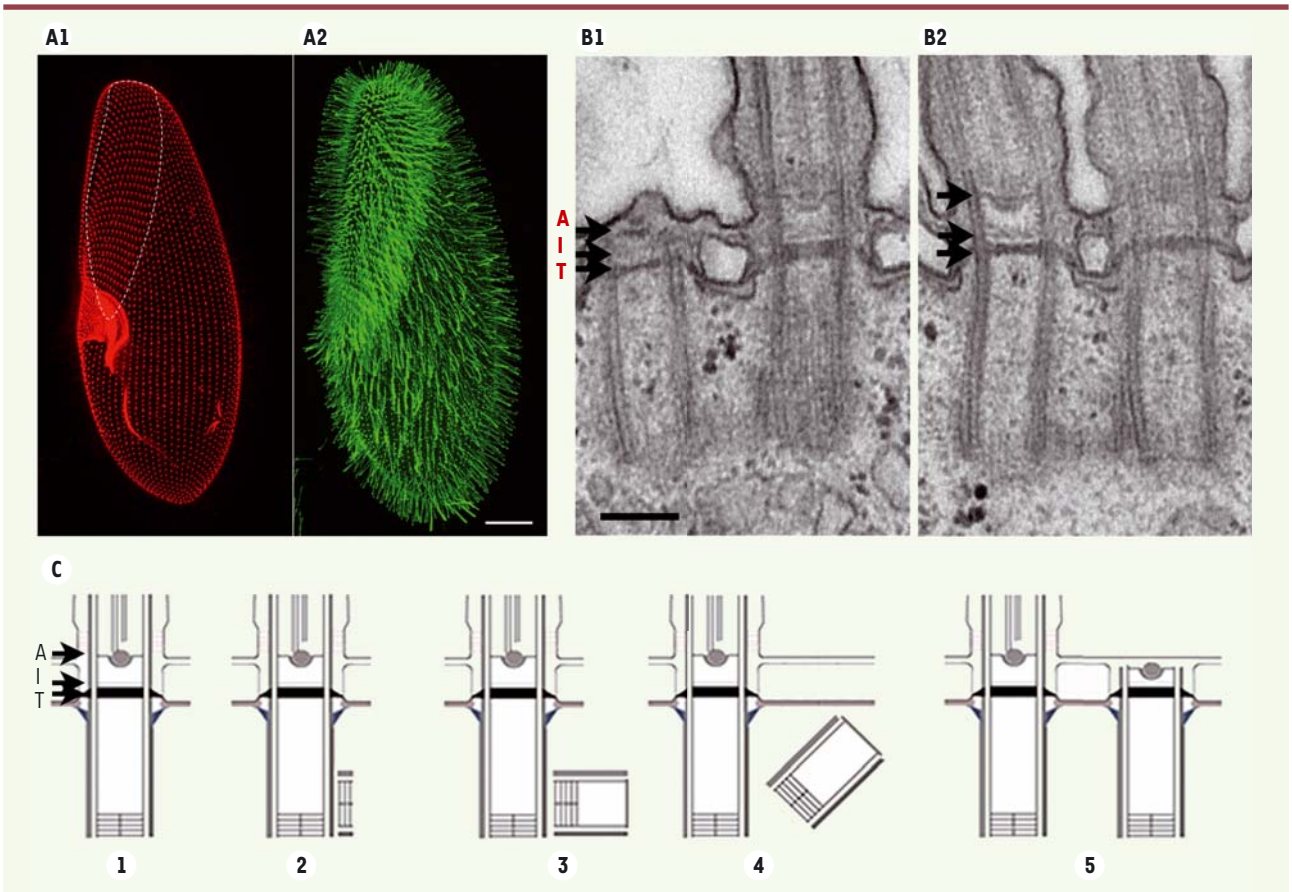


Figure 1. ***Organisation de l'appareil ciliaire de la paramécie. A.*** Organisation corticale d'une paramécie, *Paramecium tetraurelia*, après immunomarquage par l'anticorps ID5 qui se lie spécifiquement aux corps basaux (A1). Le champ invariant comportant des doublets de corps basaux ciliés est délimité par les pointillés blancs, immunomarqués par un anticorps anti-tubuline polyE marquant spécifiquement les cils (A2) (barre d'échelle : 20 µm). ***B.*** Organisation ultra-structurale de l'appareil ciliaire. Vue longitudinale d'une unité corticale présentant deux corps basaux dont seul le corps basal postérieur est cilié (B1). Vue longitudinale d'une unité corticale du champ invariant montrant deux corps basaux ciliés (B2). Les flèches indiquent la position des trois plaques constituant la zone de transition (terminale T, intermédiaire I et axosomale A). On notera l'augmentation de la taille de cette zone lorsque le corps basal est cilié (barre d'échelle : 200 nm). ***C.*** Représentation schématique du processus de duplication et d'ancrage du corps basal. Corps basal déjà ancré et cilié (1). Début de la duplication d'un nouveau corps basal (2). Élongation (3). Détachement et redressement (4). Ancrage (5).

valider très rapidement l'implication de gènes candidats dans la fonction ciliaire, est donc particulièrement importante.

Nous présentons les propriétés qui font de la paramécie un organisme de choix pour découvrir de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans certaines étapes de la ciliogenèse, notamment l'ancrage des corps basaux, pour identifier de nouvelles fonctions de certaines protéines déjà connues, et pour valider de nouveaux gènes candidats impliqués dans les ciliopathies.

La paramécie, un modèle d'étude des cils

La paramécie est un protozoaire cilié unicellulaire de la famille des *Parameciidae*, abondant dans les eaux douces et saumâtres. Sa taille est d'environ 150 µm. Son corps est recouvert de 4 000 cils vibratiles dont les battements sont nécessaires à la prise de nourriture et à la locomotion, mais aussi à la conjugaison (reproduction sexuée par fécondation réciproque). Les corps basaux des cils s'organisent en rangées longitudinales et parallèles, selon l'axe antéro-postérieur *(Figure 1A1)*, et sont insérés dans le cytosquelette sous-jacent, l'épiplasme, qui est divisé en unités corticales [6]. La polarité des corps basaux est déterminée par la position asymétrique des appendices auxquels ils sont associés. À la différence des métazoaires, chez lesquels les corps basaux dérivent de centrioles, la paramécie ne possède pas de centrosomes. Les corps basaux sont donc issus de corps basaux parentaux déjà ancrés et ciliés. Après duplication, les corps basaux nouvellement formés se redressent pour s'ancrer *(Figure 1C)*. Cet assemblage s'effectue selon une chorégraphie très précise dans le temps et dans l'espace. Des anomalies affectant cette organisation conduisent à l'apparition de phénotypes anormaux facilement détectables chez la paramécie, touchant sa viabilité, sa nage

et/ou sa forme, et directement observables et analysables en microscopie [7, 8]. Cette organisation corticale complexe et la facilité de détection et d'analyse des phénotypes font ainsi de la paramécie un excellent modèle pour étudier une panoplie de processus cellulaires, comme la duplication, la structure des corps basaux ou la motilité ciliaire. La paramécie offre également de nombreux avantages techniques qui permettent des analyses moléculaires et biochimiques rapides : (1) un outil d'inactivation génique performant, l'interférence d'ARN (ARNi), qui présente une bonne efficacité par ingestion de bactéries produisant de l'ARN double brin, et qui permet ainsi une analyse phénotypique dès la première division, aussi bien dans des cellules isolées que dans une population clonale [9] ; (2) un protocole de transgenèse suivie de marquages par des anticorps spécifiques, faciles à réaliser en microscopie à fluorescence ou électronique [10] ; (3) et des données génomiques et post-génomiques disponibles et répertoriées dans plusieurs bases de données [11, 12].

La ciliature chez la paramécie : structure et organisation

Chez la paramécie, la ciliature est organisée en deux types d'unités corticales, selon qu'elles contiennent en leur centre un (« singulet ») ou deux (« doublet ») corps basaux *(Figure 1)*. Dans la région antérieure de sa face ventrale, les unités corticales ne contiennent que des doublets de corps basaux ciliés. La région postérieure est, quant à elle, constituée uniquement de singulets ciliés. Entre ces deux régions, les unités corticales possèdent soit des singulets soit des doublets, dont seul le corps basal antérieur est cilié [6]. La duplication des corps basaux, comme celle des centrioles, est couplée à la division de la cellule. La paramécie duplique tous ses corps basaux et assemble des milliers de cils tout en continuant à nager. L'ancrage du corps basal fils n'est pas systématiquement suivi de la formation de l'axonème, et un certain nombre de corps basaux néoformés resteront sans cil ; ils deviendront ciliés au cours du cycle cellulaire suivant [7, 13].

Ancrage des corps basaux

Le processus d'ancrage des corps basaux nécessite l'interaction de leur partie distale avec la membrane plasmique. Cette étape sera à l'origine de la formation de la zone de transition, qui comporte trois plaques : terminale, intermédiaire et axosomale visible en microscopie électronique *(Figure 1B1 et B2)* [6]. Chez l'homme, des défauts d'ancrage des corps basaux ou de la formation de la zone de transition sont associés à des ciliopathies sévères, comme les syndromes de Meckel-Gruber (MKS)[2], oro-facio-digital (OFD)[3] [14], de Joubert[4], ou la néphronophtise[5] (NPHP) [15]. Christel Thauvin-Robinet *et al.* ont montré l'implication de la protéine OFD1 (*oral-facial-digital syndrome 1 protein*) et de certains de ses partenaires de liaison dans cette étape d'ancrage [16, 17]. Chez la paramécie, cette protéine assure une fonction similaire à celle décrite chez l'homme. Cette conservation fonctionnelle, des protistes à l'homme [18], valide la paramécie comme modèle d'étude du processus d'ancrage des corps basaux. L'organisation ciliaire précise de la paramécie se prête à la dissection du mécanisme moléculaire qui le contrôle. En effet, les défauts d'ancrage des corps basaux chez ce cilié sont à l'origine d'un phénotype spécifique, qui se caractérise par une altération de l'organisation corticale, et par l'apparition de corps basaux nouvellement formés dans le cytoplasme [19]. La paramécie offre ainsi une facilité d'analyse par rapport aux cellules de mammifères dans lesquelles ces défauts conduisent à une absence de cil dont l'origine nécessite d'être identifiée par des observations de coupes sériées en microscopie électronique.

Au cours de la dernière décennie, l'étude de plusieurs gènes conservés au cours de l'évolution, comme *Cen2* (*centrine2*), *Cen3* (*centrine3*), *FOR20/FOPNL* (*FOP-related protein of 20 kDa*), *OFD1* et *VFL3* (*variable flagellar number mutant 3*), a été entreprise chez la paramécie *(Figure 2)*. La déplétion de chacune de ces protéines conduit à un ensemble de phénotypes caractéristiques : arrêt de croissance de la cellule, diminution de sa taille, réduction du nombre de corps basaux présents sur le cortex et accumulation de corps basaux néoformés dans le cytoplasme *(Figure 2A2, A4)*. Alors que les protéines Cen2, FOR20/FOPNL et OFD1 sont localisées à la partie distale du corps basal [18-20], les protéines Cen3 et VFL3 se situent au niveau de la partie proximale du corps basal père, respectivement au niveau des fibres striées [18] et d'une structure cytosquelettique appelée ALF (*anterior left filament*) [21]. Cen2, FOR20 et OFD1 seraient donc impliquées dans la formation de la partie distale du corps basal néoformé et seraient nécessaires à son ancrage *(Figure 2 B1-B4)*. VFL3 définirait, quant à elle, la polarité rotationnelle du corps basal qui est nécessaire à son positionnement [18] *(Figure 2 B6 et B7)*. Cen3 contrôlerait son redressement et son orientation dans le cortex [21] *(Figure 2 B8)*. La chronologie d'action de ces protéines indique que Cen2 agit au début du processus. Elle sera suivie de l'action d'OFD1 et de FOR20, recrutées de façon interdépendante. Contrairement à OFD1, le recrutement de FOR20 nécessite la

[2] Le syndrome de Meckel-Gruber est une maladie monogénique caractérisée par la combinaison de kystes rénaux et de plusieurs manifestations associées, incluant des anomalies de développement du système nerveux central et une polydactylie.

[3] Le syndrome oro-facio-digital est un trouble neuro-développemental caractérisé par des anomalies variables, incluant des malformations externes (craniofaciales et digitales) et une atteinte possible du système nerveux central (SNC) et des viscères.

[4] Le syndrome de Joubert est caractérisé par une malformation congénitale du tronc cérébral et une agénésie (une absence de formation d'un organe ou d'un membre lors de l'embryogenèse) ou une hypoplasie du vermis cérébelleux, entraînant des troubles respiratoires, un nystagmus (un mouvement d'oscillation involontaire et saccadé du globe oculaire causé par une perturbation de la coordination des muscles oculomoteurs), une hypotonie, une ataxie (un manque de coordination fine des mouvements volontaires) et un retard du développement moteur.

[5] La néphronophtise est une néphropathie tubulo-interstitielle chronique, parfois associée à des signes extra-rénaux.

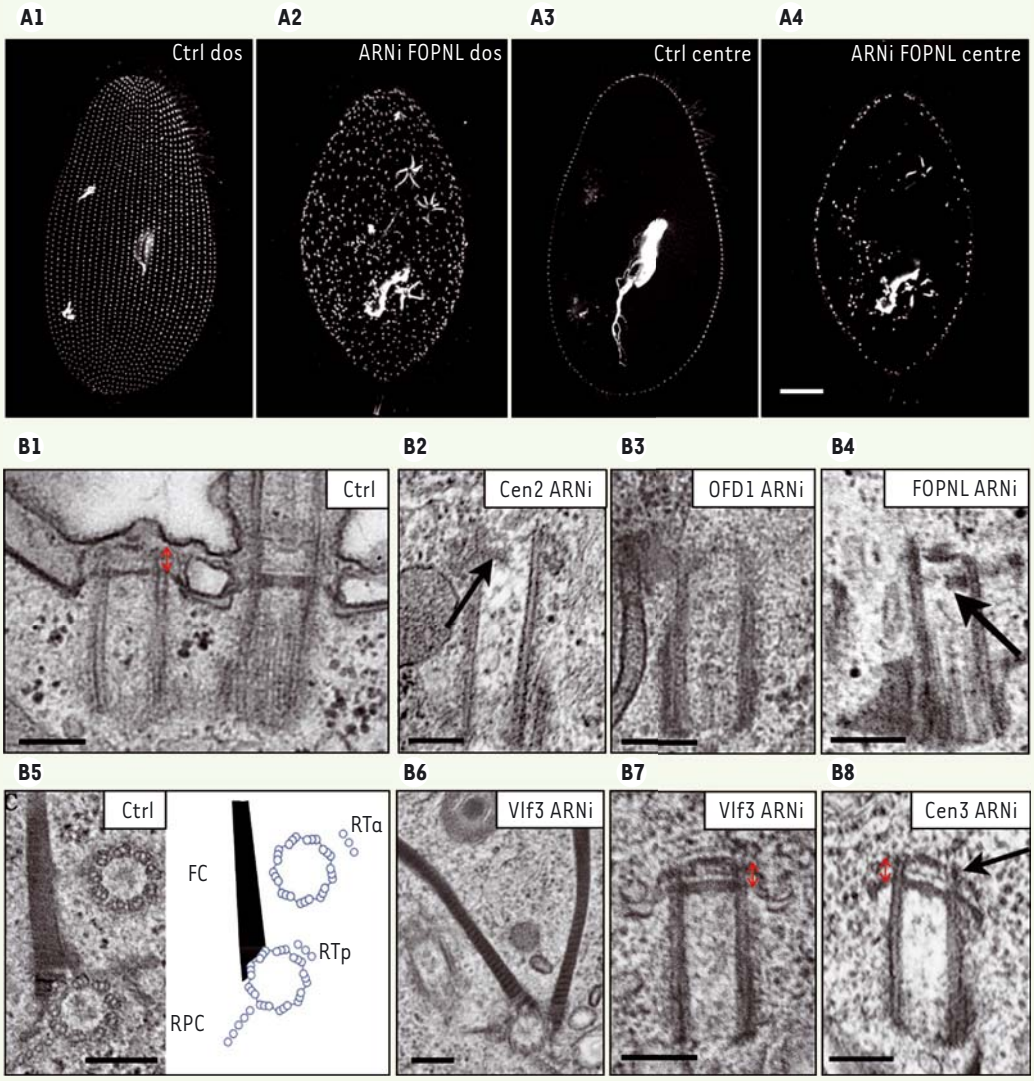


Figure 2. ***Phénotypes correspondant à l'inactivation de gènes intervenant dans le positionnement des corps basaux. A.*** Paramécies marquées par l'anticorps ID5. Organisation corticale dorsale d'une cellule témoin (Ctrl) (A1) et d'une cellule dont le gène *FOPNL* a été inactivé (A2). Coupes optiques du cytoplasme d'une cellule témoin (A3) et d'une cellule dont le gène *FOPNL* a été inactivé (A4). On observe une désorganisation de l'agencement des corps basaux accrochés à la membrane et la présence de nombreux corps basaux néoformés et intracytoplasmiques. ***B.*** Observation ultrastructurale des corps basaux. Vue longitudinale d'une unité corticale avec deux corps basaux, dont un seul est cilié, dans une cellule témoin (Ctrl) (B1) ou après inactivation des gènes : *Cen2* (B2), *OFD1* (B3), *FOPNL* (B4), *Vfl3* (B7) et *Cen3* (B8). La flèche montre les défauts dans la partie distale du corps basal. Vue transversale d'une unité corticale avec deux corps basaux au niveau des racines ciliaires et représentation schématique de cette unité corticale (B5). Fc : fibre cinétodesmale, RTC : racine microtubulaire post-ciliaire, RTa : racine microtubulaire transverse antérieure, RTp : racine microtubulaire transverse postérieure. Après inactivation du gène *Vfl3* (B6), on note la présence d'une fibre cinétodesmale surnuméraire, suggérant la perte de la polarité rotationnelle. La double flèche rouge indique la hauteur de la zone de transition (barre d'échelle : 200 nm). Toutes les images de microscopie électronique sont réalisées par M. Lemullois et ont été adaptées à partir des articles [18] et [20]. http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) [20].

localisation correcte de Cen2 tandis que VFL3 permet le recrutement de Cen3. Des résultats similaires ont été obtenus chez certains mammifères [17] et plathelminthes [22], ce qui suggère une conservation de ces fonctions au cours de l'évolution et démontre, une fois encore, que la paramécie est un modèle puissant pour examiner et analyser ces processus.

L'implication de la zone de transition dans la cassure des cils

La zone de transition contrôle le trafic des molécules entre le compartiment cytoplasmique et le compartiment ciliaire [4]. Ce contrôle semble être effectué par les fibres

de transition localisées à la base de ce dernier, et par des liens, en Y, qui relient les doublets de microtubules de l'axonème à la membrane du cil. De nombreuses protéines de la zone de transition ont été identifiées [23] : les protéines CEP290 (*centrosomal protein 290*) et RPGRIP1L (*retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein 1-like protein*), permettant le recrutement de deux complexes protéiques majeurs, MKS (*Meckel-Gruber syndrome*) et NPHP (*nephronophtysis*), qui agissent ensemble pour assurer la biogenèse et le bon fonctionnement de cette zone. Son importance dans le fonctionnement ciliaire a été démontrée : des mutations touchant des gènes codant des protéines localisées dans cette zone sont en effet associées à des ciliopathies sévères [5]. Les protéines TMEM (*transmembrane protein*)216 et TMEM107 qui appartiennent au module MKS, la protéine NPHP4 du complexe NPHP, et les deux protéines pivots CEP290 et RPGRIP1L, sont conservées chez la paramécie [7]. Comme dans les autres modèles ciliaires étudiés, elles s'organisent en symétrie d'ordre 9, autour de l'axonème. Elles assurent la biogenèse et la fonction de la zone de transition. Delphine Gogendeau *et al.* [7] ont découvert une nouvelle fonction pour ces protéines : le contrôle de la déciliation. Chez la paramécie, la déciliation peut être physiologique, comme lors de la conjugaison [24], ou induite expérimentalement par un traitement chimique (Ca^{2+}/éthanol [EtOH]) et mécanique [7]. Les paramécies qui n'expriment plus ces protéines présentent en effet un comportement de nage anormal, associé à un ralentissement de leur croissance, mais sans altération des étapes de duplication et d'ancrage des corps basaux. Les cils de cellules dont les gènes *TMEM216* ou *TMEM107* ont été inactivés, sont libérés dans le milieu extracellulaire, puis de nouveaux cils repoussent. L'absence de ces deux protéines semble ainsi affaiblir les cils qui ne résistent plus à la force exercée par les battements ciliaires. Les observations en microscopie électronique révèlent que le plan de cassure de ces cils coïncide avec la plaque axosomale de la zone de transition. Contrairement à TMEM107 et TMEM216, la déplétion des gènes codant CEP290, RPGRIP1L ou NPHP4 empêche la déciliation induite chimiquement. Cela est sans doute dû à une dérégulation du flux des ions Ca^{2+} au niveau de la zone de transition [7]. En plus de leurs fonctions déjà établies, ces protéines conservées de la zone de transition sont donc impliquées dans un autre processus cellulaire, la déciliation.

La déciliation est observée dans les épithéliums multiciliés des vertébrés. Par exemple, dans l'oviducte des oiseaux et des mammifères, les cellules rompent leurs cils lors de la phase lutéale du cycle menstruel [25]. De même, dans les cellules rénales de la lignée IMCD3 (*inner medullary collecting duct*) en culture, la perte de cil, qui est un comportement normal du cil primaire lors du cycle cellulaire, s'effectue majoritairement par cassure [26]. Comme chez les protistes, la cassure du cil chez les vertébrés s'effectue au niveau de la zone de transition, suggérant une conservation de ce processus assuré par les protéines de cette zone, au cours de l'évolution. Ces données ouvrent ainsi de nouvelles perspectives dans la compréhension du processus de ciliation/déciliation.

La paramécie : organisme modèle de la dyskinésie ciliaire primitive

La grande majorité des ciliopathies connues sont causées par le dysfonctionnement des cils primaires. Les défauts des cils motiles entraînent, quant à eux, un syndrome nommé dyskinésie ciliaire primitive (DCP). Les analyses approfondies des mécanismes moléculaires contrôlant l'assemblage et la fonction des cils, menées au cours de ces dernières années grâce à l'utilisation d'organismes modèles, ont permis de comprendre les bases moléculaires de ces ciliopathies.

La DCP est caractérisée principalement par des infections récurrentes des voies respiratoires supérieures et inférieures, causées par une altération de l'épuration mucociliaire, par une stérilité masculine, ou par une disposition des organes internes inversée (*situs inversus*)[6] [3, 27]. Une quarantaine de gènes ayant des mutations à l'origine de la DCP ont été identifiés. L'un des défauts structuraux ciliaires le plus fréquemment retrouvés est l'absence des bras de dynéine internes et externes, du fait de mutations touchant les gènes codant des protéines impliquées dans l'assemblage et/ou le transport de ces bras de dynéine [3].

La paramécie permet de tester en quelque semaines l'implication de nouveaux gènes candidats dans la DCP. Une collaboration fructueuse entre équipes travaillant sur ce modèle et des généticiens cliniciens a permis d'identifier trois gènes candidats de la maladie : *C11orf70* (*chromosome 11 open reading frame 70*)[7], *DNAH9* (*dynein axonemal heavy chain 9*) et *TTC12* (*tetratricopeptide repeat domain 12*) [28-30]. Les expériences d'interférence par ARN (ARNi) réalisées sur la paramécie ont en effet montré que la perte de fonction de chacun de ces gènes conduit à une diminution de sa vitesse de nage *(Figure 3A et B)* et de la fréquence de battement ciliaire, ainsi qu'à une formation partielle, voire à l'absence, des bras de dynéines *(Figure 3C)*. Les analyses de localisation subcellulaire, de même que des expériences biochimiques, ont révélé que C11orf70 est majoritairement présente dans le cytoplasme mais aussi au niveau des cils. La combinaison des expériences de déciliation/reciliation, de déplétion d'un des IFT (*intraflagellar transport*)[8], et de localisation a montré que la protéine codée par *C11orf70* se comportait comme un IFT *(Figure 3D)*. Cette protéine pourrait donc assurer le repliement correct des complexes dynéines dans le cytoplasme, et interagir avec les complexes IFT et transporter ces derniers dans le cil jusqu'à leur étape d'ancrage [28].

[6] Position en miroir par rapport à leur disposition normale.

[7] ou *CFAP300* (*cilia and flagella-associated protein 300*).

[8] *Intraflagellar transport* (IFT) : processus de transport bidirectionnel par lequel les constituants du cil sont acheminés. Ce processus implique des complexes protéiques de grande taille, appelés pour cette raison « *IFT particles* » et plus communément IFT.

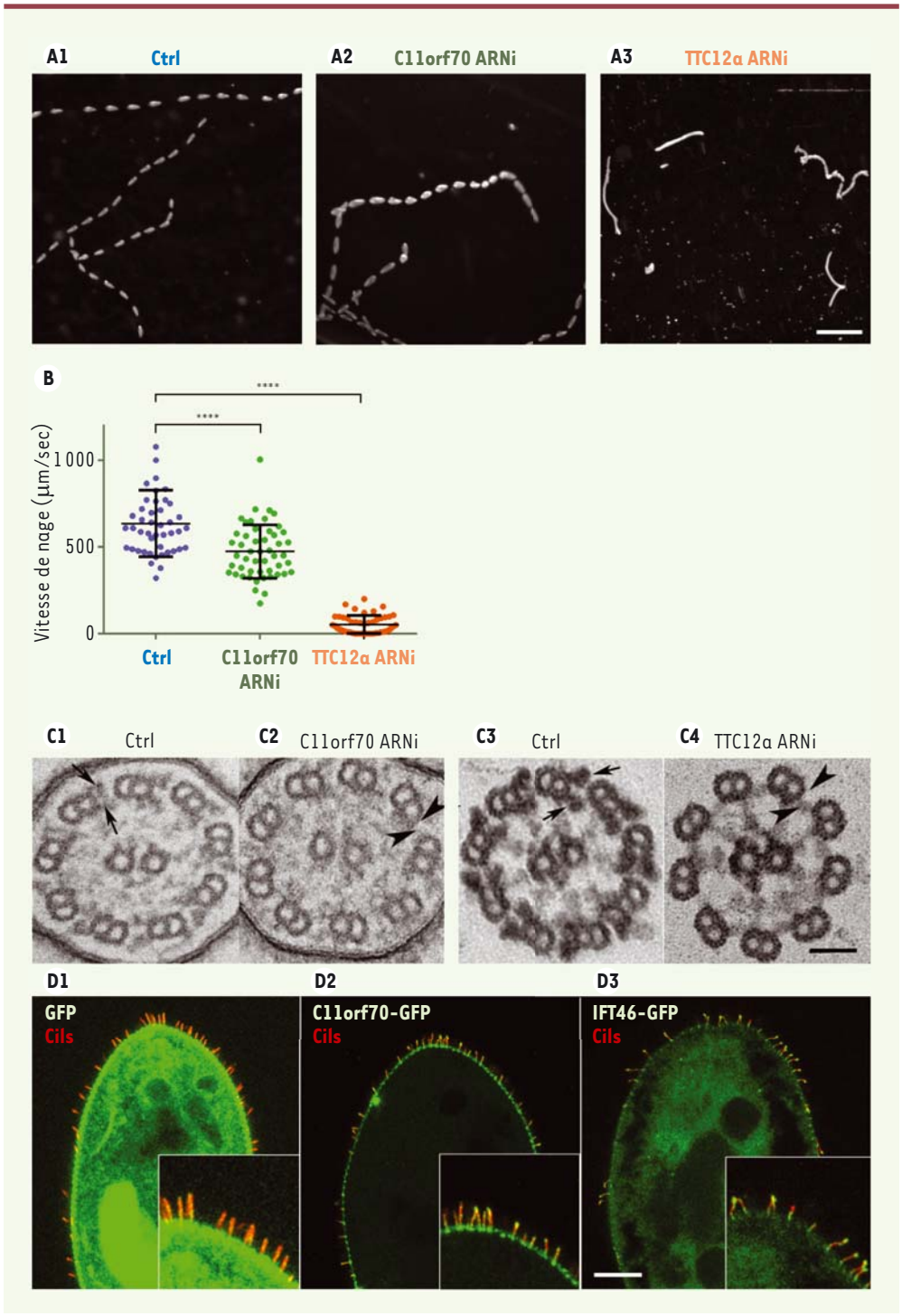


Figure 3. La paramécie, un modèle d'étude pour les dyskinésies ciliaires primitives (DCP). ***A.*** Suivi de la trajectoire de nage des cellules témoins (Ctrl) (A1), ou dont les gènes *C11orf70* (A2) ou *TTC12α* (A3) ont été inactivés, analysée par vidéo microscopie pendant une durée de 10 s, avec une acquisition toutes les 0,3 s. Une projection en Z de toutes les images du film permet d'obtenir la trajectoire. L'espacement entre deux points est directement relié à la vitesse de nage. ***B.*** Quantification de la vitesse moyenne de nage d'une cinquantaine de cellules par condition. Chaque point représente la vitesse moyenne de nage d'une paramécie. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard à la moyenne. Test t de Student : **** : $p < 0{,}0001$. ***C.*** Coupes transverses en microscopie électronique d'un axonème de cil, issues de cellule témoins (Ctrl) ou dont le gène *C11orf70* a été inactivé (C2), obtenues après une fixation par glutaraldéhyde/acide osmique. La perméabilisation suivie d'une fixation glutaraldéhyde/acide tannique/acide osmique permet de mieux visualiser les bras de dynéines de la cellule témoin (C3) et de la cellule dont le gène *TTC12* a été inactivé (C4). Les flèches indiquent la présence des bras internes et externes de dynéines et les têtes de flèche indiquent l'absence de ces bras (barre d'échelle : 50 nm). ***D.*** Localisation des protéines couplées à la GFP (*green fluorescent protein*), C11orf70-GFP et IFT46-GFP au cours de la reciliation chez la paramécie. Les cellules sont déciliées transitoirement par une solution Ca^{2+}/EtOH. Après lavage en milieu de culture (15 min), les cellules sont fixées et immunomarquées par un anticorps anti-tubuline polyE (rouge) pour observer les cils. La localisation de la GFP (D1), de C11orf70-GFP (D2) et IFT46-GFP (D3) est observée par fluorescence directe (barre d'échelle 20 µm).

Conclusion

La paramécie représente donc un modèle de choix pour comprendre les mécanismes moléculaires gouvernant les processus de la ciliogenèse et pour décrire l'architecture moléculaire sous-jacente des cils. L'étude comparative de ces processus cellulaires dans des organismes modèles éloignés d'un point de vue évolutif (paramécie, planaire, *Caenorabditis elegans*,

drosophile, poisson-zèbre et mammifères) permettra d'identifier des mécanismes communs ou spécifiques pouvant être responsables des divergences potentielles observées chez l'homme dans différents tissus. ◊

SUMMARY

Paramecium, a model organism to study ciliogenesis and ciliopathies

The cilium is a cell extension forming a distinct compartment of eukaryotic cell body with a complex and dynamic structure. This structure is highly conserved across species and ensures various functions as sensory and motility. In humans, ciliary dysfunction results in diseases (ciliopathies) that can affect all organs. Thanks to its complex ciliary structure, the unicellular and ciliated microorganism, *Paramecium*, constitutes a model of choice not only to study the structure, assembly and function of cilia but also to validate the specific role of mutations of genes linked to the ciliopathies. ◊

REMERCIEMENTS

Les auteurs saluent la mémoire de Janine Beisson (1931-2020), qui a introduit le modèle de paramécie en France et a largement contribué à la connaissance de ce modèle et des processus ciliaires. Nous remercions les co-auteurs des publications originales et particulièrement France Koll pour la lecture critique du manuscrit. Les auteurs remercient l'ANR ANR-15-CE11-0002-01 to AMT.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Hodges ME, Scheumann N, Wickstead B, *et al.* Reconstructing the evolutionary history of the centriole from protein components. *J Cell Sci* 2010 ; 123 : 1407-13.
2. Eggenschwiler JT, Anderson KV. Cilia and developmental signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007 ; 23 : 345-73.
3. Mitchison HM, Valente EM. Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. *J Pathol* 2017 ; 241 : 294-309.
4. Reiter JF, Blacque OE, Leroux MR. The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO Rep* 2012 ; 13 : 608-18.
5. Reiter JF, Leroux MR. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017 ; 18 : 533-47.
6. Tassin A-M, Lemullois M, Aubusson-Fleury A. Paramecium tetraurelia basal body structure. *Cilia* 2015 ; 5 : 6.
7. Gogendeau D, Lemullois M, Le Borgne P, *et al.* MKS-NPHP module proteins control ciliary shedding at the transition zone. *PLoS Biol* 2020 ; 18 : e3000640.
8. Ponsard C, Skowron-Zwarg M, Seltzer V, *et al.* Identification of ICIS-1, a new protein involved in cilia stability. *Front Biosci J Virtual Libr* 2007 ; 12 : 1661-9.
9. Beisson J, Bétermier M, Bré M-H, *et al.* Silencing specific Paramecium tetraurelia genes by feeding double-stranded RNA. *Cold Spring Harb Protoc* 2010 ; 2010 : pdb.prot5363.
10. Beisson J, Bétermier M, Bré MH, *et al.* DNA microinjection into the macronucleus of paramecium. *Cold Spring Harb Protoc* 2010 ; 2010 : pdb.prot5364.
11. Arnaiz O, Cain S, Cohen J, *et al.* ParameciumDB: a community resource that integrates the Paramecium tetraurelia genome sequence with genetic data. *Nucleic Acids Res* 2007 ; 35 : D439-4.
12. Arnaiz O, Cohen J, Tassin A-M, *et al.* Remodeling Cildb, a popular database for cilia and links for ciliopathies. *Cilia* 2014 ; 3 : 9.
13. Iftode F, Fleury-Aubusson A. Structural inheritance in Paramecium: ultrastructural evidence for basal body and associated rootlets polarity transmission through binary fission. *Biol Cell* 2003 ; 95 : 39-51.
14. Bruel AL, Franco B, Duffourd Y, *et al.* Fifteen years of research on oral-facial-digital syndromes: from 1 to 16 causal genes. *J Med Genet* 2017 ; 54 : 371-80.
15. Failler M, Gee HY, Krug P, *et al.* Mutations of CEP83 cause infantile nephronophthisis and intellectual disability. *Am J Hum Genet* 2014 ; 94 : 905–14.
16. Thauvin-Robinet C, Thomas S, Sinico M, *et al.* OFD1 mutations in males: phenotypic spectrum and ciliary basal body docking impairment. *Clin Genet* 2013 ; 84 : 86-90.
17. Chevrier V, Bruel A-L, Van Dam TJP, *et al.* OFIP/KIAA0753 forms a complex with OFD1 and FOR20 at pericentriolar satellites and centrosomes and is mutated in one individual with oral-facial-digital syndrome. *Hum Mol Genet* 2016 ; 25 : 497-513.
18. Bengueddach H, Lemullois M, Aubusson-Fleury A, *et al.* Basal body positioning and anchoring in the multiciliated cell Paramecium tetraurelia: roles of OFD1 and VFL3. *Cilia* 2017 ; 6 : 6.
19. Ruiz F, Garreau de Loubresse N, Klotz C, *et al.* Centrin deficiency in Paramecium affects the geometry of basal-body duplication. *Curr Biol CB* 2005 ; 15 : 2097-106.
20. Aubusson-Fleury A, Lemullois M, Garreau de Loubresse N, *et al.* The conserved centrosomal protein FOR20 is required for assembly of the transition zone and basal body docking at the cell surface. *J Cell Sci* 2012 ; 125 : 4395-404.
21. Jerka-Dziadosz M, Koll F, Włoga D, *et al.* A Centrin3-dependent, transient, appendage of the mother basal body guides the positioning of the daughter basal body in paramecium. *Protist* 2013 ; 164 : 352-68.
22. Basquin C, Ershov D, Gaudin N, *et al.* Emergence of a bilaterally symmetric pattern from chiral components in the planarian epidermis. *Dev Cell* 2019 ; 51 : 516-25.e5.
23. Gonçalves J, Pelletier L. The ciliary transition zone: finding the pieces and assembling the gate. *Mol Cells* 2017 ; 40 : 243-53.
24. Watanabe T. A scanning electron-microscopic study of the local degeneration of cilia during sexual reproduction in paramecium. *J Cell Sci* 1978 ; 32 : 55-66.
25. Brenner RM. Renewal of oviduct cilia during the menstrual cycle of the rhesus monkey. *Fertil Steril* 1969 ; 20 : 599-611.
26. Mirvis M, Siemers KA, Nelson WJ, *et al.* Primary cilium loss in mammalian cells occurs predominantly by whole-cilium shedding. *PLoS Biol* 2019 ; 17 : e3000381.
27. Lucas JS, Burgess A, Mitchison HM, *et al.* Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Arch Dis Child* 2014 ; 99 : 850-6.
28. Fassad MR, Shoemark A, Le Borgne P, *et al.* C11orf70 Mutations disrupting the intraflagellar transport-dependent assembly of multiple axonemal dyneins cause primary ciliary dyskinesia. *Am J Hum Genet* 2018 ; 102 : 956-72.
29. Fassad MR, Shoemark A, Legendre M, *et al.* Mutations in outer dynein arm heavy chain dnah9 cause motile cilia defects and situs inversus. *Am J Hum Genet* 2018 ; 103 : 984-94.
30. Thomas L, Bouhouche K, Whitfield M, *et al.* TTC12 Loss-of-Function mutations cause primary ciliary dyskinesia and unveil distinct dynein assembly mechanisms in motile cilia versus flagella. *Am J Hum Genet* 2020 ; 106 : 153-69.

TIRÉS À PART

A.M. Tassin

Tarifs d'abonnement *m/s* - 2021

Abonnez-vous à *médecine/sciences*

> Grâce à *m/s*, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement page 670 dans ce numéro de *m/s*