



HAL
open science

Contrôle neurologique de la maintenance d'un axe droit : comment des défauts ciliaires conduisent à l'émergence de la scoliose idiopathique ?

Morgane Djebbar

► To cite this version:

Morgane Djebbar. Contrôle neurologique de la maintenance d'un axe droit : comment des défauts ciliaires conduisent à l'émergence de la scoliose idiopathique ?. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS185 . tel-04364400

HAL Id: tel-04364400

<https://theses.hal.science/tel-04364400>

Submitted on 27 Dec 2023

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.

THÈSE DE DOCTORAT DE
SORBONNE UNIVERSITÉ

Préparée à l'Institut de Biologie Paris Seine
École doctorale « Complexité du Vivant » ED515

Présentée par

Morgane Djebar

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de SORBONNE UNIVERSITÉ

Contrôle neurologique de la maintenance d'un axe droit : comment des défauts ciliaires conduisent à l'émergence de la scoliose idiopathique ?

Thèse soutenue le 26 juin 2023 devant le jury composé de :

Président du jury	Jean-Pierre Levraud Directeur de Recherche – Université Paris-Saclay, Paris
Rapporteur	Alexandre Benmerah Directeur de recherche – Université de Paris
Rapportrice	Nathalie Jurisch-Yaksi Directrice de recherche - Université norvégienne des sciences et technologies, Norvège
Examinatrice	Ruxandra Bachmann-Gagescu Assistante professeur - Université de Zurich, Suisse
Examinatrice	Coralie Fassier Chargée de recherche – Sorbonne Université
Directrice de thèse	Christine Vesque Chargée de recherche – Sorbonne Université

*A mes parents et mon frère bien-aimés.
A David.*

« Et tu sais, ce qui est troublant, dans la vie, c'est que tout ce qui nous arrive, en positif comme en négatif, en joies comme en drames, sert secrètement un seul but : éveiller notre conscience, car c'est seulement là que nous devenons pleinement nous-mêmes. »

Laurent Gounelle

Remerciements

Voici 4 années de thèse qui s'achèvent et qui n'auraient pas pu être réalisées sans la présence et le soutien de personnes incroyables que j'ai croisées au cours de cette expérience.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse qui ont accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Certains viennent de loin, c'est un honneur de pouvoir présenter mes travaux devant eux : Alexandre Benmerah, Nathalie Jurisch-Yaksi, Ruxandra Bachmann, Coralie Fassier, Jean-Pierre Levraud.

Je souhaite remercier Sylvie pour la confiance qu'elle m'a accordée afin d'avoir la chance de travailler dans son équipe. Merci de t'être rendu disponible pour toujours nous apporter de très bons conseils et pour l'aide que tu nous as apportée dans certaines expériences. Cela a été un honneur de travailler dans cette équipe.

Je souhaite remercier Christine, ma directrice de thèse, pour son soutien, son expertise et son inspiration tout au long de la réalisation de cette thèse. Sans sa guidance et ses encouragements, cette aventure n'aurait pas été possible. Ta perspicacité, ton expérience et ta passion pour la recherche m'ont inspiré et m'ont encouragé à aller au-delà de mes limites pour donner le meilleur de moi-même. Enfin, je tiens à te remercier pour ta bienveillance. Tu as toujours été là pour moi, que ce soit pour discuter de la recherche ou simplement pour écouter.

Je souhaite remercier tous les membres présents de mon équipe : Isabelle, Aline, Laura, Pierre-Luc, Amina, Antonia, Ludovica, Martin, Valentina, (et Alexis, même si tu t'obstines à dire que tu es unique dans ton équipe haha) et passé Antoine. Merci à toi Isabelle pour l'aide incroyable que tu m'as apportée pendant ma thèse, et pendant toutes ces longues expériences (qui ont fini par payer !!). Cela a été un réel plaisir de pouvoir travailler à tes côtés, et de voir ta capacité à toujours trouver une solution pour chaque problème qui nous affrontions. Merci de toujours penser à nos anniversaires, aux petites fêtes comme Pâques, et à tes délicieuses « Charlottes » !! Saches que tu fais un travail remarquable et que tu nous es tous d'une grande aide. Ludovica, tu as

été mon binôme pendant tous ces années de thèse et je suis tellement reconnaissante de t'avoir rencontrée. Ça a été un réel plaisir de partager ce bureau avec toi, merci pour tous les échanges sur tous les sujets possibles et imaginables. Merci pour ta bonne humeur solaire et ton soutien quotidien lorsque le moral n'était pas forcément au beau jour. Tu as été une réelle amie et j'espère qu'on aura l'occasion de se revoir après. Merci à Antonia et Amina pour tous les moments au laboratoire et hors thèse que l'on a passés ensemble. Vous avez été de vrais rayons de soleil. J'ai adoré découvrir toutes les traditions de l'Allemagne d'Antonia et j'ai adoré passer ces quelques jours à Cologne avec toi. Merci à Aline pour ta bonne humeur et ton côté positif ! Tu m'as beaucoup soutenu pendant cette thèse et je t'en suis reconnaissante. J'ai adoré nos pauses quand tu venais nous voir Ludovica et moi pour relâcher la pression, et qu'on finissait par refaire le monde. C'était vraiment super sympa d'avoir l'occasion de prendre des verres tous ensemble et j'espère qu'on aura l'opportunité de refaire ça. Merci à toi Alexis pour ton aide dans les expériences de biologie moléculaire, mais aussi pour ton assistance « SOS plantes ». Tu as été la petite voix (démoniaque) qui nous as tous fait culpabiliser de prendre un peu de temps. Merci à Pierre-Luc pour avoir toujours un regard « nouveau » sur mes résultats : tu m'as aidé à remettre des hypothèses en question et j'ai toujours trouvé nos échanges très enrichissants. Merci pour ton aide précieuse sur Matlab. Merci à toi Martin pour nos nombreuses conversations, tu es un vrai puits de connaissances, et ça a été un réel plaisir de pouvoir discuter avec toi. Merci Laura pour ta gentillesse au quotidien et ton aide pour les génotypages. Tu as toujours les mots qu'il faut et j'espère que tu t'épanouiras, qu'importe le futur laboratoire que tu rejoindras dans le futur.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe Breau, Marie, Karen, Marion, Pénélope, Clara, Melody et Pauline. Merci à Marie, Karen, Marion et Melody pour tous vos conseils. Vous avez toujours eu un œil nouveau et de très bonnes idées pour mes expériences lors des nombreuses réunions de laboratoire. Je vous remercie pour ces moments de convivialité que nous avons partagés. Pénélope, tu as été un réel pilier pendant cette thèse. Merci pour tous les moments de pauses que l'on a passés et pour tous tes conseils dans les expériences. Merci d'avoir été l'oreille qui m'a écouté me plaindre quand ça n'allait pas (et quand ça allait aussi !) et de m'avoir fait rire au quotidien. J'ai vraiment passé de super moments hors thèse avec toi autour de tous les verres de vin que l'on a pris et sur le « Dance-Floor ». J'ai trouvé une amie en or

et je suis ravie de te compter parmi mes amies proches. Merci à Clara pour ta bonne humeur et ton humour, tu as toujours les mots qu'il faut pour voir les situations à moitié pleines. Merci pour tous les moments que l'on a passé ensemble aussi bien aux pauses café que pendant les soirées raclettes/fondues/frites. Je remercie également Pauline pour tous ces moments. Tu as été la première personne que j'ai rencontrée au laboratoire, et même si nous n'étions pas dans la même équipe, j'ai passé de supers moments lorsque l'on se croisait dans les couloirs, sur le point de partir, et qu'on finissait par discuter des heures. Je suis vraiment très heureuse que l'on continue à se voir et j'ai hâte de fêter un de tes moments heureux cet été.

Merci à toutes les personnes que j'ai croisées au 7^{ème} étage et appartenant aux autres équipes, notamment Mathieu, Johnny, Raphaëlle, Ronan, Valérie, Béatrice. Johnny et Raphaëlle, merci pour tous ces moments aux pauses café, à nos arrêts dans le couloir à parler sans se rendre compte que le temps passe. A votre soutien au cours de ma thèse, et à tous ces verres en dehors du laboratoire. Grâce à la thèse, j'ai pu vous rencontrer et j'en ressors avec des amis chers ! Merci Ronan et Valérie pour tous vos mots au quotidien qui ont su me donner le sourire. Merci pour toutes ces bières aux Friday session, vous faites toujours partis de la team des jeunes et j'ai hâte de fêter ça à Ibiza avec vous haha !

Merci au personnel du secrétariat Hafida, Isabelle, Hari, Chimène, Pierre-Yves pour votre efficacité et pour votre aide au quotidien. Merci également aux personnes de la laverie pour leur sourire quotidien et leurs petits mots qui réchauffent le cœur.

Je souhaite remercier toutes les personnes que j'ai croisé dans l'IBPS qu'elles soient encore présentes ou parties et avec qui j'ai eu de très beaux moments : Marie-Ange, Giovanna, Antoine, Pénélope, Baptiste.

Merci à l'équipe de l'animalerie aquatique Karim, Édouard, Jeremy, Marco et Sylvie pour l'aide pendant la réalisation d'une grosse expérience de traitement de drogue. Vous avez été un soutien technique incroyable, nous permettant de réaliser l'expérience dans les meilleures conditions. Merci pour vos sourires au quotidien et vos blagues qui ont su apporter de la lumière à mes journées.

Merci à l'équipe de la plateforme d'imagerie Chloé, France, Jean-François, Suzanne pour votre aide et votre assistance technique au quotidien.

Je tiens à remercier à Hafeida, Patrick, Adrien, Adlah, Virginie, Mina, Shéhérazade pour leur soutien inébranlable. Merci d'avoir été l'oreille qui m'a écouté me plaindre quand les expériences ne marchaient pas ou celle qui m'a écouté m'enthousiasmer quand nous avons découvert des résultats excitants. Vous ne comprenez toujours pas trop ce que j'étudie (allez j'exagère, Adrien ne s'en sort pas trop mal haha), mais vous avez toujours su me remonter le moral et trouver les mots justes. Merci de toujours me pousser à donner le meilleur de moi-même, c'est en partie grâce à vous que j'ai réussi à aller si loin.

Merci à David pour son soutien incroyable au cours de ces 4 années de thèse, merci pour tous ces moments de bonheur qui m'ont permis de me sortir la tête de l'eau. Tu es l'esprit tranquille qui permet d'apaiser mes maux et me permet de relativiser. Merci de toujours essayer de me sortir de ma zone de confort et de me pousser à donner le meilleur. Tu as vécu ces 3 mois d'enfermements en partie avec moi, et j'ai hâte de pouvoir fêter et continuer ma vie avec toi.

Merci à mes amis de Master 2, Barbara, Mathilde, Maëlys, Ismahan, Nate. Malgré la thèse qui nous accapare tous (ou médecine d'ailleurs !), on a toujours su se soutenir. Merci pour tous ces moments de détente et de rire. Nos partages au quotidien m'ont fait me sentir moins seule quand les expériences ne marchaient pas comme prévu. Barbara, merci pour nos appels réguliers quand j'étais en première année. Même si la distance est présente, tu as une place particulière dans mon cœur. Merci à Coline, Claire, Irina, Marion, Jimmy pour leur précieuse amitié pendant toutes ces années. Merci à Margaux, Sébastien, Melly, Alexandre, Lucille, Théophile, Alassane pour tous les moments qu'on a passé ensemble.

Merci à mon jury de comité de thèse Nathalie Dostatni, Marion Delous, et Amélie Bigorgne pour leur accompagnement et leurs remarques pertinentes. Amélie, tu m'as accompagné depuis mes tout débuts dans le monde scientifique, et je te remercie pour ta bienveillance et toute l'aide que tu m'as apporté.

Résumé en français

La scoliose idiopathique (SI) est une déformation tridimensionnelle de la colonne vertébrale très répandue qui touche 3 à 4 % de la population en l'absence d'anomalies congénitales évidentes, et dont l'étiologie est mal comprise. Des études génétiques récentes chez le poisson zèbre ont montré que la perte de la fibre de Reissner (FR), un polymère protéique de sco-spondine sécrété par l'organe sous-commissural (SCO) et présent le long des cavités du système nerveux central, déclenche une scoliose chez les juvéniles (correspondant à "l'adolescence"). L'altération de la motilité des cils dans les embryons, nécessaire à la polymérisation du RF, entraîne également des défauts de courbure de l'axe, en corrélation avec une diminution de l'expression du gène du neuropeptide *urp2* chez les mutants sco-spondine. Il n'est pas encore déterminé si ce scénario, où un défaut de circulation du LCR entraînant la perte du FR et une diminution de la signalisation de l'URP s'applique à d'autres mutants de poisson-zèbre qui n'altèrent pas directement la motilité des cils ou s'il peut être pertinent pour la SI humaine. Deux études ont également mis en évidence l'existence d'une signature neuro-inflammatoire, en aval de la perte du FR, qui contribue à la sévérité et à la pénétrance de la scoliose.

Nous avons généré un mutant de poisson zèbre pour *rpgr1p1l*, un gène codant pour une protéine de la zone de transition ciliaire, qui ne présente aucune anomalie embryonnaire et développe une scoliose avec une pénétrance presque complète chez les juvéniles. Le but de ma thèse était de déterminer la cascade d'événements menant à la scoliose chez les *rpgr1p1l*^{-/-}. Nous avons tiré profit du développement asynchrone de la scoliose chez *rpgr1p1l*^{-/-} pour montrer que les mutants droits présentent déjà des défauts ciliaires au niveau du tronc avec une augmentation du nombre de cellules immunitaires dans le cerveau et une augmentation du niveau d'expression d'*urp1* et d'*urp2*. A l'apparition de la scoliose, les mutants *rpgr1p1l*^{-/-} perdent la FR et les touffes multi-ciliées proches du SCO. La réintroduction de RPGRIP1L dans les cellules ciliées motiles et les cellules progénitrices grâce à une transgénése tissu-spécifique prévient l'apparition de la scoliose. En réduisant le niveau d'URP chez les *rpgr1p1l*^{-/-} par des croisements génétiques, nous avons démontré que l'altération de la signalisation URP ne contribue pas à la scoliose chez *rpgr1p1l*^{-/-}. De plus, un traitement anti-inflammatoire/anti-oxydant à long terme a réduit la sévérité et la pénétrance de la scoliose de 50%, suggérant que ces processus sont impliqués dans l'apparition et l'évolution de la scoliose chez *rpgr1p1l*^{-/-}. Enfin, grâce à une analyse protéomique et à des immuno-marquages, nous avons mis en évidence une astroglie au sein du SCO et du ventricule rhombencéphalique qui se développe de manière asynchrone chez les mutants droits *rpgr1p1l*^{-/-} et qui persiste chez les mutants scoliotiques. Nous proposons que l'astroglie au niveau du SCO associée au recrutement de cellules inflammatoires induisent localement la perte de touffes multi-ciliées, altérant la polymérisation du FR et conduisant finalement à la scoliose.

Nous espérons que cette étude permettra de mieux comprendre les défauts moléculaires et cellulaires à l'origine de l'IS chez le poisson zèbre et qu'elle mettra en évidence l'astroglie cérébrale en tant que défaut potentiel à l'origine de la SI chez l'homme.

Mots clés : Scoliose idiopathique ; poisson-zèbre ; multi-cils ; astroglie ; inflammation.

Résumé en anglais

Idiopathic scoliosis (IS) is a highly prevalent three-dimensional spine deformity which affects 3-4% of the population in the absence of obvious congenital abnormalities, whose etiology is poorly understood. Recent genetic studies in zebrafish have shown that loss of Reissner fiber (RF), a sco-spondin protein polymer secreted by the subcommissural organ (SCO) and present along the cavities of the central nervous system, triggers scoliosis in juveniles (the "adolescent-like" stage). Impairment of cilia motility in embryos, necessary for RF polymerization, also leads to axis curvature defects, that correlates with decreased *urp2* neuropeptide gene expression in sco-spondin mutants. It is yet not clear whether this scenario of CSF flow defect causing RF loss and decreased URP signaling holds true in other zebrafish mutants that do not impair directly cilia motility or may be relevant to human IS. Two studies also pointed to the existence of a neuro-inflammatory signature, downstream of RF loss, which contributes to scoliosis severity and penetrance.

We generated a zebrafish mutant for *rpgr11*, a gene encoding a ciliary transition zone protein, which displays no embryonic anomaly and develops scoliosis with nearly full penetrance in juveniles. The goal of my thesis was to decipher the cascade of events leading to scoliosis in *rpgr11*^{-/-}. We took advantage of the asynchronous scoliosis development in *rpgr11*^{-/-} to show that the straight mutants already presented ciliary defects at trunk level with increase number of immune cells within the brain and *urp1* and *urp2* upregulation. At scoliosis onset, *rpgr11*^{-/-} mutants had lost the RF and specific multi-ciliated tufts just lateral to the SCO. Reintroduction of RPGRIP1L into motile ciliated cells and progenitor cells thanks to tissue-specific transgenesis prevents scoliosis onset. By reducing URP level in *rpgr11*^{-/-} via genetic crosses, we demonstrated that alteration of URP signaling does not contribute to the curvature phenotype of *rpgr11*^{-/-}. Moreover, long-term anti-inflammatory/anti-oxidant treatment reduced the severity and penetrance of scoliosis by 50%, suggesting that inflammatory and/or oxidative processes are involved in *rpgr11* scoliosis onset and evolution. Finally, thanks to a proteomic analysis and immunostaining, we revealed an astrogliosis response within the SCO and rhombencephalic ventricle that develops asynchronously in straight *rpgr11*^{-/-} and persists in scoliotic fish. We propose that the astrogliosis at SCO level associated with inflammatory cells recruitment induces locally the loss of multi-ciliated tufts, impairing RF polymerization and eventually leading to scoliosis.

We hope these studies will provide new insights into the understanding of molecular and cellular defects leading to IS in zebrafish and highlight brain astrogliosis as a potential defect leading to human IS.

Mots clés : Idiopathic scoliosis; zebrafish; multi-cilia ; astrogliosis ; inflammation.

Table des matières

Résumé en français	11
Résumé en anglais	13
Liste des figures	21
Liste des tableaux.....	23
Liste des abréviations	25
Introduction.....	27
1. Une antenne cellulaire	29
1.1. Structure ciliaire	29
1.1.1. Les cils primaires.....	31
1.1.2. Les cils motiles.....	32
1.1.3. Les cellules multi-ciliées.....	34
1.2. Les différentes étapes de la ciliogénèse.....	35
1.2.1. Ciliogénèse.....	36
1.2.1.1. Assemblage du centriole.....	37
1.2.1.2. Maturation du centriole : assemblage des appendices distaux et sub-distaux	39
1.2.1.3. Amarrage de vésicules pré-ciliaires sur les appendices distaux...	40
1.2.1.4. Formation des vésicules ciliaires (VC) et extension de la VC.....	40
1.2.1.5. L'enlèvement des protéines de la coiffe sur le centriole père est un prérequis pour l'allongement de l'axonème.....	41
1.2.1.6. Élongation de l'axonème.....	41
1.2.2. Construction d'une barrière ciliaire fonctionnelle au niveau de la Zone de Transition (ZT).....	43
1.2.3. Contrôle de la composition ciliaire : régulation de la signalisation cellulaire	46
1.2.3.1. Mise en place de la barrière de diffusion par les protéines et les lipides.....	47

1.2.3.2. Impact des mutations de protéines de la TZ sur la composition ciliaire et le développement	51
1.2.4. Régulation transcriptionnelle des gènes ciliaires	54
1.2.4.1. La famille des facteurs de transcription RFX	55
1.2.4.2. Le facteur de transcription FOXJ1 est un régulateur de la ciliogénèse motile.....	57
1.2.4.3. Relation fonctionnelle entre les facteurs de transcription régulant la ciliogénèse.....	59
1.2.4.4. Contrôle transcriptionnel de la multiciliation par MCIDAS, Gmnc et Myb.....	60
1.3. Les fonctions des cils.....	61
1.3.1. Génération d'un flux orienté	62
1.3.1.1. Les différents flux dans l'organisme.....	62
1.3.1.2. Circulation et rôle du liquide cérébro-spinal chez la souris	65
1.3.1.3. Circulation et rôle du liquide cérébro-spinal chez le poisson-zèbre.....	66
1.3.2. Rôle de la voie de la polarité planaire pour générer un flux orienté	71
1.3.2.1. Battement coordonné des cellules multi-ciliées au sein de divers tissus.....	73
1.3.2.2. Battement coordonné des cellules mono-ciliées.....	74
1.3.3. Rôle du cil primaire en tant que mécano-senseur.....	75
1.3.4. La transduction de voie de signalisations importantes pour le développement et l'homéostasie.....	79
1.3.4.1. Voie Hedgehog et dépendance au cil	79
1.3.4.2. Photo transduction des signaux lumineux.....	83
1.4. Ciliopathies chez l'homme	86
1.4.1. Généralités sur les ciliopathies.....	86
1.4.2. Rpgrip1l : fonctions et pathogenèse.....	90
1.4.2.1. Pathogenèse résultant de mutation(s) dans le gène Rpgrip1l	90
1.4.2.2. Les différentes fonctions de la protéine RPGRIP1L.....	91
2. Étiologie des différentes formes de scoliose.....	95
2.1. La colonne vertébrale chez l'homme	95
2.1.1. Structure de la colonne vertébrale	95

2.1.2. Formation de la colonne vertébrale.....	96
2.2. Les différents types de scoliose.....	98
2.2.1. La scoliose congénitale.....	98
2.2.2. La scoliose neuromusculaire.....	99
2.2.3. La scoliose idiopathique.....	100
2.2.3.1. Épidémiologie.....	100
2.2.3.2. Mesure de la sévérité de la scoliose.....	101
2.2.3.3. Étude de la génétique humaine de la SI.....	102
2.3. Modèles d'étude de la SI.....	104
2.3.1. Le poulet : la pinéalectomie responsable d'une déformation de la colonne.....	104
2.3.2. Les rongeurs : un modèle très utilisé en laboratoire mais peu adapté pour la compréhension de l'étiologie de la SI.....	105
2.3.2.1. Investigation d'un rôle endocrinien dans l'apparition de la SI chez la souris.....	10
2.3.2.2. Le rôle du système de proprioception dans l'alignement de la colonne vertébrale.....	108
2.3.3. Le xénope : perturbation du système vestibulaire.....	111
2.3.4. Le poisson zèbre génétiquement modifié peut développer une scoliose au stade juvénile avec une forte pénétrance.....	112
2.3.4.1. Structure et formation de la colonne vertébrale chez le poisson- zèbre.....	112
2.3.4.2. Émergence du premier modèle génétique de SI chez le poisson- zèbre scoliotique : le mutant <i>ptk7^{-/-}</i>	116
3. Facteurs génétiques et environnementaux participant à la courbure de l'axe chez le poisson zèbre.....	119
3.1. Régulateurs embryonnaires de la courbure de l'axe chez le poisson zèbre.....	119
3.1.1. Défauts de courbures ventrales et sigmoïdes chez les mutants ciliaires et de zone de transition.....	119
3.1.2. Défaut de courbure dorsale au stade embryonnaire.....	119
3.1.3. Défaut de flux du liquide cérébro-spinal dans les mutants de motilité	120

3.1.4. Défaut de formation de la fibre de Reissner.....	121
3.1.5. Rôle des neurones en contact avec le LCS (CSF-cNs) dans la proprioception	123
3.1.5.1. Description des CSF-cNs	123
3.1.5.2. Les CSF-cNs : des organes de proprioception	124
3.1.6. Défaut d'expression des gènes urp1 et urp2.....	125
3.1.7. Hypothèse de modèle de maintenance de l'axe droit chez l'embryon de poisson-zèbre.....	127
3.2. La scoliose idiopathique chez le poisson zèbre.....	128
3.2.1. Défaut dans la circulation du LCR et la formation de la fibre de Reissner dans l'apparition de la scoliose chez le poisson zèbre	128
3.2.1.1. Rôle des cils motiles dans la maintenance d'un axe droit pendant l'adolescence.....	128
3.2.1.2. Importance de la maintenance de la fibre de Reissner au stade juvénile.....	131
3.2.2. Autre facteur participant à la scoliose chez le poisson-zèbre au stade juvénile	133
3.2.2.1. Implication de la signalisation des neuropeptides Urp1/Urp2 dans la maintenance d'un axe droit	133
3.2.2.2. Contribution partielle des CSF-cNs au développement de la scoliose.....	134
3.3. Mécanisme d'inflammation et scoliose : modèles émergents d'une régulation de la courbure de la colonne médiée par la réponse immunitaire ...	135
3.3.1. Introduction générale à la réponse immunitaire innée	135
3.3.1.1. Les macrophages participent à la réponse inflammatoire.....	135
3.3.1.2. Le système du complément	136
3.3.1.3. La microglie : fonctions dans le système nerveux.....	136
3.3.2. Induction de la scoliose par une infection bactérienne.....	137
3.3.3. Une réponse inflammatoire anormale participe au développement d'une SI chez le poisson-zèbre	138

Objectifs de la thèse..... 141

Résultats 145

Discussion et perspectives209

4. Défauts du système nerveux du mutant <i>rprip11^{-/-}</i> ne contribuant pas directement à la courbure de l'axe	213
4.1. Défauts de la porte sélective ciliaire et des mono-cils	213
4.2. Dilatation des cavités du système nerveux.....	214
4.2.1. Hypothèse de défaut de motilité des cils conduisant à une réduction de flux du LCS.....	215
4.2.2. Hypothèse d'un élargissement de la surface apicale des cellules conduisant à un élargissement des cavités	216
4.2.3. Hypothèse d'une altération du contenu du LCS.....	216
4.2.3.1. Augmentation de la production de LCS par le plexus choroïde ..	216
4.2.3.2. Altération de la composition ionique du LCS	217
5. Défauts du système nerveux contribuant à la scoliose	219
5.1. Proposition de cascade d'événements participant à la scoliose.....	219
5.1.1. Phénomène d'astroglie-like	219
5.1.2. Dysfonctionnement du métabolisme mitochondrial et de l'expression de la protéine GSK3 β	220
5.1.3. Recrutement de cellules immunitaires au sein du territoire du SCO ..	221
5.1.4. Perte ciblée des touffes multi-ciliées dans le SCO.....	222
5.1.5. Défaut de maintenance de la FR.....	223
5.2. Validation de la cascade d'événements grâce aux expériences de sauvetage	224
5.2.1. Expérience de traitement anti-inflammatoire/anti-oxydant	224
5.2.2. Sauvetage tissu spécifique dans les cellules ciliées motiles.....	225
5.3. Comparaison avec les autres modèles de SI de poisson-zèbre.....	226
5.3.1. Phénotypes similaires observés avec les modèles de SI.....	226
5.3.2. Implication d'une autre cascade génétique contrôlant la courbure de l'axe.....	227
5.3.3. La perte de la polymérisation de la FR n'explique pas l'apparition de la scoliose chez tous les modèles de SI	228
6. Pertinence du modèle pour déterminer les cascades d'événements pouvant participer à la scoliose idiopathique chez l'homme	229

6.1. Absence de contribution de la motilité ciliaire dans la circulation du LCS chez l'homme.....	229
6.2. Absence d'évidence de la présence de fibre de Reissner chez l'homme.....	230
6.3. Importance du processus inflammatoire dans l'émergence de la scoliose chez l'homme.....	231
Bibliographie.....	233

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la structure du cil.	30
Figure 2 : Localisation de populations de cils motiles et non motiles dans différents organes chez l'embryon de poisson-zèbre.....	32
Figure 3 : Description des deux types de ciliogénèse	35
Figure 4 : Structure du centriole	37
Figure 5 : Différenciation de cellules multi-ciliées chez les mammifères	38
Figure 6 : Modèle schématique du rôle de MPP9, TTBK2, Cep97-CP110 dans le contrôle de la formation du cil.....	41
Figure 7 : Structure de la zone de transition chez les mammifères.....	43
Figure 8 : Modèle de réseau d'interaction des différents modules présents à la zone de transition basé sur des études chez C. Elegans et cellules en culture	44
Figure 9 : Différents processus de régulation de la composition ciliaire	47
Figure 10 : Cibles directes et indirectes des facteurs de transcription RFX et Foxj1.....	57
Figure 11 : Cascade de contrôle transcriptionnel permettant la formation de multi-cils	60
Figure 12 : Représentation schématique de la localisation des plexus choroïdes dans les 4 ventricules dans le cerveau de souris adulte	65
Figure 13 : Localisation des populations ciliaires dans différentes régions du cerveau adulte de poisson-zèbre	69
Figure 14 : Différents positionnement des corps basaux dans la cellule permettant d'établir un battement ciliaire dans la même direction.	71
Figure 15 : Polarité planaire et acteurs de la voie Wnt-PCP.....	72
Figure 16 : Modèle de mécano-sensation ciliaire médiée par le calcium dans la vésicule de Kupffer pendant le développement de l'asymétrie droite/gauche chez le poisson-zèbre.....	76
Figure 17 : Rôle du cil, et de la voie de signalisation Shh dans le développement du tube neural	80
Figure 18 : Représentation schématique d'un photorécepteur.....	83
Figure 19 : Dysfonctionnement des cils motiles ou non-motiles conduit à des ciliopathies affectants la plupart des organes chez l'homme	87

Figure 20 : Chevauchement de différents modules qui sont responsables de différentes ciliopathies	89
Figure 21 : Structure et formation de la colonne vertébrale	95
Figure 22 : Différentes étapes conduisant à la formation des vertèbres au cours du développement	97
Figure 23 : Représentation schématique des différents types de malformations observées dans les scoliose congénitales	98
Figure 24 : Représentation schématique de la mesure de l'angle de Cobb suite à une radio de face de la colonne vertébrale	101
Figure 25 : Localisation rapprochée de la glande pinéale et du SCO chez plusieurs modèles animaux.....	106
Figure 26 : Le système proprioceptif est important pour maintenir un alignement de la colonne vertébrale.....	108
Figure 27 : Description du système vestibulaire chez le xénope.....	111
Figure 28 : Structure de la colonne vertébrale du poisson-zèbre.....	113
Figure 29 : Rôle des cellules vacuolées de la notochorde dans l'élongation de l'axe et la formation de la moelle épinière	114
Figure 30 : Localisation de la fibre de Reissner dans le cerveau et le canal central de la moelle épinière au stade larvaire chez le poisson-zèbre	121
Figure 31 : Localisation des CSF-cNs autour du canal central de la moelle épinière chez le poisson-zèbre.....	123
Figure 32 : Modèle actuel de maintenance de l'axe droit chez l'embryon de poisson-zèbre.....	127
Figure 33 : Schéma résumant les principaux résultats obtenus pendant la thèse.	211

Liste des tableaux

Tableau 1 : Facteurs de transcription ciliaires nécessaire à la production de différents types ciliaires dans différents organismes.....	56
Tableau 2 : Gènes surexprimés dans l'analyse transcriptomique impliqués dans le transport antérograde.	214
Tableau 3 : Gène cftr surexprimé dans l'analyse transcriptomique impliqué dans le transport d'ions chlorure et d'eau.....	217
Tableau 4 : Protéines d'intérêts sélectionnées dans l'analyse protéomique. Ici sont représentées des protéines diminuées appartenant au métabolisme du pyruvate.....	220

Liste des abréviations

ACIII : Adénylate cyclase III	LRO : Organe de latéralité gauche/droite
ACL : Amaurose congénitale de Leber	MCHR1 : Récepteur 1 de l'hormone concentrant la mélanine
AR : Acide rétinoïque	MEC : Matrice extracellulaire
BBS : Syndrome de Bardet-Biedl	MEF : Fibroblaste embryonnaire murin
CC : Cil connecteur	MET : Microscopie électronique à transmission
CMC : Cellule multi-ciliées	MKS : Syndrome de Meckel-Gruber
COX-2 : Cyclo-oxygénase 2	NAC : N-acetyl cystéine
CSF-cNs : Neurone en contact avec le liquid cérébro-spinal	NACET : N-acetyl cystéine ethyl ester
DC : Dystrophie du cône	NF-κB : Facteur nucléaire kappa B
Dpf : Jour post fertilisation	NPHP : Néphronoptise
ERO : Espèces réactives de l'oxygène	OFD : Syndrome oral-facial-digital
Foxj1 : Forkhead box J1	OGT : Organe tendineux de Golgi
FR : Fibre de Reissner	PC1 : polycystine-1
GFP : Protéine fluorescente verte	PC2 : polycystine-2
GPCR : Récepteur couplé aux protéines G	PCD : Syndrome de la dyskinésie ciliaire
GWAS : Étude d'association à l'échelle du génome	PCh : Plexus choroïde
Hh : Hedgehog	PCP : Polarité cellulaire planaire
Hpf : Heure post fertilisation	Pkd2l1 : Polykystose rénale 2 like 1
IFN : Interferon	RFX : Facteur de regulation X
IFT : Transport intraflagellaire	RHPT1 : Récepteur à l'hormone parathyroïde 1
INPP5E : Inositol polyphosphate-5-phosphatase E	RP : Retinitis Pigmentosa
Irg1l : Gène d'immuno-réponse 1-like	RPE : Épithélium pigmentaire rétinien
JBTS : Syndrome de Joubert	Rpgrip1l : Retininitis Pigmentosa GTPase Regulator Interaction Protein-1-Like
KO : Knock-out	
LCP1 : L-plastine 1	
LCS : Liquide cérébro-spinal	

Runx3 : Facteur de transcription
apparenté à Runt 3

SC : Scoliose congénitale

SCO : Organe subcommissural

SI : Scoliose idiopathique

SLS : Syndrome de Senior-Løken

Smo : Smoothened

SNC : Système nerveux central

SNP : Polymorphisme d'un seul
nucléotide

Sspo : Sco-spondine

TLR : Récepteur toll-like

TNF α : Facteur de nécrose tumorale

Urp1/2 : Peptide relié à l'urotensine 1/2

Uts2r3 : Urotensin-2 receptor 3

ZT : Zone de transition

Introduction

1. Une antenne cellulaire

Chez les eucaryotes, les cils jouent un rôle clé dans la signalisation cellulaire, la motilité, ou la mécano-sensation. Durant la moitié du 20^{ème} siècle, le développement de la Microscopie Électronique à Transmission (MET) a permis la production d'images en deux dimensions et à une résolution suffisante pour observer les structures ciliaires en détails. Cet outil a permis de découvrir que les cils de divers organes et tissus présentent de nombreux points communs structurels avec parfois quelques sous-structures différentes (Reiter et Leroux 2017).

1.1. Structure ciliaire

Les cils sont constitués d'un corps basal intra-cytoplasmique qui sert de point d'ancrage à l'axonème, qui pointe vers le milieu extracellulaire. Le **corps basal** est formé par le centriole père, le centriole le plus ancien hérité durant la mitose, et est ancré à la membrane grâce à des appendices (Figure 1). La plupart des corps basaux sont constitués d'une structure de neuf triplets de microtubules, nommés tubule-A ; B ; C. L'extrémité distale des corps basaux est caractérisée par la présence de deux sortes d'appendices, les appendices sub-distaux et les appendices distaux, neuf structures associées d'un côté à un triplet de microtubules, et de l'autre à la membrane plasmique à la base du cil. L'axe du cil est quant à lui formé par l'**axonème**, neuf doublets de microtubules qui prennent naissance depuis le centriole père et en continuité des tubules A et B (Jana, Marteil, et Bettencourt-Dias 2014). L'ensemble est recouvert par une membrane ciliaire qui est continue à la membrane plasmique (Figure 1). L'extension de l'axonème à partir de chaque corps basal, et son maintien ultérieur, nécessitent un Transport IntraFlagellaire (IFT en anglais), un système de transport bidirectionnel le long des microtubules, sauf rares exceptions lorsque l'assemblage du flagelle a lieu dans le cytoplasme, comme celui des spermatozoïdes de drosophile ou du flagelle de Plasmodium (Rosenbaum et Witman 2002; Han, Kwok, et Kernan 2003; Sarpal et al. 2003; Briggs et al. 2004; Sinden et al. 2010). La présence des cils est régulée dynamiquement au cours du cycle cellulaire : ils sont présents en phase G1/G0, certains se maintiennent jusqu'en S/G2, mais tous sont désassemblés avant l'entrée en mitose, pour réapparaître après la cytokinèse (Ford et al. 2018).

Le cil joue un rôle clé dans la signalisation cellulaire. Sa composition, distincte de celle du cytoplasme de la cellule est contrôlée par la Zone de Transition (ZT). La ZT est formée par plusieurs complexes, qui seront détaillés dans le paragraphe « **les étapes de la ciliogenèse** » (1.2.). La ZT contrôle les protéines qui peuvent entrer et sortir du cil. Elle présente à sa base les fibres de transition et au-dessus des structures de liaison en Y qui relient la membrane ciliaire à l'axonème sous-jacent (Figure 1). La composition lipidique de la membrane ciliaire, distincte du reste de la cellule, permet une régulation de la localisation de certaines protéines (Garcia-Gonzalo et al. 2015; Chávez et al. 2015). De plus, l'entrée et la sortie des protéines dans le cil en passant par la ZT est régulée par des complexes impliquant les IFT-A/B et les BBsomes (Nachury et Mick 2019).

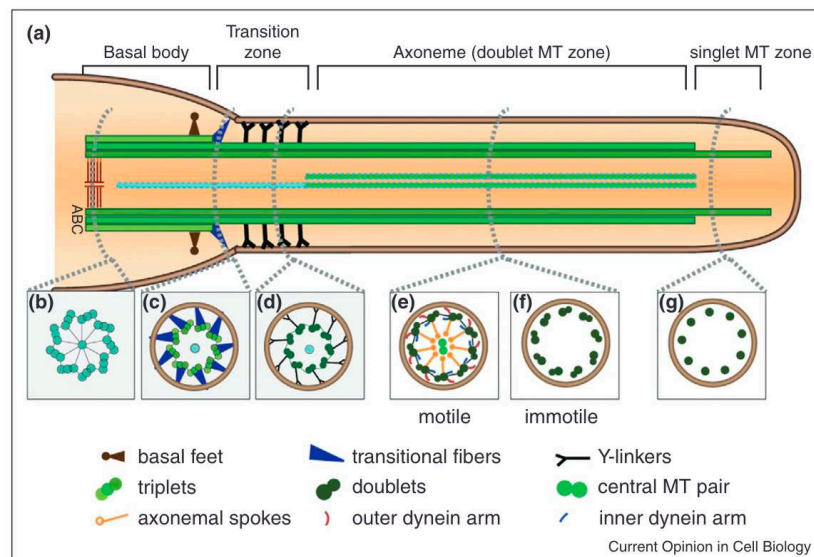


Figure 1 : Représentation schématique de la structure du cil. (Tirée de la revue (Jana, Marteil, et Bettencourt-Dias 2014) (a) Vue longitudinale du squelette du cil/flagelle qui se développe à partir de la partie distale du corps basal (b). Pendant la différenciation du centriole en corps basal, certaines structures spécialisées, telles que les appendices sub-distaux et les fibres de transition (c), servent de plateformes pour l'amarrage des composants ciliaires et fournissent un support mécanique aux cils. (d) La partie distale du corps basal est appelée zone de transition, et commence là où le tubule externe C du triplet cesse de croître. Les structures de liaison en Y qui relient les doublets de microtubules à la membrane ciliaire assurent une zone de filtration à la base des cils. (e) Le cil motile comprend une structure 9+2 avec la présence d'une paire centrale de microtubules ainsi que des bras de dynéine qui coordonnent le mouvement du cil (f). Les cils non motiles quant à eux ont généralement une structure 9+0. (g) A la fin du cil, le tubule B du doublet de microtubule cesse de croître et les tubules A se terminent progressivement.

1.1.1. Les cils primaires

Les cils primaires, également appelés cils non-motiles ou sensoriels, sont généralement courts et leur membrane est enrichie en récepteurs leur permettant de sentir le flux, la lumière, les odeurs ou d'autres signaux du milieu extracellulaire. L'exemple le plus commun est la présence d'un cil unique sur des cellules post-mitotiques et quiescentes chez les vertébrés, impliqué dans la transduction de voie(s) de signalisation. Ces cils ont une configuration de microtubules en 9+0 et sont importants pour réceptionner les signaux de l'extérieur, tel que le morphogène de la famille Hedgehog au cours du développement (Choksi et al. 2014) (Pour plus de détails, voir la partie 1.3.). Au niveau des cellules épithéliales des tubules du rein de mammifères, des cils à la structure 9+0 projettent dans le lumen tubulaire, et sentent le flux urinaire via des récepteurs mécano-sensoriels comme ceux constitués par les complexes PC1/PC2 codés par les gènes *Pkd1* et *Pkd2* (Praetorius et Leipziger 2013). Enfin, il existe des cils sensoriels de type 9+0 très spécialisés, plus longs que les cils primaires, comme ceux des photorécepteurs rétiniens. Leurs segments externes correspondent à des compartiments ciliaires dont la membrane est spécialement enrichie en récepteurs de type opsine (Kennedy et Malicki 2009).

1.1.2. Les cils motiles

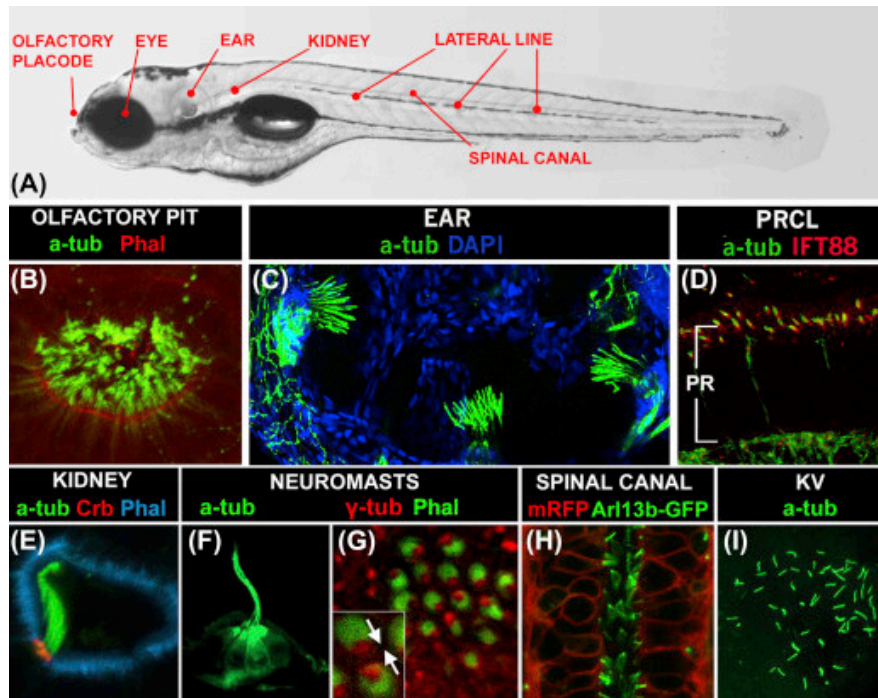


Figure 2 : Localisation de populations de cils motiles et non motiles dans différents organes chez l'embryon de poisson-zèbre (Leventea et al. 2016). **A.** Photo latérale d'un poisson à 5 jours post-fertilisation (dpf) avec la mise en évidence de plusieurs organes contenant des cils. **B.** Images confocale de la placode olfactive, **C.** et de l'oreille. **D.** La photo correspond à une cryosection transversale de la rétine à 3 dpf. **E.** Représentation d'une coupe transversale du rein à 4 dpf. **F. et G.** correspondent à des images confocale des neuromastes, **H.** du canal central de la moelle épinière, **I.** et de la vésicule de Kupffer. Les immunofluorescences représentent un marquage ciliaire (par l'utilisation du marquage tubuline acétylée (=a-tub), et Ift88. Le corps basal est immuno-marqué avec la gamma-tubuline. La phalloïdine permet de marquer l'actine. Les cils de l'immunofluorescence H. sont marqués grâce à l'expression d'un transgène Arl13b-GFP.

La grande majorité des cellules mono-ciliés motiles possèdent un axonème de type « 9+2 », c'est-à-dire constitué de neuf doublets de microtubules avec des bras de dynéine radialement arrangés et une paire centrale de microtubules. Chaque doublet possède également une série de projections, appelées rayons radiaires ou « radial spokes » en anglais, qui servent de point d'ancrage pour maintenir les doublets en

cercle autour de la paire centrale de microtubules pendant le battement ciliaire (Choksi et al. 2014; Jana, Marteil, et Bettencourt-Dias 2014) (Figure 1e).

Il existe cependant différents types de mono-cils motiles comme ceux présents sur les cellules des organes de latéralité, le « nœud » chez les mammifères, la vésicule de Kupffer chez les téléostéens (Figure 2I), ou sur la plaque du toit du gastrocèle chez le xénope (Sulik et al. 1994; Essner et al. 2005; Kramer-Zucker et al. 2005; Schweickert et al. 2007). Les cils de cet organe ont une structure qui varie en fonction de la position au sein de la structure et du stade de développement : ils sont de type « 9+0 » sur la couronne du nœud murin et « 9+2 » au centre du nœud (McGrath et al. 2003) tandis que chez le poisson-zèbre, ils ont une structure « 9+0 » entre 1 et 4 somites puis majoritairement « 9+2 » (Tavares et al. 2017; Essner et al. 2005; Kramer-Zucker et al. 2005).

Chez le poisson-zèbre, les cils motiles « 9+2 » sont présents sur les cellules épendymaires embryonnaires puis larvaires qui tapissent les ventricules du cerveau ou sur le plancher du canal central de la moelle épinière de l'embryon (Figure 2H), où ils vont contribuer à la circulation du liquide cérébro-spinal (LCS) (Pour plus de détails, voir la section 1.3.1.2). La plupart des cellules des parois latérales du canal central de la moelle épinière n'arborent pas de cil motile, mais un cil « 9+0 » non motile (Kramer-Zucker et al. 2005; Cantaut-Belarif et al. 2018; Olstad et al. 2019; Orts-Del'Immagine et al. 2020; Hagenlocher et al. 2013). La présence de cellules ciliées motiles dans le canal central a été observée chez le poisson-zèbre mais n'est pas observée chez la souris. La plupart des chordés possèdent une population rare de neurones située ventralement au niveau du central canal de la moelle appelé en anglais « cerebrospinal fluid contacting neurons » (CSF-cNs). Ces cellules sont à l'interface entre le LCS et le circuit neural. L'utilisation de la microscopie électronique et de la vidéo-microscopie a mis en évidence qu'au stade embryonnaire, ces cellules arborent au niveau apical des microvilli et un cil motile, en contact transitoire avec la Fibre de Reissner (Son rôle sera décrit dans la partie 3.1.4.). Enfin, les flagelles, généralement très longs, correspondent à des mono-cils motiles spécialisés, présents sur les cellules de spermatozoïdes ou chez les protozoaires ciliés.

1.1.3. Les cellules multi-ciliées

Les cellules multi-ciliées (CMC) peuvent arborer jusqu'à 300 cils motiles qui battent de manière coordonnée pour générer un flux directionnel. Ces cils motiles présents en très nombreux exemplaires sont retrouvés à la surface des organismes unicellulaires (e.g *paramecium*, *tetrahymena*) comme au sein de tissus spécialisés de vertébrés (Brooks et Wallingford 2014). Au cours des années 60, le développement de la microscopie électronique a permis la visualisation de CMC sur plusieurs organes, notamment sur les ventricules du cerveau où ils génèrent un flux de LCS, ou au sein du tractus respiratoire pour permettre l'expulsion du mucus hors des bronches chez les mammifères (Brightman et Palay 1963; Hagenlocher et al. 2013; Rhodin et Dalhamn 1956; Steinman 1968). Les CMC tapissent aussi les canaux de l'oviducte et permettent le transport des ovocytes. Chez les mammifères et les téléostéens, les CMC sont aussi présents au sein de régions particulières de l'épendyme cérébral, appelés les plexus choroïdes qui synthétisent le fluide cérébrospinal (Brightman et Palay 1963; Narita et al. 2012; D'Gama et al. 2021; Ho et al. 2023).

Chez le poisson-zèbre, des CMC sont présentes le long du rein embryonnaire appelé « pronéphros » afin de promouvoir la circulation de l'urine (Figure 2E). L'analyse par microscopie électronique a montré que les cils présents le long du pronéphros présentent une structure 9+2, contrairement à ceux présents sur les cellules rénales de mammifères (Kramer-Zucker et al. 2005; Webber et Lee 1975).

Cependant, il existe aussi des cils avec une structure « 9+2 » qui sont non-motiles, par exemple les cils présents sur les CMC des neurones olfactifs de mammifères qui mesurent de 5 à 6 μm , ou ceux présents sur les cellules neurosensorielles de l'oreille du poisson zèbre (Figure 2). Ceci est notamment dû à l'absence de bras de dynéine nécessaire à la motilité (Hansen et Zeiske 1998; Bang, Sewell, et Malicki 2001; Jenkins, McEwen, et Martens 2009).

1.2. Les différentes étapes de la ciliogénèse

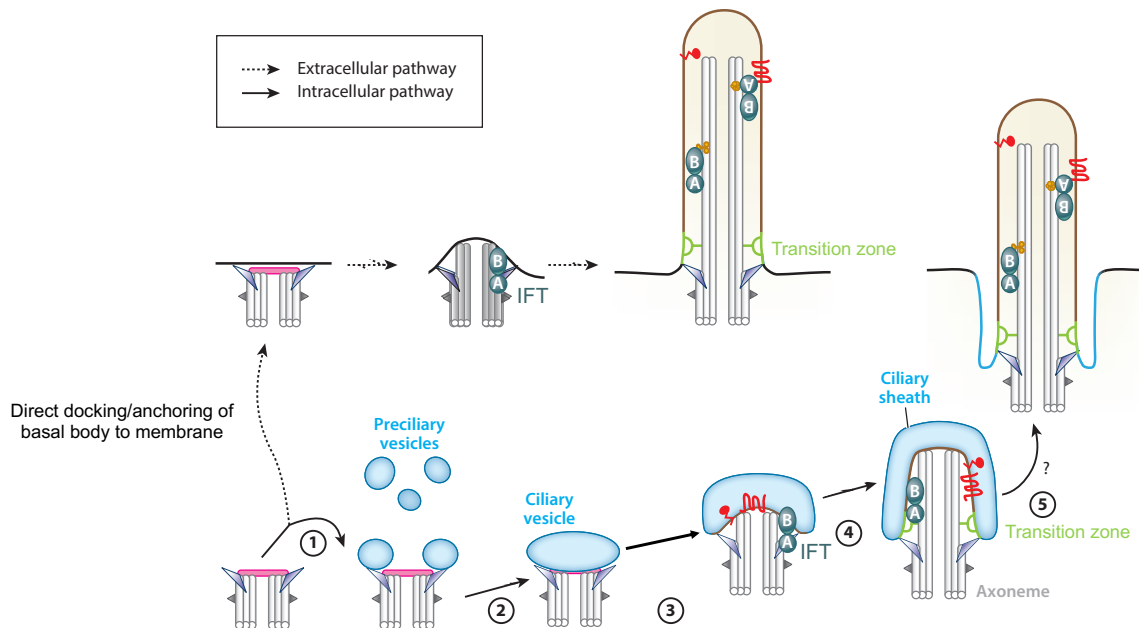


Figure 3 : Description des deux types de ciliogénèse. Les flèches en pointillées représentent la ciliogénèse associée à la membrane tandis que les flèches pleines correspondent à la ciliogénèse intracellulaire. Ces deux processus nécessitent le recrutement de plusieurs protéines (qui sont détaillées ci-dessous) qui permettront la formation d'un cil. (Modifiée de la revue (Breslow et Holland 2019))

Les travaux déterminants de microscopie électronique par S. Sorokin dans les années 1960 sur des fibroblastes ou des cellules de muscles lisses ont permis la mise en évidence de deux types de ciliogénèse : la **ciliogénèse intracellulaire** ou la **ciliogénèse associée à la membrane plasmique** (S. Sorokin 1962) (Figure 3).

La ciliogénèse intracellulaire débute par la fixation de petites vésicules aux appendices distaux des centrioles, présents dans le cytoplasme, puis fusionnent pour former une vésicule ciliaire, dont la taille va s'accroître avec la formation de la ZT. L'élongation de la vésicule ciliaire couvrant la base de l'axonème conduira à sa fusion avec la membrane plasmique et l'extrusion du cil. Au contraire, la ciliogénèse associée à la membrane repose sur l'amarrage du corps basal à la surface cellulaire, préalablement à l'élongation de l'axonème dans l'espace extracellulaire. C'est le type de ciliogénèse

observée par exemple dans les cellules de l'épithélium pulmonaire de rat (S. P. Sorokin 1968).

L'analyse de la ciliogénèse intracellulaire, que l'on peut observer dans les fibroblastes, les cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine (RPE en anglais) (S. Sorokin 1962; Sedmak et Wolfrum 2011) ou les neurones a révélé la nécessité, en plus de la présence du centriole père, de l'arrimage des vésicules de transport aux bras distaux du corps basal, et de l'intégrité du réseau de microtubules, de l'activité de moteurs de type myosine et de protéines de remodelage des membranes. Ce processus complexe comprend plusieurs étapes :

1.2.1. Ciliogénèse

L'assemblage du cil se réalise généralement après la sortie du cycle cellulaire et l'entrée en quiescence (G0) (Kobayashi et Dynlacht 2011). La formation du cil peut être déclenchée par une privation en nutriments des cellules en culture, comme dans le cas des cellules de rétines pigmentaires RPE, un des modèles cellulaires le plus étudié. L'assemblage du cil nécessite l'acquisition des appendices distaux sur le centriole père et l'amarrage de vésicules sur ce dernier. Les appendices distaux sont essentiels à l'ancrage du corps basal à la membrane plasmique (les étapes sont détaillées ci-dessous).

1.2.1.1. Assemblage du centriole

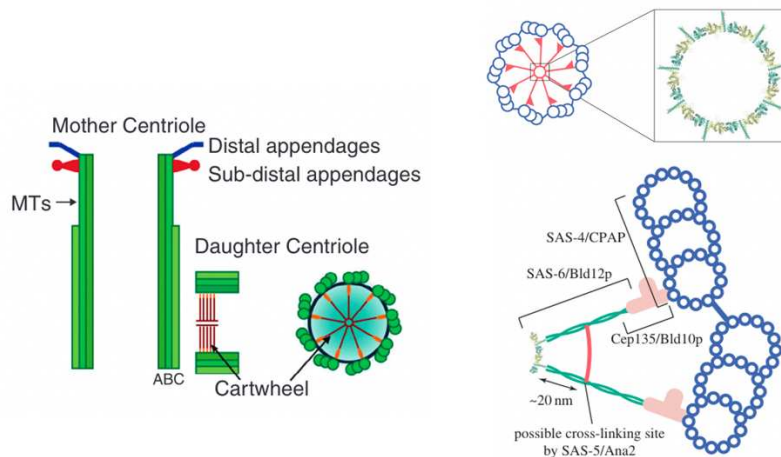


Figure 4 : Structure du centriole. Les centrioles sont composés de 9 triplets de microtubules organisés autour d'une structure en roue de charrette. Les triplets sont connectés à la roue de charrette via le tubule-A. SAS-6/Bld12p constitue le centre de la roue de charrette et la partie centrale du rayon. Cep135/Bld10p constitue la tête d'épingle et une partie distale de l'axe du rayon et connecte la roue de charrette aux microtubules. Les localisations de ces protéines se chevauchent partiellement (Figure provenant de (Jana, Marteil, et Bettencourt-Dias 2014; Hirono 2014)).

Au cours de la mono-ciliation, l'assemblage du centriole et l'établissement de sa symétrie en neuf débute par la formation d'une structure transitoire en forme de roue de charrette, située à l'extrémité proximale du corps basal (Figure 4). L'analyse de mutants de l'algue verte ciliée *Chlamydomonas* a révélé l'importance de deux protéines : SAS-6/Bld12p et Cep135/Bld10p pour la formation de cette structure : l'oligomérisation de la protéine SAS-6/Bld12p joue un rôle dans la formation du centre de la roue de charrette et dans l'établissement d'une symétrie 9 tandis que Cep135/Bld10p intervient dans la formation du rayon extérieur et de la structure en tête d'épingle (Nakazawa et al. 2007; Hiraki et al. 2007). La protéine SAS-5/Ana-2 (respectivement identifiée chez *C.Elegans* et la *Drosophile*) coopère avec SAS-6/Bld12p pour faciliter l'assemblage de la partie centrale de la roue de charrette (Qiao et al. 2012; Stevens, Roque, et Raff 2010). Par la suite, l'assemblage des triplets de microtubules se produit de manière séquentielle (Tubule-A puis B, et C).

L'élongation du centriole est la seconde étape de l'assemblage du centriole. Elle implique plusieurs mécanismes pour contrôler la croissance du centriole : (1) un

équilibre dynamique entre polymérisation et dépolymérisation des microtubules avec le recrutement de plusieurs stabilisateurs/nucléateurs de microtubules (CPAP, CEP120, OFD1, Poc5) et (2) la présence de protéines de la coiffe qui inhibent la croissance des microtubules (CP110, Cep97) (Spektor et al. 2007) (Figure 6). Le contrôle de la taille des centrioles dépend de l'activité des protéines OFD1, hPOC5 ainsi que de CFAP et CP110 (Jana, Marteil, et Bettencourt-Dias 2014).

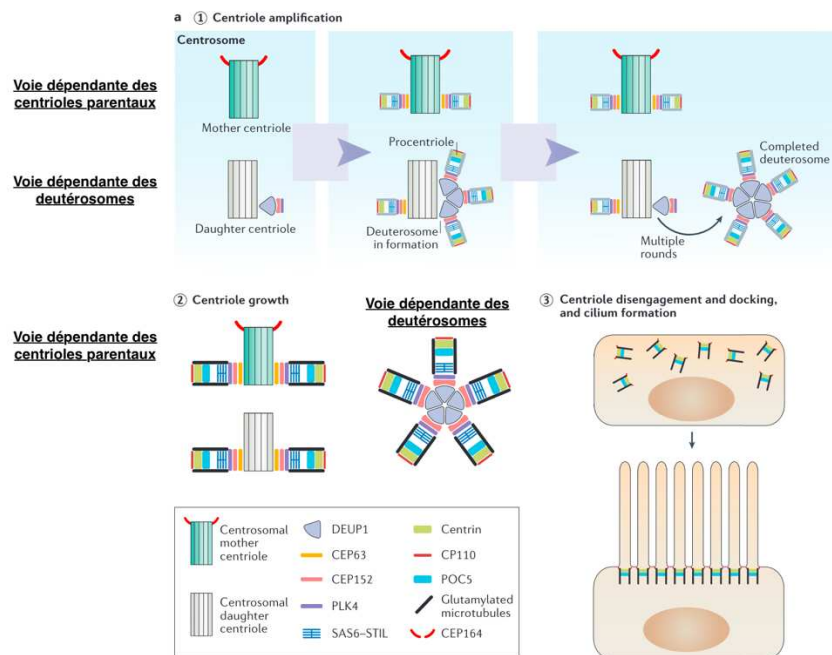


Figure 5 : Différenciation de cellules multi-ciliées chez les mammifères. (Tirée de la revue (Spassky et Meunier 2017) Etape 1 : Démonstration de l'amplification du centriole durant la voie dépendante des centrioles parentaux, ou de la voie dépendante des deutérosomes via la Protéine d'assemblage des DEUtérosomes (DEUP1). Etape 2 : Croissance du centriole. Lorsque le nombre final de centrioles est atteint après plusieurs cycles de formation de deutérosomes, le processus de formation de deutérosomes s'arrête et tous les procentrioles latents croissent et mûrissent simultanément à partir des centrioles centrosomaux et des deutérosomes. Etape 3 : Désengagement des centrioles, amarrage et formation du cil.

Une étape supplémentaire est nécessaire pour permettre la formation des multi-cils : il s'agit de l'amplification préalable des centrioles au cœur de la cellule, qui migrent ensuite pour s'arrimer à la surface apicale et se transformer en corps basaux (Meunier et Azimzadeh 2016). Chez les vertébrés, la génération des multiples centrioles est réalisée via deux processus (1) la **voie dépendante des centrioles parentaux**, qui

est analogue à la voie de duplication active pendant le cycle cellulaire, et qui peut produire 10 à 20 centrioles dans les CMC et (2) la **voie dépendante des deutérosomes**, qui produit 90 % du total des centrioles des CMC (Spassky et Meunier 2017) (Figure 5). Les deutérosomes sont des structures denses en électrons, non centriolaires, qui peuvent soutenir la croissance de pro-centrioles uniques ou multiples en fonction de leur taille (Klos Dehring et al. 2013). L'utilisation de l'imagerie en temps réel corrélée à une super-résolution apportée par la microscopie électronique (appelé en anglais « live imaging combined with correlative super-resolution light and electron microscopy ») a mis en évidence que seul le centriole fils contribue à la formation des deutérosomes, et donc à plus de quatre-vingt-dix pour cent de la population finale de centrioles (Al Jord et al. 2014). La superposition de deux processus différents de production des centrioles reste cependant énigmatique. Récemment, Mercey et al. ont démontré que les cellules en culture de trachée et des cellules épendymaires du cerveau de souris dépourvues de deutérosomes (par déplétion de Deup1) présentent un nombre correct de centrioles. Ce processus est permis grâce à l'amplification importante de centrioles à proximité du centriole père. Ces résultats très intéressants suggèrent alors que dans ces types cellulaires, les centrioles peuvent s'amplifier indépendamment des deutérosomes (Mercey et al. 2019).

1.2.1.2. Maturation du centriole : assemblage des appendices distaux et sub-distaux

Un centriole est mature lorsqu'il est capable de former un cil ou un flagelle. Alors que la formation et l'élongation d'un nouveau centriole nécessitent la durée d'un cycle cellulaire, sa maturation ne se produit qu'au cours du cycle cellulaire suivant (Pour plus de détails, voir revue Jana, Marteil, et Bettencourt-Dias 2014). Cette étape est caractérisée par l'acquisition des appendices sub-distaux et appendices distaux (également appelés fibre de transition) sur le centriole père (Figure 4). Les appendices distaux émergent à partir du tubule-B et sont essentiels à la ciliogénèse car ils permettent le recrutement de vésicules ciliaires puis l'ancrage à la membrane plasmique alors que les appendices sub-distaux sont des stabilisateurs et des nucléateurs de microtubules intra-cytoplasmiques (Tateishi et al. 2013).

1.2.1.3. Amarrage de vésicules pré-ciliaires sur les appendices distaux

Comme mentionné précédemment, les appendices distaux présents sur le centriole père sont essentiels pour recruter les vésicules pré-ciliaires. Les travaux de (C.-T. Wu, Chen, et Tang 2018) suggèrent que ces vésicules pré-ciliaires pourraient provenir du Golgi. Cette étude réalisée sur des cellules RPE a mis en évidence que c'est la protéine Myosin-Va, capable de se déplacer le long des filaments d'actine, qui transporte les vésicules pré-ciliaires jusqu'aux appendices distaux. Les protéines Cep164 et Ccdc41, localisées aux appendices distaux, interagissent ensemble et jouent un rôle indispensable dans l'amarrage de ces vésicules. La réalisation d'expériences fonctionnelles et biochimiques sur des cellules en culture a mis en évidence que la machinerie de transport vésiculaire Rab8 et son activateur Rabin8 interagissent avec Cep164 et sont impliqués dans la fusion des vésicules pré-ciliaires pour former la vésicule ciliaire du côté distal du centriole père (Schmidt et al. 2012; Joo et al. 2013; C.-T. Wu, Chen, et Tang 2018).

1.2.1.4. Formation des vésicules ciliaires (VC) et extension de la VC

Durant la ciliogénèse intracellulaire, la membrane ciliaire émerge à partir de vésicules pré-ciliaires qui vont fusionner pour former une vésicule ciliaire qui s'étendra par la suite pour donner naissance à la membrane ciliaire, recouvrant l'axonème en croissance. Deux études (Q. Lu et al. 2015; Insinna et al. 2019) ont montré que les protéines PACSIN1, EHD1 et EHD4, réorganisent les pré-vésicules associées aux appendices distaux. EDH1 et EDH4 recrutent Snap29 aux appendices distaux afin d'induire une tubulation des pré-vésicules et une extension de ces dernières (Q. Lu et al. 2015). Pacsin 1 et EHD1 crée ensuite un tubule de membrane intra-cytoplasmique entre l'axonème en croissance et la membrane plasmique, afin de faciliter l'émergence du cil en dehors de la cellule (Insinna et al. 2019).

1.2.1.5. L'enlèvement des protéines de la coiffe sur le centriole père est un prérequis pour l'allongement de l'axonème

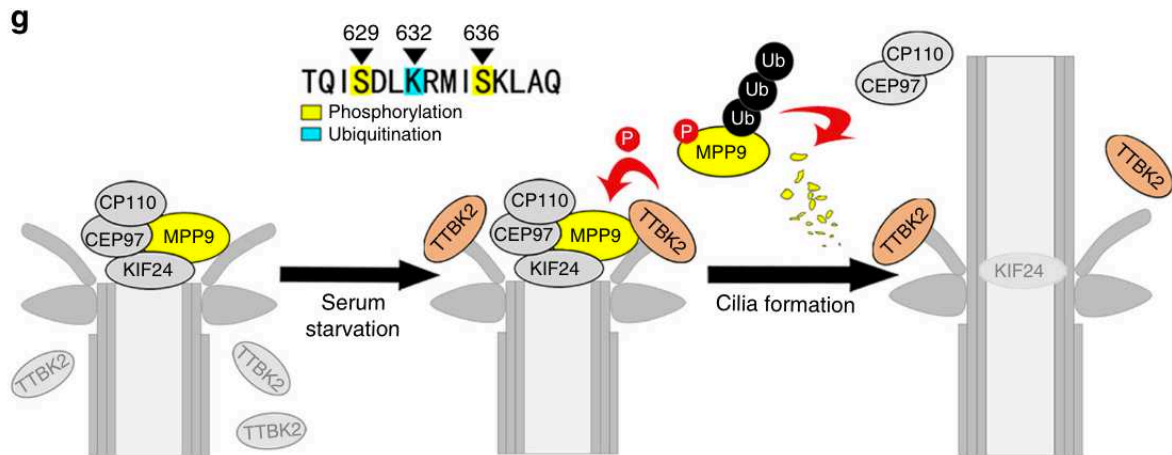


Figure 6 : Modèle schématique du rôle de MPP9, TTBK2, Cep97-CP110 dans le contrôle de la formation du cil. (Figure provenant du papier (N. Huang et al. 2018))

Comme décrit précédemment, les protéines Cp110 et Cep97 localisées sur les appendices distaux ont une activité de « coiffe » qui inhibe la croissance des microtubules. Des travaux sur les cellules en culture RPE et U2OS ont montré que la Phosphoprotéine 9 de Phase M (MPP9), se localise sur le centriole père où elle va former une structure circulaire et recruter le couple Cep97-Cp110 en se liant directement à Cep97. Un des facteurs déclencheurs de la ciliogénèse est la carence nutritionnelle. Ce signal stimule le recrutement de la sérine-thréonine kinase « Tau Tubulin Kinase 2 (TTBK2) » sur les appendices distaux qui va phosphoryler plusieurs résidus « sérine » de la protéine MPP9. Cela va alors conduire à son ubiquitinylation et sa dégradation ultérieure par le protéasome. La dégradation de MPP9 conduit à l'enlèvement de Cep97-Cp110 du centriole père et à l'initiation de la ciliogénèse (S. C. Goetz, Liem, et Anderson 2012; N. Huang et al. 2018) (Figure 6).

1.2.1.6. Élongation de l'axonème

L'élongation de l'axonème ciliaire et de la membrane implique un transport bidirectionnel de complexes protéiques associés à des moteurs de microtubules : les protéines d'IFT. La démonstration initiale d'un transport dans l'axonème a été réalisée

chez *Chlamydomonas* par le chercheur Kozminski. Son étude d'imagerie en temps réel par microscopie à contraste interférentiel a mis en évidence le déplacement de particules entre la membrane et les doublets de microtubules, soit de la base vers l'extrémité du flagelle (transport antérograde), soit dans le sens inverse (transport rétrograde) (Kozminski et al. 1993). La détermination de la composition moléculaire du complexe a quant à elle été faite par l'équipe de J. Rosenbaum. La purification biochimique du contenu des flagelles, isolés du corps cellulaire de *Chlamydomonas*, a révélé la présence de 15 protéines qui s'organisent en deux sous-complexes: appelés **IFT-A et IFT-B** (Cole et al. 1998). Par la suite, d'autres études réalisées chez les vertébrés ont mis en évidence l'existence de 20 protéines IFT différentes. Le transport **antérograde** nécessite des particules IFT-B ainsi que la **Kinésine-2**. Le transport **rétrograde** est conduit par la **Dynéine-2** et repose sur les protéines IFT-A. Les IFT jouent ainsi un rôle décisif dans la construction, le maintien et la fonctionnalité des cils (Pour plus de détails, voir la revue (Bhogaraju, Engel, et Lorentzen 2013)). Il est à noter que la délétion génétique d'une protéine IFT conduit souvent à un défaut général d'assemblage des cils causé par la perturbation du complexe IFT correspondant, ce qui rend difficile l'évaluation des fonctions spécifiques des protéines IFT individuelles à partir du phénotype des mutants.

Les analyses réalisées chez *Chlamydomonas*, *C.Elegans*, ou des cellules RPE (Lechtreck et al. 2009; Blacque et al. 2004; Nachury et al. 2007a) ont mis en évidence que le BBSome co-localise avec certains IFT et pourrait agir comme co-facteur pour le transport rétrograde de cargos au sein du cil. Le BBSome est un multimère protéique conservé chez la plupart des espèces (Nachury et al. 2007b; Valentine et al. 2012; Lechtreck et al. 2009; Langousis et al. 2016) que l'on retrouve concentré sur la membrane ciliaire, ainsi que parmi les satellites centriolaires cytoplasmiques. Ce complexe est composé de 8 protéines appelées BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8, BBS9, BBS18/BBIP10.

1.2.2. Construction d'une barrière ciliaire fonctionnelle au niveau de la Zone de Transition (ZT)

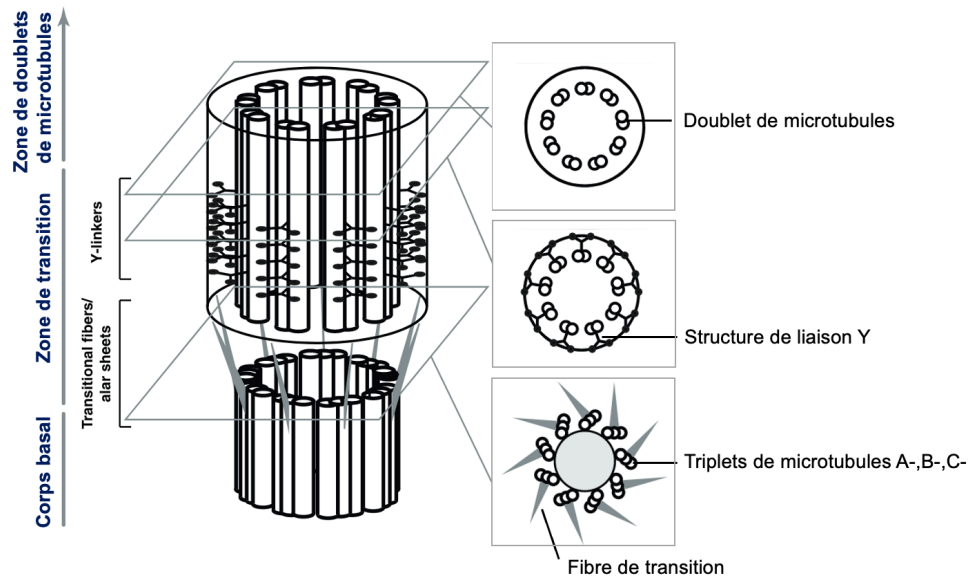


Figure 7 : Structure de la zone de transition chez les mammifères. (Adaptée de la revue (Czarnecki et Shah 2012))

La zone de transition se trouve à la jonction entre deux structures du cil : la partie distale du corps basal et l'axonème. Elle peut être subdivisée en deux régions visibles par microscopie électronique à transmission : elle prend naissance au niveau des **fibres de transition**, qui comme rappelé précédemment, émergent à partir du tubule-B et s'insèrent dans la membrane plasmique péri-ciliaire. Le corps principal quant à lui est caractérisé par la présence de **structures de liaison avec une forme de Y** qui se projettent à partir des doublets de microtubules et s'attachent à la membrane ciliaire. Ces structures de liaison-Y forment des protrusions circulaires appelées perles qui s'alignent en s'enroulant sous la membrane ciliaire pour former le "collier ciliaire" (Gibbons et Grimstone 1960; Gilula et Satir 1972) (Figure 7).

Organisation des différents modules composant la zone de transition

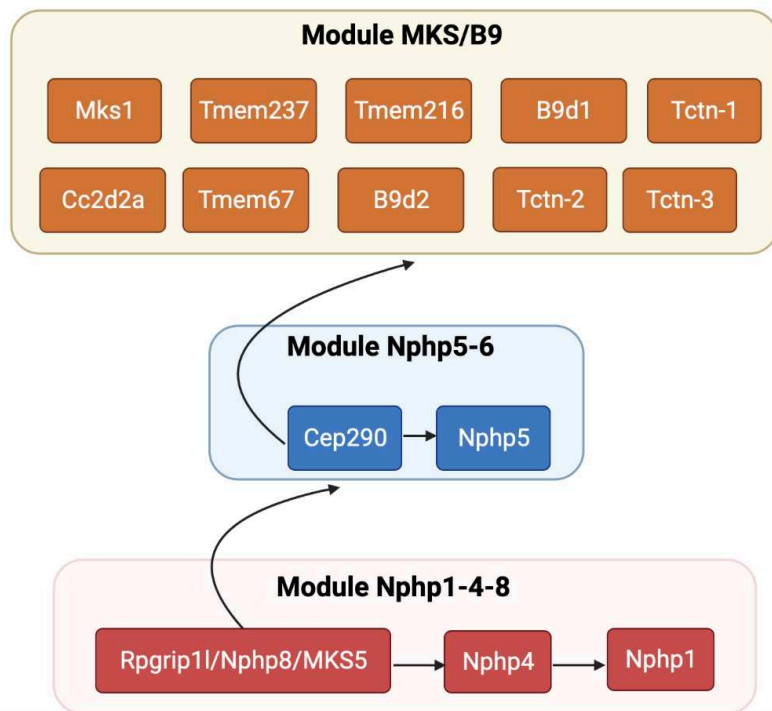


Figure 8 : Modèle de réseau d'interaction des différents modules présents à la zone de transition basé sur des études chez *C. Elegans* et cellules en culture. Rpgrip11/Nphp8/MKS5 est une protéine centrale dans le recrutement des différents partenaires de la ZT. Elle fait partie du complexe Nphp1-4-8 en rouge. Elle recrute la protéine Cep290 qui recrute ensuite la protéine Nphp5 (module bleu). Cep290 va à son tour recruter les partenaires du module MKS/B9 (module orange). (Schéma réalisé grâce à Biorender)

La plupart des protéines localisées à la TZ ont été identifiées par des études menées chez des patients atteints de ciliopathies ou grâce à des modèles animaux de perte de fonction pour un gène ciliaire ou encore par des cribles utilisant des ARNi sur des lignées cellulaires. Ces analyses ont été complétées par des études d'interactions biochimiques et de voisinage immédiat par biotinylation ce qui a permis d'établir une carte du réseau d'interaction entre les protéines de la zone de transition. Cette carte peut varier d'un type cellulaire/espèce à un(e) autre mais comprend **au moins trois groupes différents de complexes multi-protéiques** : **Nphp1-4-8**, le module **MKS/B9** (MKS1, MKS2/Tmem216, MKSR-1/B9D1, MKS10/B9D2, Tmem67, MKS6/Cc2d2a, Tmem237), et le module **NPHP5-6** (Sang et al. 2011; Garcia-Gonzalo et al. 2011;

Williams et al. 2011; Czarnecki et Shah 2012) (Figure 8). La protéine Retinins Pigmentosa GTPase Regulator Interaction Protein-1-Like (**Rpgrip1I**) aussi appelée Nphp8/MKS5 joue un rôle clé dans l'organisation et le recrutement des protéines NPHP1 et NPHP4 pour former le complexe NPHP1-4-8 par le biais de ses domaines C2N et C2 et recrute également le complexe MKS à la zone de transition des vertébrés (Sang et al. 2011; Williams et al. 2011; Jensen et al. 2015; Wiegeling et al. 2018) via sa région « coiled-coil ». Le recrutement de Nphp1 se produit indirectement par liaison avec Nphp4 et celui du module MKS/B9 via Cep290/Nphp6. Le module **Inversin (Nek8, Inversin, Nphp3, Anks6)** est localisé dans la partie proximale de l'axonème, au-dessus de la zone de transition (Williams et al. 2011; Sang et al. 2011; Jensen et al. 2015; Hoff et al. 2013).

La perte conjointe d'un des membres du module NPHP1-4-8 et d'un des membres du module MKS/B9 chez *C.Elegans* conduit à un défaut sévère de ciliogénèse et affecte la structure de la zone de transition : la membrane ciliaire n'est plus attachée aux doublets de microtubules via les structures de liaison-Y, et il y a un défaut de la composition du compartiment ciliaire. Ces défauts ne sont pas observés chez un simple mutant démontrant la nécessité de coopération entre les différents modules pour construire une ZT fonctionnelle chez *C.Elegans* (Williams et al. 2011).

Outre les études sur la hiérarchie d'assemblage de la ZT chez *C. elegans* et dans les cellules de mammifères, des analyses ont également été effectuées chez *Drosophila melanogaster*. Ici, la protéine Rpgrip1I n'a pas de rôle central dans la construction de la ZT. En effet, il n'y a pas d'orthologue de ce gène chez la *Drosophile*, ni des gènes *nphp4* et *nphp1*, ce qui montre que cet organisme est capable de former une ZT fonctionnelle sans le complexe NPHP. Plusieurs travaux ont montré que c'est la protéine Cep290 qui sert d'échafaudage pour les autres protéines de la ZT chez la drosophile, et est aussi indispensable à l'intégrité de l'axonème (Basiri et al. 2014; Z. Wu et al. 2020).

1.2.3. Contrôle de la composition ciliaire : régulation de la signalisation cellulaire

Étant donné la complexité de la ZT, nous pouvons nous demander par quels mécanismes elle contrôle la composition ciliaire et comment les protéines sont acheminées à travers l'assemblage complexe des structures de la base ciliaire ?

La présence des fibres de transition, des structures de liaisons-Y et des « colliers ciliaires » constituent ensemble une barrière physique, ce qui suggère un mécanisme de filtration ciliaire. De plus, la distance entre deux fibres de transition a été estimée à environ 60 nm, excluant donc un trafic vésiculaire classique à travers ces fibres car la taille des plus petites vésicules de transport dépasse 60 nm (Nachury, Seeley, et Jin 2010).

1.2.3.1. Mise en place de la barrière de diffusion par les protéines et les lipides

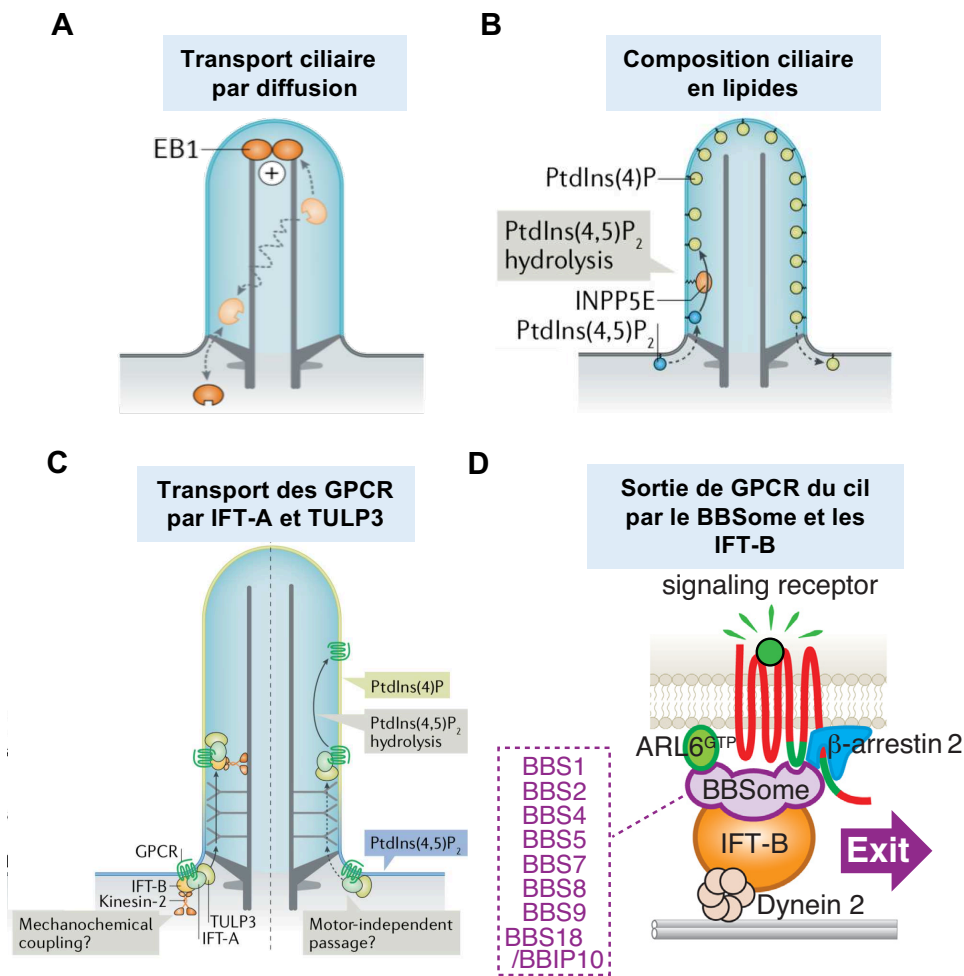


Figure 9 : Différents processus de régulation de la composition ciliaire. **A.** Mécanisme de diffusion à travers le lumen du cil avec l'exemple de la protéine EB1 qui se lie au microtubule à l'extrémité +. **B.** La phosphatidylinositol (PtdIns) 5-phosphatase INPP5E dans la membrane ciliaire convertit PtdIns(4,5)P₂ en PtdIns(4)P. Les flèches en pointillés indiquent l'échange de lipides entre les cils et la membrane plasmique (en supposant qu'il n'y a pas de barrière de diffusion pour les lipides). **C.** Importation de certains récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) par le complexe TULP3-IFT-A. L'IFT-A reconnaît les signaux de ciblage ciliaire (CTS) au sein des GPCR et décharge ses cargos lors de l'hydrolyse des PtdIns(4,5)P₂ en PtdIns(4)P dans le cil. **D.** Modèle schématique du rôle du BBSome dans la sortie de protéines GPCR du cil médié par Arl6-GTP, la β-arrestine 2 et les protéines IFT-B liées à la dynéine 2. (Schémas A à C modifiés de la revue (Nachury et Mick 2019), schéma D. tiré de la revue (Nachury 2018))

Le transport de protéines ciliaires dans le cil peut se faire par 2 mécanismes à ce jour identifiés : un mécanisme de diffusion à travers le lumen du cil ou grâce à un système d'IFT entraîné par un moteur moléculaire.

En effet, il existe un mécanisme d'entrée dans le cil par diffusion au travers du lumen du cil, ce qui permet l'entrée des molécules solubles jusqu'à 70-100 kDa (Breslow et al. 2013; Kee et al. 2012). Le transport par diffusion de la protéine « End-binding protein 1 » (EB1) est un très bon exemple : Chez *C.reinhardtii*, EB1 reste à l'extrémité proximale des flagelles à l'état stable où elle se lie à l'extrémité + des microtubules et même suite à un raccourcissement et en absence de protéines IFT. Ce transport ciliaire est indépendant des protéines IFT (Figure 9A) (Pedersen et al. 2003; J. A. Harris et al. 2016). Très récemment, une étude a montré que cette route intra-luminale est aussi utilisée dans les fibroblastes par des vésicules rab8 transportant les récepteurs SST3R et HTR6 pour 50% du transport, les autres vésicules passant entre les fibres de transition puis entre les rails de IFT et la membrane plasmique (Ruba et al. 2023).

Au contraire, le transport actif dans le cil est réalisé grâce à la machinerie IFT-A et notamment de la protéine TULP3 pour contribuer à l'entrée de toutes les protéines GPCR connues à ce jour (Mukhopadhyay et al. 2010; Sun et al. 2012; Badgandi et al. 2017) Figure 9C). Les protéines IFT-A sont capables de reconnaître un signal de ciblage ciliaire VxP (appelé « ciliary targeting signal » CTS en anglais) qui se trouve généralement en région C-terminale des protéines ciliaires (Malicki et Avidor-Reiss 2014). Par exemple, le récepteur couplé aux protéines G (Gpr161) de la signalisation Hedgehog utilise la protéine Tulp3 comme adaptateur au complexe IFT-A et PI(4,5)P2 présent dans le cil pour se concentrer dans les cils (Mukhopadhyay et al. 2010). D'autres GPCR, notamment Sstr3, Htr6 et le récepteur 1 de l'hormone concentrant la mélanine (Mchr1) présentent une localisation ciliaire réduite ou absente chez les souris déficientes en *Bbs2* ou *Bbs4* (Berbari et al. 2008), ou dans les cellules en culture IMCD3 déficientes en *Ift88* et les cellules RPE déficientes en Ift-A (*ift140*, *ift122*) (Mukhopadhyay et al. 2010; Chih et al. 2012). La perte de TULP3 dans les cellules RPE conduit à une réduction importante de la localisation ciliaire des protéines Gpr161, Mchr1 et Sstr3 (Mukhopadhyay et al. 2010; Badgandi et al. 2017). Ces résultats démontrent que les protéines IFT et BBS régulent le transport de ces récepteurs dans le cil.

De la même manière, les protéines IFT-B liées au moteur Dynéine-2 et le BBsome sont impliquées dans la sortie des protéines du cil (Ye, Nager, et Nachury 2018). L'activation des GPCR (comme Sstr3 et Gpr161) par liaison de leur ligand induit un signal de sortie du cil (Rohatgi, Milenkovic, et Scott 2007; Liew et al. 2014; Eguether et al. 2014; Pal et al. 2016; Green et al. 2016; Ye, Nager, et Nachury 2018). Il est à noter que le ligand du récepteur Gpr161 n'a pour l'instant pas été identifié. Sa sortie du cil est stimulée par l'ajout du ligand Shh qui se fixe sur son récepteur Ptch1, un inhibiteur de la voie de signalisation Shh. Suite à l'ajout du ligand, le BBsome est enrichi à l'extrémité distale du cil, et la GTPase Ift27 se désengage de son complexe IFT-B pour aller interagir avec la protéine Arl6-GFP (une autre GTPase) et va catalyser localement l'inter-conversion de l'Arl6-GDP en Arl6-GTP. Ceci initie alors l'interaction entre Arl6-GTP/BBsome à la membrane ciliaire. Le complexe Arl6/BBsome va alors interagir avec le train Ift27 et directement avec la protéine GPCR par reconnaissance de motifs spécifiques (par exemple Gpr161) et promouvoir sa sortie à travers la zone de transition (Eguether et al. 2014; Liew et al. 2014; Ye, Nager, et Nachury 2018; Klink et al. 2017). Cependant, ce mécanisme n'est pas suffisant pour permettre la sortie du cil et suggère une seconde étape probablement médiée par la protéine β -arrestin1/2, un senseur de l'activation des GPCR (Ye, Nager, et Nachury 2018; Pal et al. 2016; Green et al. 2016). En effet, la perte de la β -arrestin1/2 conduit à une accumulation de GPR161 ou de SSTR3 dans le cil. De plus, la β -arrestine 2 reconnaît directement la forme activée de ces GPCR (par exemple la partie C-terminale de la protéine GPR161). Ces travaux mettent alors en évidence que les protéines GPCR activées vont dans un premier temps former un complexe avec les composants BBsome/Arl6-GTP et Ift27 (et probablement d'autres protéines) puis se lier à la β -arrestine pour sortir du cil (Figure 9D).

La membrane ciliaire et la membrane plasmique présentent une composition lipidique distincte. La membrane ciliaire est enrichie en PtdIns-4 Phosphate (PtdIns(4)P) et seulement une faible quantité de PtdIns(4,5)P₂ se trouvent à la base du cil, tandis que la composition inverse est observée sur la membrane plasmique. (Figure 9B). Lorsque la protéine ciliaire inositol polyphosphate-5-phosphatase E (INPP5E) est absente du cil, PtdIns(4,5)P₂ se localise ectopiquement dans tout le cil. Ces données montrent que

le lipide PtdIns(4,5)P₂ diffuse de la membrane plasmique jusque dans le cil puis est hydrolysé par l'enzyme INPP5E pour former du PtdIns(4)P (Garcia-Gonzalo et al. 2015; Chávez et al. 2015). Dans ce contexte mutant, la composition lipidique de la membrane ciliaire modifiée influence la localisation de protéines ciliaires, notamment GPR161 lors de la signalisation Hedhehog (Hh). L'analyse de fibroblastes embryonnaires murins (MEF) *Inpp5e*^{-/-} et de cellules souches neurales de souris *Inpp5e*^{-/-} mettent en évidence que Tulp3 (qui lie le PtdIns(4,5)P₂ mais pas le PtdIns(4)P) (Mukhopadhyay et al. 2010; 2013) joue un rôle critique pour limiter l'accumulation de Gpr161 dans le cil. Tulp3 est nécessaire à l'interaction entre la protéine Gpr161 et les protéines IFT-A pour son entrée dans le cil (Garcia-Gonzalo et al. 2015; Chávez et al. 2015). La perte de *Inpp5e* conduit à une augmentation du niveau de PtdIns(4,5)P₂ dans le cil, et une augmentation du régulateur négatif de la voie de signalisation Hh, Gpr161, ainsi que des protéines Tulp3 et IFT-A dans le cil, ce qui restreint notamment la capacité du cil à transduire les signaux Hh. De la même manière, Tulp3 et IFT-A co-régulent la localisation ciliaire des protéines GPCR Mchr1 et Sstr3 dans des cellules en culture RPE (Mukhopadhyay et al. 2010).

La localisation des protéines dans le cil est également contrôlée par des protéines situées dans la région péri-ciliaire autour du corps basal, de la famille « septine » qui forment une barrière de diffusion. Les septines sont des GTPases associées à la membrane qui s'assemblent en filaments ou en spirales qui peuvent limiter la diffusion des protéines le long du plan de la membrane dans certains types cellulaires (Pour plus de détails, voir ces deux revues qui décrivent les fonctions des septines (Fung, Dai, et Trimble 2014; Bridges et Gladfelter 2015). Les septines sont capables de lier le PI(4,5)P₂ permettant leur polymérisation (Mostowy et Cossart 2012). L'analyse de la localisation de la protéine Septine 2 dans des MEF *Inpp5e*^{-/-} après stimulation de SAG (agoniste de la voie Hedhehog) a mis en évidence une réduction de sa localisation à la base du cil par rapport à la condition contrôle où sa quantité est inchangée (Dyson et al. 2017). L'enzyme *Inpp5e* est donc nécessaire pour la localisation à la base ciliaire de Sept2. De plus, Sept2 contrôle la localisation de protéines de la ZT comme les protéines Cc2d2a, Tmem231 et B9D1 dans des cellules IMCD3 (Chih et al. 2012). Comme les protéines de la ZT, Sept2 est capable de contrôler la localisation ciliaire de protéines telles que Sstr3, Htr6 (récepteur à la sérotonine 6), la fibrocystine et Smo dans les cellules IMCD3. Une perte d'expression

de Sept2 conduit à une diminution de la localisation de Smo dans le cil ainsi qu'à une diminution de l'activité transcriptionnelle de Gli1 et Ptch1 suite à une stimulation par le ligand Shh. Sept2 est donc requis pour la transduction de Hh dépendante du cil (Q. Hu et al. 2010). Outre leur fonction en tant que barrière ciliaire, les Septines peuvent réguler la ciliogénèse. Chez le xénope, la Septine 7 forme un anneau à la base des cils motiles dans l'épiderme, et sa perte entraîne une diminution et un raccourcissement des cils (Kim et al. 2010).

1.2.3.2. Impact des mutations de protéines de la TZ sur la composition ciliaire et le développement

L'analyse des mutations dans des protéines des différents modules de la ZT a révélé une altération grave de la composition du contenu axonémal, c'est-à-dire une fuite de certaines protéines ciliaires en dehors du cil et une accumulation ectopique de protéines qui en sont normalement exclues. Cela met en lumière le rôle de la ZT comme barrière de diffusion pour des protéines cytoplasmiques et comme porte d'entrée sélective ou comme zone de rétention pour les protéines ciliaires. Par exemple, Garcia-Gonzalo et al. ont analysé la localisation ciliaire de plusieurs récepteurs ou composant de voie de transduction dans des conditions où certaines protéines de la TZ sont absentes : il s'agit du récepteur à la somatostatine (SSTR3), de l'Adenylase cyclase III (ACIII), du récepteur de Sonic Hedgehog (Hh) Smoothened (Smo), et de PC2 dans des MEF mutants pour certains gènes du module MKS/B9 (Tctn1, Tctn2, Ccd2a, Tmem67) (Garcia-Gonzalo et al. 2011). Le récepteur Sstr3 se localise correctement au cil dans chacun de ces mutants du complexe MKS, tandis que la protéine ACIII est totalement absente des cils des mutants. La protéine PC2, est quant à elle absente des cils des MEF *Tctn1^{-/-}*, *Tctn2^{-/-}* ou *Cc2d2a^{-/-}*, alors que sa localisation ciliaire n'est pas altérée dans les cellules *Tmem67^{-/-}*.

La fonction du cil dans la signalisation hedgehog a été mise en évidence par l'analyse phénotypique des mutants de l'IFT qui altèrent le développement de l'embryon de souris en mimant la perte de fonction de la voie Hh pour certains phénotypes ou son activation ectopique pour d'autres défauts (S. C. Goetz et Anderson 2010). L'activation de la voie de signalisation requiert la translocation de la protéine Smo dans le cil, un phénomène qui est dépendant de Tctn1, Tctn2 et Cc2d2a mais indépendant de Tmem67 (Garcia-Gonzalo et al. 2011). La souris *Tctn1^{-/-}* présente notamment un doigt

supplémentaire (= un exemple de polydactylie) sur les deux membres postérieurs, ce qui mime la perte de fonction de certains composants de la voie Hh. Shh est impliqué dans la spécification du nombre et l'identité des doigts des vertébrés en empêchant la formation du répresseur Gli3 (Gli3-R) dépendant des cils. Les embryons de souris *Tctn1*^{-/-} présentent des niveaux nettement plus élevés de la forme longue de Gli3 (« Gli3-FL »), ainsi qu'une réduction de la forme courte ce qui montre un défaut de clivage protéolytique de la protéine Gli3 et donc de la formation du répresseur Gli3R. De plus, les souris *Tctn1/2*^{-/-} et *Cc2d2a*^{-/-} présentent toutes des défauts de développement dramatique avec *situs inversus*, des défauts de ciliogénèse restreints à certains tissus et une létalité embryonnaire (Garcia-Gonzalo et al. 2011). En effet, ces mutants perdent les cils du nœud embryonnaire, et présentent une réduction du nombre de cils dans le tube neural avec un défaut d'élongation de l'axonème. Dans le mésenchyme du bourgeon du membre, les cils sont moins nombreux, mais ceux qui persistent présentent une longueur proche de celle des contrôles, bien que non quantifiée. Les MEF *Tctn1/2*^{-/-} et *Cc2d2a*^{-/-} sont également capables de générer un cil de longueur correcte. Les souris *Tmem67*^{-/-} présentent quant à elles un phénotype moins sévère que les souris *Tctn1/2*^{-/-} et *Cc2d2a*^{-/-} car elles survivent jusqu'à la naissance. Cependant, elles présentent des kystes rénaux depuis le stade fœtal et une réduction du nombre de cils dans les tubules rénaux. Les MEF *Tmem67*^{-/-} cultivées *in vitro* ne présentent aucun défaut de ciliogénèse, révélant à nouveau des fonctions type-cellulaire spécifiques pour les protéines de la ZT.

Plusieurs études ont également montré que la perte de *Rpgrip11/Nphp8* chez la souris conduit à un défaut de ciliogénèse tissu-dépendant ainsi qu'une altération de la voie Hh (Delous et al. 2007; Vierkotten et al. 2007; Laclef et al. 2015; Gerhardt et al. 2015; Andreu-Cervera et al. 2019). Au stade embryonnaire, les souris *Rpgrip11*^{-/-} présentent un allongement des cils dans les MEF, les bourgeons de membres, les poumons, et le foie, et un raccourcissement dans le cœur. Dans le télencéphale, les cellules neuro-épithéliales sont presque toutes dépourvues de cil (Gerhardt et al. 2015; Besse et al. 2011). Wiegering al. ont mis en évidence sur des cellules en culture (MEF) que *Rpgrip11* régule la quantité de plusieurs protéines dans le cil comme le récepteur *Sstr3* et la GTPase ciliaire *Arl13b*, en favorisant le recrutement à la ZT de *Cep290* (Wiegering et al. 2020).

La perte des structures de liaison-Y chez *Chlamydomonas cep290^{-/-}* ou chez *C.Elegans* dans des doubles mutants pour les complexes MKS/NPHP conduit à une pénétration anormale de protéines cytoplasmiques dans le cil ainsi qu'une accumulation de certains composants ciliaires qui devraient être recyclés dans le cytoplasme (Craigie et al. 2010; Williams et al. 2011). Par exemple chez *Chlamydomonas*, l'analyse par Western blot du contenu de flagelle isolé a mis en évidence que le mutant *cep290^{-/-}* présente une accumulation de protéines de transport antérograde IFT-B telles que IFT81, IFT46, IFT20 associée à une accumulation de la protéine *bbs4*. L'analyse par spectrométrie de masse a révélé une accumulation anormalement élevée des protéines facteurs élongation 3 (EF-3) et EF-1 α dans le flagelle. Cette accumulation anormale n'est pas observée pour l'ensemble des protéines car, Craigie et al. ont observé une diminution de la quantité de protéine IFT-A IFT139 et de la protéine PC2 (Craigie et al. 2010). Ces résultats de protéomique quantitative à partir de compartiments axonémaux isolés fournissent donc des preuves expérimentales que la ZT contrôle de manière sélective l'entrée des protéines et des particules IFT dans le cil, et que CEP290 est importante pour cette fonction.

Des défauts similaires de localisation de protéines ciliaires ont été observés suite à la perte de protéines du module NPHP1-4-8 chez *Chlamydomonas* (Lin, Guo, et Dutcher 2018; Awata et al. 2014). Le mutant *rpg1^{-/-}* (homologue de RPGRIP1L chez les mammifères) et le mutant *nphp4^{-/-}* arrivent à former un flagelle mais leur composition est différente du contrôle. Les compartiments axonémaux présentent notamment une augmentation de la quantité de protéines non ciliaires dans le flagelle avec une taille comprise entre 29 et 190 kDa pour le mutant *rpg1^{-/-}* et >50 kDa pour le mutant *nphp4^{-/-}*. Le défaut de la composition du flagelle est plus fort chez le mutant *rpg1^{-/-}* par rapport au mutant *nphp4^{-/-}* qui présente 40 protéines non ciliaires. L'analyse par spectrométrie de masse a révélé la présence de protéines de traduction (exemple : glutaminyl-tRNA synthetase), des protéines chaperones (Hsp70G chez le mutant *rpg1^{-/-}* ou Hsp90 chez le mutant *nphp4^{-/-}*), des protéines de production ATP. Cependant, le mutant *rpg1^{-/-}* ne présente qu'une très faible diminution du nombre de protéines ciliaires ce qui suggère que RPGRIP1L joue un rôle mineur dans la rétention de protéines ciliaires chez *Chlamydomonas*, mais contrôle la diffusion des protéines dans le cil (Lin, Guo, et Dutcher 2018). Le mutant *nphp4^{-/-}* présente quant à lui une diminution de protéines associées à la membrane telle que la protéine FAP33. La localisation de PC-2 n'est par contre pas affectée. Ainsi, une partie des protéines normalement associées à la

membrane flagellaire ne sont pas transportées ou ne sont pas retenues dans les flagelles en l'absence de NPHP4. (Awata et al. 2014) L'analyse par western blot montre que la perte de NPHP4 conduit à une légère augmentation de la quantité de certaines protéines IFT-B comme IFT52, IFT46 ainsi qu'une augmentation de la protéine IFT139 (appartenance au complexe IFT-A) mais de manière générale, la fréquence des particules IFT dans le cil n'est pas modifiée, et seule une légère diminution de la vitesse des IFT est observée. Ceci démontre que la perte de NPHP4 n'affecte pas directement la machinerie de l'IFT. Par ailleurs, NPHP4 se localise de manière distale par rapport à CEP290 dans la ZT, et leur perte respective conduit à des défauts de structures différentes. Les structures de liaisons Y sont maintenues dans le mutant NPHP4 en opposition au mutant CEP290, cette protéine n'est donc pas requise pour leur formation ou leur maintien (Craig et al. 2010). De plus, la perte de Cep290 affecte davantage la machinerie des IFT mettant en évidence que NPHP4 et CEP290 définissent des domaines fonctionnels et structuraux différents dans la zone de transition.

Ces résultats indiquent que la simple fabrication d'un cil n'est pas suffisante et qu'il est important de construire une barrière ciliaire fonctionnelle pour conserver une composition du compartiment ciliaire correcte. La perturbation de la barrière ciliaire est observée dans un ensemble de maladies appelées ciliopathies telles que les syndromes de Meckel-Gruber et de Joubert (Cette partie sera détaillée dans 1.4.). Pour résumer, plusieurs phénotypes peuvent émerger en fonction du gène de la ZT muté et conduire à une variété de défauts de ciliogénèse ainsi que de signalisation cellulaire. Cela montre donc que la ZT joue le rôle de barrière de filtration et régule la composition ciliaire en protéines et notamment en récepteurs impliqués dans plusieurs voies de signalisation.

1.2.4. Régulation transcriptionnelle des gènes ciliaires

Le contrôle des gènes codant pour des protéines nécessaires à la formation et à la fonction des cils est principalement régulé par deux familles de facteurs de transcription.

1.2.4.1. La famille des facteurs de transcription RFX

La première famille identifiée correspond aux **protéines RFX** (Regulator Factor X) qui sont des facteurs de transcription de type *winged-helix* requis pour l'expression de composants essentiels de tous les types de cils. Ces facteurs possèdent un domaine de liaison à l'ADN conservé et se fixent sur le promoteur de leurs gènes cibles au niveau d'une séquence consensus appelée boîte X, retrouvée sur les régions régulatrices de nombreux gènes ciliaires gènes (Gajiwala et al. 2000). Ils ont été identifiés chez un grand nombre d'espèces eucaryotes. Jusqu'à présent, 8 facteurs RFX ont été identifiés chez les mammifères avec l'exception du poisson zèbre qui en contient 9 (Emery et al. 1996; Aftab et al. 2008). *D.melanogaster* et *C.Elegans* n'en possèdent qu'un appelé RFX et DAF-19 respectivement, alors que la levure, non ciliée, en possède deux (CRT1 et SAK1), impliquées respectivement comme effecteur de la voie de contrôle des dommages à l'ADN et de la réplication tandis que SAK1 régule le métabolisme du glucose (Dubruille et al. 2002; Swoboda, Adler, et Thomas 2000; M. Huang, Zhou, et Elledge 1998; Bendrioua et al. 2014).

Les protéines RFX1-4 sont exprimées dans plusieurs organes et présentent parfois des rôles redondants dans la formation et la maintenance du cil. Rfx2 est par exemple exprimé dans les tissus ciliés comme le cerveau, les reins ou l'organe de latéralité. Une perte de *rfx2* chez l'embryon de poisson-zèbre conduit à une réduction du nombre de cils primaires dans le tube neural et de cils motiles dans la vésicule de Kupffer (Yu et al. 2008; Y. Liu et al. 2007; Bisgrove et al. 2012). Rfx2 est également requis pour la croissance des cils primaires chez le xénope (Chung et al. 2012). Chez la souris, Rfx3 et Rfx4 sont tous deux exprimés dans certains territoires du cerveau, comme par exemple l'organe sous-commissural (SCO) qui sécrète la sco-spondine, et sur laquelle nous reviendrons plus tard dans l'introduction. La perte de *Rfx3* ou *Rfx4* chez la souris conduit à une perte des cils sur les cellules épendymaires du SCO, à une désorganisation de ces structures voire à leur absence, ainsi qu'à une hydrocéphalie (Baas et al. 2006; Blackshear et al. 2003). De manière générale, en fonction du territoire d'expression et de l'espèce, les protéines RFX vont contrôler la ciliogénèse de différents types cellulaires en fonction de leur profil d'expression (Tableau 1).

Tableau 1 : Facteurs de transcription ciliaires nécessaire à la production de différents types ciliaires dans différents organismes. (Issu de la revue (Choksi et al. 2014))

Cilia type	Organism	Transcription factor(s) required	References
Airway motile multicilia	Mouse	FOXJ1	(Brody et al., 2000; Chen et al., 1998)
Epidermal motile multicilia	<i>Xenopus</i>	FOXJ1 RFX2	(Stubbs et al., 2008) (Chung et al., 2012)
Sperm flagellum	Mouse	FOXJ1	(Chen et al., 1998)
Oviduct motile multicilia	Mouse	FOXJ1	(Brody et al., 2000; Chen et al., 1998)
Brain ependymal multiple motile cilia	Mouse	RFX3 FOXJ1	(El Zein et al., 2009) (Brody et al., 2000; Chen et al., 1998)
Brain ependymal monocilia/multicilia	<i>Xenopus</i>	FOXJ1	(Hagenlocher et al., 2013)
Spinal canal ependymal motile cilia	Zebrafish	FOXJ1A	(Yu et al., 2008)
Nodal motile monocilia	Mouse	RFX3 FOXJ1	(Bonnafe et al., 2004) (Alten et al., 2012)
Kupffer's vesicle motile monocilia	Zebrafish	RFX2 FOXJ1A	(Bisgrove et al., 2012) (Stubbs et al., 2008; Yu et al., 2008)
Gastrocoel roof-plate motile monocilia	<i>Xenopus</i>	RFX2 FOXJ1	(Chung et al., 2012) (Stubbs et al., 2008)
Pronephric motile multicilia and monocilia	Zebrafish	RFX2 FOXJ1A FOXJ1B	(Liu et al., 2007) (Yu et al., 2008) (Hellman et al., 2010)
Immotile signaling cilia	Mouse Zebrafish <i>Xenopus</i>	RFX4 RFX2 RFX2	(Ashique et al., 2009) (Yu et al., 2008) (Chung et al., 2012)
Otic vesicle kinocilia	Zebrafish	FOXJ1B	(Yu et al., 2011)
Chordotonal organ sensory motile cilia	<i>Drosophila</i>	FD3F	(Cachero et al., 2011; Newton et al., 2012)
Sensory neurons	<i>Drosophila</i> <i>C. elegans</i>	RFX DAF-19	(Dubruille et al., 2002) (Swoboda et al., 2000)
Olfactory motile cilia	Zebrafish	FOXJ1A	(Hellman et al., 2010)

Grâce à des études *in silico* et des approches expérimentales réalisées majoritairement sur *D.melanogaster* et *C.Elegans*, les chercheurs ont identifié certains gènes cibles directs de Rfx possédant un site de liaison « boîte X » sur leur promoteur (Swoboda, Adler, et Thomas 2000; Blacque et al. 2005; Efimenko et al. 2005; Laurençon et al. 2007; Ashique et al. 2009; Phirke et al. 2011). Ceci a permis l'identification de deux classes de gènes cibles : la première code pour des protéines ciliaires essentielles, impliquées dans les aspects fondamentaux de la formation et de la fonction des cils (Figure 10). Par exemple, les protéines Rfx contrôlent l'expression de toutes les protéines associées au complexe B des IFT, de toutes les protéines du BBsome ainsi que la protéine motrice Dync2li1 associée au complexe A des IFT. Les protéines Rfx contrôlent aussi l'expression des protéines de la zone de transition tels que les protéines à domaine B9 du complexe MKS. La deuxième classe comprend les gènes contenant des « boîtes X » qui sont nécessaires pour des fonctions ciliaires spécialisées. Ce groupe comprend notamment des représentants de différentes familles de récepteurs candidats et de facteurs associés aux récepteurs (Efimenko et al. 2005).

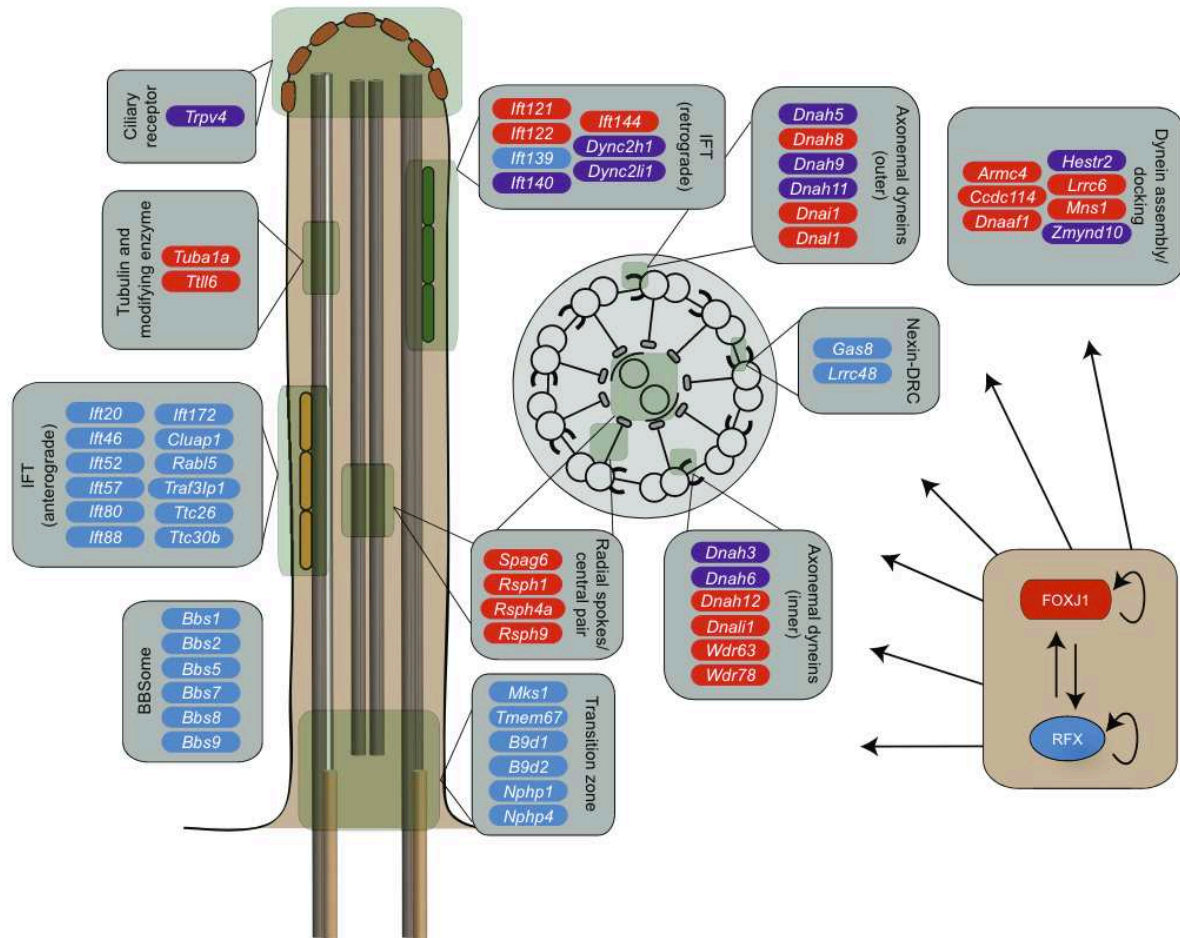


Figure 10 : Cibles directes et indirectes des facteurs de transcription RFX et Foxj1. Ces gènes cibles ont été obtenues grâce à des analyses chez la *Drosophila*, *C.Elegans* ou les *vertébrés*. Les gènes sont classés par fonction en respectant la structure ciliaire où ils sont localisés. Les gènes en bleus sont contrôlés par RFX, les gènes en rouge sont contrôlés par FOXJ1 et ceux en violet sont contrôlés par les deux facteurs de transcription. (Provient de la revue (Choksi et al. 2014))

1.2.4.2. Le facteur de transcription FOXJ1 est un régulateur de la ciliogénèse motile

Le second type de facteur de transcription de ciliogénèse est **FOXJ1 (forkhead box J1)**, qui appartient à la famille des facteurs de transcription FOX, caractérisés par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN de type forkhead (FKH). Ce facteur est présent chez de très nombreux eucaryotes mais aucun orthologue n'est présent ni chez *C.elegans*, ni chez *Drosophila melanogaster*, deux espèces qui ne présentent

pas de cils motiles (à l'exception du flagelle des spermatozoïdes de drosophile construit de manière IFT-indépendante). Des analyses d'hybridation in situ et par « southern-blot » ont mis en évidence que *Foxj1* est exprimé chez la souris dans un certain nombre de tissus portant des cils motiles incluant l'épithélium pulmonaire proximal en développement, les testicules et l'oviducte, et enfin l'épithélium de plexus choroïde différencié (Hackett et al. 1995; Lim, Zhou, et Costa 1997). Les souris déficientes pour *Foxj1* perdent les cils motiles de l'épithélium respiratoire avec une structure 9+2 et présentent un *situs inversus* (disposition en miroir des organes par rapport à leur positionnement normal), alors que dans d'autres organes, les cils primaires 9+0 comme ceux présents sur les neurones olfactifs sont bien présents. Une analyse par MET a mis en évidence que les souris *Foxj1*^{-/-} présentent un défaut de ciliogénèse : les centrioles et les corps basaux sont bien formés mais la migration du centriole et/ou l'amarrage à la membrane sont anormaux. Cependant, l'analyse par MET n'a révélé aucun défaut des cils du nœud chez la souris *Foxj1*^{-/-} au stade embryonnaire suggérant que seule leur motilité est affectée puisque des défauts d'asymétrie droite/gauche ont été observés (Brody et al. 2000). Le gène *Foxj1* murin apparaît donc comme un facteur de transcription nécessaire à la biogénèse des cils motiles.

D'autres études réalisées chez le poisson-zèbre confirment le rôle de *Foxj1* comme un régulateur majeur du programme de ciliogénèse motile. Le gène *foxj1* a été dupliqué chez le poisson-zèbre, ses paralogues sont appelés *foxj1a* et *foxj1b* (Yu et al. 2008; Amar et Dawid 2008). La perte d'expression de *foxj1a* par injection de morpholino conduit à une réduction importante du développement des cils motiles sur les cellules de la vésicule de Kupffer, sur les cellules du plancher du tube neural, et dans les canaux pronéphriques au stade embryonnaire, tandis que *Foxj1b* contrôle la formation des cils motiles de la vésicule otique (Yu et al. 2008; 2011).

L'expression ectopique de *Foxj1* dans plusieurs espèces est capable d'induire la différenciation de mono-cils motiles fonctionnels dans différents tissus comme par exemple l'apparition de marqueurs de cils motiles sur les cellules musculaires, les cellules de la rétine et de la lentille chez l'embryon de poisson zèbre (Yu et al. 2008). Pris ensemble, ces études démontrent que *Foxj1* joue un rôle clé dans la biogénèse du cil motile (Tableau 1).

Des études réalisées chez les vertébrés ont permis l'identification d'un certain nombre de gènes qui sont directement régulés par *Foxj1* (Yu et al. 2008; Jacquet et al. 2009;

El Zein et al. 2009; Didon et al. 2013). On peut retrouver des gènes qui appartiennent à des structures ciliaires différentes, notamment les protéines associées au complexe B des IFT, des gènes qui sont requis pour différentes structures et fonctions du cil motile : les gènes qui codent pour des protéines permettant d'assembler, de transporter et d'amarrer les bras de dynéine interne et externe, les rayons radiaux et la paire centrale (Figure 10).

1.2.4.3. Relation fonctionnelle entre les facteurs de transcription régulant la ciliogénèse

Les expériences de perte de fonction de facteurs RFX dans plusieurs modèles mettent en évidence qu'ils sont requis pour former des cils motiles et non-motiles. Au contraire, FOXJ1 est requis spécifiquement pour former les cils motiles. En fonction de l'espèce et du type cellulaire, ces deux facteurs de transcription peuvent coopérer pour réguler des gènes cibles. Des études réalisées chez les cellules de voies respiratoires humaines en culture, de l'embryon de poisson-zèbre et de souris montrent que Foxj1 régule l'expression de Rfx2 et Rfx3 durant la biogénèse du cil motile (Didon et al. 2013; Yu et al. 2008; Alten et al. 2012). De manière symétrique, Rfx3 contrôle l'expression de Foxj1 dans des cultures de cellules épendymaires de cerveau de souris (El Zein et al. 2009). Ces observations suggèrent des relations complexes entre les facteurs RFX et FOXJ1, qui varient d'un tissu et d'un organisme à l'autre. De nouvelles études devront être réalisées afin de préciser les territoires d'expression des différents gènes ciliaires et déterminer s'ils sont contrôlés de manière redondante par FOXJ1 et/ou des facteurs RFX.

1.2.4.4. Contrôle transcriptionnel de la multiciliation par MCIDAS, Gmnc et Myb

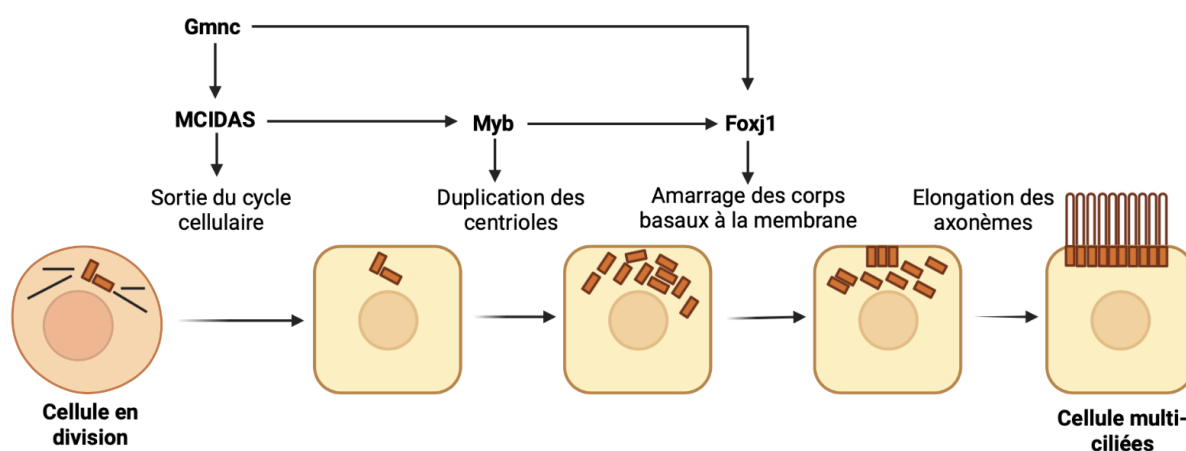


Figure 11 : Cascade de contrôle transcriptionnel permettant la formation de multi-cils. Chacun des facteurs de transcription interviennent à des étapes différentes permettant de contrôler la formation des multi-cils sur des cellules post-mitotiques. Gmnc est capable d'activer Foxx1 dans certaines CMC. (Figure réalisée avec Biorender)

Les travaux de Stubbs et al. ont mis en évidence que la protéine Multicilin/**MCIDAS** est requise pour la formation des cellules multi-ciliées dans l'épiderme de xénope et dans les voies aérienne de souris (Stubbs et al. 2012). Il est intéressant de noter que MCIDAS semble spécifique à la génération de cellules multi-ciliées, car les mono-cils motiles de la plaque du toit du gastrocoel de *xénope* ne sont pas affectés par la perte de cette protéine. De plus, l'expression ectopique de MCIDAS est capable d'induire la multiciliation d'autres types de cellules, en les amenant à devenir post-mitotiques, une caractéristique importante des cellules multi-ciliées. Par conséquent, MCIDAS est un régulateur majeur et spécifique du destin des cellules multi-ciliées chez les vertébrés. MCIDAS peut activer plusieurs facteurs de transcription requis pour la ciliogénèse comme **MYB** et **FOXJ1** (Figure 11). MYB peut par exemple agir en aval de MCIDAS pour promouvoir la duplication des centrioles et participer à la multi-ciliation des cellules épithéliales du poumon (Tan et al. 2013). Myb est aussi requis pour la formation des cellules multi-ciliées du rein chez le poisson-zèbre (L. Wang et al. 2013). Foxx1 peut également agir en aval de MCIDAS pour promouvoir l'amarrage des corps

basaux à la membrane et l'élongation de l'axonème dans la peau du xénope (Stubbs et al. 2012) (Figure 11).

Geminin/GEMC1/GMNC est un autre régulateur clé du destin des CMC chez la souris et le poisson-zèbre (Zhou et al. 2015; Terré et al. 2016; Arbi et al. 2016; Kyrousi et al. 2015; D'Gama et al. 2021). Au stade embryonnaire chez le poisson-zèbre, *Gmnc* contrôle l'expression de *Mcidas* afin de promouvoir la spécification des CMC dans le pronéphros. La perte d'expression de *gmnc* conduit à une perte des CMC sur l'épiderme d'embryon de xénope alors que sa surexpression est suffisante pour induire un nombre surnuméraire de CMC (Zhou et al. 2015). Les souris *Gmnc*^{-/-} présentent quant à elles une perte des CMC dans le cerveau, le tractus respiratoire et dans l'oviducte. Ces défauts conduisent à une hydrocéphalie, un défaut d'élimination du mucus dans le tractus respiratoire, et une infertilité. *Gmnc* contrôle donc la différenciation des CMC en activant *MCIDAS* et *Foxj1*, ainsi que d'autres gènes impliqués dans la différenciation des CMC (Terré et al. 2016; Arbi et al. 2016; Kyrousi et al. 2015). De manière très intéressante, D'Gama et al. ont documenté que les ventricules du cerveau du le poisson zèbre vont subir une modification structurelle au cours de la période de maturation sexuelle, et effectuer une transition de cellules monociliées à multiciliées sous le contrôle de *Gmnc* (D'Gama et al. 2021). Dans le cerveau, les cils situés le long des ventricules du cerveau antérieur, postérieur et du plexus choroïde sont motiles et gèrent un flux directionnel du liquide cérébro-spinal. Au sein du plexus choroïde (PCh), on observe deux populations de cellules, chacune spécifiée par un facteur de transcription différent : *foxj1a* et *foxj1b* contrôlent le destin des cellules mono-ciliées du PCh, alors que *gmnc* est important pour spécifier les cellules multi-ciliées du PCh. En son absence, les cellules n'effectuent pas de transition vers la multi-ciliation et demeurent mono-ciliées. Ces résultats mettent en avant la complexité de spécification des cellules multi-ciliées dans différents tissus et espèces.

1.3. Les fonctions des cils

Les cils sont présents sur une vaste majorité des cellules dans différents organismes. Ils vont jouer un rôle clé dans de nombreux processus biologiques durant le développement et pendant la vie d'une espèce. Au cours de cette introduction, je me

concentrera sur des fonctions ciliaires qui permettront de mieux comprendre les phénotypes liés à mon modèle d'étude : le mutant de poisson-zèbre *rpgrip1^{l/-}*.

1.3.1. Génération d'un flux orienté

1.3.1.1. Les différents flux dans l'organisme

De nombreuses expériences ont mis en évidence le rôle des cils motiles dans différents tissus.

▪ Voies respiratoires

Chez les vertébrés, le battement orienté des touffes multi-ciliées participent à la circulation du mucus produit par les cellules sécrétrices dans les poumons, permettant alors l'élimination des pathogènes et des toxines (Fahy 2010). Par exemple, la perte du gène *Till1* ou de *Odf2/Cenexine* chez la souris conduisent à un phénotype de toux/éternuement avec une accumulation importante de mucus dans les cavités paranasales et l'oreille moyenne dans le cas de la souris mutante *Odf2^{ΔEx6,7/Δex6,7}* (Kunimoto et al. 2012; Ikegami et al. 2010). Ces gènes codent pour des protéines qui sont respectivement une enzyme de modifications post-traductionnelles de l'axonème ou une protéine localisée au niveau des corps basaux. Les souris mutantes sont viables, arrivent à former des cils, mais l'analyse par microscopie en temps réelle du battement ciliaire sur des explants de trachée a mis en évidence une perturbation du battement coordonné des touffes multi-ciliées. L'injection de billes fluorescentes met en évidence un transport muco-ciliaire réduit. Ces protéines ciliaires sont donc des composants essentiels régulant le battement coordonné des cils dans la trachée afin de réguler le transport du mucus.

▪ L'épithélium nasal

L'épithélium nasal est également composé de CMC qui permettent le mouvement du mucus ou du liquide dans la cavité nasale (Getchell, Margolis, et Getchell 1984). Les neurones récepteurs olfactifs présents dans cette cavité captent les signaux olfactifs qui sont dissous par le mucus. Chez le poisson-zèbre au stade larvaire, les CMC du nez sont organisés de manière circulaire et battent avec des mouvements

asymétriques permettant la génération d'un flux et la détection des odeurs par le système olfactif les cavités nasales (Reiten et al. 2017). La perte de motilité ciliaire chez le mutant de poisson-zèbre *smh^{-/-}* conduit à un défaut de génération de flux au niveau de l'épithélium olfactif et cela conduit à un défaut d'attraction des odeurs et à une absence de réponse olfactive détectable dans les neurones olfactifs. De plus, le battement ciliaire améliore la résolution temporelle du système olfactif pour détecter les changements d'odeurs différents dans des environnements dynamiques. Ainsi, le flux médié par les cils motiles dans la cavité nasale améliore la sensibilité et la résolution temporelle des cils sensoriels des neurones olfactifs.

▪ Le pronéphros chez le poisson-zèbre

Au stade embryonnaire, le pronéphros est le premier rein qui se forme chez les vertébrés, et va ensuite régresser et être remplacé par un rein mature (Vize et al. 1997). Le pronéphros du poisson-zèbre permet le maintien de l'homéostasie osmotique (Drummond et al. 1998). Il est composé de cellules mono-ciliées motiles et multi-ciliées motiles qui apparaissent à 2 dpf et qui participent au déplacement du liquide dans les tubules rénaux, contrairement aux cils rénaux des mammifères qui sont immotiles (Kramer-Zucker et al. 2005; Sullivan-Brown et al. 2008). La perte des protéines *dnaaf1*, *cfap298*, et *ccdc40* impliquées dans l'assemblage des bras de dynéine dans les microtubules des cils chez le poisson-zèbre (Loges et al. 2009; Austin-Tse et al. 2013; Becker-Heck et al. 2011) conduit à un défaut de motilité ciliaire et à des kystes rénaux à 3 dpf (Sullivan-Brown et al. 2008). Plus précisément, les kystes rénaux apparaissent dès 2 dpf dans les tubules moyens chez les trois mutants *swt/dnaaf1^{-/-}*, *kurly/cfap298^{-/-}*, *lok/ccdc40^{-/-}* et progressent avec une dilatation des tubules rénaux. Le défaut de motilité ciliaire chez ces mutants précède la dilatation des tubules et apparaît dès 26-30 hpf : le mutant *lok/ccdc40^{-/-}* possède des cils plus courts et un battement ciliaire réduit tandis que le mutant *swt/dnaaf1^{-/-}* possède des cils immotiles, et le mutant *kurly/cfap298^{-/-}* possède des cils aussi bien motiles qu'immotiles qui battent de manière irrégulière. Malgré des variations dans les phénotypes ciliaires, ces derniers conduisent à des phénotypes similaires de dilatation des tubules rénaux de kystes dans les glomérules rénaux (Sullivan-Brown et al. 2008). Le battement des cils dans les tubules rénaux sont donc essentiels pour la circulation de l'urine.

▪ L'organe de latéralité

Par ailleurs au stade embryonnaire, l'asymétrie gauche/droite des organes chez la plupart des vertébrés est contrôlée par la présence de cellules mono-ciliées motiles présents dans l'organe de latéralité, appelé nœud chez la souris, vésicule de Kupffer chez le poisson-zèbre ou toit du gastrocèle chez le xénope (Nonaka et al., s. d.; Schweickert et al. 2007; Essner et al. 2005; Kramer-Zucker et al. 2005). Chez le poisson-zèbre, une sous-population de mono-cils présente sur cellules épithéliales ont des mouvements de rotation à partir du stade 4 somites, qui produisent un écoulement de liquide vers la gauche dans la vésicule de Kupffer (Kramer-Zucker et al. 2005; Essner et al. 2005; Okabe, Xu, et Burdine 2008; Sampaio et al. 2014). La famille des protéines PIH a été identifiée comme étant impliquée dans le préassemblage de différents sous-ensembles de dynéines axonémales, et contient 4 membres chez les vertébrés : Pih1d1, Pih1d2, Ktu/Dnaaf2, et Pih1d3/Twister (Yamamoto, Hirono, et Kamiya 2010; Omran et al. 2008; Dong et al. 2014). La perte de ces gènes chez le poisson-zèbre conduit à un défaut de motilité ciliaire avec des degrés différents dans la vésicule de Kupffer : le mutant *pih1d1*^{-/-} présente une réduction importante de la fréquence de rotation des cils, mais presque tous les cils sont motiles et le ratio d'inversion de la boucle cardiaque (une caractéristique permettant d'informer sur l'asymétrie gauche/droite) n'est en général pas affecté (H. Yamaguchi et al. 2018). Au contraire, les mutants *pih1d2*^{-/-}, *ktu*^{-/-} possèdent une réduction du nombre de cils motiles associé à une diminution de la fréquence de battement des cils. Le mutant *pih1d3*^{-/-} quant à lui perd complètement ces cils motiles et cela conduit à un positionnement de la boucle cardiaque de manière aléatoire. Ainsi, la perte de protéines requises pour la motilité ciliaire conduit à un défaut de latéralité gauche/droite chez le poisson-zèbre. La mécano-sensibilité du cil dans l'organe de latéralité joue également un rôle essentiel dans l'asymétrie gauche/droite et sera abordée dans la partie 1.3.3.

1.3.1.2. Circulation et rôle du liquide cérébro-spinal chez la souris

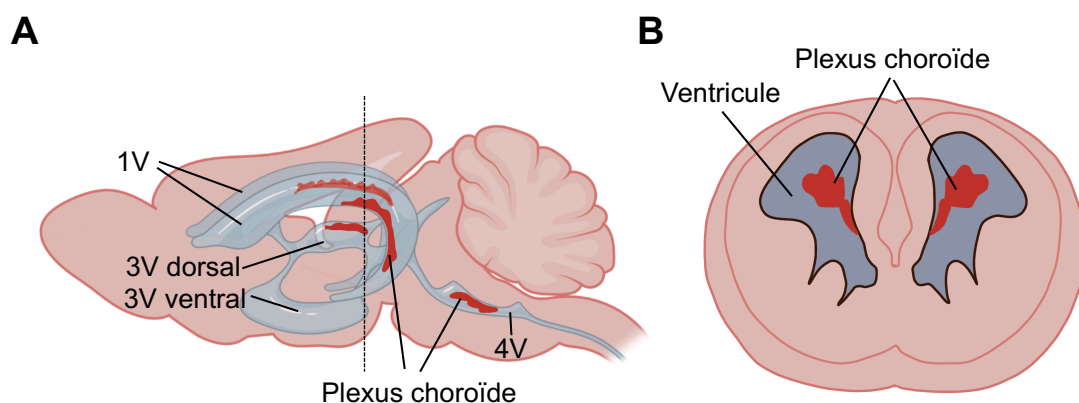


Figure 12 : Représentation schématique de la localisation des plexus choroïdes dans les 4 ventricules dans le cerveau de souris adulte. **A.** Vue latérale du cerveau de souris avec les 4 ventricules (1V : 1^{er} ventricule ; 3V : 3^{ème} ventricule ; 4V : 4^{ème} ventricule) avec les plexus choroïdes représentés en rouge. **B.** Coupe dorsale d'une coupe de cerveau de souris au niveau du cortex. Les plexus choroïdes sont des structures qui baignent dans les ventricules. (Le petit A. est inspiré du papier (Eichele et al. 2020) et le B. est dessiné)

Le liquide cérébro-spinal (LCS) est produit et sécrété par les cellules épendymaires des plexus choroïdes présents chacun dans les 4 ventricules du cerveau chez tous les vertébrés (Lun, Monuki, et Lehtinen 2015) (Figure 12). Le LCS joue un rôle essentiel dans le fonctionnement de l'organisme et au cours du développement car il est composé de divers facteurs qui participent à la prolifération de progéniteurs neuronaux, notamment Fgf2 pour les progéniteurs du mésencéphale dans l'embryon de poulet, ou Shh dans les progéniteurs du cervelet chez l'embryon de souris (Martín et al. 2006; X. Huang et al. 2010; Lehtinen et al. 2011). Ce liquide agit comme un système de filtration pour éliminer les déchets métaboliques du système nerveux central (SNC).

Il existe plusieurs modèles de souris déficientes pour des protéines ciliaires qui présentent une hydrocéphalie, c'est-à-dire une dilatation des ventricules suite à une accumulation du LCS (Ibañez-Tallon et al. 2004; Cho et al. 2018; Abdelhamed et al. 2018; Zou et al. 2020). Par exemple, la perte de la protéine du bras externe de la dynéine (Mdnah5) chez la souris conduit à un défaut de motilité ciliaire des cellules épendymaires qui tapissent les ventricules du cerveau (Ibañez-Tallon et al. 2004). Les

CMC des cellules épendymaires sont effet nécessaires pour générer un battement coordonné qui permet la circulation du LCS dans les ventricules (Worthington et Cathcart 1963; 2006) et l'aqueduc de Sylvius. La perte de motilité des cils des cellules épendymaires chez le mutant *Mdnh5^{-/-}* conduit à une fermeture de l'aqueduc de Sylvius au stade précoce post-natal et par conséquent à une accumulation du LCS. Ainsi, la circulation du LCS est nécessaire pour la maintenance des structures du cerveau (Ibañez-Tallon et al. 2004).

Cependant dans de nombreux cas, l'hydrocéphalie n'est pas liée à l'absence de cils motiles, mais plutôt à un défaut de battement coordonné, altéré notamment dans les mutants de polarité cellulaire planaire (Tissir et al. 2010; Ohata et al. 2014; Takagishi et al. 2017). Le rôle de cette voie de signalisation dans le contrôle du battement coordonné des cils sera abordé dans la partie 1.3.2.

1.3.1.3. Circulation et rôle du liquide cérébro-spinal chez le poisson-zèbre

▪ Au stade embryonnaire

Au stade précoce du développement, le LCS est majoritairement produit par les cellules neuro-épithéliales qui bordent les ventricules et le canal central dans la moelle épinière (Fame et Lehtinen 2020; Fame, Cortés-Campos, et Sive 2020), puis ensuite par le plexus choroïde. Le poisson-zèbre possède uniquement deux plexus choroïdes qui deviennent fonctionnels à partir de 2-3dpf. Ils sont localisés le long des parois médianes dorsales des ventricules du télencéphale postérieur et du rhombencéphale antérieur (García-Lecea et al. 2008; Bill et al. 2008; van Leeuwen et al. 2018). Au stade embryonnaire, les CMC du système nerveux ne sont pas encore présents et seuls les mono-cils motiles participent à la circulation du LCS. Dans le canal central de la moelle épinière chez l'embryon, les cils motiles sont présents au niveau des cellules de la ligne médiane ventrale (plancher) du tube neural et sont polarisés c'est à dire ancrés à la jonction apicale postérieure. Ils produisent un flux bidirectionnel du LCS qui facilite le mouvement des particules par un processus de transport couplé de convection-diffusion (Thouvenin et al. 2020). A 30 hpf, les cils ventraux battent 4 fois plus vite que les cils dorsaux à une vitesse moyenne de 38,1 Hz. La perte de motilité chez le mutant de motilité ciliaire *zmynd10* ou de cils chez les mutants ciliaires *ift88* ou *kif3b* chez le poisson zèbre conduit à une courbure de l'axe au stade embryonnaire, plus

précisément une queue courbée vers le bas. Ces mutants ne survivent pas après le stade larvaire. Ces mutants présentent un défaut de flux de LCS dans le canal central, observé par injection de billes fluorescentes dans les ventricules (Xiaoli Zhang et al. 2018). Grâce à la petite taille et à la transparence du cerveau au stade larvaire, des chercheurs ont pu mesurer la vitesse de circulation du liquide cérébro-spinal dans les ventricules du cerveau par microscopie en temps réelle : en moyenne les cils battent à une fréquence de 29,6 Hz à 2 dpf et 24,3 Hz à 4 dpf. Plus précisément, la fréquence de battements des cils varie d'une région du cerveau à l'autre, à 2 dpf : les cils des ventricules du télencéphale battent moins vite (~28 Hz) que les cils des ventricules du diencéphale (~31 Hz). De plus, ils ont mis en évidence que le flux du LCS est modulé par plusieurs paramètres : le battement des cils, le battement du coeur, et les contractions du corps. (Olstad et al. 2019). Ce sont notamment les contractions corporelles qui permettent le passage du LCS d'une cavité du cerveau à l'autre.

Mais quand est-il du rôle du LCS durant le développement chez le poisson-zèbre ? Pour comprendre cela, Chang et al ont drainé à plusieurs reprises les ventricules cérébraux du poisson zèbre au stade embryonnaire (dès 22hpf) peu après leur gonflement (suite à la formation du LCS) (J. T. Chang, Lehtinen, et Sive 2016). La perte du LCS conduit à la mort de certaines cellules neuro-épithéliales majoritairement localisées dans le diencéphale et à une courbure ventrale de la queue, démontrant un rôle du LCS dans la survie cellulaire au stade embryonnaire et le maintien d'un axe droit. L'injection du LCS ponctionné d'une souris au stade E10.5 dans le cerveau d'un embryon de poisson-zèbre ponctionné permet de diminuer significativement la mort cellulaire, en opposition à l'injection d'une solution saline. Ceci signifie que le LCS murin contient des facteurs de survie actifs chez le poisson-zèbre et donc que la fonction du LCS au cours du développement est conservée entre différentes espèces de vertébrés. La spectrométrie de masse sur le LCS d'embryon de poisson-zèbre (25-30 hpf) a révélé la présence de 378 protéines dont 163 qui sont conservées chez l'homme, et parmi lesquelles on retrouve la protéine Rbp4, est une protéine plasmatique qui transporte le rétinol, précurseur de l'acide rétinoïque (AR). L'inhibition de RBP4 ou de la synthèse de l'AR augmente la mort cellulaire dans le diencéphale du poisson-zèbre. De manière symétrique, l'injection de la protéine humaine RBP4 et du rétinol, ou d'AR prévient la mort cellulaire causée par le drainage du LCS chez le

poisson-zèbre. La protéine RBP4 est présente de manière abondante dans le vitellus suggérant que cette protéine pourrait être transportée du vitellus vers le LCS pour agir comme facteur de survie des cellules neuro-épithéliales (J. T. Chang, Lehtinen, et Sive 2016). A ce jour, seul ces travaux ont permis de mettre en lumière le rôle du LCS et sa composition dans la survie neuronale au stade embryonnaire chez le poisson-zèbre. Ils suggèrent également qu'un facteur différent du LCS est important pour maintenir la droiture de l'axe et nous verrons plus tard qu'il s'agit vraisemblablement de la sco-spondine dont le rôle n'avait pas encore été décrit au moment de ces travaux.

- **Au stade juvénile**

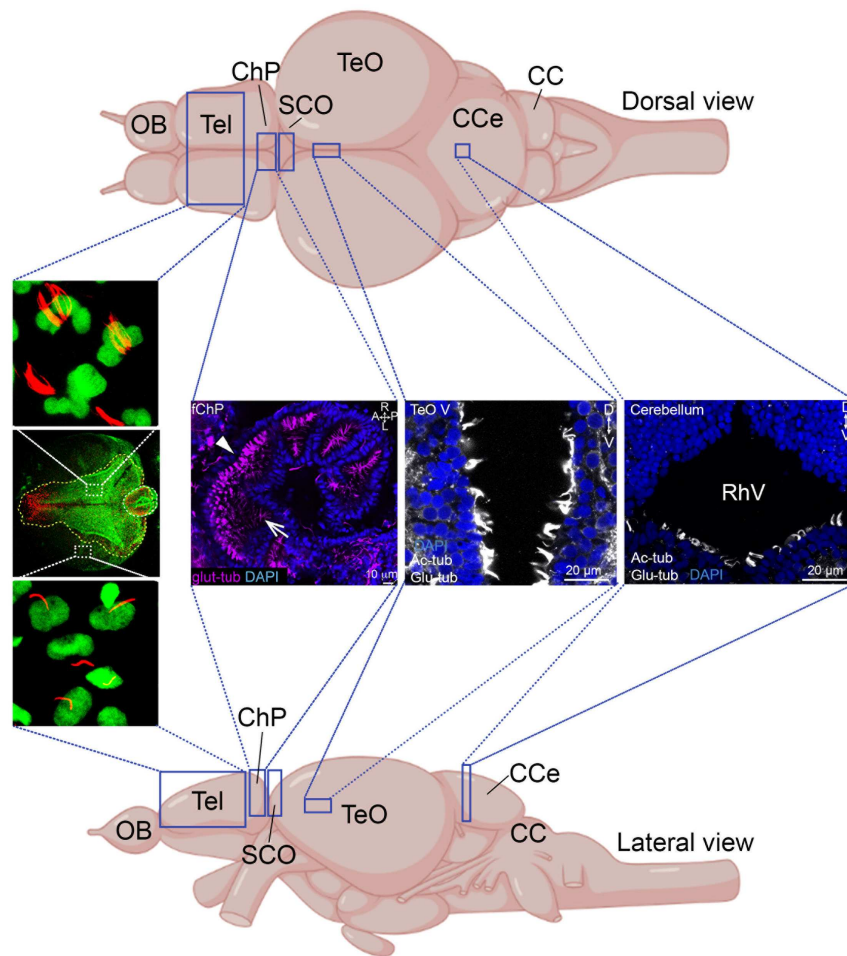


Figure 13 : Localisation des populations ciliaires dans différentes régions du cerveau adulte de poisson-zèbre. Le télencéphale est composé de cellules multi-ciliées au niveau de la région centrale et des cellules mono-ciliées dans la partie périphérique (Vue dorsale, modifiée de (Xie et al. 2023)). Le plexus choroïde du cerveau antérieur adulte est constitué de multiples cavités interconnectées et contient des mono- et des multi-cils (Vue dorsale, modifiée de (D’Gama et al. 2021)). Au niveau du ventricule de la ligne médiane du tectum optique se trouve des cellules multi-ciliées (immuno-marquage réalisé avec les anticorps anti-tubuline acétylée et tubuline glutamylée, Djebbar unpub.). Le ventricule du rhombencéphale se situe ventralement au cervelet et est composé de cellules multi-ciliées uniquement sur la partie ventrale (Immuno-marquage avec les anticorps anti-tubuline acétylée et tubuline glutamylée, Djebbar unpub.) Je décrirai la ciliogénèse au niveau du SCO dans la partie résultat de ma thèse. OB : Bulbe olfactif ; Tel : Télencéphale ; fChP : Plexus choroïde du cerveau antérieur ; SCO : Organe subcommissural ; TeO : Tectum optique; V : ventricule ; CCe : Corpus cerebelli ; CC : Crista cerebralis ; RhV : Ventricule du rhombencéphale.

Au stade juvénile (28-32 dpf), le poisson-zèbre acquiert plusieurs populations de CMC dans différentes régions du cerveau : au niveau de la ligne médiane du télencéphale (alors que latéralement se trouvent des mono-cils), dans le plexus choroïde du cerveau antérieur (qui est aussi composé de cellules mono-ciliées) (D’Gama et al. 2021) (Figure 13), le long du ventricule diencephalique, latéralement au SCO (mon travail de thèse, partie résultat) et du ventricule rhombencéphalique (Grimes et al. 2016, Meyer-Miner, 2022). Le traçage de la trajectoire de billes fluorescentes injectées dans les cavités du cerveau antérieur ou des explants de cervelet disséqués a permis d’identifier que les cils du télencéphale, du choroïde plexus et du cervelet sont motiles et génèrent un flux qui permet la circulation du LCS (Grimes et al. 2016; D’Gama et al. 2021). La perte de *foxj1b*, de *gmnc* ou d’une copie de *foxj1a*^{+/-} dans un mutant *foxj1b*^{-/-} chez le poisson zèbre conduit au stade adulte à un élargissement des ventricules du télencéphale. Ce défaut peut être interprété comme une réduction de la motilité des cils épendymaires, mais pas uniquement car cette interprétation n’a pas été étayée par l’étude du mouvement du LCS ou des cils chez ces mutants au stade tardif. Aucune étude n’a jusqu’à présent abordé directement le rôle de la composition du LCS dans le fonctionnement de l’organisme chez le poisson-zèbre au stade juvénile/adulte, en dehors de l’analyse des mutants hypomorphes pour un des composants du LCS, la Sco-spondine dont je parlerai plus précisément dans la partie 3.2.1.2. Nous verrons que des défauts de circulation du LCS au stade larvaire tardif et juvénile observé chez un mutant de motilité thermosensible *cfap298* entraîne une scoliose chez les juvéniles.

1.3.2. Rôle de la voie de la polarité planaire pour générer un flux orienté

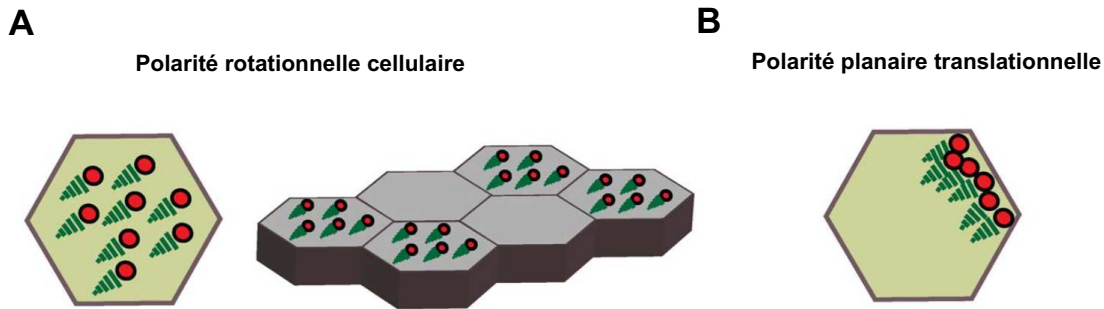


Figure 14 : Différents positionnement des corps basaux dans la cellule permettant d'établir un battement ciliaire dans la même direction. **A.** Exemple d'une polarité rotationnelle cellulaire dans des cellules multi-ciliées. **B.** Exemple de polarité planaire translationnelle dans une cellule multi-ciliée.

La génération d'un flux orienté par un épithélium cilié requiert que les cils qui pointent vers la cavité soient motiles d'une part et d'autre part qu'ils battent de manière coordonnée, c'est à dire relativement synchrone et dans la même direction. Ces épithéliums ciliés présentent donc une propriété appelée **polarité planaire cellulaire** qui oriente les battements ciliaires dans la même direction en contrôlant d'une part l'orientation uniforme des pieds basaux de multiples cils au sein de la cellule, aussi appelée polarité rotationnelle cellulaire et également leur orientation identique dans le plan du tissu, d'une cellule à l'autre, appelée polarité rotationnelle tissulaire (Carvajal-Gonzalez, Mulero-Navarro, et Mlodzik 2016; Wallingford 2010). Dans certains tissus (organe de latéralité, épendymes), il existe aussi une polarité planaire translationnelle qui positionne le ou les cils sur un côté de la surface apicale et qui s'établit avant la polarité rotationnelle (Figure 14).

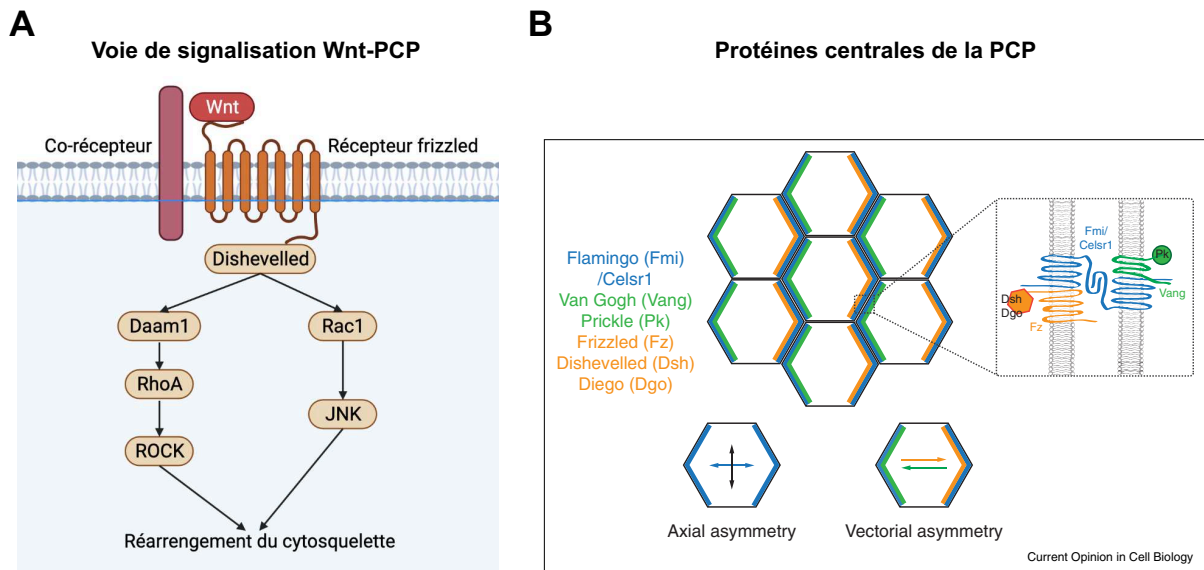


Figure 15 : Polarité planaire et acteurs de la voie Wnt-PCP. **A.** La voie Wnt/PCP est induite par l'interaction du ligand Wnt avec le récepteur frizzled et un co-récepteur. L'activation des effecteurs en aval conduit à des réarrangements du cytosquelette. **(Schéma réalisé avec Biorender et adapté de la revue (D.-L. Shi 2023))** **B.** Distribution asymétrique des protéines centrales de la PCP. Fmi/Celsr1 (bleu) présente une asymétrie axiale où elle se localise uniquement aux deux jonctions intercellulaires opposées sur la cellule. En revanche, les complexes Vang-Pk (en vert) et Fz-Dsh-Dgo (en orange) adoptent des asymétries vectorielles où chaque complexe se localise à un seul des pôles opposés de la cellule. (Figure A. réalisée avec Biorender ; Figure B tirée de la revue (Aw et Devenport 2017))

C'est le modèle de drosophile qui a permis d'identifier les acteurs moléculaires de la polarité planaire : la PCP a été mise en évidence dans l'aile de la drosophile pour le contrôle de l'orientation uniforme des soies et repose dans cet organisme sur deux voies de signalisation la **polarité cellulaire planaire (PCP) "centrale"** et les **modules "Fat-Dachsous-Four jointed" (Ft-Ds-Fj) (Butler et Wallingford 2017)**. Dans cette introduction, je me focaliserai sur la PCP « centrale » appelée également Wnt-PCP (Figure 15) car aucune donnée n'implique les acteurs Ft-Ds-Fj dans l'orientation des flux.

Les voies de signalisation Wnt sont très complexes et très loin d'être comprises entièrement mais sont très importantes pour le développement correct des métazoaires (Polakis 2012). La fixation du ligand Wnt sur un de ses récepteurs peut conduire à diverses voies de signalisation, qui dépendent de la nature du ligand et du co-récepteur associé : la signalisation Wnt peut être divisée en « **voie canonique** » (dépendant de la β -caténine pour la réponse transcriptionnelle) ou « **non canoniques** » car indépendante de la β -caténine et active la voie de la **polarité cellulaire planaire**, indispensable au battement orienté des cils ou la voie Wnt-Ca²⁺.

Parmi les protéines de PCP « centrale », on retrouve deux protéines communes avec la voie canonique, les protéines transmembranaires Frizzled ((Fz) ou **Fzd** chez les vertébrés), et les protéines cytoplasmiques Dishevelled ((Dsh) ou **Dvl** chez les vertébrés) (Figure 15A) et des protéines spécifiques de cette voie comme Van Gogh ((Vang) ou **Vangl** chez les vertébrés), Flamingo ((Fmi) ou **Celsr** chez les vertébrés pour « Cadherin EGF LAG seven-passG-type receptor »), Prickle (**Pk**), et Diego ((Dgo) ou **Ankrd6** chez les vertébrés). Un des éléments clés de l'établissement de la PCP est la distribution cellulaire asymétrique des différents composants de PCP de tel sorte que les complexes Fz, Dsh et Dgo s'accumulent typiquement d'un côté de chaque cellule, et Vang et Pk enrichis de l'autre, Fmi est présent des deux côtés (Butler et Wallingford 2017) (Figure 15B). Chez les vertébrés, les gènes de PCP présentent des orthologues, parmi lesquels on retrouve : **Vangl1-2, Celsr1-3, Fzd3 et 6, Dvl1-3, et Pk1-2**. La voie de signalisation de PCP est activée par la liaison de ligands Wnt non canoniques comme Wnt5a et Wnt11 (Cha et al. 2008; Tada et Smith, s. d.; Heisenberg et al. 2000; Kilian et al. 2003). La délétion génétique des différents gènes de PCP a permis l'identification d'une pléiotropie de rôles en fonction du tissu dans laquelle on la retrouve. Nous décrivons uniquement l'implication des gènes de PCP ayant un rôle direct dans l'orientation des mono et multi-cils et leur battement coordonné.

1.3.2.1. Battement coordonné des cellules multi-ciliées au sein de divers tissus

La découverte du rôle de protéines de PCP dans la coordination des battements des CMC a été faite dans l'épiderme d'embryon de Xénope (Park et al. 2008). L'épiderme des embryons d'amphibiens est un épithélium muco-ciliaire, un mélange de cellules

sécrétant du mucus et de cellules multi-ciliées. Ici, les protéines Dishevelled sont nécessaires pour l'amarrage et le maintien des corps basaux à la surface apicale des cellules multi-ciliées chez le Xénope. On sait maintenant que la signalisation PCP contrôle le battement polarisé dans toutes les CMC examinées à ce jour, y compris dans le cerveau (Guirao et al. 2010; Tissir et al. 2010; Ohata et al. 2014; Boutin et al. 2014; Takagishi et al. 2017), les voies respiratoires (Vladar et al. 2012), et l'oviducte (Shi et al. 2014; 2016) des mammifères. Par exemple chez la souris, le mutant *Celsr2*^{-/-} et le double mutant *Celsr2*^{-/-};*3*^{-/-} présentent une réduction importante du nombre de cils sur les cellules multi-ciliées de l'épendyme, avec des défauts de positionnement et d'organisation planaire des cils dans la cellule (Tissir et al. 2010). Ces défauts conduisent à un défaut de circulation de flux et à une dilatation des ventricules et donc à une hydrocéphalie, qui est létale chez le double mutant. La localisation des protéines Vangl2 et Fz3 est notamment altérée dans les cellules épendymaires chez le mutant *Celsr2*^{-/-} et le double mutant *Celsr2*^{-/-};*3*^{-/-}, ce qui suggère que les protéines Celsr2 et 3 régulent la polarité des corps basaux dans l'épendyme de souris à travers la localisation des protéines de PCP. Des défauts similaires de polarité du corps basal ont été observés dans le mutant de souris avec une délétion de 5 allèles de *Dvl* sur 6 dans les cellules épendymaires (*Dvl1*^{-/-};*2*^{flox/flox};*3*^{+/-}) ce qui conduit à un défaut de circulation du liquide dans les cavités du cerveau (Ohata et al. 2014) (Pour plus de détails, se référer à la revue (Spassky et Meunier 2017)).

1.3.2.2. Battement coordonné des cellules mono-ciliées

Dans le modèle poisson-zèbre, Borovina et al. ont généré par transfert de cellules germinales un mutant maternel zygotique pour la protéine de PCP Vangl2 appelé *MZvangl2/trilobite*, c'est à dire dépourvu de son stock d'ARN et de protéines maternelles, permettant d'obtenir un phénotype embryonnaire plus sévère que les mutants zygotiques (Borovina et al. 2010). Ces mutants présentent un défaut de latéralité, expliqué par un défaut de polarité rotationnelle, mis en évidence en filmant les battements ciliaires des cils de la vésicule de Kupffer grâce à la création de la lignée transgénique Tg(b-actin:arl13b-GFP). Ils ont également mis en évidence que *vangl2* est requis pour la localisation asymétrique des cils à la membrane apicale postérieure des cellules neuro-épithéliales du plancher (Borovina et al. 2010; Donati et al. 2021). Vangl2 contrôle aussi l'inclinaison uniforme et coordonnée des mono-cil

motiles dans les cellules du plancher. Ainsi Vangl2, une protéine de la PCP, est nécessaire pour la localisation asymétrique (polarité translationnelle) et l'orientation du cil motile (polarité rotationnelle), qui permettra la génération d'un flux orienté de la région antérieure vers l'extrémité postérieure de l'embryon.

Dans l'ensemble, ces résultats mettent en évidence l'importance de la voie Wnt/PCP dans le battement coordonné des cils et la circulation du liquide cérébro-spinal.

1.3.3. Rôle du cil primaire en tant que mécano-senseur

Le cil primaire est situé sur la plupart des cellules eucaryotes où il peut être impliqué dans la transmission de signaux mécaniques provenant de l'extérieur. Chez la souris, les exemples les plus étudiés pour cette fonction concernent les cils des tubules rénaux et du nœud. Les protéines Polycystine-1 (PC-1) et Polycystine-2 (PC-2) codées respectivement par les gènes *Pkd1* et *Pkd2* se localisent au niveau du cil primaire des cellules épithéliales des tubules rénaux et sont impliquées dans la mécano-transduction du flux urinaire (Nauli et al. 2003). Des analyses génétiques ont révélé que des mutations dans les gènes PKD1 et PKD2 sont responsables des maladies kystiques du rein chez l'homme à 85% et 15% respectivement (Peters et Sandkuijl 1992; Dobin et al. 1993). Les patients porteurs de mutations dans le gène PKD1 ont des maladies rénales kystiques beaucoup plus sévères (reins plus gros, insuffisance rénale plus précoce) que ceux porteurs de mutation(s) dans le gène PKD2 (Hateboer et al. 1999; P. C. Harris et al. 2006).

Au niveau du nœud, la circulation unidirectionnelle du flux nodal joue un rôle essentiel dans l'asymétrie gauche-droite chez les embryons de souris. La protéine PC-2 est un canal calcique retrouvé au niveau cytoplasmique et qui se localise aussi dans le cil primaire avec PC-1 au niveau des cellules de la couronne situées au bord du nœud. Elle joue un rôle essentiel dans la détection du flux nodal (Yoshida et al. 2012). Chez le poisson-zèbre, le rôle du cil et de PKD2 sont conservés pour la détermination de l'asymétrie droite-gauche (Schottenfeld, Sullivan-Brown, et Burdine 2007) et suggère qu'il fonctionne également comme mécano-senseur dans cet organe. Les travaux de J. Goetz (J. G. Goetz et al. 2014) ont d'ailleurs montré que les cils primaires situés le long des veines de l'embryon de poisson-zèbre sont capables de sentir le flux sanguin

et la déflexion de ce cil génère un signal calcique dépendant du canal PKD2, important pour la morphogénèse des vaisseaux sanguins.

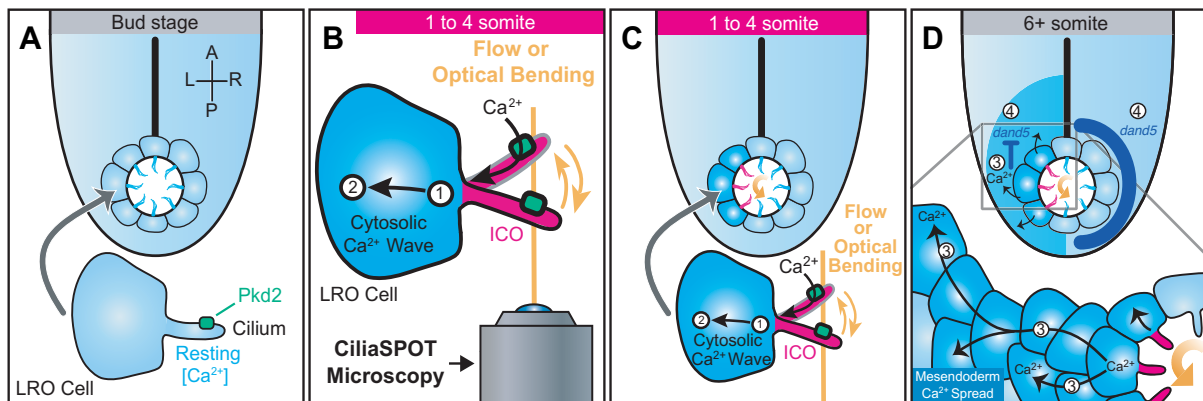


Figure 16 : Modèle de mécano-sensation ciliaire médiée par le calcium dans la vésicule de Kupffer pendant le développement de l'asymétrie droite/gauche chez le poisson-zèbre. A et B. Durant les premières étapes de développement de l'asymétrie droite/gauche, le flux orienté vers la gauche dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (flèche orange incurvée) ou la courbure optique ciliaire déclenche une signalisation calcique intra-ciliaire dépendante de Pkd2 (dans les cils « ICO = intraciliary calcium oscillations » en magenta ; dans les cellules, bleu foncé) dans la cellule du LRO soumise à la stimulation mécanique ciliaire. **C et D.** Le calcium ciliaire-cytosolique du LRO est ensuite transmis aux cellules voisines du mésendoderme, qui à leur tour dirigent finalement l'expression génique asymétrique conduisant à la formation de l'asymétrie droite gauche. (Tiré et modifiée de (Djenoune et al. 2023))

Djenoune et al. ont montré de manière très élégante que le cil agit comme un mécano-senseur dans l'organe de latéralité grâce au canal calcique PC-2 localisé dans le cil, et ceci permet d'induire une vague calcique intra-ciliaire puis intra-cytoplasmique du côté gauche, qui contrôle l'asymétrie gauche/droite en inhibant l'expression des messagers *dand5* du côté gauche (Djenoune et al. 2023) (Figure 16). Ces derniers ont créé un outil qui comprend entre autre des pinces optiques capable de stimuler mécaniquement un cil unique dans la vésicule de Kupffer et ensuite de mesurer par microscopie la vague calcique intra-ciliaire grâce à la lignée transgénique (*arl13b:GCaMP6s;arl13b:mApple*). L'utilisation d'un mutant de motilité ciliaire *cfap298/kurly* a permis de démontrer que la courbure mécanique pendant un temps

donné d'un cil immotile conduit à une vague calcique intra-ciliaire qui se propage dans le corps cellulaire et dans les cellules voisines. Ceci démontre que le cil, même immotile, est capable de répondre au stimuli mécanique et peut agir en tant qu'organelle mécano-senseur. Au contraire, le mutant *pkd2* n'est pas capable de générer une réponse calcique suite à la courbure mécanique du cil. PC2 agit donc comme un canal mécano-senseur ciliaire, qui induit la vague calcique ciliaire en réponse à la déflexion. *In fine*, la motilité ciliaire dans l'organe de latéralité est nécessaire pour générer un flux et la mécano-sensation ciliaire pour créer une réponse calcique et l'expression asymétrique de protéines telles que Dand5 du côté gauche du cœur. Le mutant de motilité ciliaire *cfap298/kurly* présente un défaut de latéralité droite/gauche et un défaut de territoire d'expression de la protéine dand5 dans le cœur. Ici, la force mécanique appliquée à un cil pendant 1h au stade 1-4 somites est capable de sauver le défaut de situs cardiaque (24 hpf) et le territoire d'expression dand5 (12 hpf). Ainsi, les cils de l'organe de latéralité sont des leviers cellulaires mécano-sensibles qui convertissent les forces biomécaniques en signaux calciques pour contrôler l'asymétrie gauche-droite (Figure 16).

Mais quand est-il du rôle du cil dans la mécano-sensation du flux dans d'autres tissus tel que les os? Jusqu'à présent, il existe très peu de données permettant de démontrer directement que le cil primaire présent sur les ostéoblastes, les cellules responsables de la formation du tissu osseux, agissent comme des mécano-senseurs du flux circulant dans les canalicules. Les canalicules sont un réseau de petits canaux dans lequel circule du liquide, et qui relie les ostéoblastes entre eux. Oliazadeh et al. ont essayé d'investiguer le rôle du cil primaire d'ostéoblastes (provenant de fragments d'os issu d'une chirurgie de la moelle) entre des contrôles et des cellules provenant de patients de scoliose idiopathique (SI) (Oliazadeh et al. 2017). Ils ont observé que les cellules de patients de SI en culture présentent une légère augmentation d'un facteur 1,2 de la longueur des cils. Afin d'évaluer si la réponse bio-mécanique du cil est affectée dans les ostéoblastes de patient SI, ils ont mesuré les changements d'expression de plusieurs gènes de mécano-sensibles suite à l'application d'un flux de liquide sur les cellules en culture. Les paramètres biomécaniques de ce flux ont été choisis en accord avec la pression et la vitesse du flux que l'on peut retrouver physiologiquement dans la hanche humaine pendant la marche. Ils ont observé que le flux stimule l'expression transcriptionnelle de certains gènes tels que Bone

morphogenetic protein 2 (BMP2) et cyclo-oxygénase 2 (COX2), deux gènes ostéogéniques, mais que la réponse transcriptionnelle pour ces deux gènes est significativement atténuée chez les patients de SI par rapport au contrôle. Une autre étude a mis en évidence que les protéines BMP2 et COX2 sont impliquées dans plusieurs voies interconnectées qui conduisent à l'ostéoblastogenèse et à la formation osseuse et donc à une densité osseuse normale (Xinping Zhang et al. 2002; Halloran, Durbano, et Nohe 2020). La diminution de réponse transcriptionnelle après application d'un flux pourrait alors montrer qu'il existe une réponse réduite à la mécano-stimulation dans les cellules SI et donc une réduction de la densité osseuse, ce qui n'est pas observé chez l'ensemble des patients. Cette étude est l'une des premières à suggérer un rôle mécano-senseur défectueux du cil primaire dans la scoliose idiopathique et pourrait expliquer l'étiologie de la maladie chez les patients SI présentant une hypo minéralisation osseuse (Oliazadeh et al. 2017). Pour aller plus loin, il aurait été intéressant de mettre en évidence la voie de signalisation qui se trouve entre le flux mécanique et l'induction transcriptionnelle de certains gènes, notamment une localisation de récepteurs/canaux à la membrane ciliaire qui pourraient jouer ce rôle. Dans ce contexte, Zheng et al. ont démontré qu'au niveau des cellules du noyau pulpeux qui composent une partie des disques intervertébraux (pour plus de détails, se référer à la partie 2.1.1), le récepteur à l'hormone parathyroïde 1 (RHPT1) se localise au cil primaire suite à un stress mécanique causé par l'application de contrainte de cisaillement (« shear stress » en anglais) sur des cellules en culture de noyau pulpeux humaines ou murines (Zheng et al. 2018). Des résultats similaires ont été observés dans les cellules du noyau pulpeux ex vivo de disques intervertébraux de rats jeunes ou âgés soumis à des charges mécaniques compressives. Des expériences d'immuno-marquage sur des coupes de tissus de disques intervertébraux mettent en évidence qu'au niveau du cil, la liaison de l'hormone parathyroïde (HPT) sur le Rhpt1 stimule la transcription de l'intégrine $\alpha\beta6$ qui va ensuite activer la cascade de signalisation des protéines de la matrice : TGF- β et CCN2. Ces protéines de matrice sont particulièrement importantes pour maintenir l'homéostasie des disques intervertébraux. Les disques sont en effet importants pour supporter les charges mécaniques apposées sur la colonne vertébrale. La perte spécifique du gène *Ift88* dans les cellules du noyau pulpeux chez la souris conduit à une diminution du volume des disques intervertébraux et à une dégénérescence de ces derniers. De plus, l'injection de l'HPT dans les souris mutantes conduit à une réduction du niveau

de production de CCN2 et d'aggrégane dans les cellules du noyau pulpeux par rapport au contrôle.

Ces résultats mettent donc en lumière le rôle mécano-senseur du cil dans les cellules du noyau pulpeux et son rôle dans la maintenance de l'homéostasie des disques intervertébraux.

1.3.4. La transduction de voie de signalisations importantes pour le développement et l'homéostasie

Outre leur capacité de mécano-senseur, les cils primaires agissent principalement comme des antennes cellulaires qui reçoivent et transmettent une variété de signaux comme des signaux chimiques ou lumineux. Chez les vertébrés, les cils primaires sont impliqués dans la transduction de plusieurs voies de signalisation essentielles au cours du **développement** et perturbées dans les maladies génétiques, telles que la voie Sonic Hedgehog (**Hh**) qui est l'une des mieux décrites ainsi que la photo-transduction des signaux lumineux.

1.3.4.1. Voie Hedgehog et dépendance au cil

Les travaux du laboratoire de Kathryn Anderson ont été les premiers à mettre en lumière le rôle du cil primaire dans la voie de signalisation Shh (Huangfu et al. 2003). Ils ont identifié deux mutants de souris IFT (*Ift88* et *Ift172*) qui présentent au stade embryonnaire (E8.0) une perte de cil dans l'organe de latéralité. Ces défauts sont associés à une réduction de certains progéniteurs neuronaux ventraux ainsi qu'une réduction du niveau d'expression des cibles de Shh dans la moelle (Ribes et Briscoe 2009; Andreu-Cervera, Catala, et Schneider-Maunoury 2021).

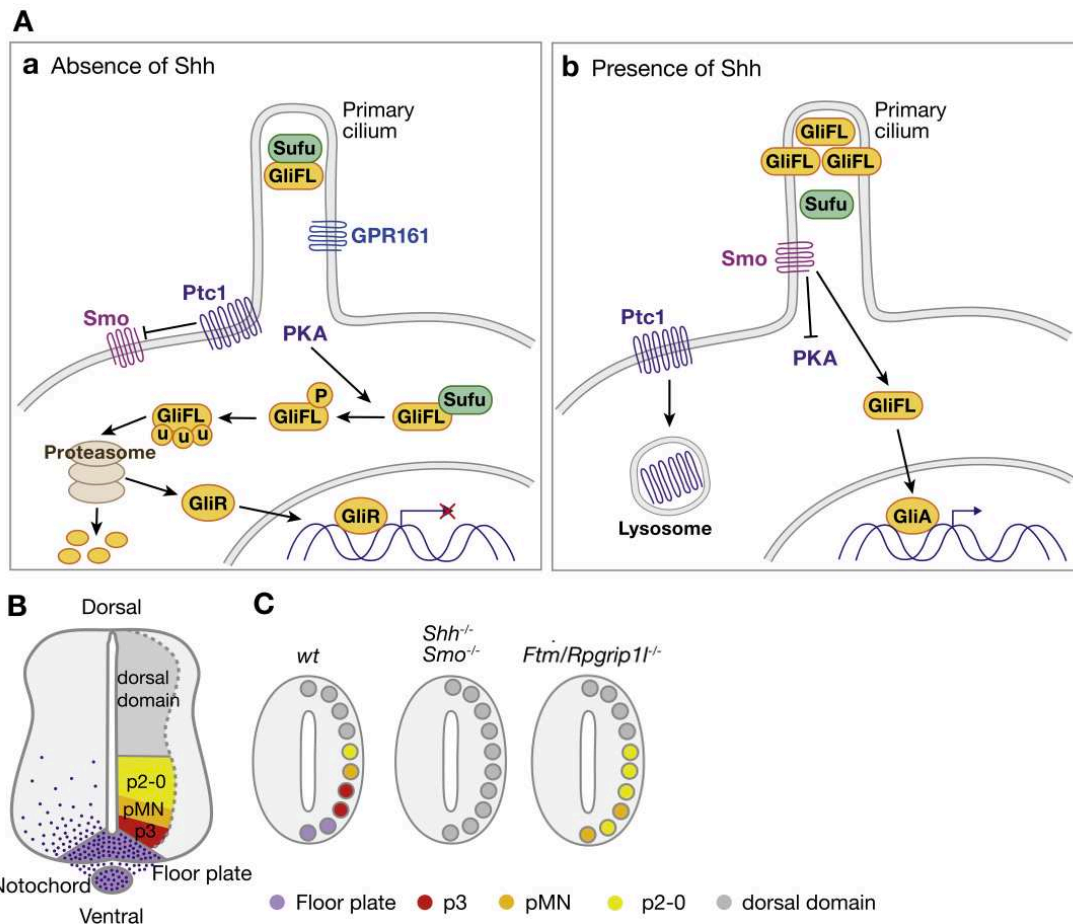


Figure 17 : Rôle du cil, et de la voie de signalisation Shh dans le développement du tube neural. A. Schéma simplifié de la transduction de la voie Shh dans des cellules ciliées, en absence (a) ou présence (b) du ligand. **B.** Organisation spatiale des domaines progéniteurs est établie par un gradient de protéine Shh (violet) sécrétée par la notochorde et le plancher dans le tube neural. pMN : progéniteurs des motoneurones. **C.** Schémas des défauts de spécification cellulaire chez les souris mutantes de la voie Hh et de *rpgrip1^{-/-}*. Les types de progéniteurs sont codés en couleur comme indiqué en C. Les couleurs sont les mêmes pour B et C. (Figure modifiée de la revue (Andreu-Cervera, Catala, et Schneider-Maunoury 2021))

Avant de présenter quels sont les défauts liés au dysfonctionnement du cil primaire sur la voie Shh, il est important de décrire les acteurs de la voie (Figure 17A). En absence du ligand Hedgehog, le récepteur Patched 1 (Ptch1) qui est une protéine à 12 domaines transmembranaires, se localise dans la membrane ciliaire. Il inhibe l'entrée de la protéine Smoothened (Smo) à 7 domaines transmembranaires dans le

cil. Smo ne peut donc pas agir sur les effecteurs nucléaires de la voie, appelés Gli. La famille des protéines Gli comprend les facteurs de transcription Gli1-3 chez les mammifères. En l'absence du ligand de Shh, les formes longues (FL) de Gli2 et Gli3 associées à la protéine SuFu sont soumises à une cascade de modifications post-traductionnelles initiées par la phosphorylation par la Protéine Kinase A (PKA). Cela conduit alors à leur ciblage vers le protéasome. Gli2-FL est dégradé par le protéasome, tandis que Gli3-FL est clivé en une forme courte ayant une activité de répression transcriptionnelle (Gli3R).

La liaison du ligand Shh à Ptch1 lève l'inhibition de Smo, conduit à sa translocation dans le cil et induit l'activation de la voie. En présence du ligand Shh, Gli2 est transformé par plusieurs modifications post-traductionnelles en un activateur transcriptionnel (Gli2A), qui active l'expression de gènes cibles, parmi lesquels Ptch1 et Gli1.

Au cours du développement, Shh est un morphogène qui est exprimé et sécrété par la corde et le plancher du tube neural (Figure 17B). Dans le tube neural ventral, Shh forme un gradient décroissant de la partie ventrale à dorsale, qui détermine les domaines d'expression le long de l'axe dorso-ventral d'une série de facteurs de transcription. En plus de ce gradient spatial, un gradient temporel de la signalisation Hh est également impliqué, les progéniteurs neuronaux qui sont les plus ventraux reçoivent une plus longue exposition au ligand, ce qui entraîne une plus grande activité de la voie de signalisation. Une revue récente résume les défauts du cerveau antérieur observés dans des mutants ciliaires de souris suite à un défaut de perturbation de la voie Shh. La perte d'expression de Shh ou de Smo chez la souris conduit à une dorsalisation complète de la moelle épinière (Figure 17C). Les souris mutantes qui perdent leurs cils présentent un phénotype moins sévère dans la détermination des différents domaines de la moelle épinière : Par exemple les mutants *Ift88* ou *Kif3a*, qui ont perdu leurs cils sur les cellules progénitrices de la moelle épinière, présentent une perte du domaine p3 qui nécessite un niveau fort d'activité de Shh, et le domaine des motoneurones progéniteurs est réduit et déplacé ventralement (Huangfu et al. 2003). La perte de Gli3 dans le mutant *Ift88* sauve partiellement le phénotype. Une analyse par Western blot à E10.5 sur l'embryon entier met en évidence que le mutant *ift88* présente une réduction du clivage protéolytique de la protéine Gli3 par rapport au contrôle. La protéine IFT88 régule donc de manière directe ou indirecte le clivage protéolytique de protéine Gli3 dans la signalisation Hh (A. Liu, Wang, et Niswander

2005). Le mutant de ZT *Rpgrip1^{-/-}* (aussi appelé *Ftm^{-/-}*) présente un phénotype similaire au niveau de la moelle épinière (Vierkotten et al. 2007) : à E11.5 le mutant présente une perte du domaine p3 associé à une forte réduction des progéniteurs de motoneurons et une expansion ventrale des progéniteurs intermédiaires (Figure 17C). De la même manière que le double mutant *Ift88 ; Gli3*, le mutant *Ftm^{-/-} ; Gli3^{-/-}* présente un sauvetage partiel de l'expression des différents marqueurs de la moelle épinière suggérant un mécanisme similaire. Une analyse par biochimie à E11.5 met en évidence une réduction du clivage protéolytique de Gli3 dans les mutants *Ftm^{-/-}*. *Rpgrip1* contrôle donc l'activité de la protéine Gli3.

Par ailleurs, au stade embryonnaire chez la souris, le mutant *Rpgrip1^{-/-}* présente plusieurs défauts morphologiques comme : une microphthalmie ou une absence de yeux, une polydactylie, des kystes rénaux et du foie. Les fœtus mutants meurent à partir de E14,5 dpc et survivent au plus tard à E18,5 dpc (Vierkotten et al. 2007; Delous et al. 2007). Les travaux de l'équipe de Sylvie Schneider-Maunoury ont montré que *Rpgrip1^{-/-}* présente plusieurs défauts du système nerveux central. Chez l'embryon, ces défauts sont associés à une perte d'expression de Shh dans la ligne médiale ventrale du diencephale avec une perte du cil primaire. En étudiant l'origine développementale de ces défauts, ils ont identifié qu'un défaut d'activité protéolytique pour produire le répresseur Gli3R est responsable d'une grande partie des défauts de la tête des fœtus *Rpgrip1^{-/-}*, comme la perte des bulbes olfactifs, la réduction du Corpus Callosum, la perte des cupules optiques. En revanche, la réintroduction de Gli3R ne sauve pas la perte de l'hypothalamus ventral qui dépend de l'activité activatrice des Gli (Besse et al. 2011; Laclef et al. 2015; Andreu-Cervera et al. 2019). Cependant, il est très important de préciser que la transduction de la voie Shh présente des degrés de dépendance au cil très variable selon les espèces ainsi que de la présence de stock maternel de protéines ciliaires. D'un côté, la transduction de HH chez la souris est très fortement perturbée chez les mutants IFTs comme décrit précédemment (Huangfu et al. 2003), tandis que la génération de plusieurs mutants IFT chez le poisson-zèbre (*ift52*, *ift57*, *ift88/ovl*, *ift172*) montre qu'aucun d'entre eux ne présente de défaut de signalisation de Shh au stade embryonnaire et que leurs cils sont normaux les deux premiers jours (Lunt, Haynes, et Perkins 2009; Tsujikawa et Malicki 2004). Cependant, les cils deviennent plus courts et leur nombre se réduit après 3 jours de développement, suggérant l'épuisement de leur stock d'ARN et de protéines maternelles. Ce stock maternel d'IFTs sauve le phénotype de ciliogénèse

embryonnaire et donc de signalisation Shh. Huang et Schier et al. ont généré par greffe de cellules germinales mutantes un mutant maternel zygotique *MZift88^{-/-}* dépourvu de stock maternel *Ift88*, qui est totalement dépourvu de cil dès la fécondation (P. Huang et Schier 2009). Cependant, ces embryons *MZift88^{-/-}* dénués de cil présentent toujours une activité Hedgehog, qui est atténuée et plus étendue : les domaines d'expression des cibles directes *ptc1* et *gli1* sont plus étendus dans les somites, tandis qu'on observe une perte d'expression du marqueur *nkx2.2a* (marqueur du plancher latéral et des neurones précurseurs p3) dans le tube neural. L'expansion des territoires d'expression de *ptc1* dans les somites dépend de l'activité activatrice de Gli1 chez le poisson-zèbre (Karlstrom et al. 2003; Ninkovic et al. 2008), dont le niveau d'expression basal n'est pas contrôlé par le cil (P. Huang et Schier 2009), contrairement à la situation observée chez la souris. Enfin, la transduction de la voie Hedgehog est totalement indépendante du cil chez la *Drosophile* pour l'ensemble des types cellulaires, sauf dans les neurones olfactifs ciliés, où la stimulation de la voie HH induit la localisation ciliaire de Smoothened ainsi que celle des récepteurs odorants (Sanchez et al. 2016).

1.3.4.2. Photo transduction des signaux lumineux

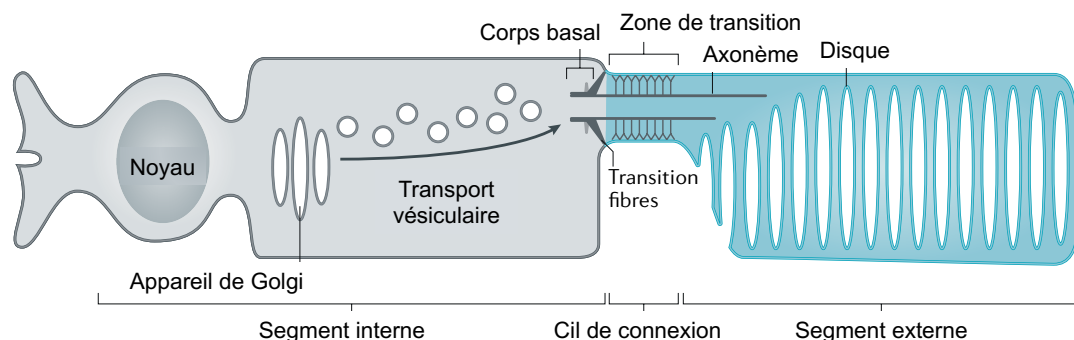


Figure 18 : Représentation schématique d'un photorécepteur. Le schéma représente un photorécepteur composé d'un segment interne, d'un cil connecteur ou ZT spécialisée, et d'un segment externe qui est composé de nombreux disques membranaires qui concentrent les récepteurs GPCR aux opsines. (Figure modifiée de la revue (Nachury et Mick 2019))

La fonction des photorécepteurs est essentielle pour le fonctionnement des yeux et l'acuité visuelle chez les vertébrés. En effet, les photorécepteurs sont des neurones sensoriels qui détectent la lumière grâce à des pigments appelés opsines, des récepteurs couplés à une protéine G (GPCR) constitué d'un rétinol lié à une protéine opsine, et concentrés au niveau d'un cil spécialisé, les segments externes des cônes et des bâtonnets (Whewey, Parry, et Johnson 2014). Des mutations dans les gènes codant pour des protéines impliquées dans le développement et la fonction des photorécepteurs sont associées à des dystrophies rétiniennes héréditaires, parfois dans le cadre de syndromes complexes touchant plusieurs organes (Ruxandra Bachmann-Gagescu 2014). Le photorécepteur est composé d'un segment extérieur (« outer segment » en anglais) dans lequel se trouve l'axonème et des disques membranaires qui permettent de concentrer les opsines en grande quantité, ainsi que d'une région appelée cil connecteur (CC) qui correspond à la ZT et d'un segment interne (« inner segment » en anglais) où la synthèse protéique a lieu (Figure 19). Les opsines sont transportées depuis des vésicules golgiennes le long des microtubules vers la région péri-ciliaire où ces vésicules vont s'amarrer et fusionner pour délivrer leurs pigments. Les récepteurs doivent ensuite traverser la région du cil connecteur afin d'atteindre le segment externe (Ruxandra Bachmann-Gagescu et Neuhauss 2019). Le mécanisme par lequel le cil connecteur filtre les protéines entre le segment externe et interne est partiellement connu. Une étude réalisée chez le poisson-zèbre au stade larvaire (5 dpf) a mis en évidence que le mutant *cc2d2a^{-/-}* (mutant pour une protéine de la ZT) présente une accumulation importante de vésicules dans la région apicale du segment interne, un défaut de localisation des opsines et de la protéine Rab8, un régulateur clé du trafic des vésicules porteuses d'opsine dans les photorécepteurs (Ruxandra Bachmann-Gagescu et al. 2011). De plus, la perte de *Cc2d2a* conduit à une perte des segments externes, avec comme conséquence une diminution de l'acuité visuelle à 5-6 dpf. Ces résultats démontrent que la protéine de la ZT *Cc2d2a*, facilite le transport de l'opsine en jouant un rôle dans le trafic et la fusion des vésicules dépendantes de Rab8 à la base du cil. De la même manière chez la souris, la protéine *Cep290* régule le trafic intracellulaire des protéines de phototransduction (rhodopsine et arrestine) et la perturbation de sa fonction entraîne une mauvaise localisation de ces protéines observée à P12, ce qui conduit à la dégénérescence rétinienne dès 1 mois post-natal (B. Chang et al. 2006).

La protéine Rpgrip1 se localise comme Ccc2d2a et Cep290 au niveau du CC (Zhao et al. 2003) et sa perte chez la souris conduit à un défaut de formation des segments externes dès P12 avec un défaut de localisation des protéines de photo-transduction (rhodopsine, ROM1). Ce défaut entraîne une dégénérescence rétinienne dès P21 (Won et al. 2009). Au niveau moléculaire, Rpgrip1 est nécessaire au recrutement des protéines Rpgr et Nphp4 au niveau du CC car les souris mutantes *Rpgrip1^{nmf247}* sont dépourvues de ces deux protéines au niveau du CC (Patil et al. 2012). Ces trois exemples illustrent que les protéines de la ZT sont importantes pour réguler la composition en protéines du compartiment ciliaire ou segment externe des photorécepteurs des vertébrés.

Les protéines IFT des photorécepteurs jouent surtout un rôle dans le transport antérograde des protéines cargos depuis le CC jusqu'au segment externe. Il est probable que l'IFT rétrograde joue un rôle moins important que dans les autres types de cils car les protéines ciliaires sortent du segment externe par un mécanisme d'élimination de l'extrémité distale du photorécepteurs dit de « shedding » plutôt que d'être recyclées vers le segment interne (Pour plus d'informations, se référer à la revue Nachury et Mick 2019). Cependant, le photorécepteur a besoin d'un minimum de transport rétrograde, grâce à la Dynéine 2, pour retourner les composants des IFT vers la TZ. La perte de la protéine Dynéine 2 chez le poisson-zèbre induite par l'injection de morpholinos conduit à des segments externes courts, désorganisés qui présentent une accumulation de vésicules dans le segment externe (Krock, Mills-Henry, et Perkins 2009).

Les protéines du BBSome, localisées à la base de l'axonème, régulent également le fonctionnement de l'IFT. La perte de la plupart des protéines du BBSome entraîne une dégénérescence rétinienne chez la souris (Davis et al. 2007; Abd-El-Barr et al. 2007; Q. Zhang et al. 2013) et chez l'homme conduisent au syndrome de Bardet-Biedl (BBS). Par exemple, les souris mutées pour *bbs2* présentent un défaut de localisation de la rhodopsine dès 7 semaines post-natales qui s'accroît au cours du temps, conduisant à une dégénérescence rétinienne à 5 mois (Nishimura et al. 2004).

Chez le poisson-zèbre, la perte de la protéine Bbs1 chez le *MZbbs1^{-/-}* conduit à 5 dpf à un défaut de photo-transduction du signal lumineux, en absence de défaut de formation des photorécepteurs (Masek et al. 2022). Ce défaut précède l'apparition de défauts morphologiques des segments externes observables à 10 dpf, qui deviennent à ce stade plus courts et mal formés par rapport aux contrôles. Une analyse

protéomique à 5 mois sur des segments externes isolés entre les *MZbbs1^{-/-}* et des contrôles a révélé une surreprésentation des protéines associées au métabolisme des lipides, à la localisation des lipides, ou à la liaison aux lipides comme les apolipoprotéines Apoeb ou Apo1b. Dès 5 dpf, l'utilisation d'une sonde fluorescente Filipin-III qui interagit spécifiquement avec le cholestérol libre a révélé que les *MZbbs1^{-/-}* présentent une augmentation du cholestérol libre uniquement dans les segments externes et ce défaut apparaît lorsque l'acuité visuelle est déjà affectée mais avant que les altérations morphologiques ne soient visibles dans la rétine des *MZbbs1^{-/-}*. Au stade adulte (5 mois), l'analyse par microscopie électronique met en évidence un aplatissement des disques des segments externes, associé à la présence de structures sphériques électro-lucides qui pourraient s'apparenter à des gouttelettes lipidiques. Ainsi, la protéine Bbs1 est importante pour l'homéostasie des photorécepteurs en participant à la définition de la composition lipidique des segments externes en plus de la composition protéique (Masek et al. 2022).

L'ensemble de ces résultats démontre l'importance des différents complexes de la ZT, BBS, et des IFT dans la formation, la fonction et le maintien des photorécepteurs.

1.4. Ciliopathies chez l'homme

De nombreuses protéines ciliaires sont essentielles pour le développement, la signalisation et en général l'homéostasie des différents organes chez l'homme. Un dysfonctionnement ciliaire peut donc conduire à une variété de maladies appelés **ciliopathies**. Le but de cette partie n'est pas de faire une description en détails des différentes ciliopathies, mais juste de mettre en lumière la complexité génétique sous-jacente de ces maladies. De par les différents rôles de la protéine Rpgrip1l (sur laquelle porte ma thèse), il n'est pas étonnant de voir que cette protéine est responsable de diverses ciliopathies qui seront détaillés dans la partie 1.4.2 Rpgrip1l : fonction et pathogénèse.

1.4.1. Généralités sur les ciliopathies

Les ciliopathies désignent un groupe de maladies qui sont causées par un dysfonctionnement des cils primaires et/ou des cils motiles, avec des atteintes

variables en fonction des organes : dysfonctionnement cérébral, dystrophie rétinienne, maladie rénale kystique, fibrose hépatique et anomalies squelettiques (Reiter et Leroux 2017). Les cils étant présents sur la plupart des organes, il n'est pas surprenant d'observer qu'une mutation d'un gène ciliaire conduise à une atteinte de divers tissus (Ruxandra Bachmann-Gagescu 2014).

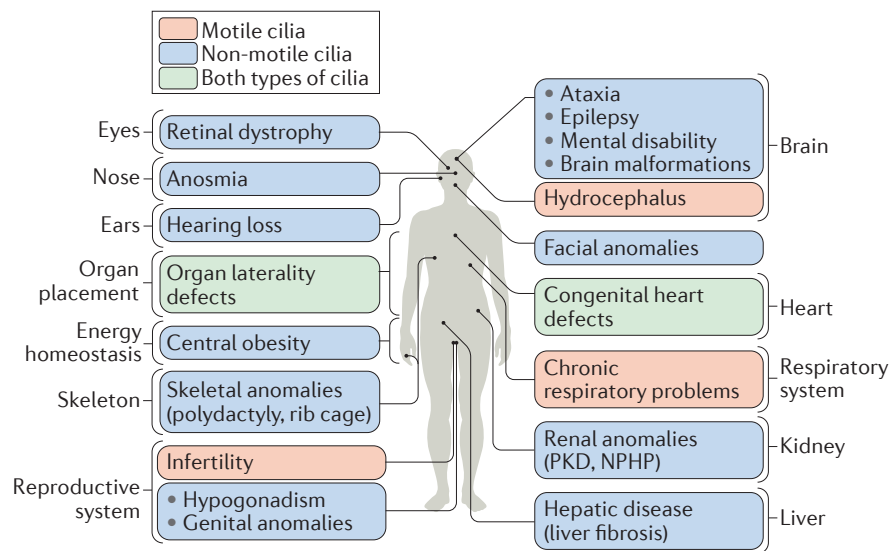


Figure 19 : Dysfonctionnement des cils motiles ou non-motiles conduit à des ciliopathies affectants la plupart des organes chez l'homme. Cette figure reflète qu'en fonction du type ciliaire affecté, plusieurs organes sont affectés. Dans chaque encadré sont représentés les défauts fonctionnels associés à chaque organe. En bleu sont représentés les organes touchés par un dysfonctionnement des cils non-motiles, en orange ceux des cils motiles, et en vert, ceux pouvant être touchés par des défauts dans les deux types de cils. (Abréviations PKD : maladie polykystique des reins ; NPHP : néphronophtise). (Figure tirée de la revue (Reiter et Leroux 2017))

On peut distinguer deux types de classes de ciliopathies chez l'homme en fonction du gène ciliaire affecté : un dysfonctionnement des cils motiles conduit à une ciliopathie motile, également appelé **syndrome de la dyskinesie ciliaire** (PCD en anglais) alors qu'une atteinte des cils en général conduit à divers syndromes listés (Figure 19). Les PCD sont caractérisées par des manifestations courantes comme des problèmes respiratoires chroniques dû à un défaut de battement des cils responsables de l'élimination du mucus, et des troubles de la fertilité (locomotion du sperme chez l'homme) et dans certains cas, un défaut de latéralité gauche/droite. Les défauts les

plus fréquemment observés dans les autres types de ciliopathies sont des kystes rénaux, une dégénérescence rétinienne, des anomalies cérébrales (malformations cérébrales, retard mental, ataxie...) et plus rarement une atteinte osseuse (dysplasie des côtes, membres courts, ou polydactylie par exemple) et des défauts de latéralité (Figure 17) (Reiter et Leroux 2017; Ruxandra Bachmann-Gagescu 2014). Le diagnostic clinique d'une ciliopathie se fera donc sur une analyse phénotypique globale. Cependant, les tableaux cliniques de différentes ciliopathies se chevauchent, ce qui rend difficile le diagnostic clinique.

Les ciliopathies sont des pathologies, qui quand elles affectent plusieurs organes correspondent à des syndromes telles que : le syndrome de Bardet-Biedl (BBS), le syndrome de Senior-Løken (SLS), le syndrome de Joubert (JBTS), le syndrome de polydactylie des côtes courtes (SRPS), le syndrome de Kartagener, le syndrome de Meckel-Gruber (MKS) et syndrome oral-facial-digital (OFD) (Mitchison et Valente 2017a). On retrouve comme pathologies des maladies rénales autosomiques dominantes ou récessives polykystiques (ADPKD en anglais), la néphronophtise (NPHP), l'amaurose congénitale de Leber (ACL). En fonction du nombre d'organes affectés et de la sévérité, les syndromes peuvent être classifiés selon un spectre de gravité allant de relativement légère à létale, où : la NPHP, le BBS et le SLS sont des syndromes aux phénotypes moyens et sont non létaux. Les syndromes de Joubert et « OFD non létal » font également parties des ciliopathies non létales, mais ont des phénotypes cérébraux, rénaux et faciaux plus sévères que ceux cités précédemment. Enfin, les syndromes Meckel et « OFD létal » conduisent à des défauts sévères entraînant une non viabilité du fœtus (Mitchison et Valente 2017).

- **Génétique des ciliopathies**

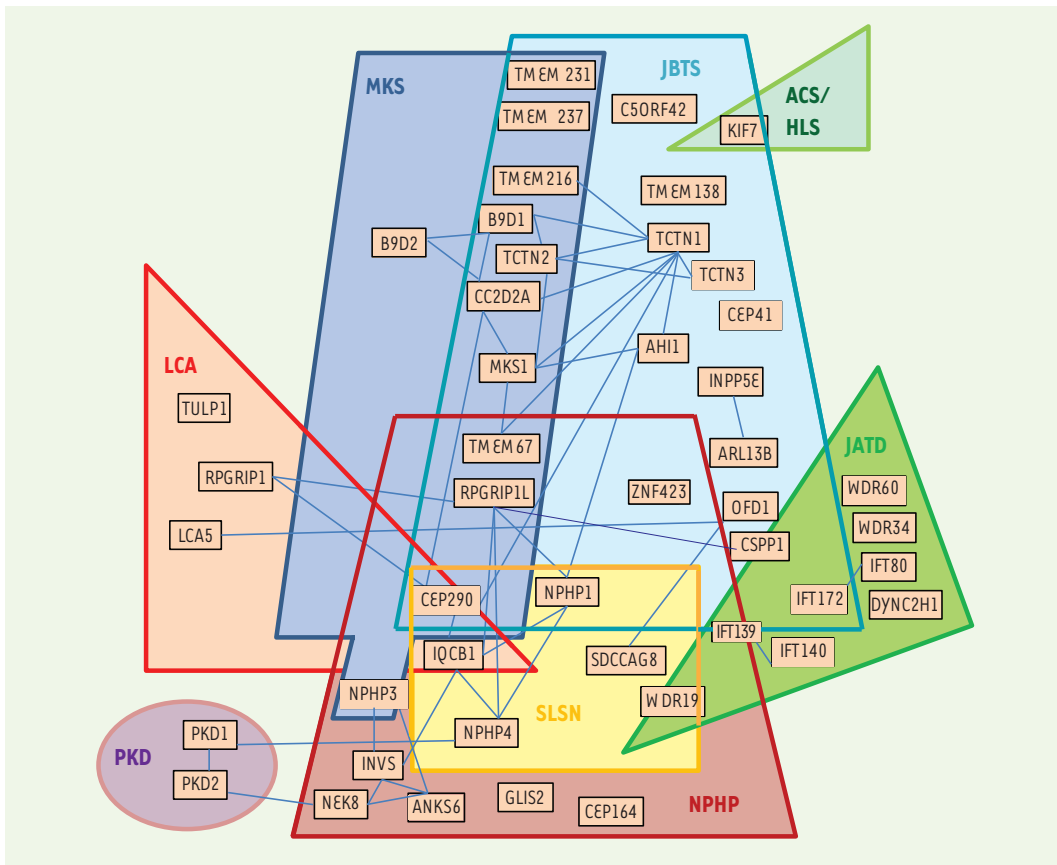


Figure 20 : Chevauchement de différents modules qui sont responsables de différentes ciliopathies. Chaque forme géométrique regroupe les gènes atteints dans une ciliopathie donnée et les intersections des différentes formes indiquent les chevauchements génétiques entre divers syndromes. Les lignes bleues indiquent les interactions entre protéines (dont la représentation ici n'est pas exhaustive) Toutes les interactions ou les ciliopathies n'ont pas été reportés pour un souci de clarté. **JBTS** : Syndrome de Joubert et maladies associées; **MKS** : syndrome de Meckel; **JATD** : dystrophie thoracique asphyxiante de Jeune; **NPHP** : néphronophtise; **SLNS** : syndrome de Senior-Løken; **PKD** : maladie polykystique rénale dominante; **ACS** : syndrome acrocalleux; **HLS** : syndrome hydrolethalus fœtal; **LCA** : amaurose congénitale de Leber.

Les ciliopathies sont caractérisées par une hétérogénéité génétique majeure : chaque syndrome peut être causé par des mutations bi-alléliques dans différents gènes, et des mutations différentes dans un même gène peuvent conduire à différentes

ciliopathies (Figure 20). Ceci est particulièrement vrai pour les syndromes de Meckel et de Joubert où de nombreux gènes mutés sont communs entre ces deux syndromes (Rpgrip1l, Cep290, Tmem67, MKS1, Cc2d2a, Tctn2, B9D1, Tmem216, Tmem237, Tmem231). L'identification progressive des gènes de ciliopathie a permis d'identifier que les mutations de protéines appartenant à un même module fonctionnel conduisent à une ciliopathie donnée. C'est le cas du syndrome de Joubert et de Meckel qui sont majoritairement causés par des mutations de gènes codant des protéines de la zone de transition, et plus rarement par une altération des protéines du module C-PLANE (effecteur de polarité planaire et de ciliogénèse) à la base du cil (Xiujuan Zhang et al. 2021; H. Wang et al. 2023).

1.4.2. Rpgrip1l : fonctions et pathogénèse

1.4.2.1. Pathogénèse résultant de mutation(s) dans le gène Rpgrip1l

Le gène codant la protéine RPGRIP1L est le paralogue du gène RPGRIP1 pour « RPGR interacting protein », un gène identifié lors d'études des pathologies de rétinites pigmentaires. RPGRIP1 comme RPGRIP1L code une protéine qui forme un complexe avec une petite protéine G du transport intracellulaire des photorécepteurs, RPGR. Les protéines codées par ces deux paralogues se localisent au niveau du cil, mais sont enrichies au niveau de régions sub-ciliaires différentes : Rpgrip1 se concentre au corps basal (Wiegering et al. 2018) (excepté dans les photorécepteurs où elle est retrouvée au cil connecteur (Zhao et al. 2003)), tandis que la protéine Rpgrip1l se localise majoritairement à la zone de transition (Williams et al. 2011; Mahuzier et al. 2012). Des mutations dans les gènes RPGRIP1 ou RPGRIP1L conduisent à des ciliopathies différentes, du fait de leur profil et niveau d'expression différent au sein des organes. Par exemple, les mutations dans le gène RPGRIP1 exprimé de manière très forte au niveau des yeux, conduisent à des défauts de la rétine chez l'homme et la souris (Zhao et al. 2003; Won et al. 2009) et entraînent des ciliopathies appelées Rétinites pigmentaires ou Retinitis Pigmentosa (RP), Dystrophie du cône (DC), Dystrophie rétinienne héréditaire (DRH) et Amaurose congénitale de Leber (ACL) chez l'homme (H. Huang et al. 2017; Sanchez-Navarro et al. 2018; Hameed 2003; Dryja et al. 2001; Gerber et al. 2001; Hanein et al. 2004; Zernant et al. 2005; Li et al. 2011; Seong et al. 2008; Miyamichi et al. 2019). Les mutations du gène RPGRIP1L, exprimé de manière ubiquitaire affectent le système nerveux central, les

yeux, les poumons, le cœur, les reins, le foie, les membres (Delous et al. 2007; Vierkotten et al. 2007; Besse et al. 2011; Gerhardt et al. 2013; Laclef et al. 2015; Andreu-Cervera et al. 2019). Ces mutations ont originellement été identifiées chez des patients affectés par le syndrome de Joubert ou des fœtus avortés diagnostiqués « Meckel » (Arts et al. 2007; Delous et al. 2007; Summers et al. 2017; Khanna et al. 2009; Otto et al. 2011; Szymanska et al. 2012; P. Zhang et al. 2022). En effet, en fonction du type de mutation (mutation tronquante ou faux-sens) et de sa position sur un des domaines fonctionnels de RPGRIP1L, des phénotypes de sévérité moyenne (JBTS) ou létale (Meckel) sont engendrés.

Le syndrome de Joubert est caractérisé par la présence du « signe de la dent molaire » sur l'IRM cérébrale (imagerie par résonance magnétique), issue d'une malformation du vermis cérébelleux et du tronc cérébral (Patel et Barkovich 2002). Ce défaut est associé à une ataxie cérébelleuse, un retard mental, une apraxie oculomotrice. Le syndrome de Joubert qui est autosomique récessif peut survenir suite à une mutation à l'état homozygote dans des familles consanguines, soit à deux mutations hétérozygotes différentes induisant un non-sens ou faux-sens (Arts et al. 2007; Delous et al. 2007; Summers et al. 2017; Khanna et al. 2009; Otto et al. 2011; Szymanska et al. 2012; P. Zhang et al. 2022). Outre les phénotypes déjà décrits observés dans le syndrome de Joubert, l'analyse de patients mutés pour RPGRIP1L a mis en évidence que certains d'entre eux, âgés de 7 et 9 ans, développent une scoliose idiopathique (Delous et al. 2007). Une scoliose peut être observée dans des cohortes de patients Joubert porteurs de mutations différentes de Rpgrip1l mais ces informations cliniques ne sont pas toujours détaillées dans les publications (R. Bachmann-Gagescu et al. 2015).

1.4.2.2. Les différentes fonctions de la protéine RPGRIP1L

Une perte de fonction de Rpgrip1l chez les mammifères conduit à une altération de la signalisation de Shh qui varie entre les organes. Par exemple, en l'absence de Rpgrip1l, la signalisation Hh est diminuée dans la moelle épinière, dans le cœur et dans les fibroblastes embryonnaires de souris (Vierkotten et al. 2007; Gerhardt et al. 2013), alors qu'elle est augmentée dans le télencéphale (Besse et al. 2011; Andreu-Cervera et al. 2019). Comme décrit précédemment dans la partie 1.3., l'absence de

Rpgrip1l produit des altérations différentes en fonction des tissus, une forte réduction de la production de Gli activateurs (Gli2A chez les mammifères, dans les régions ventrales du SNC et du cœur) ainsi qu'une altération du clivage protéolytique de la protéine Gli3 pour former le répresseur Gli3R, l'un des principaux médiateurs de la voie Hh. Elle est donc responsable d'une altération variable de la signalisation Hh et de nombreux défauts chez les embryons de souris *Rpgrip1l*^{-/-}.

De plus, l'analyse de plusieurs modèles déficient pour *Rpgrip1l* a mis en évidence le rôle de cette protéine dans la PCP. Par exemple, la souris *Rpgrip1l*^{-/-} présente au stade foetal (E18,5) un défaut de positionnement du centriole et du kino-cil sur les cellules méchano-sensorielles de la cochlée (Mahuzier et al. 2012). Chez le poisson-zèbre au stade embryonnaire, les morphants *rpgr11* présentent un défaut de convergence extension de l'axe, associée à une hydrocéphalie et un défaut de latéralité, des défauts attribués à une perturbation de la PCP. Rpgrip1l est en effet requis pour le positionnement du cil le long de l'axe antéro-postérieur dans le plancher du tube neural à 16 hpf, et ceci est médiée par la stabilisation de Dvl à la base du cil. Des analyses complémentaires sur des cellules en culture IMCD3 mettent en lumière que Rpgrip1l peut interagir avec les protéines ciliaires inversin et nphp-4 pour réguler la dégradation de Dvl par le protéasome. Cependant, les résultats observés chez les morphants *rpgr11* pourraient résulter d'un effet de toxicité complexe car le mutant *MZrpgr11*^{-/-} ne reproduit pas ces phénotypes.

Grâce à sa localisation à la zone de transition, RPGRIP1L régule la localisation ciliaire de plusieurs protéines. Wiegeling et al. ont mis en évidence sur des cellules en culture (MEF) que Rpgrip1l régule la quantité du récepteur Sstr3 et la GTPase ciliaire Arl13B au cil, en favorisant le recrutement à la ZT de Cep290 (Wiegeling et al. 2020). Dans l'hypothalamus murin, Rpgrip1l est requis pour la signalisation de la leptine (Stratigopoulos et al. 2011; 2014; 2016). En effet, Rpgrip1l contrôle le transport du récepteur à la leptine à la membrane péri-ciliaire (Stratigopoulos et al. 2014). Les souris *Rpgrip1l*^{-/-} sont hyperphagiques et par conséquent leur poids augmente.

En dehors de son rôle sur la voie Hedgehog, Rpgrip1l intervient dans deux processus liés à la protéostasie. Grâce à des études d'interaction en double hybride puis des analyses fonctionnelles réalisées sur des MEF *Rpgrip1l*^{-/-}, Gerhardt et al. ont mis en

évidence que la protéine RPGRIP1L régule l'activité du protéasome spécifiquement à la base du cil, en interagissant avec la protéine Psmd2, un composant de la sous-unité 19S régulatrice du protéasome (Gerhardt et al. 2015). L'utilisation d'une drogue appelée Sulforaphane (SFN), qui active la sous-unité catalytique protéasomale 20S (Kwak et al. 2007), permet de réduire l'accumulation des substrats protéasomiques à la base ciliaire dans les MEF *Rpgrip1^{-/-}* jusqu'au niveau des MEF contrôle, et indique donc que le traitement SFN sauve l'activité du protéasome ciliaire dans les MEF *Rpgrip1^{-/-}*. Cependant, le traitement SFN n'a pas sauvé l'allongement des cils des MEF *rpgrip1^{-/-}* indiquant que le contrôle de la longueur du cil est médié par une autre fonction de Rpgrip1l. Rpgrip1l contrôle également positivement le processus d'autophagie, mettant alors en évidence que cette protéine régit les deux processus prédominants de dégradation des protéines chez les eucaryotes, indépendamment l'un de l'autre (Struchtrup et al. 2018). L'analyse sur des MEF *Rpgrip1^{-/-}* montre que Rpgrip1l régule notamment l'initiation de l'autophagie en diminuant la signalisation mTOR, un inhibiteur de l'autophagie, via l'inhibition de la protéine Akt. Le traitement des MEF *Rpgrip1^{-/-}* avec la drogue rapamycine, un inhibiteur de la voie mTOR, restaure aussi bien l'activité autophagique que la longueur des cils. Ces résultats mettent en avant que des défauts de morphologie ciliaire présents dans certaines ciliopathies ou type cellulaire/espèces suite à la perte de Rpgrip1l pourraient être dus à un défaut d'activité autophagique. Pour conclure, les rôles non ciliaires de Rpgrip1l dans la régulation de l'activité du protéasome à la base du cil et/ou de l'autophagie pourraient être des pistes très intéressantes pour comprendre les nombreux phénotypes causés par la perte de Rpgrip1l.

Afin de comprendre l'étiologie des ciliopathies, des modèles mutants pour les gènes de ciliopathies chez la souris et le poisson zèbre ont été générés. De nombreuses différences de phénotype ont été observées pour les mutants des IFTs chez ces deux espèces comme mentionné dans l'introduction et c'est aussi le cas pour les mutants codant les protéines de TZ et les composants des BBS. De nombreux mutants ciliaires affectant les IFTs ou les gènes de motilité ciliaire chez le poisson zèbre présentent une courbure de l'axe au stade embryonnaire, létale au stade larvaire tandis que les mutants de BBS et de TZ sont viables et développent une scoliose au stade juvénile, une période correspondant à l'adolescence chez le poisson-zèbre. La viabilité des mutants de TZ est surprenante car chez la souris, ces mutants meurent

au stade foetal ou à la naissance. Ces résultats surprenants nous ont poussé à investiguer la contribution des fonctions plus tardives des cils dans l'émergence de la scoliose chez le poisson-zèbre. Il est à noter que certains patients atteints de ciliopathies comme plusieurs patients mutés dans le gène *rpgrip11* présentent aussi une scoliose. Il existe différents types de scoliose qui seront détaillés ci-dessous, pour lesquels il n'existe pas de modèle animal idéal jusqu'à présent.

2. Étiologie des différentes formes de scoliose

2.1. La colonne vertébrale chez l'homme

2.1.1. Structure de la colonne vertébrale

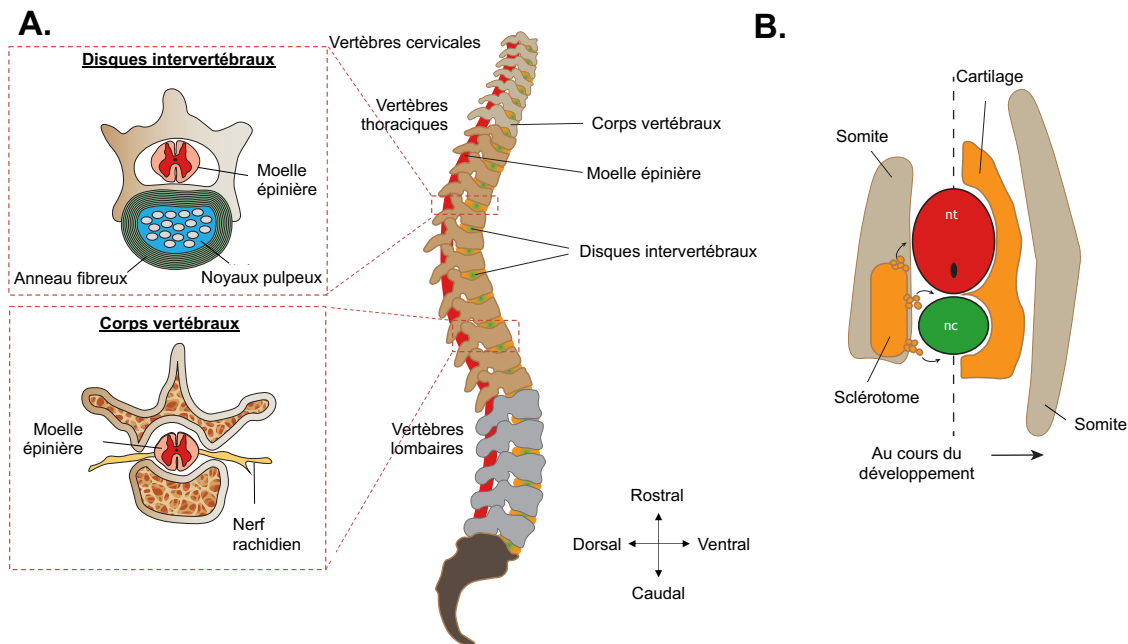


Figure 21 : Structure et formation de la colonne vertébrale. A. Vue latérale de la colonne vertébrale d'un homme adulte. La colonne vertébrale est formée d'une alternance de corps vertébraux et de disques intervertébraux (en orange, qui dérivent respectivement du sclérotome et de la corde). En son centre se trouve la moelle épinière (en rouge). Sur la partie gauche du schéma se trouve des coupes transversales de la colonne vertébrale de souris mettant en évidence qu'au niveau des disques intervertébraux se trouve un anneau fibreux avec une couche de fibrocartilage multi-lamellaire (vert) et de noyau pulpeux (bleu clair). Au centre, on retrouve la moelle épinière (rose/rouge) et les nerfs rachidiens (jaune). **B.** Représentation schématique en vue transverse de la formation de la colonne vertébrale : le sclérotome (orange) dérivé des somites va former le cartilage qui va envelopper le tube neural (future moelle épinière en rouge) et la corde (en vert). Le dermatomyotome dérivé des somites forme lui les muscles axiaux qui entourent la colonne vertébrale (Figures modifiées et tirées de la revue (Bagnat et Gray 2020)).

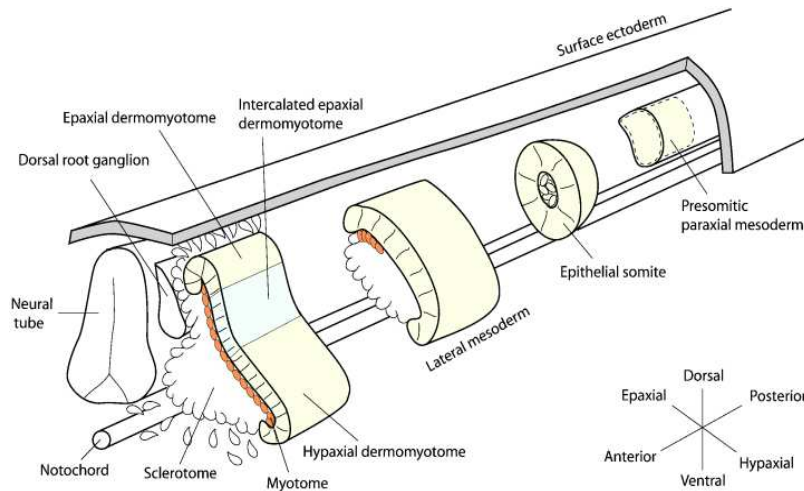
La colonne vertébrale correspond à la partie centrale du squelette et apporte une stabilité axiale. Elle contient en son centre la moelle épinière dans le canal vertébral et la protège ainsi des traumatismes externes. La structure typique de la colonne

vertébrale est formée d'une alternance de corps vertébraux intercalés avec des disques intervertébraux (Figure 21A). La colonne est entourée de muscles, et inclut le système nerveux et une vascularisation. Les disques intervertébraux sont composés d'un noyau pulpeux, entouré d'un anneau fibreux et enfin de cartilage fibreux qui permettent de lier deux vertèbres entre elles. Les disques fournissent une stabilité structurelle, une flexibilité et permettent d'amortir les charges axiales sur la colonne vertébrale lors de la réalisation de mouvements (Pattappa et al. 2012).

2.1.2. Formation de la colonne vertébrale

Les vertèbres sont dérivées des somites par un processus de bourgeonnement à partir du mésoderme pré-somitique, où la périodicité de formation des somites se fait selon une « horloge de segmentation ». Les voies de signalisation majeures de cette horloge de segmentation impliquent l'expression cyclique des gènes des voies de signalisation FGF, Wnt et Notch qui s'intègrent pour former un réseau moléculaire et générer un gradient d'expression le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon (Pour une description détaillée du processus, se référer à la revue Pourquoié 2011).

A.



B.

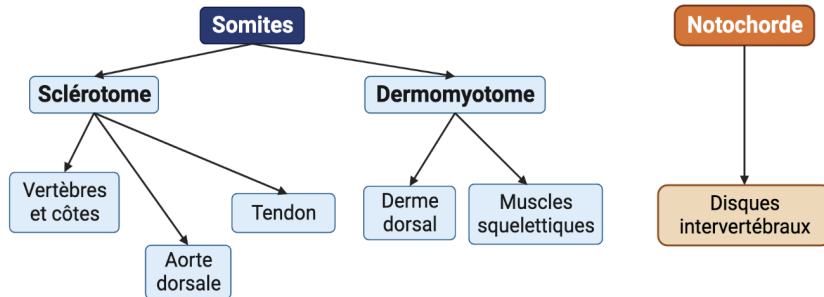


Figure 22 : Différentes étapes conduisant à la formation des vertèbres au cours du développement. **A.** Le mésoderme présomitique paraxial donne naissance aux somites. Ces somites se subdivisent en sclérotome (qui contiennent des précurseurs vertébraux) et en dermomyotome. Ensemble, ils entourent le tube neural et la notochorde. **B.** Vue générale de formations des différentes structures de la colonne vertébrale dérivée des somites et de la notochorde. (Partie A. tirée de la revue (Buckingham et al. 2003) et partie B. inspirée de la revue (Tani et al. 2020))

Les somites vont ensuite se subdiviser en sclérotome ventral (qui contient les précurseurs vertébraux) et en dermomyotome (qui contient les précurseurs du derme et des muscles (Philip F. Giampietro et al. 2009) (Figure 22B). Des études réalisées au stade embryonnaire sur la souris et le poulet ont mis en évidence que Shh sécrété par la notochorde joue un rôle important dans la spécification du sclérotome en activant l'expression de Pax1 (Chiang et al. 1996; Cairns et al. 2008). Les souris mutantes pour Shh sont dépourvues de colonnes vertébrales et seuls quelques cartilages de côtes sont formés (Chiang et al. 1996). Les cellules du sclérotome vont

migrer vers la ligne médiane, et former le tissu des progéniteurs cartilagineux qui encercle la notochorde et la moelle épinière (Figure 21B). Au cours du développement, le sclérotome donnera naissance aux structures majeures du squelette axial et des côtes tandis que la corde formera les disques intervertébraux (Tani et al. 2020).

2.2. Les différents types de scoliose

Au cours du développement embryonnaire, des défauts de formation des somites ou de la corde conduisent à des pathologies touchants la colonne chez l'homme et chez certains animaux. L'une des maladies les plus communes est la scoliose, qui correspond à une déformation de la colonne vertébrale, et qui peut être classifiée en 3 catégories en fonctions de son étiologie et du moment de son apparition : la scoliose congénitale, la scoliose neuromusculaire, la scoliose idiopathique. Les deux premières scolioses seront décrites brièvement et un intérêt particulier sera apporté sur la scoliose idiopathique.

2.2.1. La scoliose congénitale



Figure 23 : Représentation schématique des différents types de malformations observées dans les scolioses congénitales. (Schéma réalisé manuellement)

Des malformations vertébrales congénitales (comme un défaut de segmentation des somites) qui apparaissent au cours du développement embryonnaire conduisent à l'apparition de déformation de la colonne vertébrale, une pathologie connue sous le nom de **scoliose congénitale** (SC) (Pourquoié 2011).

La SC touche environ 0,13-0,5 sur 1 000 naissances humaines vivantes et le diagnostic se fait généralement dans les deux premières années de vie (P. F. Giampietro et al. 2003; Philip F. Giampietro 2012).

Parmi les défauts structuraux des vertèbres, on peut retrouver des héli-vertèbres, vertèbres cunéiformes ou une fusion de certaines vertèbres (Figure 23). Les observations faites chez les patients atteints de SC suggèrent l'existence de diverses anomalies pouvant survenir au cours du développement précoce, en particulier pendant la somitogénèse. Ces défauts peuvent être associés à d'autres défauts congénitaux comme une maladie congénitale du cœur ou malformations des reins (Arlet, Odent, et Aebi 2003).

La prise en charge de la SC est importante pour prévenir la progression de la déformation de la colonne vertébrale car sa progression peut entraîner des défauts médullaires et/ou des complications respiratoires si la rotation de la colonne survient au niveau du thorax (P. F. Giampietro et al. 2003).

Pax1 est un gène particulièrement important pendant la formation du sclérotome et sa différenciation. Une mutation faux-sens dans le gène PAX1 chez la souris « *undulated* » conduit à des anomalies de segmentation le long du squelette axial, associé à des disques intervertébraux anormaux et irréguliers (Wallin et al. 1994). En se basant sur les phénotypes du KO murin Pax1, les chercheurs pouvaient prédire que des mutations de ce gène chez l'homme pouvaient conduire à des malformations vertébrales typiques d'une scoliose congénitale, ou à des anomalies vertébrales associées à d'autres syndromes. Par exemple chez l'homme, l'analyse de la séquence d'ADN (promoteur, exons, et limites intron/exon) de 48 patients atteints de malformations vertébrales congénitales a révélé la présence de 2 variants de Pax1 à l'état hétérozygote (P. Giampietro et al. 2005). Cependant, ces variants sont présents dans la population saine avec des fréquences élevées de (~0,3 à 0,8%) ce qui pose la question de leur contribution effective à la scoliose congénitale observée chez ces patients.

2.2.2. La scoliose neuromusculaire

La scoliose neuromusculaire correspond à une déformation de la colonne vertébrale non congénitale qui survient chez des patients à la suite de dysfonctionnements du **système nerveux et de la musculature**, comme dans les cas de dystrophies musculaires, de maladies des neurones moteurs, des neuropathies périphériques (Mary, Servais, et Vialle 2018).

Par exemple dans la Dystrophie musculaire de Duchenne, la dégénérescence progressive de l'ensemble des muscles de l'organisme (notamment ceux qui entourent la colonne vertébrale) conduit à un affaissement du maintien de la colonne vertébrale, et à un défaut de sa flexibilité, facilitant le développement d'une scoliose (Hsu et Quinlivan 2013).

Dans le cas de la paralysie du regard horizontal avec scoliose progressive qui est une maladie héréditaire rare caractérisée par une absence congénitale de mouvements coordonnés horizontaux des yeux, et par l'apparition de scoliose entre l'enfance et l'adolescence (Rousan et al. 2019). De nombreuses études génétiques réalisées chez des patients (entre 1 et 55 ans) provenant de différentes ethnies ont mis en évidence que cette maladie est causée par une mutation dans le gène ROBO3 (mutations de type "faux-sens", "non-sens", "*frameshift*" conduisent à un codon d'arrêt prématuré) (Pinero-Pinto et al. 2020). ROBO3 est un récepteur de guidage axonal nécessaire pour le franchissement de la ligne médiane par les axones, notamment ceux du cerveau postérieur (Sabatier et al. 2004). Ces résultats intéressants suggéreraient qu'un défaut de guidage axonal et donc qu'un circuit nerveux altéré pourrait être à l'origine du développement de scoliose. Cependant, aucune étude à ce jour n'a permis d'élucider clairement le rôle de ROBO3 dans le développement et la progression de la scoliose dans la maladie de paralysie du regard horizontal. Une hypothèse plausible est qu'une mutation dans le gène ROBO3 conduise à un contrôle asymétrique du tonus axial, entraînant un dysfonctionnement secondaire du système musculo-squelettique, c'est-à-dire une contraction asymétrique des muscles axiaux.

Enfin, l'incidence de la scoliose neuromusculaire est variable selon la maladie neuromusculaire sous-jacente présente. Par exemple dans le cas de la myopathie de Duchenne, l'incidence est de très élevée (90%) (Wishart et Kivlehan 2021).

2.2.3. La scoliose idiopathique

2.2.3.1. Épidémiologie

La plupart des scoliose arrivent après la naissance, en absence de défauts physiologiques et anatomiques évidents, et sont cliniquement référencées comme scoliose idiopathiques (SI). Elles correspondent à une déformation en trois-dimensions de la colonne vertébrale et sont diagnostiquées sur la base de mesures des principales courbures entre les vertèbres. Cette pathologie affecte environ 4% de

la population au stade précoce de la puberté et est prédominante chez les femmes adolescentes (Ueno et al. 2011).

2.2.3.2. Mesure de la sévérité de la scoliose

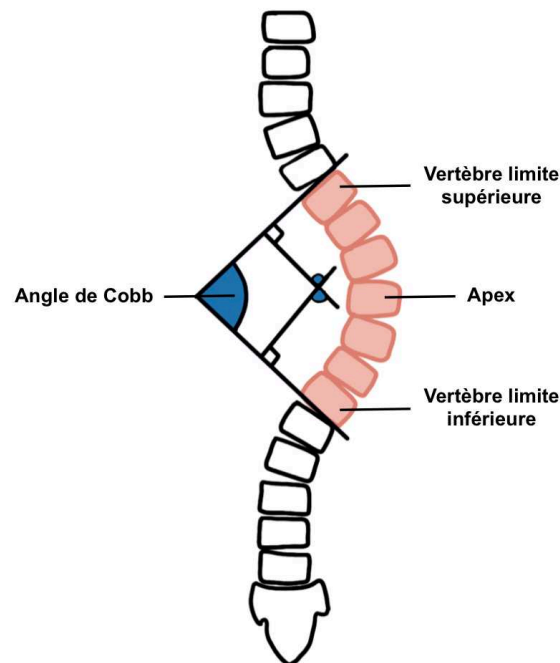


Figure 24 : Représentation schématique de la mesure de l'angle de Cobb suite à une radio de face de la colonne vertébrale. Deux droites sont tracées partant des deux vertèbres les plus inclinées. L'angle formé par l'intersection de ces droites est l'angle de Cobb (bleu). (Schéma réalisé manuellement)

Les médecins considèrent qu'un individu présente une scoliose quand la valeur de l'angle de Cobb est $>10^\circ$ (Cheng et al. 2015). L'angle de Cobb est une mesure mise en place par le chirurgien John R Cobb, qui se base sur une radio de face de la colonne vertébrale, et qui permet de mesurer et quantifier l'ampleur des déformations de la colonne vertébrale. Deux droites sont tracées partant des deux vertèbres les plus inclinées. L'angle formé par l'intersection de ces droites est l'angle de Cobb (Figure 24).

Les patients adolescents ont un squelette immature et ont davantage de risques d'avoir une progression de la courbure de leur colonne. Pour les patients ayant un angle de Cobb $<20^\circ$, un suivi vigilant est uniquement réalisé, tandis qu'au-delà de $>20^\circ$, le portage d'un corset est fortement conseillé (Parent, Newton, et Wenger 2005).

Le but du corset est de prévenir une progression de la scoliose pour garder l'angle de Cobb inférieur à 50°, déformation qui nécessiterait une intervention chirurgicale.

2.2.3.3. Étude de la génétique humaine de la SI

Cette pathologie est appelée idiopathique, car en opposition aux scolioses congénitales et neuromusculaires, son étiologie est inconnue. Les variants génétiques qui sont responsables de la SI sont très peu connus, mais des études d'association pan-génomique (« Genome Wide Association Study » GWAS en anglais) suggèrent fortement que cette pathologie est multigénique (Cheng et al. 2015; Z. Chen et al. 2009; Ogura et al. 2015; Justice et al. 2016). Par exemple, la réalisation d'un GWAS sur 1376 jeunes filles japonaise atteintes d'une SI et de 11297 jeunes filles non atteintes a mis en évidence une forte association entre la SI et un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP en anglais) proche du locus « ladybird homeobox 1 » (LBX1) (Takahashi et al. 2011) et cette association a par la suite était confirmée dans d'autres populations indépendantes (Londono et al. 2014). Le gène LBX1 code pour un facteur de transcription à homéobox impliqué dans la migration des cellules musculaires, le développement cardiaque et le tube neural, mais le mécanisme par lequel le SNP influence le risque de développer une SI est pour l'instant inconnu. Une autre étude à large échelle portant sur une cohorte internationale de patients SI (Japonaise/européenne/chinoise) a mis en évidence un SNP dans la région intronique du gène de myélinisation codant le récepteur G6 couplé à la protéine G d'adhésion (ADGRG6/GPR126) (Kou et al. 2013). La protéine Gpr126 est très fortement exprimée dans le cartilage, et la perte conditionnelle de son expression dans les cellules ostéochondro-progénitrices chez la souris entraîne un défaut de formation du cartilage des disques intervertébraux, associé au développement d'une rotation de la colonne similaire aux patients de SI (Karner et al. 2015). Par une stratégie expérimentale similaire, un GWAS réalisé sur une cohorte de patients provenant de plusieurs régions du globe (Amérique du nord, Japon, Asie de l'est) a permis l'identification d'un autre SNP, situé au sein un élément « enhancer » (Pec7) en aval de Pax1 (Sharma et al. 2015). Pax1 est aussi impliqué dans le développement du tissu cartilagineux des disques intervertébraux. Ainsi, l'altération d'expression de Pax1 pourrait augmenter le risque de déformer la colonne vertébrale. Ensemble, ces deux analyses (Gpr126 ;

Pax1) suggèrent qu'une potentielle altération des disques intervertébraux pourrait être à l'origine de la SI.

L'utilisation du séquençage de l'exome entier (« whole exome sequencing » WES en anglais) permet d'identifier des mutations dans des régions codantes de gènes, des jonctions d'épissage mais ne peut malheureusement pas identifier des variants dans des promoteurs ou des régions d'amplifications comme décrit précédemment. L'utilisation de cette technique sur des cohortes de patients de SI a permis l'identification de nombreux variants associés à la maladie dans les gènes FBN1 et 2 ; HSPG2 ; Poc5 (Buchan, Alvarado, et al. 2014; Patten et al. 2015; Baschal et al. 2015). Cette approche a notamment permis l'identification de plusieurs variants rares dans le gène codant la protéine centriolaire (POC5) (Patten et al. 2015) et communs entre plusieurs familles affectées par une SI « dominante », suggérant que ces variants jouent probablement un rôle dans la maladie. L'analyse dans des cellules RPE a mis en évidence que POC5 se localise au niveau du centriole et est nécessaire à l'assemblage de la portion distale du centriole ainsi qu'à la progression dans le cycle cellulaire (Azimzadeh et al. 2009). Afin de tester la fonctionnalité des 3 variants de POC5 identifiés chez les patients, Patten et al. ont injecté chez l'embryon de poisson-zèbre les ARNm humains correspondants (Patten et al. 2015). Ils ont observé dans 50% des larves un phénotype de courbure de l'axe des larves à 72 hpf, de sévérité variable. Les mutants qui survivent jusqu'au stade juvénile présentent une courbure de la colonne vertébrale sans défaut structurel des vertèbres. Cette étude génétique est la première à mettre en lumière un lien entre les centrioles/cils et l'apparition d'une scoliose chez le poisson-zèbre.

De manière générale, la réalisation de GWAS et de séquençage de l'exome entier sur des cohortes de patients ont permis l'identification de nombreux loci du génome associés à la SI et qui sont impliqués dans de nombreux processus biologiques. Il reste à déterminer si ces derniers sont déclencheurs de la SI ou s'ils favorisent seulement sa progression. En effet, de nombreux patients porteurs des variants rares de Poc5 identifiés dans (Patten et al. 2015) sont scoliotiques mais pas tous. Ceci implique que le fond génétique, le sexe ou les conditions de vie peuvent influencer sur le développement de la maladie.

2.3. Modèles d'étude de la SI

Malgré les progrès récents des études génétiques de la SI, notre compréhension des causes biologiques de cette maladie est limitée, en grande partie à cause d'un manque historique de modèles animaux appropriés pour étudier la scoliose.

2.3.1. Le poulet : la pinéalectomie responsable d'une déformation de la colonne

Les animaux bipèdes sont des modèles attractifs car ils subissent des forces mécaniques appliquées à la colonne vertébrale similaire à celles chez l'homme (Boby et al. 2015). C'est dans ce contexte que l'utilisation du poulet a été mis en avant pour étudier l'étiologie de la SI. Plusieurs groupes de recherche ont tenté d'élucider le rôle de la mélatonine, une hormone produite par la glande pinéale, dans l'étiologie de la SI. La mélatonine est une hormone produite principalement pendant la nuit à partir de l'acide aminé tryptophane après 2 réactions enzymatiques successives (Arendt 1998), essentielle à la régulation circadienne du sommeil (Brown 1994). La pinéalectomie sur le jeune poussin (entre 2 et 3 jours après éclosion) conduit à l'apparition d'une déformation de la colonne vertébrale, similaire à celle retrouvée chez l'homme atteint d'une SI (M. Machida et al. 1993; 1994; 1995; 1997; Coillard et Rivard 1996; Kanemura et al. 1997). Cette déformation commence à 2 semaines post-pinéalectomie et progresse ensuite entre 3 et 4 semaines de vie. La rotation en 3 dimensions est caractérisée par une courbure latérale, avec rotation vertébrale dans le plan axial et une déformation au niveau du thorax conduit à une lordoscoliose. A 65 jours post-pinéalectomie, l'analyse de certains poulets très scoliotiques (angle de Cobb > 50°) conduit à une compression des vertèbres qui présentent alors une forme concave, un phénotype absent chez les patients atteints de SI, mais présents chez certains patients atteints de scoliose congénitale. Au contraire, une injection de mélatonine tous les jours sur 30 poulets pinéalectomisés a permis de réduire l'incidence de la scoliose de 30 à 6 animaux à 3 mois. De plus, la scoliose des animaux opérés puis injectés est moins sévère, bien qu'aucune donnée quantitative ne soit fournie, en dehors d'une appréciation morphologique de la courbure de la colonne sur une radiographie. De plus, plusieurs controverses subsistent sur ce modèle : l'incidence de la scoliose chez des poulets pinéalectomisés varie grandement d'une étude à l'autre. Elle peut être de

100% dès 14 jours post pinéalectomie (M. Machida et al. 1993) puis de 55% à 30 jours post pinéalectomie (Beuerlein et al. 2001) (Pour plus de détails, voir le tableau n°1 de la revue (Wai et al. 2014) qui récapitule en détails le pourcentage d'apparition de scoliose après pinéalectomie chez le poulet dans diverses études). Par ailleurs, les déformations cunéiformes des vertèbres observées chez le poulet sont normalement caractéristiques des scolioses congénitales mettant en évidence que ce modèle n'est pas le plus adapté pour étudier l'étiopathologie de la SI.

2.3.2. Les rongeurs : un modèle très utilisé en laboratoire mais peu adapté pour la compréhension de l'étiologie de la SI

2.3.2.1. Investigation d'un rôle endocrinien dans l'apparition de la SI chez la souris

Les rongeurs, contrairement à l'homme, sont des animaux quadrupèdes dont la structure de la colonne vertébrale, le centre de gravité, et les charges mécaniques pesant sur la colonne vertébrale sont radicalement différentes. Le développement d'une scoliose chez les rongeurs a donc été favorisé par une intervention chirurgicale visant à les rendre bipèdes. L'amputation des membres antérieurs et de la queue chez des rats associée à une pinéalectomie à 3 semaines conduit au développement d'une scoliose thoracique ou thora-colombaire similaire à l'homme (Masafumi Machida et al. 2005). En effet, les analyses réalisées chez le poulet et présentées dans le paragraphe précédent soutiennent l'hypothèse que la bipédie associée à la perte de mélatonine favorise le développement d'une scoliose. Les rats opérés sont incités à pratiquer une locomotion bipède car leur apport en nourriture et eau est placé en hauteur. De la même manière chez des souris déficientes en mélatonine, la bipédie suite à une amputation des membres antérieurs et de la queue à 3 semaines conduit à une scoliose (Akel et al. 2009). Ces résultats suggèrent donc qu'une perturbation de la signalisation endocrinienne et probablement d'une carence en mélatonine favorise la SI. Il est important de noter que la pinéalectomie seule sur un rat quadrupède n'induit aucune déformation de la colonne vertébrale (Masafumi Machida et al. 1999), et aucune courbure de la colonne n'est rapportée dans les souris génétiquement déficientes en mélatonine (Kasahara et al. 2010; C. Zhang et al. 2021) ou pour la signalisation de ce neuromédiateur (Jin et al. 2003). Ces résultats génétiques récents

démontrent donc que la carence en mélatonine n'est pas suffisante pour provoquer une scoliose chez les quadrupèdes, si elle n'est pas associée à la bipédie.

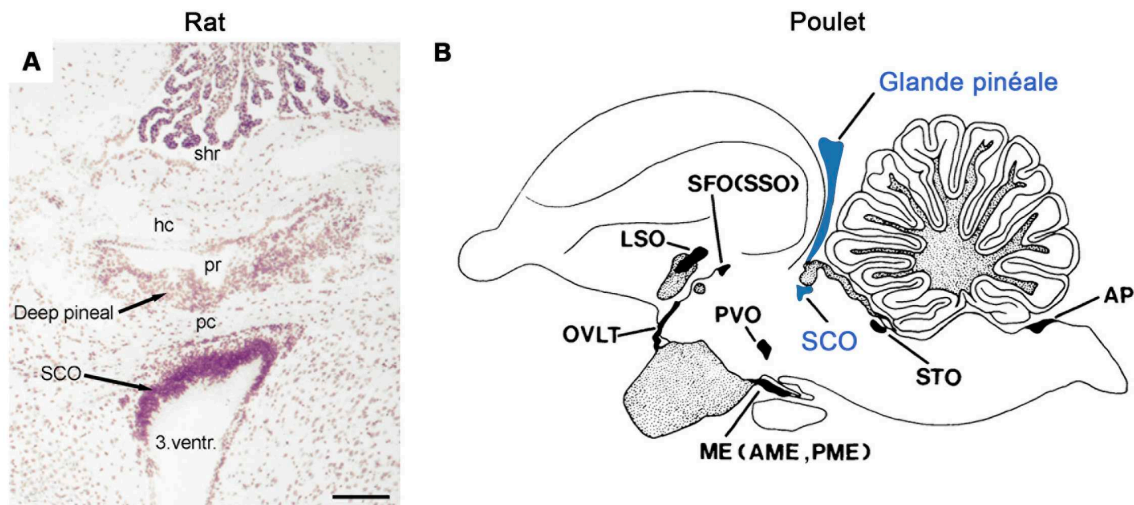


Figure 25 : Localisation rapprochée de la glande pinéale et du SCO chez plusieurs modèles animaux. **A.** Coupe coronale au cryostat du cerveau de rat mettant en évidence la localisation de la glande pinéale (appelée « deep pineal ») à proximité du SCO (Møller et al. 2022). **B.** Représentation schématique du cerveau de poulet avec la présence de la glande pinéale à proximité du SCO (couleur bleu) (Kuenzel et van Tienhoven 1982).

Des données récentes suggèrent que l'ablation de la glande pinéale chez le poulet pourraient produire un effet indirect sur un organe sécréteur voisin (Figure 25). En effet, l'acte chirurgical de retrait de la glande pinéale sur la ligne médiane dorsale du cerveau antérieur pourrait perturber l'intégrité du SCO qui synthétise la fibre de Reissner, indispensable au maintien de la droiture de l'axe chez le jeune poisson-zèbre (Cantaut-Belarif et al. 2018; Rose et al. 2020). Cette hypothèse d'artéfact chirurgical ne peut être proposée dans le cas de souris mutantes, déficientes en mélatonine. L'observation que les poulets pinéalectomisés présentent une densité osseuse réduite suggère que la stimulation mécanique de la colonne associée à une faible densité osseuse pourrait expliquer les déformations de la colonne. Cette hypothèse a conduit les généticiens humains à tester l'association de polymorphismes dans le gène de la mélatonine ou de son récepteur chez des patients SI. Ces

associations parfois retrouvées sur des petites cohortes n'ont pas été confirmées au travers d'analyses de cohortes de grandes taille, comme celle de (M. Yang et al. 2015).

D'autres expériences ont été menées afin d'explorer si d'autres voies neuroendocrines participent à l'apparition/progression de la SI. Des analyses d'une cohorte de taille restreinte (120 patientes atteintes de SI) pendant la période de puberté (entre 10 et 17 ans) ont mis en évidence qu'elles souffrent d'une ostéopénie et d'un poids plus faible que la moyenne (Qiu et al. 2007). La leptine est une hormone importante qui régule la croissance de l'ensemble du corps et des os, et le poids en particulier pendant l'enfance et l'adolescence (Considine et al. 1996; Pasco et al. 2001). Des analyses sanguines ont révélé dans cette cohorte une diminution d'un facteur 2-3 du niveau de leptine par rapport aux patientes contrôles. Ces résultats suggèrent qu'il existe une corrélation entre les phénotypes observés chez les patientes souffrant de SI et un niveau anormalement bas de leptine circulant dans le sang (Qiu et al. 2007). Wu et al. ont réalisé une expérience d'injection dans l'hypothalamus de vecteurs lenti-viraux exprimant la leptine dans des souris ayant subi une amputation des membres antérieurs (T. Wu et al. 2015) avec l'espoir de réduire l'apparition de scoliose. Cette injection conduit à une augmentation du nombre de déformation de la colonne vertébrale par rapport aux souris amputées mais non injectées (92% des souris amputées et injectées par rapport à 52% des souris amputées contrôles). De plus les souris présentent une augmentation de la sévérité de la scoliose d'un facteur x1,5 par rapport aux souris amputées non injectées, indiquant que l'injection de leptine est délétère pour le maintien de la droiture de l'axe, et ne sauve pas les défauts de ce modèle mais les exacerbe. D'autres études cliniques n'ont pas reproduit ces observations, suggérant que si l'altération des niveaux de leptine est un facteur favorisant la scoliose, cela ne concerne qu'une sous-population de patients et reflète probablement une hétérogénéité de l'étiologie de la SI et démontre donc l'importance de travailler sur des cohortes de grandes tailles.

Ces expériences réalisées chez les rongeurs suggèrent l'implication de défaut(s) endocrinien(s) dans l'étiologie de la SI mais montrent également que ces modèles animaux ne sont pas les plus adaptés car ils requièrent plusieurs interventions chirurgicales lourdes et invalidantes (ablation de glande sécrétrice et ablation des membres pour favoriser les contraintes mécaniques apportées par la bipédie) pour entraîner une déformation de la colonne similaire à l'homme (Gorman et Breden 2009).

2.3.2.2. Le rôle du système de proprioception dans l'alignement de la colonne vertébrale

De manière intéressante, des travaux ont mis en lumière le rôle d'un **système de proprioception** qui contrôle l'alignement de la colonne vertébrale chez les rongeurs qui, lorsqu'il est altéré pendant la période de croissance, favorise la survenue de scoliose.

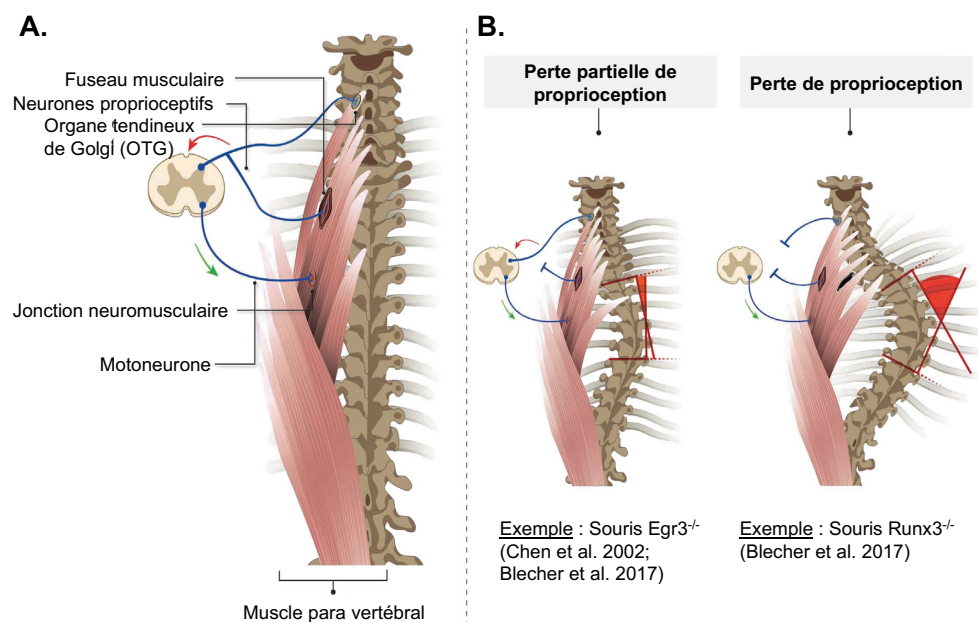


Figure 26 : Le système proprioceptif est important pour maintenir un alignement de la colonne vertébrale. **A.** La présence d'un circuit proprioceptif fonctionnel permet de réguler la contraction des muscles et maintenir un bon alignement de la colonne vertébrale. **B.** La perte partielle de la proprioception comme la perte de fuseaux musculaires dans le mutant $Egr3^{-/-}$ conduit à une légère courbure de la colonne tandis qu'une absence totale du circuit de proprioception conduit à une déformation sévère de la colonne vertébrale (comme chez le mutant $Runx3^{-/-}$). (Tiré et modifié du papier (Blecher et al. 2017)).

La proprioception est la capacité de percevoir la position dans l'espace des différentes parties de son corps, notamment par la mesure de l'extension des muscles. Ces informations de proprioception sont produites par des organes mécano-sensoriels

appelés **récepteurs proprioceptifs**. Chez l'homme et les vertébrés terrestres, les deux types de récepteurs proprioceptifs sont le **fuseau musculaire** et **organe tendineux de Golgi (OTG)** (Proske et Gandevia 2012). Le fuseau musculaire possède une structure allongée au sein du muscle strié et détecte l'étirement du muscle (Banks 2005). L'OTG est quant à lui situé à la jonction entre les tendons et le muscle, et détecte les contractions du muscle (Jami 1992). Le canal ionique Piezo2 mécano-sensible est exprimé dans ces deux récepteurs proprioceptifs et agit comme mécano-transducteur (Woo et al. 2015). Le fuseau musculaire et l'OTG vont pouvoir transmettre l'information biomécanique aux système nerveux car ils sont connectés aux **neurones proprioceptifs** par des fibres afférentes sensorielles spécialisées. (Figure 26). Le corps cellulaire des neurones proprioceptifs est localisé dans les ganglions de la racine dorsale et se finit dans la moelle épinière (H.-H. Chen et Frank 1999). Les neurones proprioceptifs communiquent avec le SNC pour informer des sensations mécaniques perçus par les muscles et les tendons (Proske et Gandevia 2012).

Ces neurones expriment plusieurs marqueurs essentiels à leur développement : le récepteur à activité tyrosine kinase C (TrkC) (Smeyne et al. 1994), la neurogénine 2 (Ngn2) (Ma et al. 1999) et le facteur de transcription apparenté à Runt 3 (Runx3) (Levanon 2002; Inoue et al. 2002), tous essentiels à la spécification et la survie des neurones sensoriels du DRG. De plus, dans les muscles squelettiques, la différenciation d'un des deux organes proprioceptifs, les fibres musculaires intra-fusales est régulée par la protéine « early growth response 3 » (Egr3) (Tourtellotte et al. 2001; Oliveira Fernandes et Tourtellotte 2015).

Blecher et al. ont mis en évidence le rôle du système de proprioception dans le maintien d'une colonne vertébrale droite grâce à l'analyse de souris mutantes pour Runx3, qui provoque la mort des neurones de proprioception (Blecher et al. 2017). Ces souris *Runx3^{-/-}* développent une scoliose entre P60 et P90, pendant la puberté, qui progresse ensuite lentement de P150 à P240. L'utilisation de la technique de micro-tomographie à rayons X appelée « micro-CT », qui correspond à une technique de tomographie non-destructrice pour produire une image en trois dimensions d'un échantillon sur les souris *Runx3^{-/-}* à P25 et à P40 a montré que les souris mutantes ne présentent pas de dysplasie initiale des vertèbres. Elles n'ont également pas de défauts d'asymétrie musculaire ou de défauts de formation des disques intervertébraux. La délétion conditionnelle de Runx3 dans les tissus nerveux

périphériques ou dans le système nerveux sensoriel (en utilisant respectivement le promoteur *Wnt1-Cre* ou *Brn3a-CreER^{T2}*) ou des éléments régulateurs en amont du gène *Runx3* conduit à une scoliose mais avec une pénétrance réduite par rapport à la souris *Runx3^{-/-}*. Les souris *Wnt-Cre Runx3^{ff}*, *Brn3a-CreER^{T2} Runx3^{ff}*, et la délétion des 3 éléments régulateurs ont une incidence à P90 de 75%, 45%, et 50% respectivement par rapport aux souris *Runx3^{-/-}* (95%). De la même manière, les souris *Egr3^{-/-}* qui sont déficientes en fuseau musculaire, mais qui ont encore des OTG développent une scoliose mais moins sévère et moins pénétrante (61% en opposition à 95% chez les souris *Runx3^{-/-}*) (H.-H. Chen, Tourtellotte, et Frank 2002; Tourtellotte et al. 2001). Ces résultats montrent qu'un défaut de signalisation de proprioception chez la souris peut participer à l'apparition d'une scoliose et démontre l'importance de la coopération de ces deux récepteurs proprioceptifs dans le maintien de la colonne vertébrale (Figure 26). Ces résultats sont renforcés par l'analyse du mutant de souris ayant perdu l'expression de *Piezo2* dans les neurones proprioceptifs (en utilisant la lignée *Prx1-Cre; Piezo2^{ff/ff}*) et qui développent à P60 une courbure de la colonne, c'est-à-dire à la même période que les souris *Runx3^{-/-}*. Les souris *Piezo2^{-/-}* développent aussi bien une cyphose (100% de pénétrance) qu'une scoliose mais avec une pénétrance moins importante que les souris *Runx3^{-/-}* (42%) (Assaraf et al. 2020). *Piezo2* est donc un canal ionique mécano-sensible important dans le système proprioceptif. Cependant, la pénétrance plus faible indique qu'il existerait d'autre(s) récepteurs mécano-sensibles impliqués dans la détection de l'étirement des muscles et des tendons.

2.3.3. Le xénope : perturbation du système vestibulaire

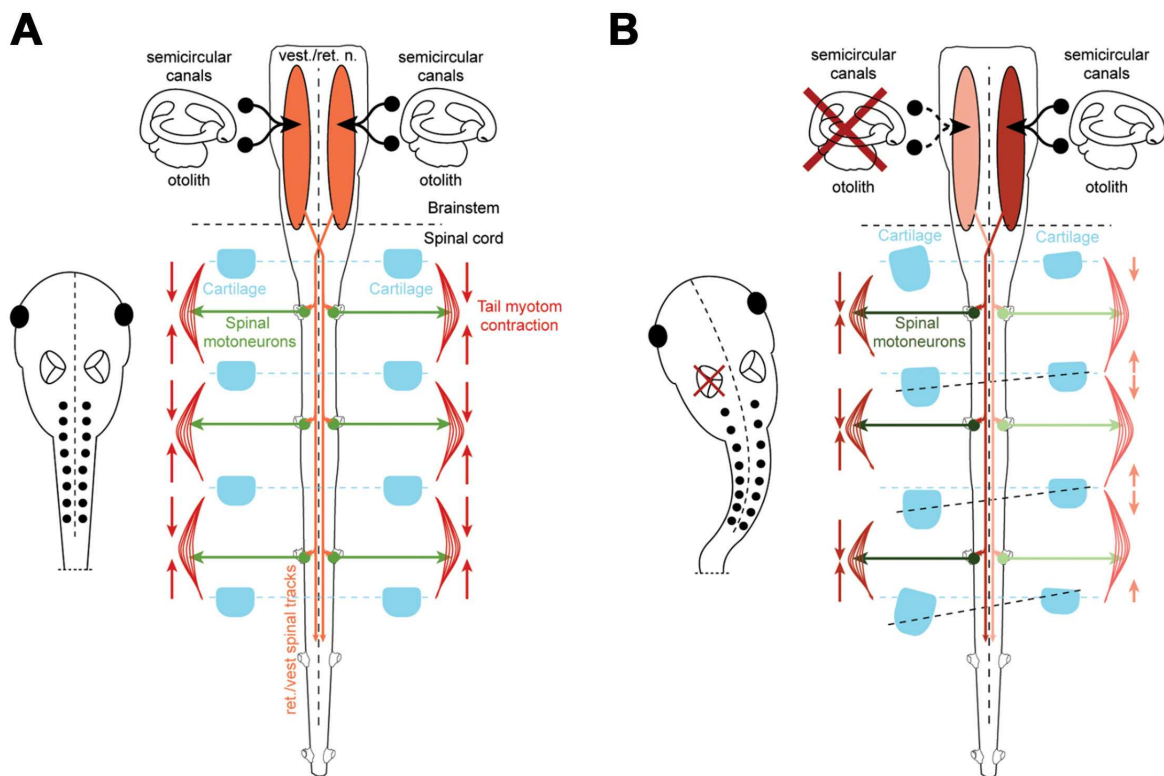


Figure 27 : Description du système vestibulaire chez le xénope. **A.** Schéma décrivant la localisation bilatérale de l'organe vestibulaire qui transmet les informations de positionnement dans l'espace aux neurones vestibulaires situés dans la moelle épinière. *In fine*, ce système permet de contrôler le tonus des muscles et des membres. **B.** Exemple d'une perte unilatérale gauche du labyrinthe osseux chez le xénope (Tiré du papier Lambert et al. 2009).

Jusqu'à présent, seule une équipe de recherche a utilisé le *Xenopus Laevis* comme modèle d'étude pour la SI, en pratiquant la destruction unilatérale de son système vestibulaire (Lambert et al. 2009). Le système vestibulaire, constitué du vestibule et des canaux semi-circulaires se situe dans la partie postérieure du labyrinthe osseux de l'oreille interne (Angelaki et Cullen 2008). Cet organe sensoriel bilatéral contrôle l'équilibre en fournissant une information de position dans l'espace : les canaux semi-circulaires et les otolithes du vestibule perçoivent ces signaux qu'ils transmettent aux neurones vestibulaires centraux du rhombencéphale pour contrôler le tonus des muscles des membres (Figure 27). Ceci garantit alors une posture symétrique du squelette (Gordy et Straka 2021). Lambert et al. ont démontré qu'une perte unilatérale

du labyrinthe osseux par acte chirurgical au stade 56-59 durant la pré-métamorphose conduit à une posture asymétrique du côté de la lésion (Lambert et al. 2009) (Figure 27). Les larves n'arrivent pas à récupérer le contrôle vestibulo-spinal symétrique de la colonne. Après la métamorphose (stade 65-66), les xénopes adultes présentent une torsion sévère de la colonne vertébrale (angle de Cobb $\sim 46^\circ$), similaire à celle trouvée chez les patients atteints de SI. Ces résultats mettent en lumière qu'un déséquilibre du système vestibulaire de manière unilatérale pendant la pré-métamorphose conduit à une torsion en 3 dimensions de la colonne vertébrale, et que le xénope ne possède pas de système de compensation sensorielle pour percevoir les informations proprioceptives comme chez la souris. Des analyses de préparations *in vitro* semi-intactes de cerveau disséqués ou de coupes de cerveau (stade 55-57 juste après une labyrinthectomie unilatérale ou plusieurs jours après la lésion) ont révélé que les larves présentent une perte des neurones vestibulaires dans le cerveau postérieur du côté de la lésion, ce qui conduit à une perte de réponse des nerfs moteurs spinaux après stimulation. Par conséquent, cela entraîne un contrôle locomoteur asymétrique des muscles qui entourent la colonne vertébrale. La contraction asymétrique des muscles du tronc le long de la colonne vertébrale à des stades où la colonne est en cours d'ossification conduit à une déformation de cette dernière (Lambert et al. 2013). Ainsi chez les animaux aquatiques, le système vestibulaire bilatéral et plus particulièrement le **contrôle neuronal** jouent un rôle important dans la contraction symétrique des muscles entourant la colonne vertébrale.

2.3.4. Le poisson zèbre génétiquement modifié peut développer une scoliose au stade juvénile avec une forte pénétrance

2.3.4.1. Structure et formation de la colonne vertébrale chez le poisson-zèbre

Le poisson-zèbre (*Danio rerio*) s'affiche comme un modèle d'étude très intéressant pour étudier l'étiologie de la SI. L'homme subit des charges sur la colonne vertébrale de par le poids de sa tête, et du fait de la gravité couplée aux charges générées par la marche et la position debout. Une étude indique que les téléostéens subissent des forces cranio-caudales sur leur colonne vertébrale, générées par la nage et la propulsion de la queue (Gorman et Breden 2009). Comme l'embryon du poisson-zèbre

est transparent, le suivi de formation de sa colonne vertébrale est très facile aux stades précoces (embryonnaire et larvaire) mais les études de la torsion éventuelle de la colonne aux stades tardifs (juvénile et adulte) requièrent la réalisation de micro-CT ou de marquage histologique après digestion des chairs pour obtenir une image en 3D du squelette. Le poisson-zèbre semble donc un modèle d'étude plus avantageux que les modèles quadrupèdes présentés précédemment.

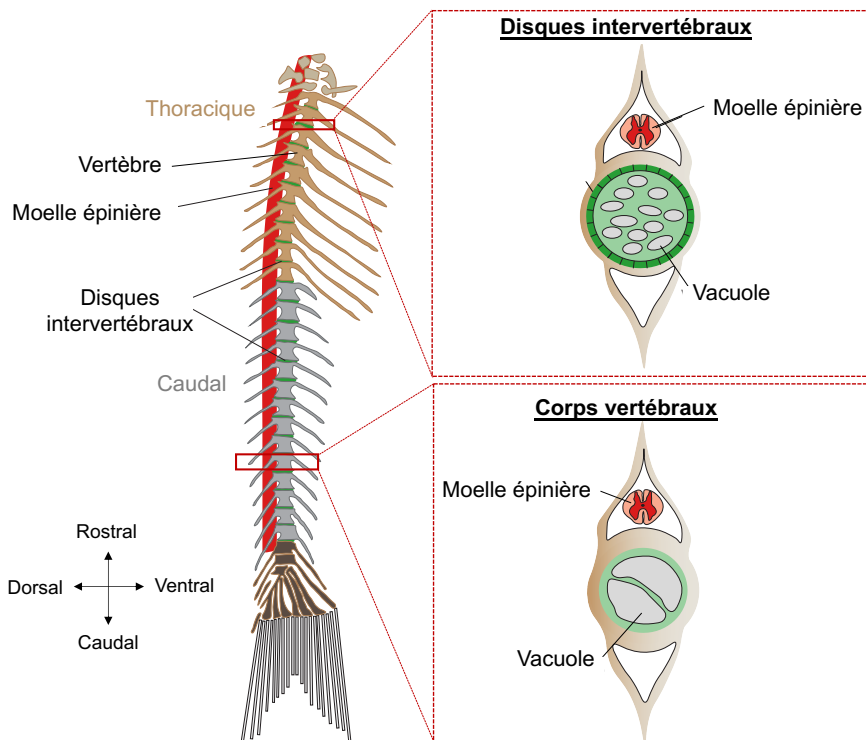


Figure 28 : Structure de la colonne vertébrale du poisson-zèbre. Vue latérale schématisée de la colonne vertébrale d'un poisson-zèbre. La colonne vertébrale est formée de vertèbres (marron dans la partie thoracique et grise dans la partie caudale) espacées par des disques intervertébraux (vert). La partie droite représente des coupes transversales des disques intervertébraux et des corps vertébraux : on retrouve des cellules vacuolisées fragmentées qui forment le disque du poisson zèbre et les grandes cellules vacuolisées dans la région du corps vertébral (Figures modifiées de la revue (Bagnat et Gray 2020).

La morphologie de la colonne vertébrale du poisson-zèbre est similaire à celle de l'homme : les vertèbres sont espacées entre elles par les disques intervertébraux le long de l'axe rostro-caudal. On peut remarquer que la moelle épinière passe entre les

vertèbres (Figure 28) qui sont plus fines que chez l'homme (Figure 21) (Bagnat et Gray 2020).

Il est à noter que le processus de formation de la colonne vertébrale chez le poisson-zèbre est assez similaire à celui de l'homme, mais la contribution de chaque population de cellules mésodermiques à la formation de la colonne diffère légèrement. Chez le poisson-zèbre, les disques intervertébraux sont formés exclusivement par la notochorde qui va se remodeler pour former une structure semblable aux noyaux pulpeux présents dans les disques intervertébraux chez l'homme (Fleming, Keynes, et Tannahill 2004).

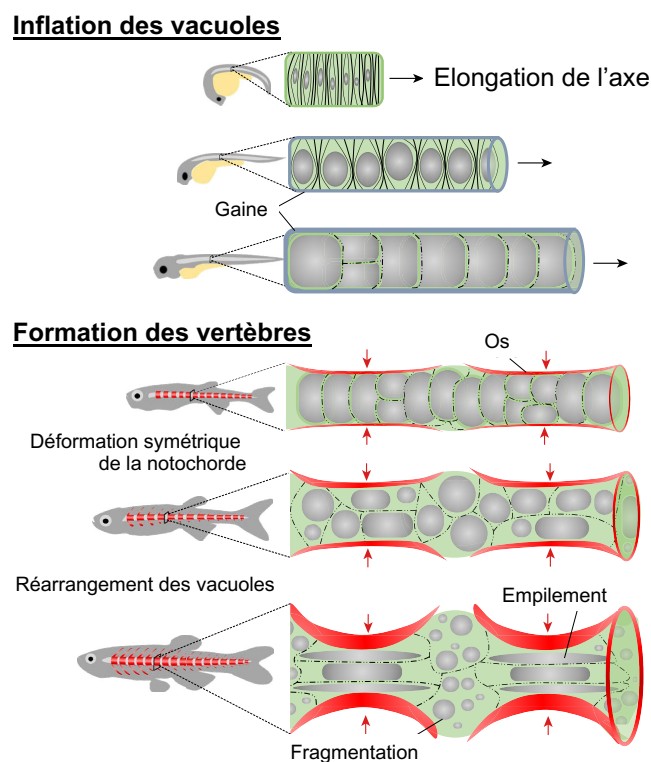


Figure 29 : Rôle des cellules vacuolées de la notochorde dans l'élongation de l'axe et la formation de la moelle épinière. (Tirée de la revue (Bagnat et Gray 2020))

La notochorde est formée de cellules vacuolées qui vont se dilater suite à la pression créée par les lysosomes des vacuoles tout le long de l'axe antéro-postérieur. Les cellules vacuolées sont entourées de cellules de la gaine péri-cordale elles-mêmes entourées d'une gaine de matrice extra-cellulaire (MEC) formée de collagène et d'élastine. Les cellules péri-cordales sont importantes pour orienter la migration des ostéoblastes dérivés des sclérotomes vers des régions spécifiques dans la formation

du corps vertébral (Wopat et al. 2018; Bagwell et al. 2020). Les vacuoles de la notochorde permettent d'absorber la pression exercée par la croissance des os vertébraux qui se forment autour de la notochorde. Au cours de la croissance osseuse, les cellules vacuolées se réorganisent et s'empilent sous les vertèbres en cours de formation tandis qu'au niveau des disques intervertébraux, les vacuoles se fragmentent sélectivement (Figure 29) (une description complète de la contribution de la notochorde à la formation de la colonne est détaillée dans la revue (Bagnat et Gray 2020)). Le mutant de poisson-zèbre *spz1^{-/-}* est déficient pour une kinase appelée *Dstyk*, importante pour la fusion des membranes des cellules vacuolées. Ainsi, un défaut d'inflation des cellules vacuolées conduit à une déformation des vertèbres comme observé dans le mutant *spz1^{-/-}* (Bagwell et al. 2020). La perte d'expression de *dstyk* conduit à des cellules comprenant des vacuoles qui ne s'étendent pas et se fragmentent conduisant alors à une croissance osseuse asymétrique et donc à des malformations vertébrales similaires à celles retrouvées dans les cas de scoliose congénitale.

De la même manière, les défauts morphologiques de formation de la notochorde conduisent à des fusions des vertèbres. Par exemple, 3 mutations récessives ont été identifiées dans le gène *col8a1a/leviathan* conduisant à des repliements de la notochorde à 2 dpf associée à l'ondulation de la couche médiane de la gaine de MEC (Gray et al. 2014). Ces défauts ont pour conséquence des fusions vertébrales dans les régions thoracique et caudale de la colonne vertébrale chez le juvénile à 45 dpf. Les poissons mutés sont alors plus courts que les contrôles. Ce gène est originellement exprimé dans la corde, le plancher, et l'hypocorde à 1 dpf, et son expression se maintient dans les cellules vacuolisées de la notochorde à 2dpf tandis qu'elle diminue dans les autres régions. Une perte transitoire de l'expression du gène *col8a1a* entre 0-3 dpf par injection de morpholino récapitule les phénotypes observés chez les mutants. La protéine *Col8a1a* est ainsi requise pour maintenir l'ultrastructure de la couche médiane de la gaine de MEC de la notochorde et une perte de l'intégrité de cette couche est à l'origine de la formation des défauts de la notochorde embryonnaire, qui contribuent par la suite à la formation de malformations vertébrales et de la scoliose chez l'adulte. L'ensemble de ces résultats mettent en évidence qu'un défaut d'inflation des vacuoles des cellules de la notochorde ou de la composition de la gaine de MEC conduisent à des malformations vertébrales. Chez l'homme, l'origine de la SC est en partie attribuée à un défaut de somitogenèse (Giampietro et al. 2009;

Pourquoi 2011). Cependant dans la majorité des cas, l'étiologie est indéterminée et pourrait alors résulter des mécanismes décrits précédemment. Les mutants de notochorde repliée (comme le mutant *leviathan*) sont alors de bons modèles pour découvrir de nouvelles mutations potentiellement impliquées dans la scoliose congénitale humaine.

Même si le processus développemental de formation de la colonne diffère légèrement entre l'homme et le poisson, l'architecture de la colonne vertébrale entre l'homme et le poisson-zèbre est conservée. Le poisson-zèbre est donc un bon modèle d'étude pour l'investigation génétique et biologique de la SI.

2.3.4.2. Émergence du premier modèle génétique de SI chez le poisson-zèbre scoliotique : le mutant *ptk7^{-/-}*

L'utilisation de la technique de l'édition du génome a permis la génération de nombreux mutants de poisson-zèbre qui développent une courbure de l'axe au stade embryonnaire, ou une scoliose au stade juvénile (similaire à l'adolescence chez l'homme et se situe entre 3 et 12 semaines) (que nous verrons en détails dans la partie 3.) et qui met en évidence l'altération de trois processus biologiques chez les animaux courbés : la ciliogénèse (qui contrôle la circulation du LCS), la formation de la fibre de Reissner, l'activation du système immunitaire inné et induit.

Le mutant codant la protéine tyrosine kinase 7 (*ptk7^{-/-}*) a été le premier modèle de poisson-zèbre développant une scoliose au stade juvénile, similaire à la scoliose idiopathique chez l'homme (Grimes et al. 2016). La protéine Ptk7 est un régulateur des voies de signalisation Wnt canonique (Wnt/ β -caténine) et Wnt-PCP (Hayes et al. 2013). Grimes et al. ont mis en évidence qu'au stade adulte, le mutant scoliotique *ptk7^{-/-}* présente une dilatation des ventricules du cerveau, associé à une réduction importante du nombre de touffes multi-ciliées qui tapissent les cavités de ces ventricules. L'analyse du flux ventriculaire dans des cerveaux adultes injectés avec des billes fluorescentes dans le diencephale a mis en évidence une réduction d'un facteur 5 de la vitesse de des billes chez les mutants *ptk7^{-/-}* par rapport aux contrôles. La réintroduction de l'expression de *ptk7* sous le contrôle d'un promoteur spécifique des cellules ciliées motiles *foxj1a* a permis un sauvetage de la scoliose, avec une restauration des CMC dans les ventricules du cerveau et du flux du LCS. Cette étude

a été la première à mettre en évidence l'implication de la motilité ciliaire dans la maintenance d'un axe droit chez le poisson-zèbre et de favoriser l'hypothèse d'une origine neurale à cette pathologie. Nous verrons par la suite que la motilité ciliaire est importante pour maintenir un flux du LCS et aide à la polymérisation d'une glycoprotéine appelée sco-spondine.

3. Facteurs génétiques et environnementaux participant à la courbure de l'axe chez le poisson zèbre

3.1. Régulateurs embryonnaires de la courbure de l'axe chez le poisson zèbre

3.1.1. Défauts de courbures ventrales et sigmoïdes chez les mutants ciliaires et de zone de transition

La perte des gènes codant pour des protéines ciliaires IFT-B chez les mutants *ift88^{-/-}/oval*, *ift54^{-/-}/elipsa*, pour des kinésines comme chez le mutant *kif3b^{-/-}* ou protéine se localisant au cil comme *arl13^{hi459/hi459}/sco* conduit à l'émergence d'une courbure ventrale (phénotype « tail down ») au stade embryonnaire (entre 30 hpf et 2 dpf) (Kramer-Zucker et al. 2005; Omori et al. 2008; Song et al. 2016; Duldulao, Lee, et Sun 2009). Ce défaut est associé à des kystes rénaux au niveau des glomérules, à une dystrophie rétinienne et à un défaut de latéralité droite/gauche. Chez ces mutants, la courbure de l'axe conduit à une létalité précoce au stade larvaire. Les mutants de zone de transition présentent quant à eux un phénotype de courbure de pénétrance variable, parfois sigmoïde ou légèrement ventrale au stade embryonnaire, comme par exemple les mutants *cc2d2a^{w38/w38}*, *cep290^{fh297/fh297}*, *tmem67^{e3/e3}* (Gorden et al. 2008; Bachmann-Gagescu et al. 2011; Wang et al. 2022; Zhu et al. 2021). Les mutants de ZT présentent dans certains cas une dystrophie rétinienne comme chez le mutant *cc2d2a^{w38/w38}*, mais en général, les défauts sont moins sévères que les mutants de protéines ciliaires. Ces mutants sont viables au stade larvaire et développent une scoliose au stade juvénile.

3.1.2. Défaut de courbure dorsale au stade embryonnaire

Chez le poisson-zèbre, seul le mutant *pkd2^{-/-}* (Metzner et al. 2020; Cao et al. 2009; Schottenfeld, Sullivan-Brown, et Burdine 2007) a été documenté comme développant une courbure dorsale (phénotype « tail up ») au stade embryonnaire (2 dpf). Des analyses réalisées sur des morphants suggéreraient que le défaut de courbure dorsale serait causé par une augmentation du dépôt de la matrice extracellulaire suite à l'augmentation de la production et/ou du dépôt de collagène 2a2 (Mangos et al. 2010). L'analyse par crible de drogues sur le mutant *pkd2^{-/-}* a mis en évidence que la courbure

de l'axe pourrait également provenir d'une dérégulation de l'acétylase d'histone 1 (« Hdac 1 » en anglais). L'inhibition de l'Hdac1 par un traitement au trichostatine A ou par l'acide valproïque est capable de sauver la courbure embryonnaire (Cao et al. 2009).

3.1.3. Défaut de flux du liquide cérébro-spinal dans les mutants de motilité

Comme mentionné précédemment, le LCS assure la protection du cerveau et de la moelle épinière, et transporte des signaux de survie/prolifération dans le SNC. La circulation du LCS est essentielle au développement normal du SNC, car il fournit des facteurs de croissance et des molécules de signalisation qui influencent la prolifération et la différenciation de l'épithélium neural (Fame et Lehtinen 2020). Au stade embryonnaire chez le poisson-zèbre, le LCS circule à travers les cavités du cerveau et du canal central dans un premier temps grâce à la présence de cils sur les cellules épendymaires du canal central à 30 hpf et au battement du cœur, et plus tardivement (2dpf) grâce à l'acquisition d'une motilité des cils sur cellules épendymaires du cerveau (Olstad et al. 2019; Thouvenin et al. 2020). Le canal central s'étend du plancher du 4^{ème} ventricule du cerveau jusqu'à l'*ampula caudalis* situé dans la queue. Les cils battent de manière synchronisée et génèrent un mouvement ondulatoire qui permet la circulation du LCS. Plusieurs études ont mis en évidence qu'un défaut de motilité ciliaire conduit à une courbure « tail down » au stade embryonnaire entre 30-55 hpf. Par exemple à 3 dpf, le mutant de motilité ciliaire *zmynd10*^{-/-} présente un phénotype *tail down* associé à un maintien des cils le long du canal central (Xiaoli Zhang et al. 2018). L'injection de billes fluorescentes dans les ventricules du cerveau de ce mutant a mis en évidence de manière indirecte que la motilité ciliaire dans le canal central est diminuée d'un facteur 5 à 3 dpf par rapport au contrôle. De la même manière, le mutant ciliaire *ift88/ovl* présente un phénotype *tail down* à 3 dpf associé à une diminution importante de la motilité ciliaire dans le canal central (Cantaut-Belarif et al. 2018), montrée initialement en utilisant des morpholinos anti IFTs (Kramer-Zucker et al. 2005).

Ces résultats mettent en lumière que la circulation du LCS générée par les cils pourrait permettre l'apport le long des cavités de signaux nécessaires pour maintenir un axe droit chez l'embryon.

3.1.4. Défaut de formation de la fibre de Reissner

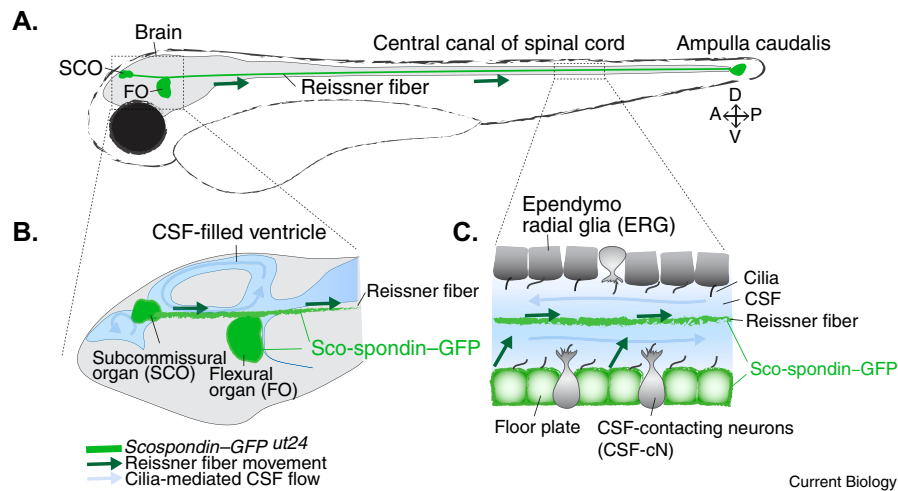


Figure 30 : Localisation de la fibre de Reissner dans le cerveau et le canal central de la moelle épinière au stade larvaire chez le poisson-zèbre. (A) La fibre de Reissner (vert) présente du diencéphale au canal central de la moelle épinière et qui se termine dans la queue, au niveau de l'ampoule caudale. **(B)** La fibre de Reissner est issue de la polymérisation d'une glycoprotéine appelée Sco-spondine. Elle est sécrétée dans le LCS cérébral par l'organe subcommissural (SCO) et l'organe flexural. **(C)** Dans la moelle épinière, la sco-spondine est également produite par le plancher. Les neurones sensoriels ventraux qui bordent le canal central (CSN-cNs) s'intercalent entre les cellules du plancher et expriment les neuropeptides « urotensin-related neuropeptides 1 et 2 » (Urp1 et Urp2). (Figure tirée de la revue (Ringers et Jurisch-Yaksi 2020))

La fibre de Reissner (FR) est issue de la polymérisation d'une glycoprotéine appelée sco-spondine (sspo) et est en suspension au sein du LCS (E. M. Rodríguez, Rodríguez, et Hein 1998; Muñoz et al. 2019). Chez le poisson-zèbre, la FR s'étend du diencéphale jusqu'à la partie caudale du canal central de la moelle épinière. Elle est d'ailleurs conservée chez les cordés à l'exception possible des hominidés (Muñoz et al. 2019; Meiniel et Meiniel 2007). Au stade embryonnaire, la sco-spondine est originellement produite et sécrétée par différentes structures : les cellules du plancher de la moelle épinière (dès 15 hpf), l'organe flexural présent dans le rhombencéphale antérieur et les cellules glandulaires du SCO situé entre le diencéphale et le mésencéphale (à partir de 24 hpf) (Figure 30) (Lichtenfeld et al. 1999). Plus

tardivement dans le développement, la sco-spondine sera principalement produite par le SCO. La génération d'une insertion en phase de la GFP au sein du locus de la Sco-spondin, la lignée Knock-in *sspo*-GFP a permis de suivre *in vivo* les propriétés dynamiques de la formation de la FR dans des embryons de poisson zèbre en cours de développement (Troutwine et al. 2020). Cette lignée transgénique a révélé que la FR suit un mouvement rostro-caudal continu dans le cerveau et le canal central et se désassemble au niveau de l'ampoule caudale située de la queue comme préalablement montré chez le rat. Au stade larvaire, les sécrétions de *sspo* produites par les cellules du plancher du canal central fusionnent avec la fibre sous-jacente.

La génération d'un mutant de poisson-zèbre déficient pour la *Sspo* a permis de mettre en évidence le rôle crucial de la FR dans la maintenance d'un axe droit. Grâce à l'utilisation de l'édition de génome par CRISPR/Cas9, plusieurs laboratoires ont généré des mutants nuls *sspo* qui affectent la structure ou la fonction de la protéine (Cantaut-Belarif et al. 2018; Rose et al. 2020; H. Lu et al. 2020). L'utilisation d'un anticorps anti-FR non commercial et dirigé contre la protéine bovine, a permis d'observer que ce mutant n'arrive pas à former de FR (aussi bien dans le SCO que dans le canal central) à 24 hpf (Cantaut-Belarif et al. 2018). A 30 hpf, le mutant *sspo* développe un phénotype tail down, similaire aux mutants ciliaires ou de motilité ciliaire et meurt aux alentours de 10 dpf. L'utilisation de la lignée transgénique Tg(β actin :arl13b-GFP; *sco-spondine*^{*icm13/icm13*}) qui permet de visualiser en temps réel les cils marqués par la protéine Arl13b, a démontré que la morphologie et l'orientation des cils n'est pas affectée. De plus, aucun défaut de circulation du LCS n'a été observée dans le canal central à 30 hpf. Ainsi la maintenance de la FR est nécessaire pour maintenir un axe droit, et le défaut de courbure embryonnaire chez le mutant *sspo* ne résulte pas d'un défaut de circulation du LCS dans le canal central. De manière très intéressante, Cantaut Belarif et al. ont mis en lumière que les mutants ciliaires *traf3ip1/elipsa*, *ift88/oval*, *dzip1/iguana* et le mutant de motilité ciliaire *kurly* qui présentent tous trois un phénotype « tail-down » à 48 hpf, présentent également une polymérisation défectueuse de la FR dans le canal central, associée à la présence d'agrégats (Cantaut-Belarif et al. 2018). Les cils via leur motilité sont donc requis pour la formation et le maintien de la FR et par conséquent un maintien de l'axe droit au stade embryonnaire.

3.1.5. Rôle des neurones en contact avec le LCS (CSF-cNs) dans la proprioception

3.1.5.1. Description des CSF-cNs

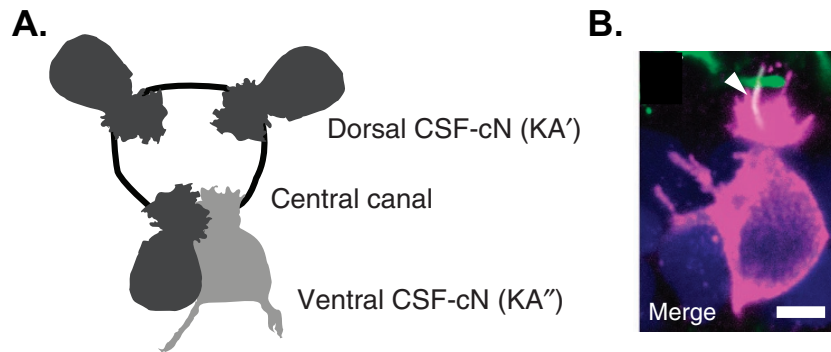


Figure 31 : Localisation des CSF-cNs autour du canal central de la moelle épinière chez le poisson-zèbre. **A.** Représentation schématique des CSF-cNs dorsalement et ventralement autour du canal central. (KA : Kolmer Agduhr) **B.** Visualisation des CSF-cNs par microscopie confocale à 4 dpf chez la larve de poisson-zèbre grâce à la lignée transgénique Tg (pkd2l1:gal4, UAS:tagRFP-CAAX;cmcl2:GFP, β act:Arl13-GFP). Les CSF-cNs projettent un cil Arl13-GFP (flèche) et de multiples microvillosités dans le LCS (Tiré de l'article (Böhm et al. 2016)).

Au niveau du canal central de la moelle épinière se trouve des neurones sensoriels GABA-ergiques spécifiques localisés dorsalement et ventralement appelés CSF-cNs. Les cellules ventrales s'intercalent entre les cellules du plancher latéral (figure 30A). Les CSF-cNs ont originellement été identifiées par Kolmer (1921) et Agduhr (1922) et ont été décrites comme des cellules présentant une extension bulbeuse apicale dans le canal central et qui envoient des projections axonales basales aux autres cellules (Djenoune et Wyart 2017). De par la ressemblance morphologique entre les cellules ciliées et les CSF-cNs, ces auteurs ont suggéré que ces neurones pourraient correspondre à un organe sensoriel de proprioception entre le LCS et le SNC de la moelle épinière. Les CSF-cNs sont retrouvés chez de nombreuses espèces (comme le macaque (LaMotte 1987), la souris (Orts-Del'Immagine et al. 2012; B. Vigh et al. 1983), les amphibiens (B. Vigh, Vigh-Teichmann, et Aros 1977; Dale et al. 1987; Alibardi 1990), le poisson-zèbre (Bernhardt et al. 1992; Higashijima, Mandel, et Fetcho 2004; Wyart et al. 2009; L. Yang, Rastegar, et Strähle 2010) mais leur morphologie

varie. Les CSF-cNs arborent des microvilli et un kinocil à leur surface qui baigne dans le LCS (Figure 31) (Béla Vigh et Vigh-Teichmann 1998; Orts-Del'Immagine et al. 2014; Djenoune et al. 2014; Böhm et al. 2016; Djenoune et al. 2017). Chez les larves de poisson-zèbre, les CSF-cNs dorsaux projettent soit un axone ascendant ipsilatéral qui fait synapse avec les interneurons prémoteurs impliqués dans la locomotion lente, tandis que les CSF-cNs ventraux projettent vers les motoneurons ou directement dans le muscle (Higashijima, Mandel, et Fetcho 2004; Wyart et al. 2009; Fidelin et al. 2015; Djenoune et al. 2017).

3.1.5.2. Les CSF-cNs : des organes de proprioception

Le canal calcique « polycystic kidney disease 2 like 1 » (Pkd2l1) est exprimé spécifiquement par les CSF-cNs chez le poisson-zèbre, la souris et le macaque où il est enrichi au niveau des extensions apicales (Djenoune et al. 2014; Sternberg et al. 2018). L'utilisation de technique d'imagerie calcique via la lignée transgénique Tg(pkd2l1:GCaMP5) dans les larves de poisson zèbre en mouvement associée à une analyse comportementale quantitative a montré que les CSF-cNs répondent à la flexion passive et active de la moelle épinière et participe au contrôle de l'équilibre postural (Böhm et al. 2016; Hubbard et al. 2016). En effet, les CSF-cNs dorsaux répondent à une flexion latérale induite de la moelle épinière du côté de la contraction alors que les cellules dorsales controlatérales et ventrales restent pour la plupart non actives. Les CSF-cNs ventraux sont recrutés suite à une contraction longitudinale de la moelle épinière (Hubbard et al. 2016). Chez les mutants *pkd2l1^{-/-}*, les CSF-cNs sont bien présents mais la réponse calcique suite à une flexion d'un côté du tronc est abolie et ceci est associé à une réduction de la fréquence de mouvement de la queue de la larve. Ces résultats démontrent que le canal Pkd2l1 dans les CSF-cNs est nécessaire à la réponse mécano-sensorielle suite à une flexion induite et orchestre une boucle de rétroaction qui permet de réguler la fréquence de locomotion et participe au contrôle postural (Böhm et al. 2016).

De plus, Orts-Del'Immagine et al. ont mis en évidence que les CSF-cNs détectent la courbure vertébrale en établissant un contact proche avec la FR grâce à leur cil et aux microvilli (Orts-Del'Immagine et al. 2020). En effet, l'utilisation d'imagerie calcique grâce à la lignée transgénique Tg(pkd2l1:hGCaMP5G) à 3 dpf a permis de montrer

que le mutant *cfap298*^{-/-} qui présente une perte de polymérisation de la FR conduit à une diminution de la réponse calcique des CSF-cNs induite par une courbure de la moelle épinière par rapport au contrôle. Cette réponse atténuée n'est pas causée par une réduction d'activité calcique du canal *pkd211* et suggère donc que l'absence de la FR pourrait être responsable de ce défaut. L'utilisation d'un mutant hypomorphe de sco-spondin (3 dpf) qui présente un défaut d'agrégation de la Sco-spondine en fibre permet de montrer que la fibre de RF est critique pour la fonction mécano-sensorielle des CSF-cNs. L'activité calcique est en effet réduite chez le mutant *sspo* hypomorphe par rapport au contrôle suite à une flexion de la moelle. De la même manière, une ablation focale de la FR avec laser chez la larve conduit à une rétractation et relaxation de la fibre associée à une diminution de l'activité des CSF-cNs (Bellegarda et al. 2023). Ces résultats permettent de mettre en lumière le rôle de proprioception des CSF-cNs sur la courbure de l'axe grâce à son contact étroit avec la FR chez le poisson-zèbre. Il n'existe pas encore de modèle de poissons mutants dépourvus des CSF-cNs qui permettrait d'évaluer la contribution de cette population neuronale sur le contrôle postural et la locomotion des larves de poisson-zèbre.

3.1.6. Défaut d'expression des gènes *urp1* et *urp2*

Au stade larvaire, la droiture de l'axe est en partie contrôlée par le niveau d'expression des peptides « urotensin-related peptides 1 et 2 » (*Urp1* et *Urp2*) exprimés par les CSF-cNs (Parmentier et al. 2011; Quan et al. 2015; Xiaoli Zhang et al. 2018). **Urp1** et **Urp2** appartiennent à une famille multigénique de neuropeptides appelée famille de l'urotensin 2 également composée des membres *Urp* et Urotensine 2 (*Uts2a* et *Uts2b*) (Tostivint et al. 2006; 2013; Vaudry et al. 2015). Des études phylogénétiques et l'analyse de la synténie indiquent que l'urotensine 2 et les peptides apparentés à l'urotensine 2 appartiennent à la superfamille de la somatostatine. *Urp1* et *urp2* sont conservés chez l'ensemble des téléostéens mais leur duplication est perdue chez les mammifères et seul le gène Urotensine 2 est retrouvé (Vaudry et al. 2015). *Urp1* et *urp2* sont des neuropeptides de 8 acide-aminés, qui, de par leur petite taille, diffusent très facilement. Ils agissent via une famille multigénique de récepteurs couplés aux protéines G appelée *Uts2r*. A ce jour, 5 récepteurs ont été identifiés chez le poisson-zèbre et uniquement un chez les mammifères, GPR14 (Tostivint et al. 2014).

Zhang et al. ont été les premiers à mettre en évidence grâce à une analyse transcriptomique (à 28 hpf) que l'expression des neuropeptides *urp1* et *urp2* est diminuée dans le mutant de motilité ciliaire *zmynd10^{-/-}* (Xiaoli Zhang et al. 2018). L'expression de ces neuropeptides est également diminuée chez d'autres mutants de motilité ciliaire présentant un phénotype *tail down* (*foxj1a*, un facteur de transcription régulant la ciliogénèse des cils motiles et *ccdc103* et *lrrc50* qui sont des régulateurs de l'assemblage des bras de dynéine). Des expériences de gain et de perte de fonction ont respectivement montré que l'injection de peptides *urp1* ou *urp2* dans la moelle épinière permet de sauver la courbure embryonnaire du mutant *zmynd10^{-/-}* à 28 hpf alors que la génération de morphants *urp1* produit une courbure « tail down » à 30 hpf. Ces résultats ont été les premiers à mettre en évidence que la courbure embryonnaire observée chez les mutants ciliaires est issue d'une diminution de l'expression des neuropeptides *urp1/2*. Cependant, il est à noter que les mutants *urp1^{-/-}* et *urp2^{-/-}* ne produisent pas de courbure au stade embryonnaire, mais seulement au stade larvaire tardif, ce qui suggère l'existence d'une compensation fonctionnelle (Bearce et al. 2022; Gaillard et al. 2023). Il a été montré que les peptides Urp1 et Urp2 signalent via leur récepteur Uts2r3 exprimé dans les muscles somitiques dorsaux (Xiaoli Zhang et al. 2018). En effet, les morphants *uts2r3* présentent un phénotype « tail down » à 48 hpf qui ne peut pas être sauvé par injection du peptide Urp1/2 dans la moelle épinière. Cependant, le mutant *uts2r3^{-/-}* n'a lui-aussi aucun phénotype à l'état embryonnaire et développe une courbure de l'axe au stade larvaire, comme les double-mutants *urp1^{-/-}; urp2^{-/-}*. Les travaux de (Gaillard et al. 2023) ont permis d'exclure que l'absence de phénotype embryonnaire chez ces mutants était causée par des stocks maternels de ces protéines et pointent vers l'existence d'un mécanisme de contrôle de droiture de l'axe redondant, capable de prendre le relai chez les mutants de la voie Urotensine. Récemment, plusieurs études ont suggéré un lien entre la FR et le niveau d'expression d'*urp1/2* dans le maintien de l'axe droit chez l'embryon. Les mutants nuls *sspo* présentent comme les mutants ciliaires une diminution de l'expression d'*urp1/2* au stade embryonnaire (dès 30 hpf). La restauration d'un niveau d'expression Urp2 est suffisante pour sauver le phénotype de courbure embryonnaire (Cantaut-Belarif et al. 2020; H. Lu et al. 2020). Les composés monoaminergiques que sont l'épinéphrine et la norépinéphrine ont été proposés comme intermédiaires pour agir entre la stimulation de la FR et l'expression d'*urp1/2* dans les CSF-cNs (Xiaoli Zhang et al. 2018; H. Lu et al. 2020; Cantaut-Belarif et al. 2020). Un traitement avec l'épinéphrine ou la

norépinéphrine des embryons mutants *sspo*^{-/-} et *zmynd10*^{-/-} permet de restaurer l'expression de l'*urp1/2* et améliore la courbure de l'axe. Par ailleurs, la norépinéphrine a été observée à proximité de la FR et son récepteur adrénergique $\beta 2$ (*Adrb2*) est exprimée par les cellules voisines des CSF-cNs (à 30 hpf) (Cantaut-Belarif et al. 2020). Cependant, l'immuno-marquage *Adrb2* met en évidence des structures de forme circulaire, assez différentes d'un marquage membranaire, attendu pour un récepteur des signaux du LCS, présents sur les cellules cuboidales du plancher. Ainsi, même si ces composés monoaminergiques sont capables de redresser les axes tail-down en activant l'AMPC, de nouvelles expériences de perte de fonction génétique des monoamines permettraient de valider leur implication physiologique dans l'embryon.

3.1.7. Hypothèse de modèle de maintenance de l'axe droit chez l'embryon de poisson-zèbre

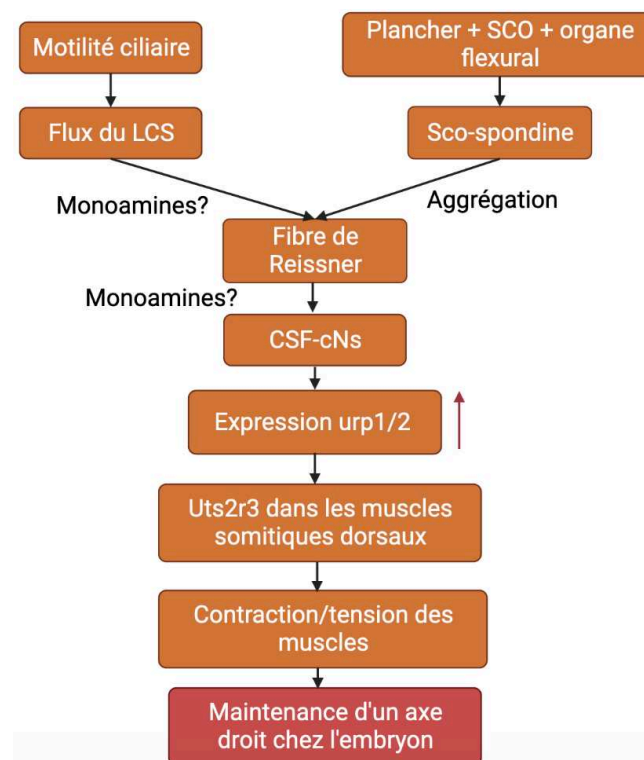


Figure 32 : Modèle actuel de maintenance de l'axe droit chez l'embryon de poisson-zèbre. Modèle de contrôle de l'axe droit impliquant les cils, le flux de CSF, le RF et le CSF-cNS via la signalisation Urp et l'activité musculaire à contraction lente. (SCO : Subcommissural organe ; LCS : Liquide Cérébro-spinal ; CSF-cNs : Cerebrospinal fluid contacting neurons ; urp1/2 : urotensin-related peptide 1/2) (Figure réalisée avec Biorender)

L'ensemble de ces résultats a permis la mise en place d'un modèle hypothétique de maintenance de l'axe droit chez l'embryon de poisson-zèbre. La motilité ciliaire est nécessaire pour maintenir un flux du LCS. Ce flux à son tour permet de former et maintenir la FR. La FR amènerait des monoamines pour activer l'expression des URPs par les CSF-cNs. Ces cellules produisent et sécrètent les neuropeptides Urp1/Urp2 qui se fixent sur leur récepteur Utsr2r3 dans les muscles somitiques dorsaux pour promouvoir la maintenance de l'axe droit, probablement grâce à une régulation du tonus musculaire (Figure 32).

3.2. La scoliose idiopathique chez le poisson zèbre

3.2.1. Défaut dans la circulation du LCR et la formation de la fibre de Reissner dans l'apparition de la scoliose chez le poisson zèbre

3.2.1.1. Rôle des cils motiles dans la maintenance d'un axe droit pendant l'adolescence

Au stade embryonnaire (1-3 dpf), la majorité des mutants ciliaires présentent tous une courbure de la queue vers le bas (appelé phénotype « *tail down* ») qui impacte fortement la nage de l'embryon. Ces mutants de motilité ne peuvent donc pas se nourrir correctement et meurent généralement entre 1 et 2 semaines. Pour outrepasser cette létalité, les équipes de Ciruna et Burdine ont tiré profit du mutant thermosensible *cfap298/kurly* qui lorsqu'il est élevé à une température permissive (25°C) jusqu'à 5 dpf reste droit, ce qui permet d'éviter la létalité embryonnaire puis développe une scoliose entre 3 et 4 semaines s'il est incubé à 30°C par la suite (Grimes et al. 2016). Grâce à la thermo-sensibilité du phénotype, ils ont déterminé que la restauration des cils motiles à 19 dpf à l'émergence de la scoliose est suffisante pour éviter l'apparition de la scoliose. Ces résultats sont renforcés par l'analyse de mutants de motilité ciliaire *ccdc40* (Becker-Heck et al. 2011), *ccdc151* (Hjeij et al. 2014), *dyx1c1* (UK10K et al. 2013), et *c21orf59/kurly* (Austin-Tse et al. 2013). Les phénotypes embryonnaires ont été sauvés grâce à l'injection d'ARN au stade une cellule puis à analyser les mutants *ccdc40*, *ccdc151*, *dyx1c1* au stade juvénile. L'ensemble de ces mutants développent une scoliose sans malformation congénitale vertébrale. L'injection de billes fluorescentes dans le diencephale a mis en évidence

une réduction du flux ventriculaire d'un facteur 5 chez les mutants scoliotiques *cfap298* et *ccdc151*. Ces résultats permettent d'affirmer que la perte de la motilité ciliaire dans 4 mutants conduit à une courbure de la colonne vertébrale chez le poisson-zèbre et fournit une preuve solide qu'un dysfonctionnement des cils motiles participe à l'émergence de la SI chez le poisson.

De la même manière, le mutant *ptk7^{-/-}*, décrit précédemment, développe une scoliose au stade juvénile (entre 12 et 40 jours (Van Gennip, Boswell, et Ciruna 2018)) présente une perte des touffes multi-ciliées sur les cellules épendymaires du cerveau et une dilatation des ventricules qui est généralement associée à un défaut de motilité ciliaire (Grimes et al. 2016). Une mutation non-sens dans le gène *kif6* conduit également à l'apparition d'une scoliose sans anomalie vertébrale durant la phase de croissance chez le poisson-zèbre, (Buchan, Gray, et al. 2014; Konjikusic et al. 2018). Ce gène code pour la protéine kinésine 6 appartenant à la super famille des microtubules kinésine-9 et est impliquée dans le transport intracellulaire de complexes protéiques (Miki, Okada, et Hirokawa 2005). Le mutant *kif6^{sko/sko}/skolios* développe une légère courbure de la queue vers le bas au stade embryonnaire (2-3 dpf) avec une pénétrance de 80% et évolue vers une scoliose au stade juvénile. Au stade embryonnaire, Buchan et al. n'ont observé aucun défaut de morphologie et de nombre de cils dans le canal central de la moelle épinière (Buchan, Gray, et al. 2014). De plus, l'analyse du flux du LCS par injection de colorant dans le 4^{ème} ventricule du cerveau n'a révélé aucun défaut de circulation du liquide, deux phénotypes qui sont normalement attribués au phénotype de courbure embryonnaire *tail down*. Au cours de l'adolescence, l'utilisation de la lignée transgénique *tg(foxj1a::ar113bGFP)* a permis d'observer qu'à 90 dpf, les mutants *kif6^{sko/sko}* présentent une forte réduction des touffes multi-ciliées qui bordent les ventricules associée à une hydrocéphalie (Konjikusic et al. 2018). Ces résultats suggèrent que la protéine kif6 est impliquée dans le maintien des cils des cellules épendymaires du cerveau et participe à l'homéostasie ventriculaire durant la période de maturation sexuelle chez le poisson-zèbre. Ensemble, ces études mettent en lumière le rôle de la motilité ciliaire dans le maintien d'un axe droit au cours du développement de la colonne vertébrale. De manière très intéressante, des mutants de zone de transition ciliaires tels que *cep290^{-/-}* (Cardenas-Rodriguez et al. 2021), *cc2d2a^{-/-}* (Ruxandra Bachmann-Gagescu et al. 2011), *tmem67^{e3/e3}* (Zhu et al. 2021) ou le mutant déficient pour une protéine du complexe ciliaire Bbs, *bbs1^{-/-}* (Masek et al. 2022) ou encore des mutants impliqués dans des modifications post-

traductionnelles des cils *armc9*^{-/-} et *togaram1*^{-/-} (Latour et al. 2020) développent une scoliose au stade juvénile, mais l'étiologie de la scoliose n'a pas encore été étudiée chez ces derniers. Cela suggère qu'un dysfonctionnement de la fonction de la ZT, du transport ciliaire ou des modifications post-traductionnelles des cils pourraient participer au développement de la scoliose au stade juvénile.

Dans ce contexte, nous pouvons nous demander quelle(s) population(s) de cils motiles sont importantes pour maintenir un axe droit chez le poisson-zèbre ? L'analyse réalisée chez le mutant *ptk7*^{-/-} suggère que la scoliose proviendrait d'une perte des cils motiles des cellules épendymaires du cerveau. La réintroduction du gène *ptk7* sous le contrôle du promoteur de cils motiles *foxj1a* est suffisant pour restaurer les touffes multi-ciliées dans les ventricules du cerveau et sauver la scoliose (Grimes et al. 2016). Une étude récente suggère qu'une altération des cellules du plexus choroïde pourrait aussi être impliquée dans l'émergence de la scoliose chez le mutant *katnb1*^{-/-} (Meyer-Miner et al. 2022). La protéine katanine est un hétérodimère liant les microtubules composés des sous-unités catalytique p60 et d'échafaudage p80 où la sous-unité p80 (Katnb1) a notamment pour fonction de localiser la katanine au centrosome. L'analyse de MEF murins en culture a mis en évidence que la protéine Katnb1 est impliquée dans le contrôle de la ciliogénèse. Une perte d'expression de cette protéine conduit à une amplification surnuméraire des centrioles (W. F. Hu et al. 2014). Le mutant *katnb1*^{-/-} développe une scoliose entre 21 et 23 dpf qui est totalement pénétrante à 30 dpf, sans anomalie vertébrale (Meyer-Miner et al. 2022). Une analyse par microscopie électronique à balayage de cerveaux disséqués à 3 semaines a mis en évidence que les cellules épendymaires au niveau des ventricules du rhombencéphale ne sont pas encore apparues chez un contrôle, alors que le mutant *katnb1*^{-/-} est scoliotique. Au même stade, le plexus choroïde du cerveau antérieur et du rhombencéphale présentent une majorité de cellules mono-cils. Plus tardivement à 30 dpf, les CMC apparaissent. Le mutant scoliotique *katnb1*^{-/-} présente une réduction du nombre de mono-cils à 21 dpf par rapport au contrôle. A 30 dpf, ce mutant n'arrive pas à former de multi-cils, et seul des agrégats sont observés par immunofluorescence. De plus à 3 semaines, ce mutant scoliotique présente une réduction du flux ventriculaire mesurée par injection d'un colorant fluorescent dans les ventricules du cerveau. Ces résultats suggèrent alors qu'un défaut des cils du plexus choroïde pourrait contribuer à une altération de la circulation et/ou du contenu du LCS et participerait à la scoliose.

Ces deux études proposent que l'altération de deux populations ciliaires différentes, soit les cellules épendymaires du cervelet soit les cellules du plexus choroïde sont à l'origine de la scoliose. Il serait intéressant de déterminer si une ou plusieurs population(s) de cils participent à l'induction de la scoliose et si ce sont les mêmes populations dans les différents mutants scoliotiques.

3.2.1.2. Importance de la maintenance de la fibre de Reissner au stade juvénile

Au stade embryonnaire, la maintenance de la fibre de Reissner joue un rôle clé dans la droiture de l'axe. Mais quand est-il au stade juvénile ? Les équipes de B. Ciruna et R. Gray ont analysé respectivement un mutant dominant *sspo^{dmh4/+}* et deux mutants récessifs *sspo^{stl297/stl297}* et *sspo^{stl300/stl300}* qui développent une scoliose au stade juvénile (Rose et al. 2020; Troutwine et al. 2020). Le mutant *sspo^{dmh4/+}* présente une mutation faux-sens qui conduit à une fonction anormale de la glycoprotéine (Rose et al. 2020). Les mutants *sspo^{stl297/stl297}* et *sspo^{stl300/stl300}* possèdent une mutation hypomorphe qui perturbe une cystéine de la protéine conduisant à sa sécrétion inefficace puis à la dépolymérisation de la FR (Troutwine et al. 2020).

Le mutant *sspo^{stl297/stl297}* commence à développer une courbure de l'axe à 5 dpf qui devient complètement pénétrante à 15 dpf. Ce mutant présente une FR pendant les premiers stades embryonnaires (3 dpf) qui se dépolymérise progressivement entre 5 et 10 dpf, coïncidant avec l'apparition de la scoliose. Troutwine et al. ont suggéré que le mutant *sspo^{stl297/stl297}* présente un défaut de sécrétion de la sco-spondine par les cellules du plancher, conduisant à la perte progressive de la FR.

Le mutant dominant *sspo^{dmh4/+}* développe une torsion de la colonne vertébrale dès 13 dpf qui évolue progressivement vers une scoliose au stade juvénile. Au stade embryonnaire, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la sco-spondine bovine a permis d'observer une FR intacte dans la tête, le tronc et la queue chez le mutant *sspo^{dmh4/+}*. Cependant, une grande partie de la sco-spondine s'accumule dans le cytoplasme des cellules du plancher, comme chez le mutant *sspo^{stl297/stl297}*. A 21 dpf, le mutant a perdu la fibre et présente uniquement des agrégats dans les ventricules du cerveau. A ce même stade, le mutant *sspo^{dmh4/+}* présente un défaut de flux ventriculaire, en absence de défaut morphologique des cils bordant les ventricules du cerveau. Une hypothèse

pour expliquer l'altération du flux de LCS dans ce mutant serait que des agrégats de sco-spondine dépolymérisée obstruent les ventricules et/ou le canal central.

En conclusion, ces données démontrent que la maintenance de la FR au stade juvénile est déterminante pour le maintien d'un axe droit chez le poisson-zèbre. Il reste cependant à déterminer par quels mécanismes la FR assure cette fonction de contrôle dans le canal central de la moelle épinière.

Au stade juvénile, la maintenance d'une FR correctement polymérisée au sein du CSF est un processus actif qui requiert vraisemblablement une motilité ciliaire intacte. Il est intéressant de noter que chez les mutants scoliotiques *ptk7^{-/-}* et *ccdc151^{-/-}*, la perte de la polymérisation de la FR à 21 dpf dans le cerveau coïncide avec l'apparition de la scoliose (Rose et al. 2020). Seul des agrégats sont présents chez ces mutants et certains s'accumulent de manière ectopique dans les ventricules télencéphaliques, situés antérieurement au SCO. Le mutant de motilité ciliaire thermosensible *cfap298^{-/-}* présente également des agrégats de sco-spondine dans le canal central de la moelle épinière à 12 dpf (Bearce et al. 2022). Le fait que deux mutants *ccdc151^{-/-}* et *cfap298^{-/-}* codant des protéines requises pour la motilité ciliaire perdent la RF aux stades juvéniles suggère que les cils motiles sont encore nécessaires à ces stades pour son maintien. Ceci est en accord avec des données obtenues chez le rat adulte qui montrent un renouvellement constant de la FR depuis son site de synthèse dans le SCO sous la forme d'un « tapis roulant » qui apporte de la fibre néoformée dans le canal central depuis la tête vers la queue (S. Rodríguez et al. 1990). Ce mode de formation de la fibre, validé par imagerie sur embryons de poisson-zèbre vivants (grâce à la création d'une lignée transgénique knock-in Scospondin-GFP (Troutwine et al. 2020) perdure donc tout au long de la vie du poisson-zèbre. De plus, la motilité directionnelle du CSF en est un acteur clef, probablement en favorisant la polymérisation des multi-mères de FR en direction caudale et en empêchant les fibrilles de SCO d'envahir les ventricules télencéphaliques.

3.2.2. Autre facteur participant à la scoliose chez le poisson-zèbre au stade juvénile

3.2.2.1. Implication de la signalisation des neuropeptides Urp1/Urp2 dans la maintenance d'un axe droit

La génération d'un double mutant *urp1^{-/-};urp2^{-/-}* ou du mutant pour leur récepteur *uts2r3^{-/-}* a mis en évidence que la signalisation de ces neuropeptides via leur récepteur est nécessaire pour maintenir un axe droit chez le poisson-zèbre (Bearce et al. 2022; Gaillard et al. 2023). En effet, ces mutants développent un phénotype cyphotique au stade juvénile (visible entre 7 et 13 dpf) qui évolue vers une scoliose au stade adulte. Urp1 et Urp2 agissent de manière redondante pour maintenir la droiture de l'axe, la perte d'un de ces neuropeptides conduit uniquement à un phénotype cyphotique où la perte d'*urp2* est plus sévère (Bearce et al. 2022; Gaillard et al. 2023). Urp1 et Urp2 sont donc nécessaires pour maintenir une morphologie droite de l'axe au cours de l'adolescence en se fixant sur leur récepteur Uts2r3, et Urp2 joue un rôle plus important que Urp1. L'utilisation du colorant calcéine (entre 8 et 12 dpf) a permis de démontrer que le double mutant *urp1^{-/-}; urp2^{-/-}* ne présente aucun défaut de morphologie des vertèbres ou d'espacement, caractéristique des scolioses congénitales. Cependant, le double mutant présente parfois des modifications de la forme des centres des vertèbres qui apparaissent plus courts à l'apex, probablement du fait des contraintes physiques appliquées durant la croissance pendant la courbure de la colonne (Bearce et al. 2022; Gaillard et al. 2023). Ces résultats indiquent que le double mutant *urp1^{-/-};urp2^{-/-}* est un bon modèle d'étude pour étudier la scoliose idiopathique.

Comme décrit précédemment, la diminution de la signalisation d'*urp1/2* coïncide avec une courbure de la queue vers le bas au stade embryonnaire chez de nombreux mutants ciliaires, comme observé chez le mutant *cfap298^{tm304}* à 28 hpf (Bearce et al. 2022). La comparaison de la déformation de la colonne vertébrale par analyse μ CT à 3 mois entre le mutant de motilité ciliaire *cfap298^{tm304}* sauvé par le changement de température et les mutants *urp1^{-/-};urp2^{-/-}* et *uts2r3^{-/-}* a mis en évidence un angle de Cobb augmenté d'un facteur x1,3 chez le mutant ciliaire par rapport au mutant *urp1^{-/-};urp2^{-/-}*. De plus, le mutant *cfap298^{tm304}* possède une déformation latérale de la colonne vertébrale visible en plan dorsal, tandis que les mutants *urp1^{-/-};urp2^{-/-}* et *uts2r3^{-/-}* présente uniquement une courbure dorso-ventrale, visible en plan latéral. Ces résultats suggèrent que la diminution d'expression de *urp2* chez le mutant *cfap298^{tm304}*

et à plus large échelle dans d'autres mutants ciliaires n'explique que partiellement la déformation de l'axe, et que d'autre(s) mécanisme(s) sont impliqués pour expliquer les défauts de courbure latéraux, par exemple ceux présents chez des mutants de motilité ciliaire.

3.2.2.2. Contribution partielle des CSF-cNs au développement de la scoliose

Urp1 et *urp2* sont exprimés par les CSF-cNs qui bordent le canal central de la moelle épinière. Ces cellules expriment spécifiquement le canal ionique Pkd2l1 et agissent comme un organe de proprioception en contact étroit avec la FR (Bellegarda et al. 2023). Le mutant nul *pkd2l1*^{-/-} de poisson-zèbre, conduit à une perte de l'activité calcique du canal *pkd2l1* dans les cellules CSF-cNs (Sternberg et al. 2018). Ces résultats ont été obtenus suite à l'utilisation de la technique d'enregistrement patch clamp chez des contrôles et des mutants *pkd2l1*^{-/-} âgés de 30 hpf. Le mutant *pkd2l1*^{-/-} présente un axe droit au stade larvaire qui évolue vers une cyphose au stade juvénile (Marie-Hardy et al. 2023). Cette déformation légère de la colonne vertébrale est moins importante que celle observée chez le double mutant *urp1*^{-/-} ; *urp2*^{-/-}, ce qui suggère que la maintenance d'un axe droit ne dépend pas uniquement de l'activité calcique de ce canal ionique. Comme les CSF-cNs expriment un ensemble de canaux ioniques de la même famille, la perte de fonction d'un des membres peut être partiellement compensée par l'activité des autres membres.

Deux modèles d'étude de la SI chez le poisson-zèbre ont mis en lumière la participation d'une réponse inflammatoire anormale au développement de la scoliose. Nous verrons que cette inflammation se localise dans le système neural et qu'une diminution de cette réponse immunitaire permet de sauver partiellement la pénétrance et la sévérité de la scoliose.

3.3. Mécanisme d'inflammation et scoliose : modèles émergents d'une régulation de la courbure de la colonne médiée par la réponse immunitaire

Le but de cette sous partie n'est pas de faire une description de tout le processus inflammatoire et des différents médiateurs, mais de donner les clés en main au lecteur pour comprendre le processus inflammatoire/stress oxydatif observé chez les modèles de SI de poisson-zèbre.

3.3.1. Introduction générale à la réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée est la première réponse de l'organisme suite à une blessure chimique/physique ou à une infection par un pathogène (Horiguchi et al. 2018). Cette réponse immunitaire va impliquer de nombreux types de cellules immunitaires comme les neutrophiles, les macrophages, qui présentent à leur surface des récepteurs appelés « PRR » qui permettent de détecter les composants microbiens conservés associés aux pathogènes ou des cellules endommagées (Taro Kawai et Akira 2010). Les composants microbiens associés aux pathogènes sont appelés PAMP. Les cellules endommagées possèdent des motifs qui sont appelés DAMP et ces deux types de motifs sont reconnus par les récepteurs toll-like (appelé en anglais toll-like receptor « TLR »). Il existe de nombreux sous-type de TLR qui conduisent à l'activation de divers protéines adaptatrices, et qui conduisent toutes à l'activation en aval dans les cellules immunitaires des facteurs de transcription tels que le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B), le facteur régulateur 3/7 de l'interféron (IFN) (T Kawai et Akira 2006).

3.3.1.1. Les macrophages participent à la réponse inflammatoire

Les macrophages sont des acteurs clés qui participent à la défense contre une infection ou une blessure et contribuent au processus inflammatoire. Suite à leur activation par des PAMP ou DAMP, ces cellules vont produire et sécréter des facteurs pro-inflammatoires (comme IL-6, IL-12, TNF α), des espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS en anglais) (Rivera et al. 2016). Cette réponse a pour but de retarder l'envahissement/progression des dommages dans d'autres tissus. Au stade quiescent

des cellules, il existe un équilibre redox (balance anti/pro-oxydant) qui participe au fonctionnement des cellules (Carrière et al. 2006). Dans le contexte du système immunitaire, les ERO vont permettre de détruire le pathogène phagocyté. Cependant, une production excessive d'ERO est particulièrement dangereuse pour l'homéostasie d'une cellule car en trop grand excès, ils conduisent à une oxydation non spécifique de molécules biologiques comme les protéines et les lipides, pouvant conduire à une perte de fonction. Le glutathion joue donc un rôle important car il s'agit d'une molécule anti-oxydante qui capte et réduit les ERO (Migdal et Serres 2011).

Il existe des macrophages de type 1 (M1) ou 2 (M2). Les macrophages M1 ont une activité de phagocytose pour dégrader les débris extracellulaires et possèdent notamment une activité bactéricide. Ces macrophages M1 expriment une protéine appelée perforine-2/gène 1 exprimée par les macrophages (Mpeg1) qui est impliquée dans la formation de pore dans la membrane des cellules et des pathogènes, conduisant à leur lyse (Bayly-Jones et al. 2020).

3.3.1.2. Le système du complément

Au sein du système immunitaire, le système du complément joue un rôle majeur dans l'élimination du « non-soi » comme des pathogènes/cellules endommagées qui pourraient endommager l'organisme (Dunkelberger et Song 2010). Le système du complément est un réseau de protéines complexes qui implique une cascade de clivage protéolytique. Il existe 3 voies du complément qui ensemble conduisent à la libération de signaux pro-inflammatoires (anaphylatoxines), à l'opsonisation qui permet le ciblage des membranes des pathogènes à détruire et enfin à leur lyse. Parmi les anaphylatoxines, on retrouve C3a, C4a, C5a qui ont des effets pro-inflammatoires mais peuvent aussi avoir une pléiotropie de fonctions comme la contraction des muscles lisses. Les protéines du complément C5b à C9 participent à la formation de pores dans les membranes des cellules/pathogènes.

3.3.1.3. La microglie : fonctions dans le système nerveux

Dans le système nerveux, la microglie est une population de cellules résidentes qui est impliquée dans la maintenance des réseaux neuronaux, et la réparation suite à une blessure. Les cellules microgliales permettent le remodelage des synapses

neuronaux. En cas de blessure dans le système nerveux, ces cellules vont être impliquées dans l'élimination de microbes, de cellules mortes, ou d'agrégats protéiques (Colonna et Butovsky 2017). La microglie agit comme des macrophages du cerveau, et provient également de progéniteurs myéloïdes. La microglie peut donc être visualisée par un antigène commun à ces deux lignages, la protéine cytosolique lymphocyte 1 ou L-Plastin (LCP1). Les cellules microgliales sécrètent des cytokines, et des facteurs neurotrophiques qui sont importants pour le fonctionnement du système nerveux et du système immunitaire. De la même manière que les macrophages, les cellules microgliales présentent à leur surface des PRR qui permettent la reconnaissance des DAMP et PAMP dans le système nerveux. Suite à l'activation de la microglie, on retrouve deux classes appelées microglie M1 et microglie M2 (Colonna et Butovsky 2017). La microglie M1 est pro-inflammatoire, et sécrète un ensemble de cytokines pro-inflammatoires comme TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12. Elle exprime également l'oxydase NADPH qui conduit à une augmentation des ERO. La microglie M2 est anti-inflammatoire et est impliquée dans les phases de réparation du système nerveux. Les cellules microgliales M2 produisent d'autres facteurs solubles comme IL-4, IL-13, IL-10.

Ensemble, les macrophages, les cellules microgliales et le système du complément participent à la réponse inflammatoire.

3.3.2. Induction de la scoliose par une infection bactérienne

Une infection bactérienne de *Pseudoloma neurophilia*, un pathogène retrouvé couramment dans les animaleries aquatiques est capable de conduire à l'apparition d'une scoliose chez les poissons (Sanders, Watral, et Kent 2012). Ce parasite envahit en effet le système nerveux et les muscles, le plus fréquemment chez les poissons âgés, suggérant alors que l'activation importante du système immunitaire dans ces régions pourraient contribuer à l'apparition d'une cyphose. Il est intéressant de noter qu'une infection de bactérie E.Coli dans la corde d'embryons de poisson-zèbre à 48 hpf conduit à un recrutement important de macrophages exprimant IL1b à cet endroit (Nguyen-Chi et al. 2014). L'infection précoce de la corde a pour conséquence tardive le développement d'une scoliose au stade juvénile (60dpf) avec la présence de vertèbres fusionnées ou mal formées, caractéristiques de la SC. Ces résultats mettent

en lumière qu'une activation importante du système immunitaire à proximité des vertèbres (système nerveux, muscles, corde) peut conduire à une scoliose ou une cyphose chez le poisson-zèbre.

3.3.3. Une réponse inflammatoire anormale participe au développement d'une SI chez le poisson-zèbre

Actuellement, 3 études ont permis de mettre en évidence la contribution d'une réponse inflammatoire/stress oxydatif dans l'apparition et la sévérité de la scoliose.

Une analyse transcriptomique réalisée sur le tronc des mutants *ptk7^{-/-}* à 3 stades au cours de la progression de la SI (début de la scoliose, scoliose légère, scoliose sévère) a permis la mise en évidence d'une augmentation de l'expression des protéines du complément et de la réponse immunitaire innée et inflammatoire (Van Gennip, Boswell, et Ciruna 2018). Le mutant *ptk7^{-/-}* présente une évolution de ces marqueurs en fonction du développement de la scoliose : à l'émergence de la scoliose, le mutant *ptk7^{-/-}* présente une augmentation de marqueurs de l'inflammation de la phase aiguë type *tnf* ou de gènes reliés aux ERO comme *nox1*. Les poissons très scoliotiques présentent une forte augmentation des marqueurs du complément, par exemple C3a.2, C7, C4 et ceci est associé à une augmentation importante de marqueur de la réponse inflammatoire comme le gène d'immuno-réponse 1-like (*irg1l*). *Irg1l* est le gène le plus fortement surexprimé dans l'analyse transcriptomique et est exprimé en réponse à une infection bactérienne ou une blessure induite par une inflammation, et contribue au recrutement des macrophages et neutrophiles (Hall et al. 2014). De plus, cette signature inflammatoire s'accompagne d'une invasion de macrophages visualisée avec la lignée transgénique tg(*mpeg1:eGFP*) dans la moelle épinière à l'émergence de la scoliose à 18 dpf. Ces résultats suggèrent alors qu'une neuro-inflammation/stress oxydatif localisée dans le tronc du mutant *ptk7^{-/-}* participe à l'apparition de la scoliose. De manière très intéressante, lorsque les mutants *ptk7^{-/-}* sont traités avec un agent anti-oxydant/anti-inflammatoire N-acetylcystéine (NAC) de 8 dpf à 40 dpf, l'incidence de la scoliose diminue significativement d'un facteur x4,7. Le NAC est en effet une drogue capable de stimuler la production de glutathion, et peut détoxifier les radicaux oxydés en se liant à eux (Samuni et al. 2013). Après avoir retiré le NAC, les mutants *ptk7^{-/-}* sauvés développent rapidement une scoliose. Si ces mutants sont traités avec le NAC à l'émergence de la scoliose, la sévérité de la

scoliose mesurée avec les angles de Cobb est réduite d'un facteur x2,4. Ces résultats mettent en lumière qu'un traitement anti-inflammatoire/anti-oxydant est capable de supprimer partiellement l'apparition et la sévérité de la scoliose chez le mutant de *ptk7*.

De la même manière, une analyse transcriptomique réalisée chez le mutant *sspo^{dmh4/+}* scoliotique à 21 dpf a mis en évidence une augmentation des marqueurs d'inflammation (comme des marqueurs du complément) et de stress oxydatif (comme *noxo1*) dans le cerveau (Rose et al. 2020), de manière similaire aux marqueurs retrouvés dans le tronc des mutants *ptk7^{-/-}* (Van Gennip, Boswell, et Ciruna 2018). Une analyse par microscopie en temps réel à l'aide d'une double lignée transgénique Tg(*tnfa::eGFP*) et tg(*mpeg1::mCherry*) a permis de mettre en évidence une augmentation du marqueur *Tnfa* dans la région du tectum optique par des cellules qui ne présentent pas le marqueur de macrophages *Mpeg1*. Il s'agit très probablement de la microglie résidente du système nerveux, qui serait activée et exprimerait TNF α . Ainsi, un processus inflammatoire anormal est observé chez ces deux modèles de SI, mais dans des endroits différents et qui mettent en jeu des acteurs inflammatoires différents.

Suite à l'observation d'une réponse transcriptomique inflammatoire et à la visualisation de la microglie dans le cerveau des mutants *sspo^{dmh4/+}*, un traitement NACET (1mM) sur le long terme a été réalisée avant l'émergence de la scoliose (7 dpf) et jusqu'à 30 dpf afin de tester son potentiel effet bénéfique sur l'apparition des scoliose. Ce traitement a permis de diminuer la sévérité de la scoliose mais n'est pas capable de restaurer le flux du LCS, altéré chez les mutants *sspo^{dmh4}*. L'ensemble de ces résultats permettent de conclure que le stress oxydatif et les marqueurs neuro-inflammatoires représentent un mécanisme commun à l'origine de la scoliose idiopathique des mutants *ptk7* et *sco-spondine*. Ce processus d'inflammation serait donc une réponse directe ou indirecte au défaut de motilité du LCS ou à la dépolymérisation de la RF (Rose et al. 2020). Pour l'instant aucune étude n'a permis de comprendre l'origine de cette inflammation au sein du tissu neural et comment elle participe au développement d'une courbure de l'axe. Nous discuterons de plusieurs hypothèses au cours de ma discussion. Ces études apporteront de nouvelles découvertes sur les facteurs contrôlant la droiture de la colonne vertébrale chez les vertébrés, et pourraient fournir de nouvelles méthodes de prévention chez les patients atteints de SI.

Enfin, même si son origine est inconnue, l'équipe de Ciruna a montré que l'induction d'une réponse inflammatoire dans le système nerveux est suffisante pour induire une scoliose chez le poisson-zèbre. En générant des lignées transgéniques qui permettent l'expression mosaïque du gène codant pour la cytokine pro-inflammatoire interféron- γ 1-2 (*ifng1-2*) ou l'enzyme mitochondriale productrice de ERO *irg1l* dans le système nerveux en utilisant le promoteur *foxj1a*, Van Gennip et al. ont mis en évidence que les poissons développent une scoliose à 3 semaines, avec une pénétrance de 27% et 18,4% respectivement (Van Gennip, Boswell, et Ciruna 2018). Cette pénétrance partielle peut être expliquée par l'expression mosaïque du transgène dans la moelle épinière, visualisée avec une protéine de fusion. De plus, l'association de signaux pro-inflammatoires et le développement d'une scoliose est spécifique du système nerveux, car les poissons exprimant le gène *irg1l* sous le contrôle d'un marqueur endothélial mosaïque n'ont pas développé de scoliose.

L'ensemble de ces études a permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes impliqués dans la maintenance d'un axe droit chez le poisson-zèbre au stade juvénile. La motilité ciliaire est importante pour maintenir un flux du LCS. Une perte de motilité ou plus généralement une perte des cils des cellules épendymaires des ventricules du cerveau ou des cils du plexus choroïde coïncide avec l'apparition d'une scoliose. La courbure de l'axe coïncide avec la perte de la polymérisation de la FR. Une neuro-inflammation participe à l'émergence de la scoliose chez les mutants scoliotiques *ptk7^{-/-}* et *sspo^{dmh4/+}* et les données actuelles suggèrent ce processus se trouve en aval d'un défaut de motilité ciliaire.

Jusqu'à présent, parmi les mutants ciliaires de poisson-zèbre qui développent une scoliose au stade juvénile, seul le mutant de motilité ciliaire *cfap298^{-/-}* a été étudié en détails pour comprendre les mécanismes sous-jacents de la pathologie. Il serait très intéressant de voir si les défauts observés chez ce mutant de motilité sont conservés chez d'autres mutants ciliaires tels que les mutants de ZT, les BBS, ou d'autres mutants de gènes conduisant au Syndrome de Joubert chez l'homme.

Objectifs de la thèse

La SI correspond à une rotation tridimensionnelle de la colonne vertébrale. La maladie se développe pendant la croissance rapide du corps à la puberté chez l'homme, en l'absence d'anomalies vertébrales sous-jacentes ou de défauts physiologiques. Bien qu'elle touche 3 à 4 % de la population, son étiologie reste mal comprise, en grande partie à cause de l'hétérogénéité génétique et du manque de modèles d'études appropriés.

Des études génétiques sur le poisson-zèbre ont mis en évidence qu'un défaut de maintien de la fibre de Reissner, un polymère de glycoprotéine appelée sco-spondine, sécrétée par l'organe subcommissural et présente le long des cavités du système nerveux central, conduit à l'apparition d'une scoliose au stade juvénile (stade "adolescent") (Rose et al. 2020; Troutwine et al. 2020). L'altération de la motilité des cils dans les embryons, nécessaire à la polymérisation de la fibre de Reissner (Cantaut-Belarif et al. 2018), entraîne également des défauts de courbure de l'axe, coïncidant avec une diminution de l'expression du gène du neuropeptide *urp2*. Trois modèles de poisson-zèbre de SI, les mutants *ptk7^{-/-}*, *kif6^{-/-}*, *katnb1^{-/-}* présentent une perte des touffes multi-ciliées des cellules épendymaires qui bordent les ventricules du cerveau (*ptk7^{-/-}*, *kif6^{-/-}*) (Van Gennip, Boswell, et Ciruna 2018; Buchan, Gray, et al. 2014) ou des cils du plexus choroïde (*katnb1^{-/-}*) (Meyer-Miner et al. 2022) qui coïncident avec l'apparition de la scoliose au stade juvénile. De plus, les mutants scoliotiques *ptk7^{-/-}*, *katnb1^{-/-}* et le mutant thermosensible *cfap298^{-/-}* présentent une réduction du flux ventriculaire du cerveau. Une analyse transcriptomique chez les mutants scoliotiques *sspo^{dmh4/+}* et *ptk7^{-/-}* a révélé un processus inflammatoire localisé dans le système nerveux, qui peut être contré par un traitement anti-inflammatoire, et réduire la pénétrance et la sévérité de la scoliose (Rose et al. 2020; Van Gennip, Boswell, et Ciruna 2018). L'ensemble de ces résultats suggèrent alors un rôle clé du maintien des multi-cils au stade juvénile pour permettre une circulation du flux du LCS, et participer au maintien de la fibre de Reissner, qui peut alors induire l'expression d'un niveau correct d'URPs afin de préserver la droiture de la colonne vertébrale. Il n'est pas encore clair que ce scénario soit valide pour de nombreux mutants scoliotiques, notamment les mutants ciliaires viables. Jusqu'à présent, seul le mutant de motilité

ciliaire thermosensible *cfap298^{-/-}* a été étudié en détails pour comprendre l'étiologie de la SI.

Avant mon arrivée au laboratoire, mon équipe a produit un mutant nul de poisson zèbre pour le gène de la ciliopathie *rpgr11*. Les poissons *rpgr11^{-/-}* développent de graves déformations de la colonne vertébrale pendant le stade juvénile, en l'absence d'anomalie des vertèbres. Le mutant *rpgr11* est donc un modèle intéressant pour étudier la SI. *Rpgr11* code pour une protéine ciliaire ubiquitaire située dans la zone de transition (TZ) des cils. Les cils sont des organites motiles et/ou sensoriels formés de neuf doublets de microtubules émergeant du corps basal. Ils transmettent les signaux de l'environnement à la cellule et sont présents sur presque toutes les cellules eucaryotes. La ZT est une région située à la base du cil et impliquée dans le contrôle de l'entrée et de la sortie des protéines, ce que l'on appelle la "porte ciliaire". *Rpgr11* est un composant central de la ZT. Afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la scoliose chez le mutant *rpgr11^{-/-}*, une étude transcriptomique comparative a été réalisée dans le cerveau et le tronc des contrôles et des mutants au moment de l'apparition de la scoliose. Cette analyse a montré une surexpression de nombreux gènes chez les poissons *rpgr11^{-/-}*, en particulier des gènes impliqués dans deux voies principales (1) les neuropeptides de la famille de l'Urotensine II - *urp1* et *urp2*, (2) les gènes impliqués dans la réponse immunitaire et l'inflammation.

Mon projet de thèse a donc pour objectif de déterminer l'implication d'un contrôle neurologique dans la maintenance d'un axe droit chez le poisson-zèbre, notamment comment des défauts ciliaires participent à l'émergence de la scoliose idiopathique ? Pour répondre à cette question, mon projet s'articule autour de 4 grands axes :

Axe 1 : Analyse des défauts présents dans le système nerveux : morphologie ciliaire et composition du LCS chez le mutant *rpgr11^{-/-}*

Le développement de la scoliose chez le mutant *rpgr11^{-/-}* est asynchrone pendant le stade juvénile, nous voulons donc étudier la morphologie ciliaire dans le canal central de la moelle épinière, et les cavités du cerveau chez des mutants droits et scoliotiques afin de déterminer quelle(s) population(s) de cils participent à l'émergence de la scoliose. Pour se faire, des coupes transverses de cerveau et sagittales de tronc seront réalisées et des anticorps dirigés contre des protéines ciliaires seront utilisés.

De plus, nous souhaitons étudier la persistance de la fibre de Reissner chez les mutants *rpgr11^{-/-}* par immunofluorescence en utilisant un anticorps anti-FR ou en utilisant la lignée transgénique tg(sspo:sspo-GFP) et déterminer si la perte de la FR observée chez les animaux scoliotiques précède, coïncide ou apparaît après le début de la courbure de l'axe.

Axe 2 : Expérience de sauvetage phénotypique de la scoliose par sauvetage tissu spécifique

Afin de déterminer quel(s) population(s) de cellules participent à l'émergence de la scoliose, nous voulons tenter de sauver le phénotype scoliotique du mutant *rpgr11^{-/-}*, en réalisant des sauvetages tissu-spécifiques en réintroduisant l'expression du gène RPGRIP1L sous le contrôle de promoteur exprimé spécifiquement soit dans les cellules progénitrices de cils motiles (promoteur *foxj1a*) soit dans les cellules du cartilage (enhancer *col2a1a*).

Axe 3 : Expérience de sauvetage phénotypique de la scoliose par génie génétique ou traitement de drogue

L'analyse transcriptomique a mis en lumière deux processus dérégulés à l'émergence de la scoliose chez le mutant *rpgr11^{-/-}* : (1) une augmentation de l'expression des neuropeptides *urp1* et *urp2* et (2) une augmentation des gènes liés à l'inflammation/stress oxydatif.

(1) L'objectif est dans un premier temps d'étudier dynamiquement l'augmentation d'expression des neuropeptides par Q-PCR. Si nous confirmons cette augmentation, nous souhaitons diminuer l'expression d'*urp2* (le neuropeptide le plus exprimé au stade juvénile) en enlevant une ou deux copies dans un fond *rpgr11^{-/-}* par croisement génétique (collaboration avec G. Pezeron du Muséum d'Histoire Naturelle) et voir si cela peut sauver l'apparition de la scoliose.

(2) Nous souhaitons déterminer les tissus dans lesquels le mutant *rpgr11^{-/-}* expérimente un processus inflammatoire. Si nous confirmons cette inflammation, nous tenterons de la diminuer grâce à un traitement anti-inflammatoire/anti-oxydant, le N-acetyl Cystéine Ethyl Ester, utilisé précédemment sur un autre modèle de SI. Le traitement sera réalisé à l'émergence de la scoliose jusqu'au stade adulte, et nous permettra de

déterminer s'il est capable de retarder l'apparition ou la progression de la scoliose chez les mutants *rpgr11^{-/-}*.

Axe 4 : Détermination des défauts cérébraux par analyse protéomique et mise en lumière d'un processus d'astrogliose dans le cerveau des mutants *rpgr11^{-/-}*

Afin d'évaluer si le processus inflammatoire dans le système nerveux central est couplé à la dérégulation d'autres processus, nous avons réalisé une analyse protéomique sur des cerveaux disséqués à 3 mois entre des mutants scoliotiques *rpgr11^{-/-}* et des contrôles. Nous avons observé la surexpression de plusieurs protéines impliquées dans le transport vésiculaire appartenant à la famille des Annexines (par exemple Annexine A2). L'objectif est de déterminer quelles populations de cellules (microglie ou macrophages, cellules endothéliales, cellules de la glie radiaire, cellules épendymaires, neurones) surexpriment cette protéine. Pour cela, nous réaliserons des immunomarquages avec des anticorps dirigés contre l'Annexin A2, la GFAP (marqueur de cellules radiaires gliales), HuC (marqueur de neurones) sur des coupes transverses de cerveau. Nous analyserons quels processus cellulaires sont particulièrement altérés en faisant une analyse bio-informatique avec le logiciel Metascape.

Résultats

**ASTROGLIOSIS ASSOCIATED WITH MULTICILIA LOSS IN THE
SUBCOMMISSURAL ORGAN UNDERLIES SCOLIOSIS IN A ZEBRAFISH
CILIARY MUTANT**

Morgane Djebbar¹, Isabelle Anselme¹, Guillaume Pezeron², Pierre-Luc Bardet¹,
Yasmine Cantaut-Belarif³, Alexis Eschstruth¹, Diego López Santos¹, Hélène Le
Ribeuz¹, Arnim Jenett⁴, Hanane Khoury¹, Joëlle Véziers⁵, Caroline Parmentier⁶ Sylvie
Schneider-Maunoury^{1*} and Christine Vesque^{1*}

1 Sorbonne Université, CNRS UMR7622, INSERM U1156, Institut de Biologie Paris
Seine (IBPS) - Developmental Biology Unit, 75005, Paris, France

2 Molecular Physiology and Adaptation (PhyMA - UMR7221), Muséum National
d'Histoire Naturelle, CNRS, Paris, France

3 Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM), Sorbonne Université, Inserm U
1127, CNRS UMR 7225, F-75013, Paris, France

4 TEFOR Paris-Saclay, CNRS UMS2010 / INRA UMS1451, Université Paris-Saclay.

5 Inserm UMR 1229, CHU Nantes PHU4 OTONN, SC3M facility, Inserm UMS 016,
CNRS 3556, Université de Nantes, Nantes, France.

6 Sorbonne Université, UMR8246, INSERM U1130, Institut de Biologie Paris Seine
(IBPS) – Neurosciences Paris Seine (NPS), 75005, Paris, France

* Co-corresponding authors. sylvie.schneider-maunoury@sorbonne-universite.fr
christine.vesque@upmc.fr

ABSTRACT

Cilia defects lead to scoliosis in zebrafish, but the underlying pathogenic mechanisms are poorly understood. We dissected the mechanisms of scoliosis onset in a zebrafish mutant for the *rpgr11* gene, encoding a ciliary transition zone protein, which develops scoliosis with near-total penetrance but asynchronous onset in juveniles. We took advantage of this asynchrony, unique among reported zebrafish scoliosis models, to determine which cellular defects precede or correlate with the onset of axis curvature. We found that brain ventricle dilations, *urp1/urp2* upregulation and neuroinflammation preceded axis curvature, while the loss of multicilia tufts around the subcommissural organ and the disappearance of the Reissner fiber coincided with curvature onset. To explore the etiology of scoliosis in *rpgr11*^{-/-} fish, we performed genetic and chemical rescue experiments, together with transcriptional and proteomic studies. We found that the ubiquitous protein Rpgrip11 was exclusively required in *foxj1a*-expressing cells to prevent axis curvature. URP upregulation did not contribute to scoliosis in *rpgr11*^{-/-} fish, while inflammation increased scoliosis penetrance and severity. Finally, we uncovered an astrogliosis process that developed within the subcommissural organ and at the ventral surface of the rhombencephalic ventricle and then spread along brain ventricles. We thus propose a model in which astrogliosis in a subset of *foxj1a*-expressing cells in the brain initiates scoliosis by triggering the loss of motile multicilia in its vicinity, leading to impaired RF polymerization. Our work suggests a novel pathogenic mechanism of zebrafish scoliosis, involving spatially restricted brain inflammation and astrogliosis preceding curvature onset.

INTRODUCTION

Idiopathic scoliosis (IS) is a 3D rotation of the spine without vertebral anomalies that affects 3% of adolescents worldwide. Its etiology remained mysterious, mainly because of the lack of appropriate animal models and the complexity of its inheritance profile in large families presenting a severe scoliosis trait [1]. Since the description of the first IS model in the zebrafish *ptk7* gene mutant [2], a number of mutants for genes encoding ciliary proteins were shown to develop scoliosis at late larval and juvenile stage (4 to 12 weeks post-fertilization, wpf) without any vertebral fusion or fracture, highlighting the link between cilia function and straight axis maintenance in that species [3][4].

Cilia are microtubular organelles with sensory and/or motile functions. Zebrafish mutants in genes involved in cilia motility or in intraflagellar transport display severe embryonic axis curvature and are usually not viable beyond larval stages. [3][5]. In contrast, mutants in genes implicated in ciliary gating or ciliary trafficking encoding respectively components of the transition zone (TZ) or the BBS complex [4][6]–[8], survive to adult stage and some of them develop scoliosis with variable penetrance. The molecular basis for these differences is still poorly understood, even if progress has been made in our understanding of zebrafish scoliosis. Cilia-driven movements of the cerebrospinal fluid (CSF) are involved in zebrafish axis straightness, both in embryos and juveniles [3][9] and are tightly linked to the assembly and maintenance of the Reissner fiber (RF), a SCO-spondin polymer secreted by the subcommissural organ (SCO) and running down the brain and spinal cord CSF-filled cavities [10]. RF loss at embryonic stage in null *sco* mutants is lethal while its loss at juvenile stage in hypomorphic *sco* mutants triggers scoliosis with full penetrance [5][11]. Signaling downstream of the RF in embryos implicates Urp1 and Urp2, two neuropeptides of the Urotensin 2 family expressed in CSF-contacting neurons (CSF-cNs), that trigger dorsal muscle contraction in embryos and larvae [10][12][13][14]. Their combined mutations or the mutation of their receptor gene *uts2r3* lead to scoliosis at adult stages [12][14][15]. However, whether RF maintenance and URP signaling are perturbed in juvenile scoliotic mutants encoding TZ proteins (“TZ mutants”) and how these perturbations are linked to scoliosis is unknown, especially as TZ mutants do not display any sign of embryonic or larval cilia motility defects [4]. Finally, neuro-

inflammation has been described in a small subset of zebrafish IS models for which anti-inflammatory/anti-oxidant treatments (with NAC or NACET) partially rescue scoliosis penetrance and severity [5][16].

In this paper we dissected the mechanisms of scoliosis appearance in a novel deletion allele of the zebrafish TZ mutant *rpgr11*, which is viable and develops an axis curvature phenotype with nearly full penetrance at juvenile stages. We took advantage of its asynchronous onset to decipher the chronology of events leading to scoliosis. We showed that the loss of motile cilia from multiciliated cells (MCCs) lateral to the SCO and of the RF coincide with scoliosis onset. Thanks to various rescue experiments and multi-omics studies, we propose a novel and unexpected role of local astrogliosis and neuroinflammation at the top of the hierarchy of events leading to scoliosis in the *rpgr11* mutant model.

RESULTS

***Rpgr11*^{-/-} fish asynchronously develop scoliosis at juvenile stage and show cilia defects**

To study the mechanisms of scoliosis appearance upon ciliary dysfunction in zebrafish, we made use of a viable zebrafish deletion mutant in the *rpgr11* gene encoding a ciliary transition zone protein (*rpgr11*^{Δ4-25}, Supplementary Figure S1-A, (thereafter called *rpgr11*). The vast majority of *rpgr11*^{-/-} were straight, with occasionally a few percent of mutants displaying a sigmoid curvature (from 0% to 10% maximum, depending on the clutch). They did not display any additional defects found in many ciliary mutants such as randomized left-right asymmetry, kidney cysts or retinal anomalies [17]–[19] (Figure 1 and Supplementary Figure S1B). *rpgr11*^{-/-} animals developed scoliosis during juvenile stages. Scoliosis appearance was asynchronous between clutches, from 4 weeks post fertilization (wpf) to 11 wpf (1 to 2 cm length), and also to a lesser extent within a clutch. It initiated by slight upward bending of the tail (the *tail-up* phenotype) and progressed toward severe curvature (Figure 1A, B) with 90% penetrance in adults (100% in females and 80% in males) (Figure 1C). Micro-computed tomography (μCT) at two different stages (5 wpf and 23 wpf) confirmed that spine curvature was tridimensional and initiated by a tail-up and showed no evidence

of vertebral fusion, malformation or fracture (Figure 1D-G and Supplementary Movie 1).

We observed normal cilia at embryonic stages in zebrafish *rpgr11^{-/-}* embryos (Supplementary Figure 1 G-H) consistent with the observation of a straight axis without laterality defects or kidney cysts. However, cilia were slightly longer in 5 dpf larvae retina (Supplementary Figure S1I-K). On scanning electron microscopy (SEM) of the adult brain ventricles (Figure 1H-J'''), cilia tufts of cerebellar ependymal cells from scoliotic animals were very sparse and disorganized (Figure 1J, J') compared to controls (Figure 1H, H'), whereas cilia tufts of a straight *rpgr11^{-/-}* "escaper" were morphologically normal even if less dense (Figure 1 I, I'). In the hindbrain, cilia of monociliated ependymal cells showed abnormal, irregular structures, with either bulged or thinner parts (Figure 1, compare H'' with I'' and J'' and J'''). We also compared cilia along the spinal cord central canal from straight and scoliotic juveniles (Figure 1 K-M'''). Cilia density was reduced to the same extent, irrespective of the fish curvature status, cilia length was increased (Figure 1 N, O) and Arl13b content was severely reduced (Figure 1 K'', L'', M''). We also noted that the lumen of the central canal appeared enlarged in all mutants at various A/P levels (Figure 1 P).

Thus, the ciliary mutant *rpgr11^{-/-}* displays a nearly fully penetrant juvenile scoliosis without vertebral anomalies, making it a valuable model to study the etiology of idiopathic scoliosis. Furthermore, its asynchronous curvature onset allowed us to investigate the chronology of early defects leading to axis curvature. Our data revealed that, at trunk level, the severity of ciliogenesis defects does not correlate with axis curvature defects.

Rpgr11^{-/-} juveniles show ventricular dilations and loss of the Reissner fiber at scoliosis onset

Ciliary beating is an essential actor of CSF flow and of ventricular development in zebrafish larvae [22]. Thus, ciliary defects in the brain of *rpgr11^{-/-}* adults and juveniles could lead to abnormal ventricular volume and content. To determine whether ventricular dilations could be precocious events associated with scoliosis, we analyzed ventricular volume at the onset of spine curvature (Figure 2A-G). Ventricular reconstruction was performed on cleared brains of 4 control and 4 *rpgr11^{-/-}* (3 tail-up and 1 straight) fish at 5 wpf, stained with ZO1 to highlight the ventricular border and

with Dil to outline brain shape, focusing on the posterior midbrain and hindbrain ventricles (Figure 2A-D) We identified a significant increase in ventricle volume in *rpgr11*^{-/-} fish compared to controls, that was restricted to the ventral regions of the caudal midbrain (ROI4.4) and hindbrain (ROI6), as confirmed by sections through the hindbrain ventricle (Figure 2E, G). In conclusion, ventricle dilations were present in the midbrain and hindbrain of *rpgr11*^{-/-} fish, even in a straight mutant (green circles in Figure 2F, G).

Ventricular dilations and defective ependymal ciliogenesis have been associated with abnormal CSF flow and defective Reissner Fiber (RF) maintenance in several zebrafish scoliotic fish [3][5]. The RF is mainly composed of SCO-spondin secreted by the SCO and floor plate (FP) and its loss at juvenile stages triggers scoliosis in zebrafish [5][11]. To visualize the RF, we either introduced by genetic cross one copy of a *scospondin-GFP* knock-in allele [11] into *rpgr11*^{-/-} animals or used an antibody that labels the RF in zebrafish embryos [10][23]. The RF formed normally in *rpgr11*^{-/-} embryos, as expected given the absence of embryonic curvature (Supplementary Figure 1 E, F). We could visualize the RF in wild-type adult brains in SEM (Supplementary Figure 1 L-N). To study its maintenance in *rpgr11*^{-/-} juveniles, we immunostained spinal cord longitudinal sections of 7-8 wpf animals, a stage at which half the mutants are still straight while the other half starts to develop a curved axis. The RF was visualized as a 1 μm diameter rod in the central canal of the neural tube and few dots were present in the apical cytoplasm of FP cells (Figure 2I) as well as in the SCO of all controls (n=8, Figure 2L, O). In *rpgr11*^{-/-} tail up and scoliotic fish, the RF was absent at all axis levels and some SCO-spondin-positive debris were present in the central canal (n=8, Figure 2K). Transverse sections at the level of the SCO revealed abnormally packed material in the ventricle (Figure 2 N, Q). We also observed that Sco-spondin aggregates spread anteriorly in forebrain choroid plexus cavities of scoliotic juveniles (7/7), a situation never observed in controls (0/6) or in straight juveniles (0/5) (Supplementary Figure 2 A-F). On the contrary, in all *rpgr11*^{-/-} straight fish, the RF was present (n=9, Figure 2J). Thus, in *rpgr11*^{-/-} fish, the loss of RF correlated with scoliosis onset.

Scoliotic juveniles loose ciliated tufts lining posterior SCO level and introduction of RPGRIP1L in foxj1a lineages rescues scoliosis

As CSF flow is instrumental in RF polymerization at embryonic stages, we assessed whether the absence of motile cilia around the SCO could explain the RF polymerisation defect in the subset of juveniles that develop scoliosis. Brain transverse sections at SCO level and immunostaining against Sco-spondin-GFP revealed that SCO width varied along its length from 24 cells anteriorly to 6-8 cells posteriorly (Figure 2L, O). This was associated with a change in surrounding cell populations. Dorsal midline Sco-spondin secreting cells presented monocilia along the whole length of the SCO in controls (Figure 3A, D), that were still present in all *rpgrip1l*^{-/-} juveniles (Figure 3 B, E, C, F). As SCO narrowed posteriorly, long ciliary tufts appeared on both sides, as observed in the rat brain [24] (Figure 3G). These lateral tufts were preserved in straight *rpgrip1l*^{-/-} juveniles (n=5) (Figure 3 H) but were abnormally long at anterior SCO level and missing at posterior SCO level in tail-up or mildly scoliotic *rpgrip1l*^{-/-} fish (n=7) (Figure 3F, 3I).

Since we cannot exclude that defective CSF composition triggered by abnormal forebrain choroid plexus (fChP) function, as suggested in another scoliotic model [25] could contribute to defective RF polymerization, we also analyzed ciliogenesis defects within the forebrain choroid plexus.

fChP sectioning anterior to the SCO revealed mono and multiciliated cell populations with a specific distribution along the anterior-posterior axis as described in [26]. At the level of the habenula nuclei, cells of dorsal and ventral midline territories were monociliated, while lateral cells presented multicilia tufts (Figure 3J', J''). *rpgrip1l*^{-/-} juveniles, whether scoliotic, tail-up or straight, presented an incomplete penetrance of ciliary defects in the fChP. Half of the straight (Supplementary Figure 2 K-K''; n= 2/4) and scoliotic (Supplementary Figure 2 M-M''; n=3/5) juveniles presented mono and multicilia in the fChP territory, while the remaining straight (Sup Figure 2 L-L''; n=2/4) and scoliotic (Sup Figure 2 N-N''; n=2/5) *rpgrip1l*^{-/-} displayed sparse and severely elongated monocilia in a tissue devoid of multiciliated tufts.

This data shows that impaired RF polymerization in scoliotic *rpgrip1l*^{-/-} juveniles strictly correlates with the loss of MCC at posterior SCO level while the incomplete penetrance

of fChP ciliogenesis defects, irrespective of the curvature status of *rpgr11*^{-/-} fish, ruled out this tissue as a main driver of *rpgr11*^{-/-} scoliosis.

Since *rpgr11* is ubiquitously expressed in zebrafish [27], scoliosis might originate from ciliary defects in multiple tissues or could be of neurological origin as shown for the *ptk7* and *ktnb1* scoliotic models [14][26]. We tested if introducing by transgenesis a tagged human RPGRIP1L protein under the control of the *col2a1a* enhancer (Figure 3 P) [28] or *foxj1a* enhancer [3] (Figure 3 O) would reduce scoliosis penetrance and severity. The *foxj1a* enhancer used drives expression in motile ciliated cells, among which ependymal cells lining CNS cavities, while the *col2a1a* regulatory region drives expression in cartilage cells including intervertebral disks and semi-circular canals cells, tissues that have been proposed to be defective in idiopathic scoliosis models [28][29]. Introducing one copy of the transgene Foxj1a:5XMyRPGRIP1L into *rpgr11*^{-/-} was sufficient to fully rescue scoliosis (Figure 3 O) while RPGRIP1L expression triggered by the *Col2a1a* promoter did not have any beneficial effect on scoliosis penetrance or severity (Figure 3 P).

In conclusion, the loss of *rpgr11* in *foxj1a*-expressing cells drives scoliosis, most probably by affecting MCCs around the SCO.

Regulators of motile ciliogenesis, embryonic axis straightness and inflammation genes are upregulated in rpgr11^{-/-} juveniles

To get further insight into the early mechanisms of spine curvatures in *rpgr11* mutants, we obtained the transcriptomes of the brain and dorsal trunk of 5 control (2 wt and 3 *rpgr11*^{+/-}) and 7 *rpgr11*^{-/-} juveniles at scoliosis onset (6 tail-up and 1 straight). Differential gene expression analysis was performed with one-way ANOVA. A complete annotated gene list is displayed in Supplementary Table 1. This analysis showed a large predominance of upregulated genes in the dorsal trunk (32 downregulated vs 1001 upregulated genes), and less in the brain (56 downregulated vs 235 upregulated genes) (Figure 4A). In the trunk, the most upregulated biological processes in GO term analysis included cilium movement, cilium assembly, cell adhesion, extracellular matrix organization and inflammation (Fig 4B). Many genes upregulated in the brain were also upregulated in the trunk, suggesting that, in the

trunk, these genes were specific to the CNS (Figure 4C). Among the 15 most significant GO terms, 9 were related to cilium movement or cilium assembly (not shown). This was likely due to the 5-fold upregulation of *foxj1a*, encoding a master transcriptional activator of genes involved in ciliary motility [30][31] (Figure 4D). To confirm this hypothesis, we compared our dataset with those of targets of Foxj1 from [33]–[35]. 208 upregulated genes were targets of Foxj1, of whom 146 were direct targets (Supplementary Table 2). Another large series of genes overexpressed in mutants were involved in inflammatory processes and immune response (Figure 4D), reminiscent of the *ptk7* scoliotic mutant [16].

Several genes encoding regulators of embryonic axis curvature were upregulated in *rpgr11*^{-/-} fish, among which *pkd1b* [36], *urp1* and *urp2* [12][14][15] and *scospondin* [5][10][11]. *urp1* and *urp2* encode peptides of the Urotensin 2 family and are expressed in ventral spinal CSF-cNs [36][37]. Their downregulation underlies embryonic ventral curvature of several cilia motility mutants [12] and their combined loss of function induces larval kyphosis that evolves into adult scoliosis [14][15]. Our observation of an upregulation points to the fact that the pathogenic mechanisms of axis curvature can differ between stages and the nature of the invalidated gene. Nevertheless, an increased dose of URP peptides can produce an upward curvature in embryos [12] and juveniles [13][15], allowing to postulate that an altered level of URPs might participate in *rpgr11* axis curvature.

URP upregulation does not contribute to Rpgrip11 scoliosis penetrance or severity

To independently validate URP upregulation in *rpgr11*^{-/-}, *urp1* and *urp2* expression levels were monitored via qRT-PCR on individual straight or scoliotic *rpgr11*^{-/-} juvenile and adult fish. *urp2* was the most highly expressed gene among all *urp* members at juvenile stages (Figure 5 D-E and Supplementary Figure 3A-E). *urp2* expression was upregulated in 5 weeks juveniles, both in straight and scoliotic fish and the upregulation was maintained in adult scoliotic fish (Figure 5A). We thus decided to decrease global URP production by downregulating *urp2* expression level via genetic means. We generated double heterozygous fish for the *rpgr11* deletion allele and the recently generated *urp2* deleted allele [14] to produce double mutants and siblings. The

removal of one or two *urp2* allele(s) [14] in *rpgr11*^{-/-} fish did not lower their curvature index (Figure 5 B and Supplementary fig 3F-H), neither at two months (Supplementary Figure 4F) nor at four months (Supplementary Figure 4H), using the curvature quantification method on whole fish (described in Supplementary 2 G and methods). We also showed that the 4 other *urp* family members were not upregulated in compensation of *urp2* total loss (Figure 5E for *urp1* and Supplementary Figure 3C-E for *urp*, *uts2a* and *uts2b*). We observed that *urp2* messenger amounts were reduced by removing one or two functional copies of *urp2*, probably as a consequence of mRNA decay, previously observed in [14] (Figure 5D).

We therefore succeeded in lowering global URP expression level in *rpgr11* mutants without producing any beneficial effect on its axis curvature phenotype, ruling out altered URP signaling as a main driver of scoliosis in *rpgr11* mutants.

Brain neuroinflammation contributes to scoliosis penetrance and severity

Innate and adaptative immune system markers are upregulated in the brain and dorsal trunk transcriptomes suggesting that inflammation through the activation and proliferation of immune cells could play a role in axis curvature, as observed in *ptk7* and *sspo* scoliotic models [5][39]. To assess the repartition of immune cells at scoliosis onset, we performed immunostaining on brain and trunk sections for the LCP1/L-Plastin marker, which labels both macrophages and microglia. A two-fold increase in the number of ramified Lcp1-positive cells was detected at optic tectum levels in straight *rpgr11*^{-/-} juveniles compared to controls as illustrated in Figure 6 A-G at the level of the optic tectum, while scoliotic *rpgr11*^{-/-} fish have similar Lcp1⁺ cell number as compared to control fish in the brain (Figure 6 G). This Lcp1 increase in neural tissue was restricted to the tectum since we did not detect any significant difference in the cerebellum and the spinal cord (Sup Figure 6 A-B). Together, these results showed that an increase in immune cells within the anterior brain precedes scoliosis onset in *rpgr11*^{-/-} juvenile fish.

We decided to counteract inflammation before curvature initiation by performing a drug treatment with the hope of reducing scoliosis penetrance and severity. We used the NACET anti-oxidant and anti-inflammatory drug that successfully reduced scoliosis of *scospondin* hypomorphic mutant fish [5]. We first assayed the biological activity of

our NACET batch on the ciliary motility mutant *dnaaf1*^{-/-} [40]. Indeed, NACET was shown to rescue the embryonic tail-down phenotype of the ciliary motility mutant *ccdc151*^{ts} [5] and we observed that a 3mM NACET treatment rescued the *dnaaf1*^{-/-} tail-down phenotype (supplementary Figure 4B-F). We used half of the concentration (1.5 mM) that rescues the embryonic tail-down phenotype as in [5], to perform a long-term treatment, from 4 weeks to 12 weeks, on the progeny of *rpgr11*^{+/-} incrosses. This long-term treatment reduced scoliosis penetrance from 92% to 58% (Figure 6H) and markedly reduced spinal curvature index, as measured and illustrated in (Figure 6I-L').

To investigate whether the individual curvature index of a fish may be correlated with a specific inflammation signature, we assayed immune marker expression levels by qRT-PCR in individual, treated and untreated, adult fish. Most immune markers that were upregulated at scoliosis onset in *rpgr11*^{-/-} in our transcriptomic dataset were unchanged in untreated adult scoliotic fish, as shown for the highest upregulated immune gene of our transcriptome dataset *irg1l* and others (Supplementary Figure 4G-I). These results, together with the observation that the highest number of immune cells were present in the brain of straight mutants and not in scoliotic mutants, suggest the existence of an inflammatory episode before and at scoliosis onset that does not persist till adulthood.

Our data thus show that *rpgr11*^{-/-} juvenile fish present a brain inflammation signature at scoliosis onset and that an anti-inflammatory/anti-oxidant treatment on the *rpgr11*^{-/-} juveniles is able to maintain a straight axis in approximately one third of the mutants and to slow down curve progression in the other two thirds.

Astrogliosis at SCO and cerebellar levels precedes scoliosis onset

To characterize long-lasting defects present in the mutant brains at protein level, we performed a quantitative proteomic analysis by mass spectrometry to compare 5 *rpgr11*^{-/-} brains to 5 control brains at adult stages. This analysis detected 5706 proteins among which only 26 were differentially expressed between both conditions with an FDR of 5%, associated with a P value of 1.10^{-3} . 22 were present in higher and 4 in lower quantity, as illustrated in Figure 7A (volcano-plot) and Supplementary Table 3. Among the proteins that were present in higher quantity in mutants, several

members of the Annexin family were identified: Anxa-2a, Anxa-1a, Anxa-5b (Figure 7A-B). *Anxa-2a* was also upregulated in the transcriptome of *rpgrip1^{-/-}* at scoliosis onset demonstrating a persistent increase of Annexin-2a amounts until the adult stage. These molecules are involved in a wide array of intracellular trafficking processes among which diverse immune system functions. The list also contained upregulated proteins more specifically involved in immune response such as Stat3, Jak1, and several proteins of the complement cascade and its regulation (C3, C7, C9, Ptx3) (Figure 7 B, Supplementary Table 3), thus identifying a long-lasting immune signature at protein level within scoliotic fish.

To assess if the most differentially expressed protein, Anxa2, was specifically enriched in immune cells, we immunostained brain sections. To our surprise, we observed a highly restricted Anxa2 staining on SCO cells and on ventral ependymal cells of the rhombencephalic ventricle (RhV), that was barely detectable in controls and much stronger in mutants (Supplementary Figure 6B, E, H, K). Anxa2 signal was mainly cytoplasmic and, in mutants, spread over long cellular extensions reaching the pial surface of the rhombencephalon (Supplementary Figure 6K). This cell shape is characteristic of radial glial cells, a cell type that behaves as neural and glial progenitors and also plays astrocytic functions in zebrafish, as anamniote brains are devoid of stellate astrocytes [38][39]. To confirm the glial nature of Anxa2-positive cells and reveal a potential astrogliosis phenotype in mutants, we double-labelled brain sections with GFAP and Anxa2. In adult mutants, SCO cells were strongly double-positive for Anxa2 and GFAP, while controls displayed much weaker labelling for GFAP in the SCO and no labelling for Anxa2 (Supplementary Figure 6A-F). We made similar observations at rhombencephalic ventricle (RhV) level: most ventral ependymal cells of this territory were positive for Anxa2 and strongly positive for GFAP, and GFAP labelling was much higher in mutants than in controls (Supplementary Figure 6 G-L). To assay whether an astrogliosis-like phenotype is present at scoliotic onset and could be associated with the presence of immune cells, we immunostained GFAP together with Lcp1 on juvenile brain sections of straight and tail-up mutants and controls. Tail-up juveniles (n=3/3) presented a strong GFAP staining in almost all cells of the SCO and along Rhombencephalic ventricle, higher than control levels (Figure 7E, I, H, L and Figure 7M), while the phenotype of straight fish was heterogenous: two out of four juveniles presented some positive GFAP cells (Figure 7G, K and red dots on Figure 7M graph, and Figure 7F, J and green dots on Figure 7M graph) as confirmed by cell

quantification (Figure 7M). As scoliosis onset is asynchronous in *rpgr11*^{-/-}, heterogenous GFAP staining among straight mutant fish may support an early role of astrogliosis at SCO and cerebellar levels in scoliosis onset. Astrogliosis may be reinforced or induced by an inflammatory environment containing cytokines released by microglia or macrophages or the presence of high level of ROS and NO [43]. Indeed, the straight mutants (2/4) that presented a high GFAP staining within SCO cells (Figure 7 N-Q) also showed a higher number of Lcp1 positive cells of ameboid shape around the SCO than in controls (red dots in 7R graph).

Our data thus uncovers an early astrogliosis process initiated at the SCO and Rhombencephalic Ventricle levels and preceding the local loss of multicilia and of the RF polymerization defect. Astrogliosis then spreads along the brain ventricles and becomes prominent in scoliotic adults.

DISCUSSION

In this paper we dissected the mechanisms of scoliosis appearance in zebrafish mutants for the TZ gene *rpgr11*, taking advantage of its asynchronous onset to decipher the chronology of events leading to scoliosis. We found that increased *urp1/2* expression preceded scoliosis onset in *rpgr11*^{-/-} juveniles. However, genetic experiments ruled out an involvement of increased URP signaling in scoliosis development in this model. We also found an increase of LCP1-positive immune cells in the brain of *rpgr11*^{-/-} juveniles before scoliosis onset, correlating with increased expression of inflammation genes. NACET treatment confirmed that increased inflammation participated in the penetrance and severity of scoliosis in *rpgr11*^{-/-} fish. Importantly, our results showed an asynchronous astrogliosis in the SCO in straight *rpgr11*^{-/-} that became widely spread at scoliosis onset. It precedes the coincident appearance of two events: loss of cilia on MCCs at SCO exit and depolymerization of the Reissner fiber at scoliosis onset. This surprising spatiotemporal correlation suggests that astrogliosis triggers multicilia loss at the SCO exit, which impairs RF polymerization. This proposed cascade of events brings new light on the origin of scoliosis in a ciliary gene mutant.

Rpgrip1l is a ciliary gene, and cilia defects lead to RF loss and scoliosis in several zebrafish mutants. Here we showed that *rpgrip1l* deficiency affected cilia maintenance differentially depending on the territory and the developmental stage, raising the question of which ciliated cells are responsible for RF loss and scoliosis initiation. We showed sparser and abnormally long monocilia in the central canal of all juveniles at stages preceding axis curvature. Ciliary tufts around SCO exit were present in straight *rpgrip1l^{-/-}* juveniles and absent in scoliotic *rpgrip1l^{-/-}*. We also observed scoliotic juveniles with normal MCCs within the forebrain choroid plexus but no multicilia tufts CC around the SCO. This suggests that multicilia along CNS ventricles are gradually lost in different ependymal territories in *rpgrip1l^{-/-}*. MCCs at SCO exit are likely to create a CSF flow to promote RF polymerization, a hypothesis reinforced by the strict correlation of their loss with RF absence at scoliosis onset. Indeed, RF loss in *rpgrip1l^{-/-}* fish is not caused by defective expression or secretion of SCO-spondin by the SCO, as large SCO-spondin aggregates are present within the adjacent ventricles and do not accumulate within cell bodies, pointing to a polymerization defect. Aggregates could be found all along the brain ventricles, both anteriorly in the forebrain at the level of the forebrain choroid plexus and posteriorly under the tectum, suggesting the absence of a directional CSF flow at scoliosis onset. Thus, it is likely that both CSF flow defect and RF loss are present at scoliosis onset in *rpgrip1l^{-/-}*, phenotypes in common with some zebrafish IS models (*ptk7*, *cfap298^{ts}*, *ccdc151^{ts}*) [3] but not all (*utrs3^{-/-}*, [*urp1^{-/-}urp2^{-/-}*]) [14][15].

Recent work suggested that impairment of ciliogenesis in the fChP of the *ktn1b* mutant could play a role in inducing axis curvature, since multicilia from ependymal cells lining cerebellar ventricles were preserved [25], pointing that defects in another *foxj1a* expressing population could trigger scoliosis in that mutant. In the case of the *rpgrip1l* mutant, we could decorrelate fChP ciliogenesis defects with axis curvature, ruling out this cell type as crucial for the maintenance of axis straightness in this mutant. This, combined with data from D’Gama who showed that the total loss of MCC in the fChP of [*foxj1b^{-/-}*, *gmnc^{-/-}*] did not trigger axis curvature [26], suggests that another *foxj1a*-expressing population is crucial for axis maintenance in ciliary mutants. Our results strongly suggest that this population corresponds to the MCCs lining SCO exit.

Our transcriptomic analysis and qRT-PCR data challenges a model proposed for axis straightness of zebrafish embryos in which loss of RF down-regulates *urp2* and *urp1* expression [13] since we observed an upregulation of both genes before and after RF loss. As forced expression of *urp1/2* induces a tail-up phenotype in embryos and juveniles [12][13][15], we attempted to rescue *rpgrip1^{-/-}* axis curvature by down-regulating URP expression. No beneficial effect on scoliosis penetrance nor severity was observed, indicating that increased URP expression level does not significantly contribute to axis curvature in *rpgrip1^{-/-}*. This implies that several molecular pathways independently or redundantly maintain axis straightness in zebrafish, perhaps specifically along different directions. This is suggested by the directionality of curvature in the different mutants and their early progression, a tail-down defect followed by kyphosis in Urp-signaling mutants and *pkd2l1* mutants [14][15][41], whereas *rpgrip1^{-/-}* display a slight tail-up defect associated with marked medio-lateral undulations.

In this study, we showed that RPGRIP1L rescued axis curvature when expressed under the control of *foxj1a* enhancer. Moreover, we found an unexpected spectacular defect that we identified as astrogliosis, arising in a subdomain of Foxj1a-positive cells, within the SCO and ventral ependymal cells lining the rhombencephalic ventricle. This implies that Rpgrip1l protects directly or indirectly astroglial progenitors and ependymal cells from astrogliosis by yet unknown mechanisms. The observation of astrogliosis in some straight juveniles mutants before MCC loss around the SCO and RF loss suggests a sequence of events in which progressive astrogliosis in *rpgrip1^{-/-}* juveniles leads to loss of cilia in MCCs at the SCO and thus to defects in RF polymerization.

The proteomic data pointed to two altered processes that may underly gradual multicilia loss in the brain and astrogliosis, an inflammatory environment and a low pyruvate metabolism. Indeed, GSK3bb amount is increased by 2.4 fold in *rpgrip1l* mutant brains (P 0.001, Supplementary Table 3), and this is of particular interest since abnormally high GSK3β activity underlies multiple neurodegenerative pathologies such as Alzheimer disease, X-fragile and Rett syndromes. Down-regulating this enzymatic activity was shown to prevent gliosis in the corresponding murine animal models [45]–[47] and more precisely to lower Nfkb1 inflammatory activity in the cerebellum of *Mecp2* murine model of the Rett syndrome. The presence of an

inflammatory environment in the CNS and in vicinity of the SCO may inhibit ciliogenesis of neighbouring multiciliated cells as shown in the brain of mice presenting high NF- κ B activity in astrocytes [48]. This study also highlighted that high NF- κ B activity impacted ependymal ciliogenesis in restricted territories (leaving lateral ependymal cells and choroid plexus multicilia intact) and over a restricted time-window in the developing brain. The Metascope analysis also indicated a significant reduction in the amount of several enzymes implicated in pyruvate metabolism (Figure 7 B), which is of particular interest in light of a recent report demonstrating that a reduction of the activity of this pathway strongly impaired the ciliogenesis of *Xenopus* epidermis MCC [49].

Furthermore, our data highlight a role of *rpgr11* in preventing a transient episode of neuro-inflammation in the brain of juveniles, as all mutants display an increased number of Lcp1-positive cells at all antero-posterior brain levels, in regions poor in cell bodies and rich in cell projections. Lcp1+ immune cells may be recruited to phagocyte damaged neurons or improperly myelinated tracts. We noted in the proteomic analysis that mutant brains presented a moderate down regulation of some pyruvate metabolism markers and electron transport chain actors (Figure 7D) that suggested a reduction of mitochondrial activities as well as an increase of cell death inducer markers (Figure 7E). Further studies will decipher if these defects participate in Lcp1 cells recruitment in *rpgr11*^{-/-} juveniles.

This Lcp1 population likely produced inflammatory signals in the brain parenchyma that could indirectly increase astrogliosis at ventricle levels. Indeed, even if *rpgr11* may have an autonomous function to prevent astrogliosis in radial glial cells (as supported by the rescue experiment with the *foxj1a* promoter), the presence of few amoeboid Lcp1+ cells around the mutant SCO suggests that a second immune population could participate in astrogliosis reinforcement. At later stages, GFAP upregulation became widespread along CNS cavities. To our knowledge, this is the first report of severe astrogliosis in the brain of a ciliary mutant in zebrafish, that may parallel the situation observed in two murine models of primary ciliary dyskinesia with decreased CSF flow and gliosis at juvenile stage [50].

Overall, our data support a model in which progressive astrogliosis at the level of the SCO and ventral ependymal cells lining the rhombencephalic ventricle in a widespread

inflammatory environment has a negative impact on multicilia maintenance in these two regions. The loss of motile multicilia, particularly at SCO exit impairs continuous RF polymerization, leading to its late loss at juvenile stages and finally to scoliosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the IBPS aquatic animal and imaging facilities and the ICM sequencing facility for their technical assistance. We thank Michaël Trichet from the IBPS electron microscopy facility for participating in the MEB experiments, the TACGENE facility for providing the Cas9 protein; the TEFOR Paris-Saclay facility for the brain clearing experiment; Thierry Jaffredo and Pierre Charbord for their precious help in transcriptome analysis; Nicolas Baylé for initial characterization of the *rpgr11* mutant; Christine Carapito and Aurélie Hirschler from Institut pluridisciplinaire Hubert Curien for their precious help for the proteomic analysis. This work was supported by funding to SSM from the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM EQU201903007943) and the Fondation Yves Cotrel.

REFERENCES

- [1] S. A. Patten *et al.*, « Functional variants of POC5 identified in patients with idiopathic scoliosis », *J. Clin. Invest.*, vol. 125, n° 3, p. 1124-1128, mars 2015, doi: 10.1172/JCI77262.
- [2] M. Hayes *et al.*, « *ptk7* mutant zebrafish models of congenital and idiopathic scoliosis implicate dysregulated Wnt signalling in disease », *Nat Commun*, vol. 5, n° 1, p. 4777, sept. 2014, doi: 10.1038/ncomms5777.
- [3] D. T. Grimes, C. W. Boswell, N. F. C. Morante, R. M. Henkelman, R. D. Burdine, et B. Ciruna, « Zebrafish models of idiopathic scoliosis link cerebrospinal fluid flow defects to spine curvature », *Science*, vol. 352, n° 6291, p. 1341-1344, juin 2016, doi: 10.1126/science.aaf6419.
- [4] J. Wang *et al.*, « Variable phenotypes and penetrance between and within different zebrafish ciliary transition zone mutants », *Disease Models & Mechanisms*, vol. 15, n° 12, p. dmm049568, déc. 2022, doi: 10.1242/dmm.049568.
- [5] C. D. Rose *et al.*, « SCO-Spondin Defects and Neuroinflammation Are Conserved Mechanisms Driving Spinal Deformity across Genetic Models of Idiopathic Scoliosis », *Current Biology*, vol. 30, n° 12, p. 2363-2373.e6, juin 2020, doi: 10.1016/j.cub.2020.04.020.
- [6] P. Song, J. Fogerty, L. T. Cianciolo, R. Stupay, et B. D. Perkins, « Cone Photoreceptor Degeneration and Neuroinflammation in the Zebrafish Bardet-Biedl Syndrome 2 (*bbs2*) Mutant Does Not Lead to Retinal Regeneration », *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, p. 578528, nov. 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.578528.

- [7] M. R. Bentley-Ford *et al.*, « Evolutionarily conserved genetic interactions between *nphp-4* and *bbs-5* mutations exacerbate ciliopathy phenotypes », *Genetics*, vol. 220, n° 1, p. iyab209, janv. 2022, doi: 10.1093/genetics/iyab209.
- [8] M. Masek *et al.*, « Loss of the Bardet-Biedl protein *Bbs1* alters photoreceptor outer segment protein and lipid composition », *Nat Commun*, vol. 13, n° 1, p. 1282, mars 2022, doi: 10.1038/s41467-022-28982-6.
- [9] C. W. Boswell et B. Ciruna, « Understanding Idiopathic Scoliosis: A New Zebrafish School of Thought », *Trends in Genetics*, vol. 33, n° 3, p. 183-196, mars 2017, doi: 10.1016/j.tig.2017.01.001.
- [10] Y. Cantaut-Belarif, J. R. Sternberg, O. Thouvenin, C. Wyart, et P.-L. Bardet, « The Reissner Fiber in the Cerebrospinal Fluid Controls Morphogenesis of the Body Axis », *Current Biology*, vol. 28, n° 15, p. 2479-2486.e4, août 2018, doi: 10.1016/j.cub.2018.05.079.
- [11] B. R. Troutwine *et al.*, « The Reissner Fiber Is Highly Dynamic In Vivo and Controls Morphogenesis of the Spine », *Current Biology*, vol. 30, n° 12, p. 2353-2362.e3, juin 2020, doi: 10.1016/j.cub.2020.04.015.
- [12] X. Zhang *et al.*, « Cilia-driven cerebrospinal fluid flow directs expression of urotensin neuropeptides to straighten the vertebrate body axis », *Nat Genet*, vol. 50, n° 12, p. 1666-1673, déc. 2018, doi: 10.1038/s41588-018-0260-3.
- [13] H. Lu, A. Shagirova, J. L. Goggi, H. L. Yeo, et S. Roy, « Reissner fibre-induced urotensin signalling from cerebrospinal fluid-contacting neurons prevents scoliosis of the vertebrate spine », *Biology Open*, vol. 9, n° 5, p. bio052027, mai 2020, doi: 10.1242/bio.052027.
- [14] A.-L. Gaillard *et al.*, « *Urp1* and *Urp2* act redundantly to maintain spine shape in zebrafish larvae », *Developmental Biology*, vol. 496, p. 36-51, avr. 2023, doi: 10.1016/j.ydbio.2023.01.010.
- [15] E. A. Bearce *et al.*, « Urotensin II-related peptides, *Urp1* and *Urp2*, control zebrafish spine morphology », *eLife*, vol. 11, p. e83883, déc. 2022, doi: 10.7554/eLife.83883.
- [16] J. L. M. Van Gennip, C. W. Boswell, et B. Ciruna, « Neuroinflammatory signals drive spinal curve formation in zebrafish models of idiopathic scoliosis », *Science Advances*, vol. 4, n° 12, p. eaav1781, déc. 2018, doi: 10.1126/sciadv.aav1781.
- [17] M. Tsujikawa et J. Malicki, « Intraflagellar Transport Genes Are Essential for Differentiation and Survival of Vertebrate Sensory Neurons », *Neuron*, vol. 42, n° 5, p. 703-716, juin 2004, doi: 10.1016/S0896-6273(04)00268-5.
- [18] A. G. Kramer-Zucker, F. Olale, C. J. Haycraft, B. K. Yoder, A. F. Schier, et I. A. Drummond, « Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis », *Development*, vol. 132, n° 8, p. 1907-1921, avr. 2005, doi: 10.1242/dev.01772.
- [19] R. Bachmann-Gagescu *et al.*, « The ciliopathy gene *cc2d2a* controls zebrafish photoreceptor outer segment development through a role in Rab8-dependent vesicle trafficking », *Human Molecular Genetics*, vol. 20, n° 20, p. 4041-4055, oct. 2011, doi: 10.1093/hmg/ddr332.
- [20] L. Besse *et al.*, « Primary cilia control telencephalic patterning and morphogenesis via Gli3 proteolytic processing », *Development*, vol. 138, n° 10, p. 2079-2088, mai 2011, doi: 10.1242/dev.059808.
- [21] A. Andreu-Cervera, I. Anselme, A. Karam, C. Laclef, M. Catala, et S. Schneider-Maunoury, « The ciliopathy gene *ftm/rpgrip1l* controls mouse forebrain patterning via region-specific modulation of hedgehog/gli signaling », *J. Neurosci.*, p. 2199-18, janv. 2019, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2199-18.2019.

- [22] E. W. Olstad *et al.*, « Ciliary Beating Compartmentalizes Cerebrospinal Fluid Flow in the Brain and Regulates Ventricular Development », *Current Biology*, vol. 29, n° 2, p. 229-241.e6, janv. 2019, doi: 10.1016/j.cub.2018.11.059.
- [23] R. Didier', B. Dastugue, et A. Meiniel, « The secretory material of the subcommissural organ of the chick embryo. Characterization of a specific polypeptide by two-dimensional electrophoresis », 1995.
- [24] P. Collins et D. H. M. Woollam, « The ventricular surface of the subcommissural organ: a scanning and transmission electron microscopic study », nov. 1978.
- [25] A. Meyer-Miner, J. L. M. Van Gennip, K. Henke, M. P. Harris, et B. Ciruna, « Resolving primary pathomechanisms driving idiopathic-like spinal curvature using a new *katnb1* scoliosis model », *iScience*, vol. 25, n° 9, p. 105028, sept. 2022, doi: 10.1016/j.isci.2022.105028.
- [26] P. P. D'Gama *et al.*, « Diversity and function of motile ciliated cell types within ependymal lineages of the zebrafish brain », *Cell Reports*, vol. 37, n° 1, p. 109775, oct. 2021, doi: 10.1016/j.celrep.2021.109775.
- [27] A. Mahuzier *et al.*, « Dishevelled stabilization by the ciliopathy protein Rpgrip11 is essential for planar cell polarity », *Journal of Cell Biology*, vol. 198, n° 5, p. 927-940, sept. 2012, doi: 10.1083/jcb.201111009.
- [28] R. M. Dale et J. Topczewski, « Identification of an evolutionarily conserved regulatory element of the zebrafish *col2a1a* gene », *Developmental Biology*, vol. 357, n° 2, p. 518-531, sept. 2011, doi: 10.1016/j.ydbio.2011.06.020.
- [29] C. M. Karner, F. Long, L. Solnica-Krezel, K. R. Monk, et R. S. Gray, « *Gpr126/Adgrg6* deletion in cartilage models idiopathic scoliosis and pectus excavatum in mice », *Hum Mol Genet*, vol. 24, n° 15, p. 4365-4373, août 2015, doi: 10.1093/hmg/ddv170.
- [30] M. Hitier *et al.*, « Lateral Semicircular Canal Asymmetry in Idiopathic Scoliosis: An Early Link between Biomechanical, Hormonal and Neurosensory Theories? », *PLoS ONE*, vol. 10, n° 7, p. e0131120, juill. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0131120.
- [31] X. Yu, C. P. Ng, H. Habacher, et S. Roy, « *Foxj1* transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program », *Nat Genet*, vol. 40, n° 12, p. 1445-1453, déc. 2008, doi: 10.1038/ng.263.
- [32] J. Wallmeier *et al.*, « De Novo Mutations in *FOXJ1* Result in a Motile Ciliopathy with Hydrocephalus and Randomization of Left/Right Body Asymmetry », *The American Journal of Human Genetics*, vol. 105, n° 5, p. 1030-1039, nov. 2019, doi: 10.1016/j.ajhg.2019.09.022.
- [33] S. P. Choksi, G. Lauter, P. Swoboda, et S. Roy, « Switching on cilia: transcriptional networks regulating ciliogenesis », *Development*, vol. 141, n° 7, p. 1427-1441, avr. 2014, doi: 10.1242/dev.074666.
- [34] I. K. Quigley et C. Kintner, « *Rfx2* Stabilizes *Foxj1* Binding at Chromatin Loops to Enable Multiciliated Cell Gene Expression », *PLoS Genet*, vol. 13, n° 1, p. e1006538, janv. 2017, doi: 10.1371/journal.pgen.1006538.
- [35] I. Mukherjee, S. Roy, et S. Chakrabarti, « Identification of Important Effector Proteins in the *FOXJ1* Transcriptional Network Associated With Ciliogenesis and Ciliary Function », *Front. Genet.*, vol. 10, p. 23, mars 2019, doi: 10.3389/fgene.2019.00023.
- [36] S. Mangos *et al.*, « The ADPKD genes *pkd1a/b* and *pkd2* regulate extracellular matrix formation », *Disease Models & Mechanisms*, vol. 3, n° 5-6, p. 354-365, avr. 2010, doi: 10.1242/dmm.003194.

- [37] C. Parmentier *et al.*, « Occurrence of Two Distinct Urotensin II-Related Peptides in Zebrafish Provides New Insight into the Evolutionary History of the Urotensin II Gene Family », *Endocrinology*, vol. 152, n° 6, p. 2330-2341, juin 2011, doi: 10.1210/en.2010-1500.
- [38] F. B. Quan *et al.*, « Comparative Distribution and In Vitro Activities of the Urotensin II-Related Peptides URP1 and URP2 in Zebrafish: Evidence for Their Colocalization in Spinal Cerebrospinal Fluid-Contacting Neurons », *PLoS ONE*, vol. 10, n° 3, p. e0119290, mars 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0119290.
- [39] J. L. M. Van Gennip, C. W. Boswell, et B. Ciruna, « Neuroinflammatory signals drive spinal curve formation in zebrafish models of idiopathic scoliosis », *Sci. Adv.*, vol. 4, n° 12, p. eaav1781, déc. 2018, doi: 10.1126/sciadv.aav1781.
- [40] J. Sullivan-Brown *et al.*, « Zebrafish mutations affecting cilia motility share similar cystic phenotypes and suggest a mechanism of cyst formation that differs from *pkd2* morphants », *Developmental Biology*, vol. 314, n° 2, p. 261-275, févr. 2008, doi: 10.1016/j.ydbio.2007.11.025.
- [41] D. A. Lyons et W. S. Talbot, « Glial Cell Development and Function in Zebrafish », *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 7, n° 2, p. a020586, févr. 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a020586.
- [42] N. Jurisch-Yaksi, E. Yaksi, et C. Kizil, « Radial glia in the zebrafish brain: Functional, structural, and physiological comparison with the mammalian glia », *Glia*, vol. 68, n° 12, p. 2451-2470, déc. 2020, doi: 10.1002/glia.23849.
- [43] M. V. Sofroniew, « Astrogliosis », *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 7, n° 2, p. a020420, févr. 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a020420.
- [44] L. Marie-Hardy *et al.*, « Loss of CSF-contacting neuron sensory function is associated with a hyper-kyphosis of the spine reminiscent of Scheuermann's disease », *Sci Rep*, vol. 13, n° 1, p. 5529, avr. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-32536-1.
- [45] M. Medina et J. Avila, « Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) Inhibitors for the Treatment of Alzheimers Disease », *CPD*, vol. 16, n° 25, p. 2790-2798, août 2010, doi: 10.2174/138161210793176581.
- [46] M. A. Mines, E. Beurel, et R. S. Jope, « Regulation of Cell Survival Mechanisms in Alzheimer's Disease by Glycogen Synthase Kinase-3 », *International Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 2011, p. 1-11, 2011, doi: 10.4061/2011/861072.
- [47] O. C. Jorge-Torres *et al.*, « Inhibition of Gsk3b Reduces Nfkb1 Signaling and Rescues Synaptic Activity to Improve the Rett Syndrome Phenotype in Mecp2-Knockout Mice », *Cell Reports*, vol. 23, n° 6, p. 1665-1677, mai 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.010.
- [48] M. Lattke, A. Magnutzki, P. Walther, T. Wirth, et B. Baumann, « Nuclear Factor κ B Activation Impairs Ependymal Ciliogenesis and Links Neuroinflammation to Hydrocephalus Formation », *J. Neurosci.*, vol. 32, n° 34, p. 11511-11523, août 2012, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0182-12.2012.
- [49] Y. Ji *et al.*, « Peroxiredoxin5 Controls Vertebrate Ciliogenesis by Modulating Mitochondrial Reactive Oxygen Species », *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 30, n° 14, p. 1731-1745, mai 2019, doi: 10.1089/ars.2018.7507.
- [50] R. Finn, C. C. Evans, et L. Lee, « Strain-dependent brain defects in mouse models of primary ciliary dyskinesia with mutations in *Pcdp1* and *Spf2* », *Neuroscience*, vol. 277, p. 552-567, sept. 2014, doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.07.029.
- [51] C. B. Kimmel, W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, et T. F. Schilling, « Stages of embryonic development of the zebrafish », *Dev. Dyn.*, vol. 203, n° 3, p. 253-310, juill. 1995, doi: 10.1002/aja.1002030302.

- [52] M. Haeussler *et al.*, « Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR », *Genome Biol*, vol. 17, n° 1, p. 148, déc. 2016, doi: 10.1186/s13059-016-1012-2.
- [53] J. Schindelin *et al.*, « Fiji: an open-source platform for biological-image analysis », *Nat Methods*, vol. 9, n° 7, p. 676-682, juill. 2012, doi: 10.1038/nmeth.2019.
- [54] D. W. Huang, B. T. Sherman, et R. A. Lempicki, « Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources », *Nat Protoc*, vol. 4, n° 1, p. 44-57, janv. 2009, doi: 10.1038/nprot.2008.211.
- [55] M. Stefanini, C. D. Martino, et L. Zamboni, « Fixation of Ejaculated Spermatozoa for Electron Microscopy », *Nature*, vol. 216, n° 5111, p. 173-174, oct. 1967, doi: 10.1038/216173a0.
- [56] I. Anselme, C. Laclef, M. Lanaud, U. Rütther, et S. Schneider-Maunoury, « Defects in brain patterning and head morphogenesis in the mouse mutant Fused toes », *Developmental Biology*, vol. 304, n° 1, p. 208-220, avr. 2007, doi: 10.1016/j.ydbio.2006.12.025.
- [57] P. Affaticati *et al.*, « zPACT: Tissue Clearing and Immunohistochemistry on Juvenile Zebrafish Brain », *BIO-PROTOCOL*, vol. 7, n° 23, 2017, doi: 10.21769/BioProtoc.2636.
- [58] C. S. Hughes, S. Foehr, D. A. Garfield, E. E. Furlong, L. M. Steinmetz, et J. Krijgsveld, « Ultrasensitive proteome analysis using paramagnetic bead technology », *Mol Syst Biol*, vol. 10, n° 10, p. 757, oct. 2014, doi: 10.15252/msb.20145625.
- [59] D. Bouyssié *et al.*, « Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics », *Bioinformatics*, vol. 36, n° 10, p. 3148-3155, mai 2020, doi: 10.1093/bioinformatics/btaa118.
- [60] S. Wiczorek *et al.*, « DAPAR & ProStaR: software to perform statistical analyses in quantitative discovery proteomics », *Bioinformatics*, vol. 33, n° 1, p. 135-136, janv. 2017, doi: 10.1093/bioinformatics/btw580.
- [61] K. M. Kwan *et al.*, « The Tol2kit: A multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs », *Dev. Dyn.*, vol. 236, n° 11, p. 3088-3099, nov. 2007, doi: 10.1002/dvdy.21343.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Zebrafish

Wild-type, *rpgrip1*^{ex4} and *rpgrip1*^Δ zebrafish embryos and adults were raised, staged and maintained as previously described [51]. All our experiments were made in agreement with the european Directive 210/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes, and the French application decree 'Décret 2013-118'. The projects of our group have been approved by our local ethical committee 'Comité d'éthique Charles Darwin'. The authorization number is APAFIS #31540-2021051809258003 v4. The fish facility has been approved by the French 'Service for animal protection and health' with approval number A750525. All experiments were

performed on *Danio rerio* embryos of mixed AB/TL background. Animals were raised at 28.5°C under a 14/10 light/dark cycle.

KEY RESOURCES TABLE

Reagent type or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Antibody	Rabbit polyclonal IgG anti-bovine Reissner Fiber	Didier et al 1995	Courtesy of Dr. S.Gobron	1:200
Antibody	Mouse monoclonal IgG1k anti ZO1 -1A12	Thermofisher	#33-9100	1:150
Antibody	Mouse monoclonal IgG2b anti-acetylated-tubulin (clone 6-11B-1)	Sigma-Aldrich	#T 6793 RRID: AB_477585	1:400
Antibody	Mouse monoclonal IgG1 anti glutamylated Tubulin	Adipogen	#AG-20B-0020-C100	1:500
Antibody	Rabbit polyclonal anti-Arl13b	Proteintech	#17711-1-AP	1:200
Antibody	Mouse monoclonal IgG1 anti-GFAP	Sigma	#G3893	1:400
Antibody	Chicken monoclonal IgY anti-GFP	AVES lab	#GFP-1020	1:200
Antibody	Mouse monoclonal IgG2a anti-myc (clone 9b11)	Cell signaling	#2276	1:200

Antibody	Rabbit polyclonal anti-LCP1	GeneTex	#GTX124420	1:200
Antibody	Mouse monoclonal IgG1 anti-gamma-tubulin	Sigma	#T6557	1:500
Antibody	Mouse polyclonal anti-annexin A2	Proteintech	#11256-1-AP	1:200
Antibody	Goat anti-mouse IgG1 Alexa633	Molecular probes	# A-21126 RRID:AB_2535768	1:400
Antibody	Goat anti-mouse IgG1 Alexa568	Molecular Probes	# A-21124 RRID:AB_2535766	1:400
Antibody	Goat anti-mouse IgG2a Alexa568	Molecular probes	# A-21134 RRID:AB_2535773	1:400
Antibody	Goat anti-mouse IgG2a Alexa488	Molecular probes	# A-21131 RRID:AB_141618	1:400
Antibody	Goat anti-mouse IgG2b Alexa633	Molecular probes	# A-21146 RRID:AB_2535782	1:400
Antibody	Goat anti-mouse IgG2b Alexa568	Molecular probes	# A-21144 RRID:AB_2535780	1:400
Antibody	Goat anti-rabbit IgG Alexa568	Molecular probes	# A-11011 RRID:AB_143157	1:400
Antibody	Goat anti-rabbit IgG Alexa488	Molecular probes	# A-11008 RRID:AB_143165	1:400
Antibody	FITC donkey Anti-Chicken IgY	Jackson ImmunoResearch	# 703-096-155	1:200
Chemical	Vectashield	Vector Laboratories	H-1000	

Strain (Danio rerio)	zebrafish wild-type AB or (TL x AB) hybrid strains	N/A	N/A	
Strain (Danio rerio)	Zebrafish <i>rpgr1</i> ^Δ mutant strain	This manuscript		
Strain (Danio rerio)	Zebrafish <i>rpgr1</i> ^{ex4} mutant strain	This manuscript		
Strain (Danio rerio)	Zebrafish <i>urp2</i> ^{+/-}	[14]	ZDB-ALT-230207-5	
Strain (Danio rerio)	Zebrafish <i>dnaaf1</i> ^{tm317b/+}	[40]		
Recombinant DNA	Foxj1 promoter-enhancer sequence	[3]		
Software	LASX	Leica		
Software	Amira for Life & Biomedical Sciences	Thermo Fisher Scientific		
Software	CRISPOR	[52]	http://crispor.tefor.net/	
Software	Fiji/ImageJ	[53]	https://imagej.net/Fiji/Downloads	
Software	Partek Flow™	PARTEK®		
Software	Partek Genomics Suite™	PARTEK®		
Software	DAVID	[54]	https://david.ncicrf.gov/	
Software	PRISM	GraphPad	https://www.graphpad.com/	
Software	Metascape		https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1	

Software	Matlab	The Mathworks, Inc.	https://fr.mathworks.com/products/matlab.html	
Software	NRecon reconstruction software	Micro Photonics Inc.		
Software	CTvox	Bruker		
Software	CT Analysis	Bruker		
Other				
Refractometer	Roth Sochiel EURL	DR 301-95		
Confocal microscope	Leica	SP5		
Confocal microscope	Zeiss	LSM 980 Inverted		
Confocal microscope	Zeiss	LSM 710		
Macroscope	Zeiss	AXIOZOOM V16		
Micro-scanner	Bruker	Skyscan 1272		
Microtome	Leica	RM2125RT		
Q-PCR apparatus	Applied Biosystems	Step One plus		

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Sylvie Schneider-Maunoury
sylvie.schneider-maunoury@sorbonne-universite.fr
Christine Vesque
Christine.vesque@upmc.fr

METHOD DETAILS

Rpgrip1l mutant generation and genotyping

Guide RNA preparation and microinjection

Crispr target sites were selected for their high predicted specificity and efficiency using the CRISPOR online tool. Real efficiency was assessed on zebrafish embryos by T7E1 test. The two most efficient guides (Rpgr11_x4_G1: GCTTACGGTCCTTCACCAGACGG and Rpgr11_x25_G3: CCTCAGTTGACAGGTTTCAGCGG) respectively situated 24 nt from beginning of exon 4 and 82 nt downstream of exon 25 were kept for further experiments.

sgRNA transcription templates were obtained by PCR using T7_Rpgr11-x4_G1_Fw primer (5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGCTTACGGTCCTTCACCAGAGTTTTAGAGCTA GAAATAGC- 3') or T7_Rpgr11-x25_G3_Fw (5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGCCTCAGTTGACAGGTTTCAGGTTTTAGAGCT AGAAATAG C-3') as forward primer and sgRNA_R universal primer (5'-AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTT AACTTGCTA TTTCTAGCTCTAAAAC-3') as reverse primer. sgRNAs were transcribed using Megascript T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and purified using NucleoSpin® RNA Clean up XS kit (Macherey Nagel, Düren, Germany). sgRNA:Cas9 RNP complex was obtained by incubating Cas9 protein (gift of TACGENE, Paris, France) (7.5 µM) with sgRNA (10 µM) in 20 mM Hepes-NaOH pH 7.5, 150 mM KCl for 10 min at 28 °C. 1–2 nl was injected per embryo. For deletion, Rpgr11_x4_G1 and Rpgr11_x25_G3 RNP complexes were mixed half and half.

Screening and genotyping

Injected (F0) fish were screened for germline transmission by crossing with wild type fish and extracting genomic DNA from obtained embryos. For genomic DNA extraction, caudal fin (juveniles/adults) or whole embryo DNA were used. Genomic DNA was isolated with Proteinase K (PK) digestion in 40 µl of lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 250 mM NaCl, 0.2% SDS, 0.1 µg/µl Proteinase K) for embryos (300 µl for adult fin) overnight at 37°C with agitation. PK enzyme was inactivated 10 min at 90°C and a five-fold dilution was used as a template for PCR amplification. Genotyping of mutations in exon 4 and deletion between the two Crispr target sites was performed by PCR using Rpgr11-ex4-del (CCCACACTGCATACGCACTC) as forward primers for deletion and Rpgr11_ex25_R3 (GTTGTGTCTCTGCCATATATTG) as reverse primers for deletion and Rpgr11_x25_25F (AGTGTGCGGTACATCTCCAA) as forward primers as forward primers for mutation.

For urp2 genotyping, caudal fin from adults were extracted in 300µl of lysis solution and PCR was performed as above to detect exon 5 deletion using the following primers: urp2-F1 (TGATTACTAGCCCTGTCCCAAC) and urp2-R1 (AGGTACAGTACACACGTACAG).

µCT scans

The samples were scanned on a Bruker micro scanner (Skyscan 1272) with a resolution of 8.5 µm, a rotation step of 0.55° and a total rotation of 180°. For the acquisition of adult fish (2.5 cm), a 0.25 mm aluminium filter was used, for a voltage of 50 kV and an intensity of 180 mA, for juvenile fish (0.9 to 1.2 cm) the filter was omitted, and a voltage of 60 kV was used with an intensity of 166 mA. Each image contained 1008 x 672 pixels and was based on the average of 3 images. The 3D reconstruction by backprojection was carried out by the NRecon software and the 2D image overlays were then cleaned by the CT Analyser software. The Dataviewer software allowed all fish skeletons to be oriented in the same way taking the otoliths as landmarks. The CTvox software then allowed 3D visualizing of the samples. Morphometric analysis was performed with the CT Analyser software.

Scanning electron microscopy

Fish were euthanized using lethal concentration of MS222 (0.028 mg/mL). The brains were quickly dissected in 1.22 X PBS (pH 7.4), 0.1 M sodium cacodylate and fixed overnight with 2% glutaraldehyde in 0.61 X PBS (pH 7.4), 0.1 M sodium cacodylate at 4°C. They were sectioned along the dorsal midline with a razor blade to expose their ventricular surfaces. Both halves were washed four times in 1.22 X PBS and post-fixed for 15 minutes in 1.22 X PBS containing 1% OsO₄. Fixed samples were washed four times in ultrapure water, dehydrated with a graded series of ethanol and critical point dried (CPD 300, Leica) at 79 bar and 38 °C with liquid CO₂ as the transition fluid and then depressurized slowly (0,025 bar/s). They were then mounted on aluminum mounts with conductive silver cement. Sample surfaces were coated with a 5 nm platinum layer using a sputtering device (ACE 600, Leica). Samples were observed under high vacuum conditions using a Field Emission Scanning Electron Microscope (Gemini 500, Zeiss) operating at 5 kV, with a 20 µm objective aperture diameter and a working distance around 3 mm. Secondary electrons were collected with an in-lens detector. Scan speed and line compensation integrations were adjusted during observation.

Histological sections of juvenile and immunofluorescence on sections

Juvenile and adult zebrafish were euthanized using lethal concentration of MS222 (0.028 mg/mL). Pictures and size measurements were systematically taken before fixation. Fish were fixed in Zamboni fixative [35 ml PFA 4 %, 7.5 ml saturated picric acid (1.2 %), 7.5 ml 0.2M Phosphate Buffer (PB)] [55] overnight at 4°C under agitation. Fish were washed with Ethanol 70% and processed for dehydration by successive 1 h incubation in Ethanol (3 x 70% and 2 x 100%) at room temperature under agitation, then for paraffin inclusion. 14 µm sagittal paraffine sections were obtained using a Leica RM2125RT microtome. Sections were deparaffinized and antigen retrieval was performed by incubation for 7 min in boiling citrate buffer (10 mM, pH 6). Immunofluorescence staining was performed as described previously [56]. The following primary antibodies were used: anti-RF, anti-Acetylated Tubulin, anti-Glutamylated Tubulin, anti-Arl13b, anti-LCP1, anti-AnnexinA2. Corresponding primary and secondary antibodies are described and referenced in the Key Resources Table.

Immunofluorescence on whole embryos

Embryos from 24 to 40 hpf were fixed 4 hr to overnight in 4% paraformaldehyde (PFA) at 4°C. Larvae at 48 and 72 hpf were fixed 2 hr in 4% PFA and 3% sucrose at 4°C, skin from the rostral trunk was partially removed and yolk was removed. Samples from 24 to 40 hpf embryos were blocked over-night in a solution containing 0.5% Triton, 1% DMSO, 10% normal goat serum and 2 mg/mL BSA. Samples from 48 to 72 hpf larvae were blocked in 0.7% Triton, 1% DMSO, 10% NGS and 2 mg/mL BSA. Primary antibodies were incubated one to two nights at 4°C in a buffer containing 0.5% Triton, 1% DMSO, 1% NGS and 1 mg/mL BSA. All secondary antibodies were from Molecular Probes, used at 1:400 in blocking buffer, and incubated 2.5 hr at room temperature. The following primary antibodies were used for in toto immunohistochemistry with anti-Reissner fiber and anti-Acetylated-tubulin, anti-Myc, anti-Gamma-tubulin antibodies. Corresponding primary and secondary antibodies are described and referenced in the Key Resources Table. Whole mount zebrafish embryos (dorsal or lateral mounting in Vectashield Mounting Medium) were imaged on a Leica SP5 confocal microscope and Zeiss LSM910 confocal microscope, both equipped with a 63X immersion objective. Images were then processed using Fiji.

Whole-mount brain clearing

Brains were dissected from 4-5 wpf size-matched (0.9-1.2 mm length) zebrafish after in toto fixation with formaldehyde. Whole-mount tissue clearing was performed following the zPACT protocol [57]. In brief, brains were infused for 2 days in hydrogel monomer solution (4% acrylamide, 0.25% VA-044, 1% formaldehyde and 5% DMSO in 1X PBS) at 4°C. Polymerization was carried out for 2h30 at 37°C in a desiccation chamber filled with pure nitrogen. Brains were transferred into histology cassettes and incubated in clearing solution (8% SDS and 200 mM boric acid in dH₂O) at 37°C with gentle agitation for 8 days. Cleared brains were washed in 1X PBS with 0.1% Tween-20 (PBT) for 3 days at room temperature and kept in 0.5% formaldehyde, 0.05% sodium azide in PBT at 4°C until further processing. Brains were subsequently placed for 1h in depigmentation pre-incubation solution (0.5X SSC, 0.1% Tween-20 in dH₂O) at room temperature. The solution was replaced by depigmentation solution (0.5X SSC, Triton X-100 0.5%, formamide 0.05% and H₂O₂ 0.03% in dH₂O) for 45 minutes at room temperature. Depigmented brains were washed for 4h in PBT and post-fixed (2% formaldehyde and 2% DMSO in PBT) overnight at 4°C.

Cleared brain immunostaining

Whole-mount immunolabeling of cleared brains was performed as described in the zPACT protocol with slight modifications. Briefly, brains were washed in PBT for one day at room temperature and blocked for 10h in 10% normal goat serum, 10% DMSO, 5% PBS-glycine 1M and 0.5% Triton X-100 in PBT at room temperature. Brains were washed again in PBT for 1h prior to incubation with anti-ZO-1 antibody (ZO1-1A12, ThermoFisher, 1:150) in staining solution (2% normal goat serum, 10% DMSO, 0.1% Tween-20, 0.1% Triton X-100 and 0.05% sodium azide in PBT) for 12 days at room temperature under gentle agitation. Primary antibody was renewed once after 6 days of incubation. Samples were washed three times in PBT and thereafter incubated with Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (A11001, Invitrogen, 1:200) for 10 days in staining solution at room temperature under gentle agitation. Secondary antibody was renewed once after 5 days of incubation. Samples were washed three times in PBT prior to a counterstaining with DiI C18 (D282, Invitrogen, 1 µM) in staining solution for three days at room temperature with gentle agitation. Samples were washed in PBT for 3h before mounting procedure.

Mounting and confocal imaging

Samples were placed in 50% fructose-based high-refractive index solution (fbHRI, see [57]) /50% PBT for 1h, then in 100% fbHRI. Brains were mounted in agarose-coated (1% in standard embryo medium) 60 mm Petri dish with custom imprinted niches to help orientation. Niche-fitted brains were embedded in 1% phytigel and the Petri dish filled with 100% fbHRI. fbHRI was changed three times before imaging until its refractive index matched 1.457. Images were acquired with a Leica TCS SP8 laser scanning confocal microscope equipped with a Leica HC FLUOTAR L 25x/1.00 IMM motCorr objective. Brains were scanned at a resolution of 1.74x1.74x1.74 μm (xyz) and tiled into 45 to 70 individual image stacks, depending on brain dimensions, subsequently stitched, using LAS X software.

Volumetric analysis of the posterior ventricles

The volumes of the posterior ventricles were segmented, reconstructed and analyzed using Amira for Life & Biomedical Sciences software (Thermo Fisher Scientific). In essence the ventricles volumes were manually segmented in Amira's segmentation editor and subsequently refined by local thresholding and simplification of the corresponding surfaces. Volumes, which were open to the environment were artificially closed with minimal surfaces by connecting the distal-most points of their surface to the contralaterally corresponding points using straight edges. Due to the biologic variability of the sample population the overall size of the specimens needed to be normalized to keep the measured volumes comparable. For this spatial normalization one of the specimens was randomly selected from the wildtype population as template (1664, grey) and the 'Registration' module in Amira was used to compute region-specific rigid registrations for the other specimens, allowing for isotropic scaling only [details in supp. mat.]. For excluding the influence of the ventricular volumes, the registration was computed on the basis of the independent reference stain (DiIC18) (details in supp. mat.). Region specific volume differences between the mutant and wildtype population were evaluated on seven subvolumes of the posterior ventricles (details in supp. mat.).

RNA extraction for transcriptome analysis and quantitative RT-PCR

Juvenile and adult zebrafish were euthanized using lethal concentration of MS222 (0.28 mg/mL). Their length was measured and their fin cut-off for genotyping. For transcriptomic analysis, brain and dorsal trunk from 1 month juvenile (0.9 to 1.0 cm) zebrafish were dissected in cold PBS with forceps and lysed in QIAzol (QIAGEN) after homogenization with plunger pistons and 1ml syringes. Samples were either stored in QIAzol at -80°C or immediately processed. Extracts containing RNA were loaded onto QIAGEN-mini columns, DNase digested and purified in the miRNAeasy QIAGEN kit (Cat 217004) protocol. Samples were stored at -80°C until use. RNA concentration and size profile were obtained on the TapeStation of ICM platform. All preparations had a RIN above 9.2. For Q-PCR from 3 or 12 weeks juveniles, whole fish minus internal organs were lysed in Trizol (Life technologies) using the Manufacturer protocol.

Quantitative PCR

The cDNA from the isolated RNAs was obtained following GoScript Reverse Transcription System protocol (Promega), using 3 to 4 µg of total RNA for each sample. The 20 µL RT-reaction was diluted 4-fold and 4µl was used for each amplification performed in duplicates. The primers used for qPCR were the following: *urp2* (F: ACCAGAGGAAACAGCAATGGAC; R: TGAGGTTTCCATCCGTCCTACTAC), *urp1* (F: ACATTCTGGCTGTGGTTTGTTC; R: CTCTTTTGCACCTCTCTGAAGC), *urp* (F: GCGGAAAATGTCATGCCTCTTC; R: TTGAGCTCCTTTTGAAGCTCCTG), *uts2a* (F: CACTGCTCAACAGAGACAGTATCA; R: CCAAAGACCACTGGGAGGAAC), *uts2b* (F: TACCCGTCTCTCATCAGTGGAG; R: TTTTCCAGCAAGGCCTCTTTTAC) where all of them are from Gaillard et al. 2023, *rpgr11* (F: CAGACACCTGCTGGAGTTACA; R: TCCTGACTCACATCAAACGCA), *irg11* (F: TCCCTAAGAGGTTCCATCCTCC; R: AAGATGCAGCGATGGCCAAA), *stat3* (F: CAGGACTGGGCGTATGCG; R: GAAGCGGCTGTACTGCTGAT), *c4b* (F: GGGTGTCTTATGGCGGTGG and R: GCGCACAACAAGCTTTTCTCATC) *lsm12b* (F: GAGACTCCTCCTCCTTAGCAT and R: GATTGCATAGGCTTGGGACAAC). The Q-PCR were performed using the StepOne real-time PCR system and following its standard amplification protocol (Thermo Scientific). Relative gene expression levels were quantified using the comparative CT method ($2^{-\Delta\Delta CT}$ method or $2^{-\Delta CT}$) on the basis of CT values for target genes and *lsm12b* as internal control.

RNA-sequencing and analysis

RNA-seq libraries were constructed at ICM according to standard Illumina protocols and sequenced on an Illumina NovaSeq 6000 to obtain about 40 megabases of sequence in total, both strands. Paired-end reads were aligned against the GRCz11 genome using the STAR RNA-seq aligner with default parameters outputting FastQ files using Partekflow™. Gene-expression levels in terms of transcripts per million were estimated by HTseq-count, and differentially expressed gene (DEG) analysis was carried out using ANOVA. The genes with a fold-change value of 2 or more and an adjusted p value of less than 0.01 were defined as significant DEGs. The list of differentially expressed genes was then generated. Gene Ontology GO analysis was performed using DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>). Principle component Analysis PCA and Hierarchical clustering were performed using Partek genomics suite™.

Quantitative proteomics

Sample preparation: Adult zebrafish were euthanized using lethal concentration of MS222 (0.28 mg/mL). For proteomic analysis, brain from 3 months zebrafish were dissected in cold PBS with forceps and immediately flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Zebrafish brain samples were lysed in RIPA buffer (Sigma) with 1/100 antiprotease and sonicated for 5 minutes. After a 660 nm protein assay (Thermo), samples were digested using a Single Pot Solid Phase enhanced Sample Preparation (SP3) protocol [58]. In brief, 40 µg of each protein extract was reduced with 12mM dithiothreitol (DTT) and alkylated using 40 mM iodoacetamic acid (IAM). A mixture of hydrophilic and hydrophobic magnetic beads was used to clean-up the proteins at a ratio of 20:1 beads:proteins (Sera-Mag Speed beads, Fisher Scientific). After addition of ACN to a final concentration of 50%, the beads were allowed to bind to the proteins for 18 minutes. Protein-bead mixtures were washed twice with 80% EtOH and once with 100% ACN. The protein-bead complexes were digested with a mixture of trypsin:LysC (Promega) at a 1:20 ratio overnight at 37°C. Extracted peptides were cleaned-up using automated C18 solid phase extraction on the Bravo AssayMAP platform (Agilent Technologies).

NanoLC-MS-MS analysis

The peptide extracts were analysed on a nanoLC-TimsTof Pro coupling (Bruker Daltonics). The peptides (200ng) were separated on an IonOpticks column (25cm X

75µm 1.6µm C18 resin) using a gradient of 2-37% B (2%ACN, 0.1%FA) in 100 minutes at a flow rate of 0.3 nl/min. The dual TIMS had a ramp time and accumulation time of 166 ms resulting in a total cycle time of 1.89s. Data was acquired in Data Dependent Acquisition-Parallel Accumulation Serial Fragmentation (DDA-PASEF) mode with 10 PASEF scans in a mass range from 100 m/z to 1700 m/z. The ion mobility scan range was fixed from 0.7-1.25 Vs/cm². All samples were injected using a randomized injection sequence. To minimize carry-over, one solvent blank injection was performed after each sample.

Data interpretation

Raw files were converted to .mgf peaklists using MsConvert and were submitted to Mascot database searches (version 2.5.1, MatrixScience, London, UK) against a *Danio rerio* protein sequence database downloaded from UniProtKB-SwissProt (2022_05_18, 61 732 entries, taxonomy ID: 7955), to which common contaminants and decoy sequences were added. Spectra were searched with a mass tolerance of 15 ppm in MS mode and 0.05 Da in MS/MS mode. One trypsin missed cleavage was tolerated. Carbamidomethylation of cysteine residues was set as a fixed modification. *Oxidation of methionine residues and acetylation of proteins' n-termini were set as variable modifications.* Identification results were imported into the Proline software (version 2.1.2,) [59] for validation. Peptide Spectrum Matches (PSM) with pretty rank equal to one were retained. False Discovery Rate was then optimized to be below 1% at PSM level using Mascot Adjusted E-value and below 1% at Protein Level using Mascot Mudpit score. For label free quantification, peptide abundances were extracted without cross assignment between the samples. Protein abundances were computed using the sum of the unique peptide abundances normalized at the peptide level using the median.

To be considered, proteins must be identified in at least four out of the five replicates in at least one condition. The imputation of the missing values and differential data analysis were performed using the open-source ProStaR software [60]. Imputation of missing values was done using the approximation of the lower limit of quantification by the 2.5% lower quantile of each replicate intensity distribution (“det quantile”). A Limma moderated *t*-test was applied on the dataset to perform differential analysis. The adaptive Benjamini-Hochberg procedure was applied to adjust the p-values and False Discovery Rate.

Embryos drug treatment

27 hpf embryos from *dnaaf1*^{tm317b/+} incross were dechorionated manually. N-acetyl cysteine ethyl ester (NACET) (BIOLLA Chemicals #59587-09-6) was prepared extemporaneously at the final concentration of 3 mM in osmosed water (pH 7.2 Conductivity 650 μ S). Embryos were treated between 27 hpf to 60 hpf and embryos were anesthetized and imaged laterally with the head pointing to the left.

Juvenile drug treatment

Fish for drug treatment were housed off-system in 1.8 liter tanks with 20 fish per tank. NACET (BIOLLA Chemicals #59587-09-6) was prepared extemporaneously at 1.5 mM 286.5mg/L in fish water (pH 7.2, Conductivity 650 μ S) and fish water (containing the drug or not) was changed once per day. Fish were treated from 30 dpf to 84 dpf. Fish were fed according to the regular feeding schedule throughout the experiment. Once per week, fish were monitored for scoliosis onset. At 85 dpf, fish were euthanized, and pictures and size measurements were performed in order to evaluate the curvature index. Half of the fish were fixed for histology analysis in zamboni fixative [35 ml PFA 4 %, 15 ml saturated picric acid (1.2 %)] overnight at 4°C under agitation, while the other half was processed for RT-qPCR analysis. Their internal organs were removed in cold PBS 1X, and they were cut in small pieces before lysis in QIAzol (QIAGEN). Homogenization was achieved using plunger pistons and several passages through 1ml syringes.

Transgenesis

The Tol2 -5.2foxj1a:5xmyc-RPGRIP1L plasmid was produced using the Gateway system by combining four plasmids. P5E-foxj1a enhancer was kindly donated by [3]. 5xmyc-RPGRIP1L cDNA was amplified from the plasmid pCS2-5xmyc-RPGRIP1L [27] using CloneAmp HiFi PCR Premix (Takara # 639298) using primers : forward 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGCAGGATCCCATCGATTTAAAGCT-3' and reverse 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCCGAGCTCGGTTCAAGCCTCCAAGTCATCTCTGT-3. The PCR product was gel purified using QIAEX II gel extraction kit (QIAGEN, #20021) . BP recombination (Invitrogen "Gateway BP Clonase II Enzyme Mix" #11789-020) was performed into pDONR221 #218 to generate pMe-

5xmyc-RPGRIP1L. the 3' entry polyadenylation signal plasmid was used [61]. The 3 plasmids were shuttled into the backbone containing the *cmcl2*:GFP selection cassette [61] using the LR recombination (Invitrogen "Gateway LR Clonase II Plus Enzyme Mix" #12538-120). *rpgrip1l*^{+/-} X AB embryos outcrosses were injected at the one cell stage with 1nl of a mix containing 20 ng/μl plasmid and 25 ng/μl Tol2 transposase RNA and screened at 48 hpf for GFP expression in the heart.

The Tol2 -1.7kbc*col2a1a*:h5xmyc-RPGRIP1L plasmid was produced using the Gateway system by combining four plasmids. *Col2a1a* enhancer was amplified from the plasmid -1.7kbc*col2a1a*:EGFP-CAAX [28] using CloneAmp HiFi PCR Premix (Takara # 639298) with the primers : forward 5'-GGG GAC AAC TTT GTA TAG AAA AGT TGG CCC TCT GAC ACC TGA TGC CAA TTG C-3' and reverse 5' GGG GAC TGC TTT TTT GTA CAA ACT TGC TTG CAG GTC CTA AGG GGT GAA AGT CG-3'. The PCR product was gel purified and BP recombination was performed into pDONR_P4-P1R_#219. The middle entry plasmid and 3' plasmid was the same as those used to generate the Tol2 -5.2*foxj1a*:5xmyc-RPGRIP1L plasmid generated. *rpgrip1l*^{+/-} X AB embryos outcrosses were injected at the one cell stage with 1nl of a mix containing 20 ng/μl plasmid and 25 ng/μl Tol2 transposase RNA and screened at 48 hpf for GFP expression in the heart.

F1 transgenic animals were first selected upon the presence of green fluorescence signal within the heart and later for their transmission of Myc staining at cilia base of embryonic neural cells for the *doxj1a* promoter and notochordal cells for the *col2a1* promoter.

Skeletal preparations, Alizarin staining and imaging

Animals were euthanized using a lethal concentration of MS222 (0.28 mg/mL), skin was removed and then, the fish were fixed in 4% paraformaldehyde over-night 4°C. After evisceration, samples were incubated in borax 5%, rinsed several times in 1% KOH and incubated in solution composed with Alizarin 0.01% (Sigma, A5533) and KOH 1% during 2 days. Fish were rinsed several times in KOH 1% and incubated in trypsin 1% and borax 2% for 2 days until cleared. Samples were rinsed several times in distilled water and transferred in glycerol 80% (in KOH 1%) using progressive dilutions. Samples were kept in glycerol 80% until imaging.

Cobb angles measurements

To quantitatively evaluate the severity of spine curvature in *rpgr11^{+/-};urp2^{+/-}* incross, we used the zebrafish skeletal preparations stained with Alizarin. We drew parallel lines to the top and bottom most displaced vertebrae. The Cobb angle was then measured as the angle of intersection between lines drawn perpendicular to the original 2 lines. This was conducted using FIJI software. For each fish, the total Cobb angle was calculated by summing all Cobb angles.

Curvature index measurements

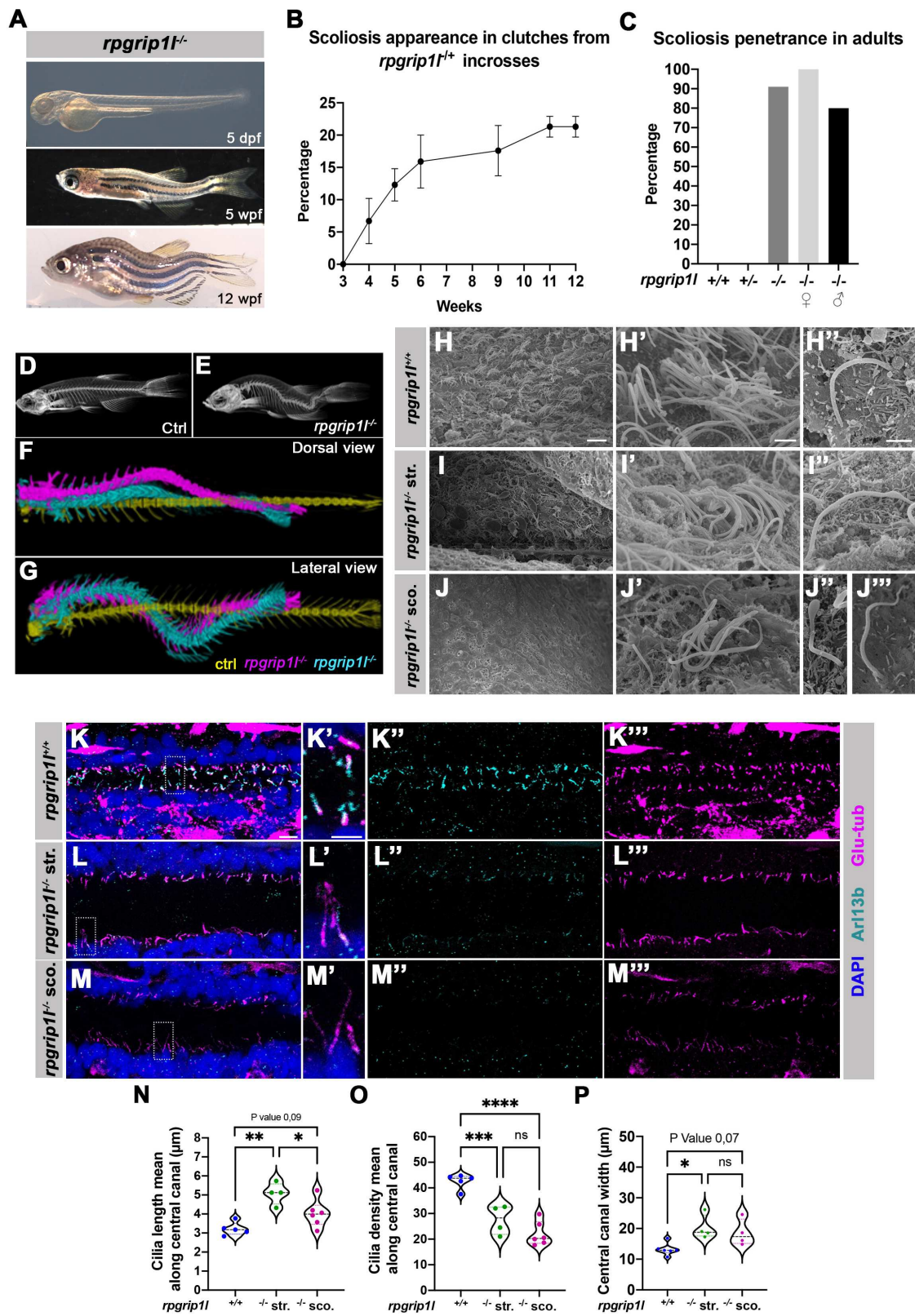
We implemented a novel procedure to quantify curvatures on both axes by drawing a line along the body of the fish as shown in Figure supplementary 3A and curvature was calculated in MATLAB using the LineCurvature2D function. For *rpgr11^{+/-};urp2^{+/-}* incross and NACET experiment, a line following the body deformation was drawn from the mouth to the base of the tail following the midline of the fish in lateral position and another one along the dorsal axis. Curvature index of both curves were summed for each fish. Curvature analysis was performed blinded to fish genotype. *rpgr11^{+/+}* or *rpgr11^{+/-}* siblings were used as controls.

Data acquisition for body-curvature analysis at embryonic stage

Zebrafish larvae were anesthetized and imaged laterally with the head pointing to the left. The angle between the line connecting the center of the eye to the center of the yolk and the line connecting the center of the yolk to the tip of the tail was measured to evaluate the body curvature of the embryos. For quantitative analysis, the angles of each embryo were put in the same concentric circles represented with a Roseplot, with 0° pointing to the right and 90° pointing to the top. Each triangle represents a 30° quadrant, and its height indicates the number of embryos within the same quadrant.

Quantification, statistical analysis and figure preparation

For all experiments the number of samples analyzed is indicated in the text and/or visible in the figures. Statistical analysis was performed using the Prism software. ****: P value < 0.0001; ***: P value < 0.001; **: P value < 0.01; *: P value < 0.05. Graph were made using Prism and Matlab and figures were assembled using Photoshop software.



Djebar et al. Figure 1

Figure 1: *rpgr11*^{-/-} zebrafish develop scoliosis and show cilia defects at juvenile stages.

(A) Representative *rpgr11*^{-/-} fish at 5 days post-fertilization (dpf) (4 mm body length, larvae), 5 wpf (1.2 cm body length, juveniles) and 12 wpf (2.5 cm body length, adults), showing absence of defects in embryos, onset of spine curvature (tail up) in juveniles and scoliosis in adults.

(B-C) Graph showing the dynamics of scoliosis appearance **(B)** in *rpgr11*^{+/+} incrosses (total 4 clutches, 252 fish) and scoliosis penetrance **(C)** in adults.

(D-E) Micro-computed tomography (μ CT) scans of 4 control siblings (D) and 4 *rpgr11*^{-/-} (E) adult fish.

(F-G) Dorsal and lateral views of the superimposed spines of one control (yellow) and two *rpgr11*^{-/-} (pink, cyan) adult fish illustrating the 3D spine curvatures in mutants.

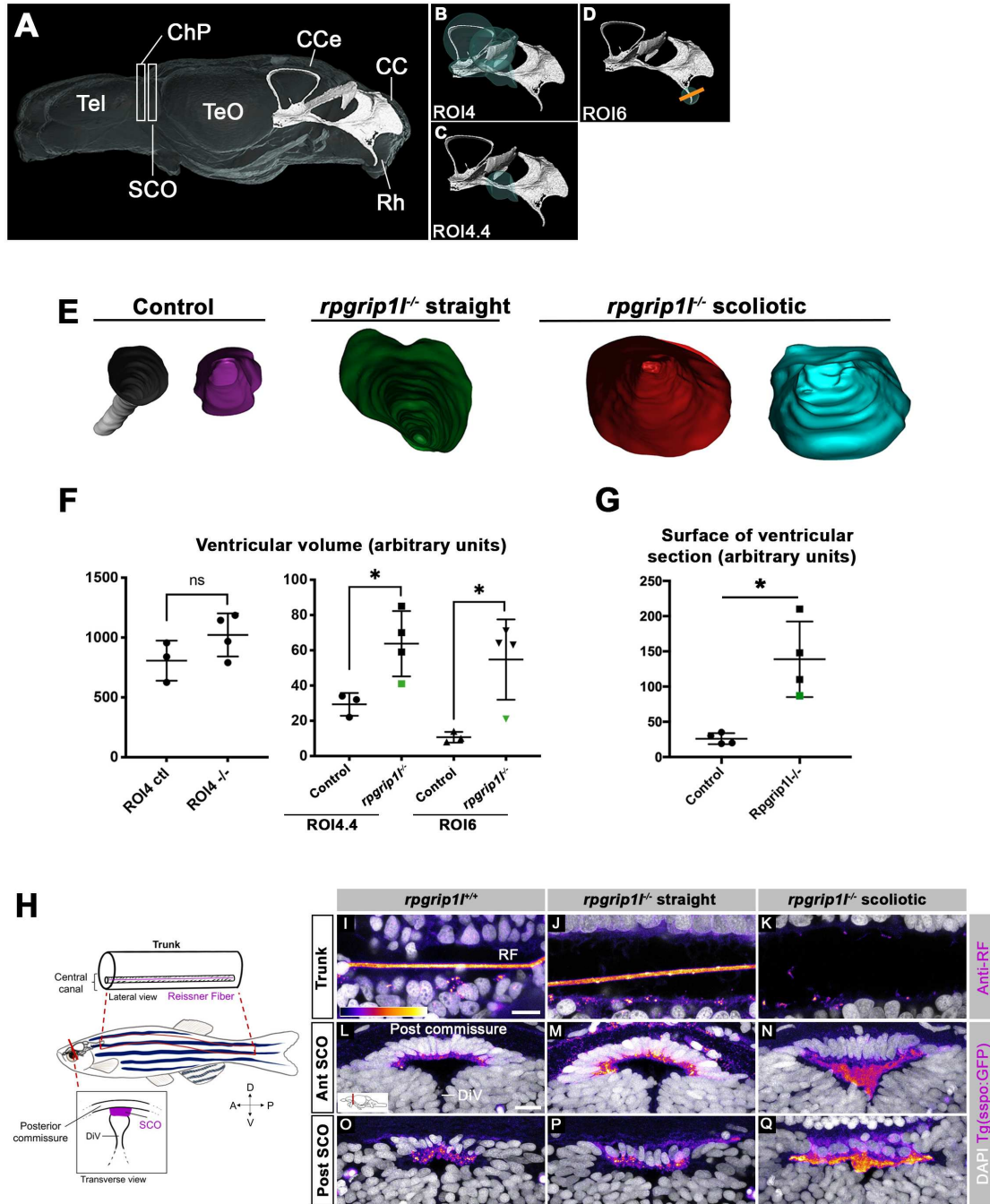
(H-J''') Scanning electron microscopy of the brain ventricles of control (H-H''), *rpgr11*^{-/-} straight (I-I'') and *rpgr11*^{-/-} scoliotic (J-J'') fish at adult stage. Midbrain ependymal multiciliated cells are remaining (I, I') in *rpgr11*^{-/-} straight but hindbrain monociliated cells (O) are appearing abnormal (I'). *rpgr11*^{-/-} scoliotic fish present ciliary defects in cerebellar ependymal multiciliated cells (J, J'') and in hindbrain monociliated cells (J'', J'''). Scale bars: 10 μ m for H-J, 2 μ m for K-M, 1 μ m for N-P'.

(K-M''') Immunostaining of trunk lateral sections at the level of the central canal of the spinal cord between *rpgr11*^{+/+} (n=5) (K-K'''), *rpgr11*^{-/-} straight (n=4) (L-L''') and *rpgr11*^{-/-} scoliotic (n=6) (M-M''') at 8 weeks (N=2). Cilia are immunostained with Arl13b (cyan), and glutamylated-tubulin (magenta). K', L', M' represent a magnification of monocilia. Scale bars: 10 μ m for K, L, M, 5 μ m for K'-M'.

(N) Graph of cilia length mean (in μ m) along the central canal of *rpgr11*^{+/+} siblings (n=300 cilia from 5 fish), straight *rpgr11*^{-/-} (n=267 from 4 fish) and scoliotic *rpgr11*^{-/-} (n=414 from 6 fish) juvenile fish (N=2). Each dot represents the mean ciliary length of 4-8 sections analysis along the AP axis of the fish. Statistical analysis was performed using Tukey's multiple comparisons test where * means P-value < 0.05, and ** means P-value < 0.01. "+/+ " represents *rpgr11*^{+/+} siblings, "-/+ str" represents straight *rpgr11*^{-/-} fish and "-/- sco" represents scoliotic *rpgr11*^{-/-} fish.

(O) Graph of cilia density mean along the central canal of juvenile *rpgr11^{+/+}* siblings (n=5), straight *rpgr11^{-/-}* (n=4) and scoliotic *rpgr11^{-/-}* fish (n=6) (N=2). Density is the number of cilia per 100 μm^2 CC length. Each dot represents the mean cilia density of 4-8 sections analysis along the AP axis of the fish. Statistical analysis was performed using Tukey's multiple comparisons test where ns means non significant, *** means P-value < 0.001, and **** means P-value < 0.0001. "+/+ " represents *rpgr11^{+/+}* siblings, "-/- str" represents *rpgr11^{-/-}* straight fish and "-/- sco" represents *rpgr11^{-/-}* scoliotic fish.

(P) Graph of central canal width (in μm) of juvenile *rpgr11^{+/+}* siblings (n=5), straight *rpgr11^{-/-}* (n=4) and scoliotic *rpgr11^{-/-}* fish (n=6) (N=2). This measurement corresponds to the nuclear free region at the level of spinal cord central canal. Each dot represents the mean of 3 measurements made at different AP axis level. Statistical analysis was performed using Tukey's multiple comparisons test where ns means non significant, * means P-value < 0.05.



Djebar et al. Figure 2

Figure 2: *rpgrip1*^{-/-} juveniles show ventricular dilations and Reissner Fiber loss at scoliosis onset at the subcommissural organ level and in the central canal of the spinal cord.

(A) Reconstruction of the posterior midbrain and hindbrain ventricles in a control transparenized 5 weeks post-fertilization (wpf) zebrafish brain stained with ZO1 antibody (ventricular surface) and Dil (global brain shape). Several brain regions are annotated on the reconstruction where Tel means telencephalon, ChP means forebrain choroid

plexus, SCO means subcommissural organ, TeO means optic tectum, CCe means corpus cerebelli, CC means crista cerebelli and Rh means rhombencephalon.

(B-D) Visualization of the ROIs shown in F. The orange line in D indicates the level of optical sections in E.

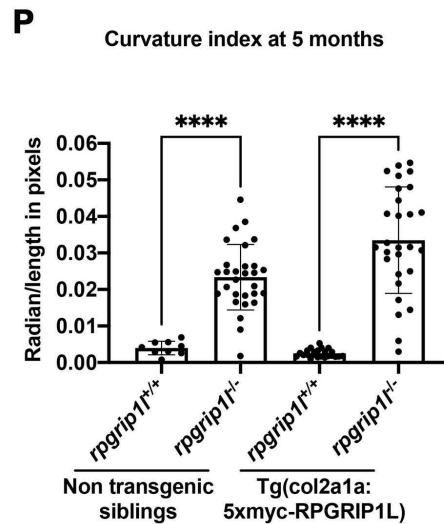
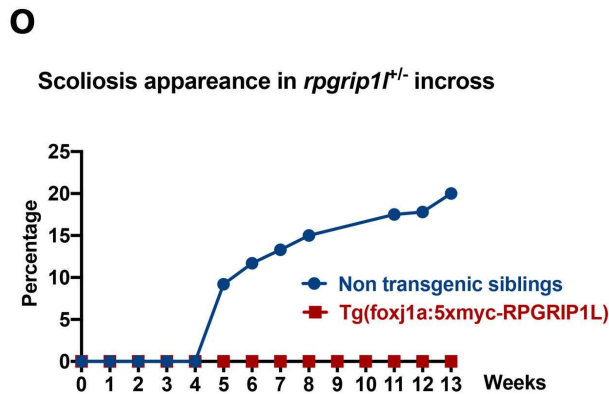
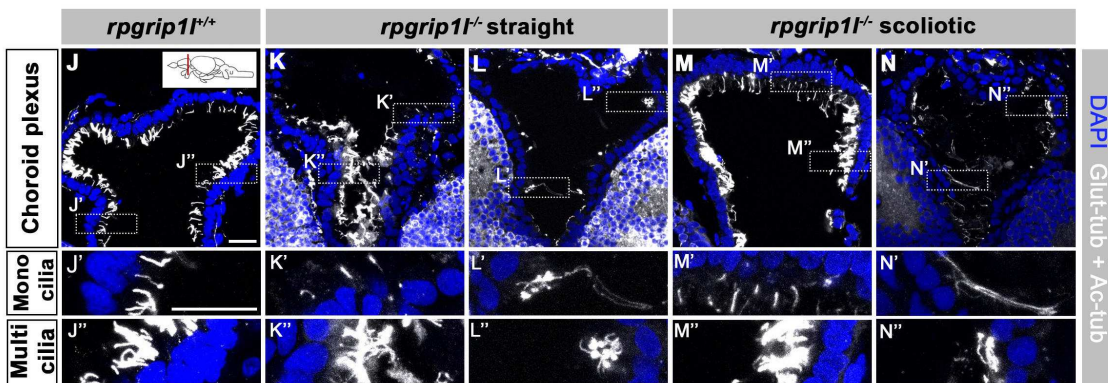
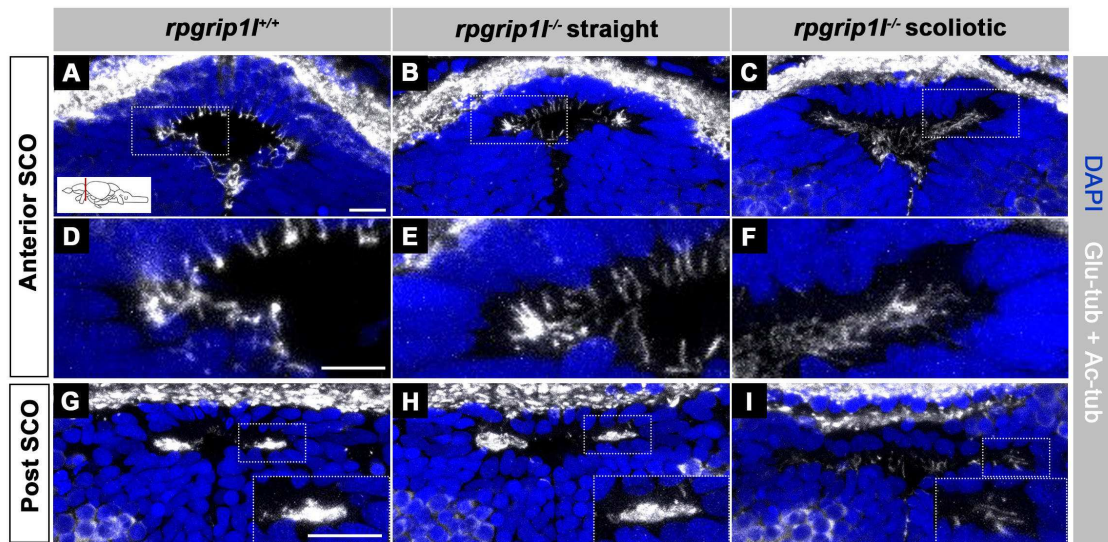
(E) Optical transverse sections showing the caudal part of reconstructed ventricles of a control and two *rpgr11*^{-/-} fish, one straight and two tail-up.

(F) Graphs of the ventricle volume at the onset of scoliosis in 3 control and 4 *rpgr11*^{-/-} (one straight and three tail-up) fish. The green dot corresponds to the straight mutant fish. Each dot represents a fish. Statistical analysis was performed using unpaired t-test where ns means non significant, and * means Pvalue < 0.05.

(G) Graph of the surface of the optical sections as illustrated in G. The green dot corresponds to a straight mutant fish. Each dot represents a fish. Statistical analysis was performed using unpaired t-test where ns means non significant, and * means Pvalue < 0.05.

(H) Illustration of SCO location (transverse view) within the adult brain and of the spinal cord central canal (lateral view) in the trunk. DiV corresponds to diencephalic ventricle.

(I-Q) Visualization of the RF in sagittal sections of the trunk (I-K) (N=3) and transverse sections of the brain at the level of the sub-commissural organ (SCO) (N=2) (L-Q) juvenile fish, using *scospondin-GFP*^{uts24/+} (fire mode for GFP and RF signals). I, L, O are 8 (wpf) *rpgr11*^{+/+} siblings (n=10), (J, M, P) straight *rpgr11*^{-/-} (n=9) and (K, N, Q) scoliotic *rpgr11*^{-/-} (n=8) fish. L-N show sections at anterior level (Ant SCO) while O-Q show sections of the posterior SCO (Post SCO) at the junction between the diencephalon and tectum region. Scale bars: 5 μm in I-K, 10 μm in L-Q.



Djebar et al. Figure 3

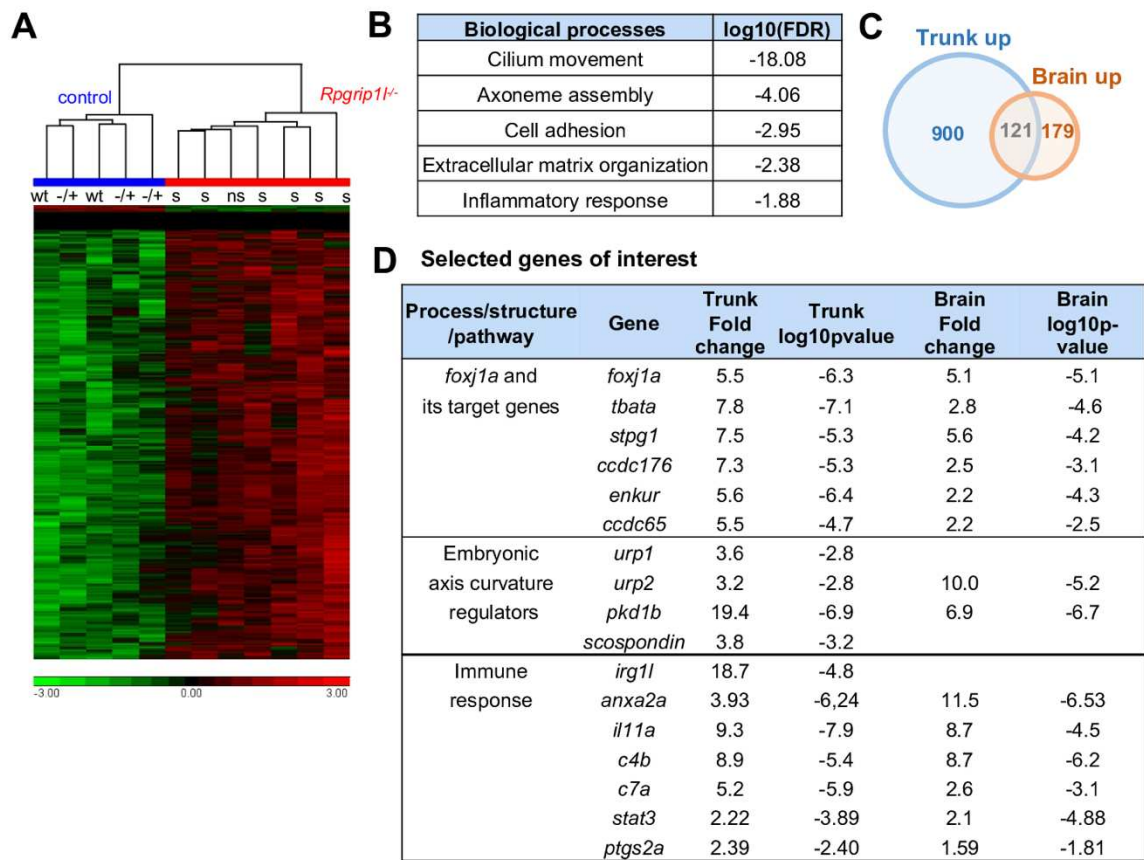
Figure 3: *rpgrip1*^{-/-} scoliotic fish exhibit cilia defect at the subcommissural organ level and introduction of RPGRIP1L in *foxj1a*-positive lineages suppresses scoliosis

(A-I) Immunostaining of cilia of transverse sections at SCO level using glutamylated-tubulin, acetylated-tubulin (both in white), and nuclei using DAPI (blue) between *rpgr1p1^{+/+}* siblings (n=6) (A, D, G), straight *rpgr1p1^{-/-}* (n=3) (B, E, H) and scoliotic *rpgr1p1^{-/-}* (n=7) (C, F, I) 8 weeks juveniles fish (N=2). (A-F) correspond to anterior SCO level where D, E, F are the respective magnification of control (A), straight *rpgr1p1^{-/-}* (B), and scoliotic *rpgr1p1^{-/-}* (C) fish. (G-I) correspond to posterior SCO level where the square on the right side represents a magnification of multi-cilia in control (G), *rpgr1p1^{-/-}* straight (H), and *rpgr1p1^{-/-}* scoliotic (I) fish. Scale bars: 10 μ m for A-I.

(J-N'') Representative maximum intensity Z-stack projections of confocal transverse brain section at the forebrain choroid plexus level between *rpgr1p1^{+/+}* siblings (n=7), straight *rpgr1p1^{-/-}* (n=4) and scoliotic *rpgr1p1^{-/-}* (n=5) in 8 wpf juvenile fish (N=2). Cilia are immunostained with glutamylated-tubulin and acetylated-tubulin antibodies (both in white) and nuclei are stained with DAPI (blue). At the level of Habenula nuclei, control present monocilia in the dorsal midline region (J') and multicilia on lateral sides (J'') (n=7/7) whereas straight *rpgr1p1^{-/-}* exhibit either normal cilia phenotype with monocilia (K') or multicilia (K'') (n=2/4) or abnormal ones (L', L'') (n=2/4). Scoliotic *rpgr1p1^{-/-}* present also normal monocilia (M') and multicilia (M'') (n=3/5) or long monocilia (N') and a decrease in ciliary density of multi-ciliated tufts (N'') (n=2/5). Scale bar: 20 μ m for J-N''.

(O) Time course of scoliosis appearance in *rpgr1p1^{+/+}* incross between non transgenic (n=117 fish) and transgenic Tg(foxj1a:5xmyc-RPGRIP1L) (n=118 fish) fish from 0 to 13 weeks. In non-transgenic clutch, n=24/26 mutants developed a scoliosis. Tg(foxj1a:5xmyc-RPGRIP1L); *rpgr1p1^{-/-}* fish didn't develop any scoliosis (0/31 mutants).

(P) Graphic representing the curvature index at 5 months in *rpgr1p1^{+/+}* incrosses between non transgenic siblings and Tg(col2a1a:5xmyc-RPGRIP1L) lines. Transgenic mutants are not rescued either for scoliosis severity or appearance. Statistical analysis was performed using Tukey's multiple comparisons test where **** means Pvalue < 0.0001 with error bars s.d.



Djebar et al. Figure 4

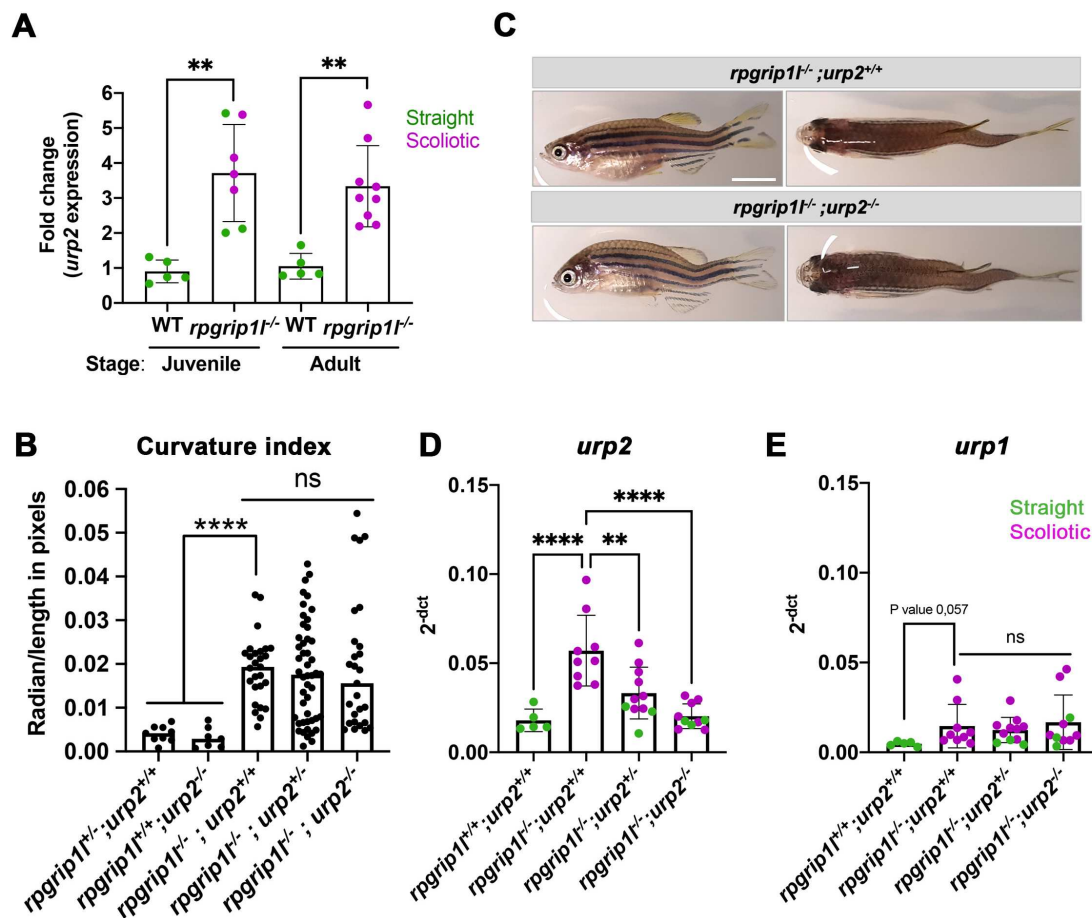
Figure 4: Comparative transcriptome analysis of the trunk and brain of control and *rpgrip1^{-/-}* fish.

(A) Hierarchical clustering of the deregulated genes in the trunk (after removal of the skin and internal organs) of 2 wt, 3 *rpgrip1^{+/+}* and 7 *rpgrip1^{-/-}* (6 tail-up and 1 straight) fish at 4 wpf (0.9 cm body length).

(B) Go term analysis of biological processes in the trunk samples.

(C) Venn diagram of the upregulated genes in brain and trunk samples, based on human Refseq, showing many common genes between the two tissues.

(D) Selected genes of interest upregulated in the trunk and/or brain of *rpgrip1^{-/-}* fish.



Djebar et al. Figure 5

Figure 5: URP expression upregulation does not contribute to axis curvature of *rpgrip1^{-/-}* fish.

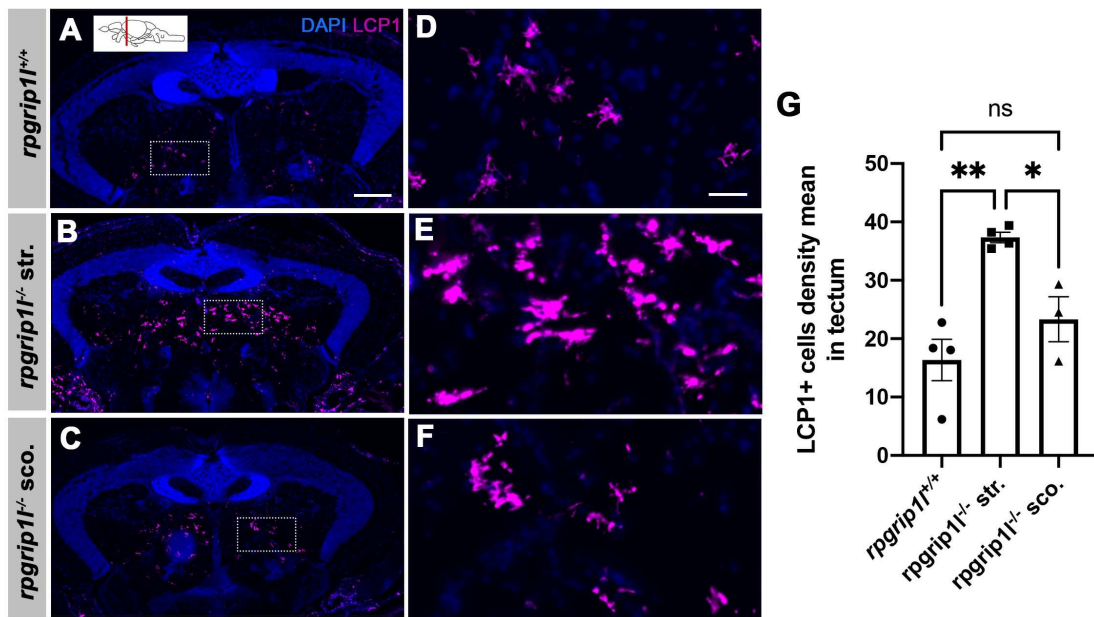
(A) Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) assaying *urp2* expression level in *rpgrip1^{-/-}* mutants and *rpgrip1^{+/+}* siblings. Each dot represents the value obtained for one fish and values for straight *rpgrip1^{-/-}* fish are colored in green and for scoliotic *rpgrip1^{-/-}* fish in purple. qRT-PCR analysis was performed at 5 weeks post fertilization (wpf) or juvenile stage between controls (n=5) and *rpgrip1^{-/-}* (n=7) and 12 wpf (adult stage) between controls (n=5) and *rpgrip1^{-/-}* (n=9). *urp2* expression level are increased by approximately 3.5-fold in *rpgrip1^{-/-}* at both stages. Statistical analysis performed using unpaired t-test where **P < 0.01 with error bars represent s.d.

(B) Quantification of body axis curvature from dorsal and lateral views at 3 months. Each point represents the value measured for one fish. Statistical analysis was performed using Tukey's multiple comparisons test where **** P < 0,0001 with error bars represent s.d. (n=9 *rpgrip1^{+/+}; urp2^{+/+}*, n=7 *rpgrip1^{+/+}; urp2^{-/-}*, n=27 *rpgrip1^{-/-}; urp2^{+/+}*, n=27 *rpgrip1^{-/-}; urp2^{-/-}*).

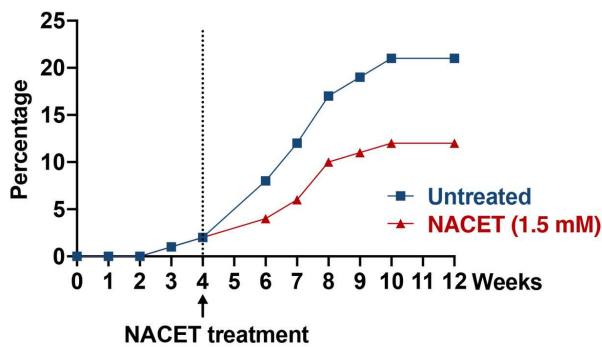
urp2^{+/+}, n=48 *rpgr1p1*^{-/-}; *urp2*^{+/+}, n=27 *rpgr1p1*^{-/-}; *urp2*^{-/-}). The curvature index was not significantly changed by removing one or two alleles of *urp2* in *rpgr1p1*^{-/-}

(C) Representative *rpgr1p1*^{-/-}; *urp2*^{+/+} and sibling *rpgr1p1*^{-/-}; *urp2*^{-/-} zebrafish on lateral and dorsal views at 12 wpf stage. Scale bar 5mm.

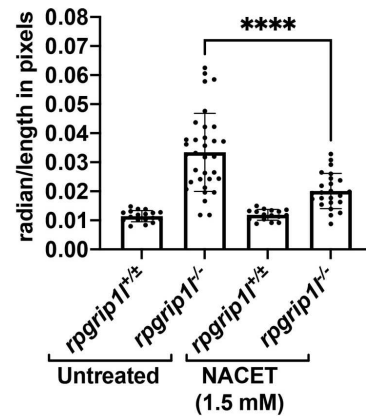
(D-E) Expression levels of *urp2* (D) and *urp1* (E) in zebrafish adult stage (12 wpf). Each dot represents the value for one fish, where values for straight *rpgr1p1*^{-/-} fish are colored in green and for scoliotic *rpgr1p1*^{-/-} fish in purple. (n=5 *rpgr1p1*^{+/+}; *urp2*^{+/+}, n=9 *rpgr1p1*^{+/+}; *urp2*^{-/-}, n=11 *rpgr1p1*^{-/-}; *urp2*^{+/+}, n=10 *rpgr1p1*^{-/-}; *urp2*^{-/-}). Each gene expression level is compared to *lsm12b* housekeeping gene. Statistical analysis was performed using Tukey's multiple comparisons test where ns means non significant and ** P < 0.01, **** P < 0.0001 with error bars represent s.d.



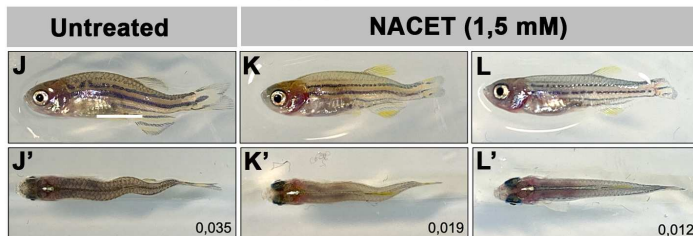
H Scoliosis penetrance in *rpgrip1*^{-/-} incross



I Curvature index



Scoliotic phenotype and associated curvature index of *rpgrip1*^{-/-} adults



Djebar et al. Figure 6

Figure 6: Increased number of LCP1+ cells in straight *rpgrip1*^{-/-} brains and NACET treatment reduces both scoliosis penetrance and severity in *rpgrip1*^{-/-}.

(A-F) Immunostaining of immune cells on transverse sections of the optic tectum region of *rpgrip1*^{+/+} 8 wpf fish (n=4), straight *rpgrip1*^{-/-} (n=4) and scoliotic *rpgrip1*^{-/-} fish

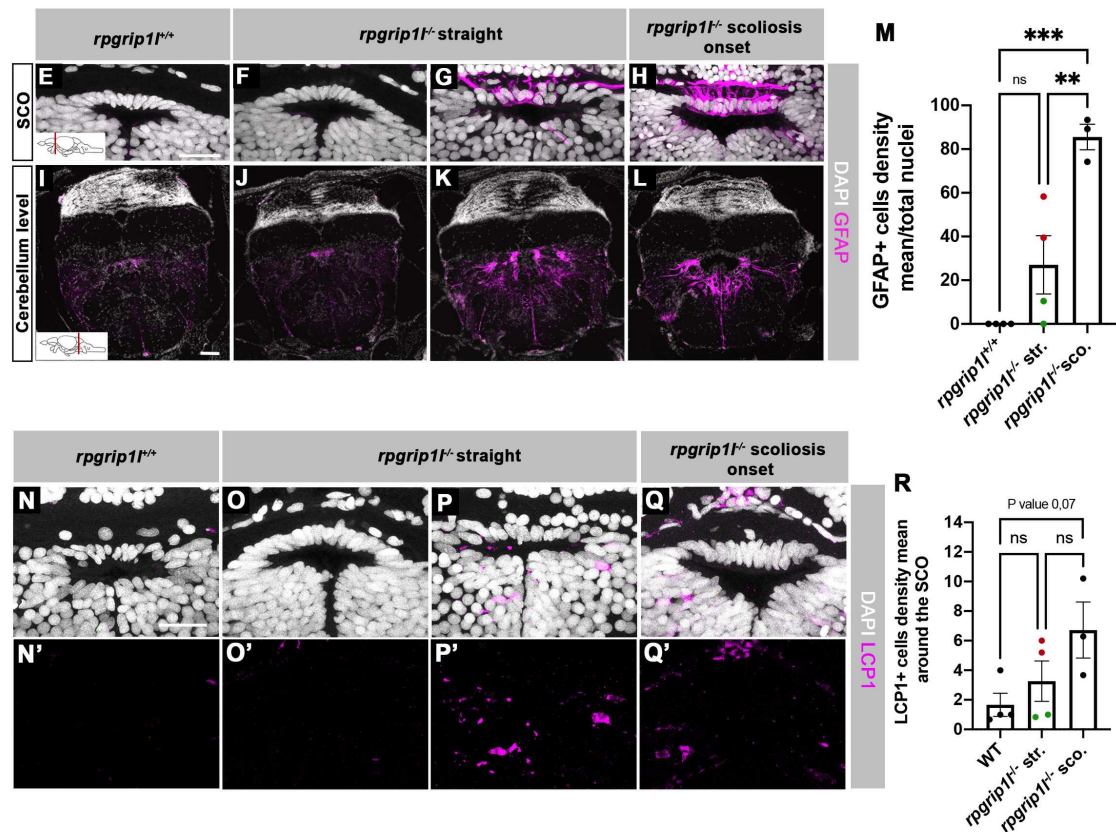
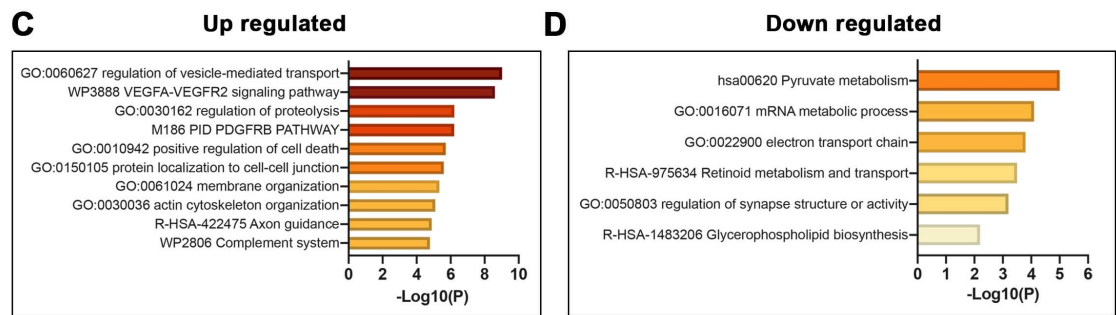
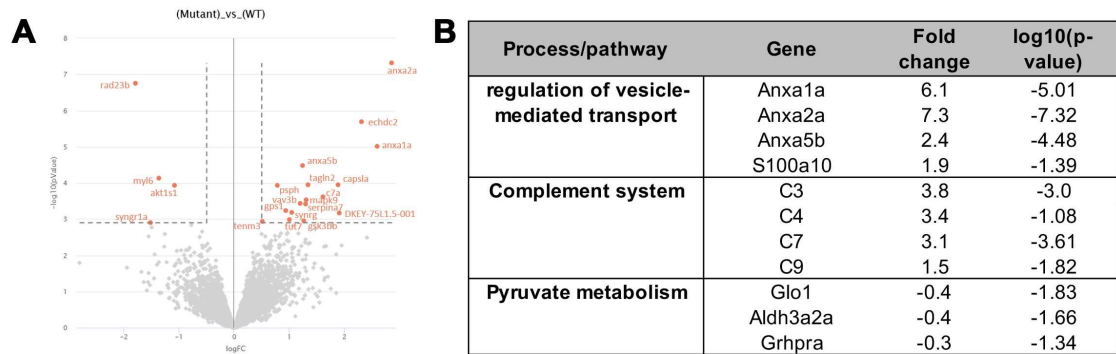
(n=3). Immune cells are marked with LCP1 antibody (magenta) and nuclei with DAPI (blue). *rpgr1p1^{+/+}* are represented in (A, D) where (D) is a magnification of (A). (B, E) straight *rpgr1p1^{-/-}* fish experience an increase of immune cells in the parenchyma of the optic tectum region. (E) is a magnification of (B). (C, F) Scoliotic *rpgr1p1^{-/-}* present a reduced increase of immune cells numbers compared to *rpgr1p1^{-/-}* straight fish in the optic tectum region, (F) is a magnification of (C). Scale bars: 100 μ m for A, B, C; 30 μ m for D, E, F. str: straight, sco: scoliotic.

(G) Quantification of the mean of LCP1+ cells density in the optic tectum region of *rpgr1p1^{+/+}* siblings (n=4), straight *rpgr1p1^{-/-}* (n=4) and scoliotic *rpgr1p1^{-/-}* fish (n=3) at 8 wpf. Each dot represents a fish. Between 15-20 sections were counted for each brain level. Straight *rpgr1p1^{-/-}* fish sections display around twice more Lcp1 cells at tectum level than controls, while scoliotic *rpgr1p1^{-/-}* fish present slightly increased of LCP1+ cells density compared to controls. Statistical analysis was performed using Tukey's multiple comparisons test where ns means non significative and * Pvalue < 0.05, ** Pvalue < 0.01 with error bars represent s.d.

(H) Kinetics of scoliosis development in *rpgr1p1^{-/-}* incross in the presence (n=150 fish) or absence (n=174 fish) of NACET treatment (1.5 mM) from 4 to 12 weeks. In untreated condition, *rpgr1p1^{-/-}* (n=36/39) developed a scoliosis whereas with NACET treatment, 42% of *rpgr1p1^{-/-}* (n=13/31) remained straight at 13 wpf. "str" means straight and "sco" means scoliotic.

(I) Quantification of body axis curvature from dorsal and lateral views at 13 wpf stage, at the end of NACET treatment. Each dot corresponds to the value for one fish. Among the 174 fish raised in untreated condition, we measured 18 controls (*rpgr1p1^{+/+}*), and 33 *rpgr1p1^{-/-}*, and upon NACET treatment, 16 controls (*rpgr1p1^{+/+}*) and 23 *rpgr1p1^{-/-}*. *rpgr1p1^{+/+}* represents a pool of *rpgr1p1^{+/+}* and *rpgr1p1^{-/-}*. Statistical analysis was performed using Tukey's multiple comparisons test where **** Pvalue < 0.0001 with error bars represent s.d.

(J-L') Representative picture of *rpgr1p1^{-/-}* fish with its average curvature index without or after NACET treatment, at 13 wpf. Scale bar correspond to 5 mm. (J, J') present pictures of untreated *rpgr1p1^{-/-}* scoliotic fish on lateral (J) and dorsal (J') views. (K, K') present pictures of treated *rpgr1p1^{-/-}* with a lower curvature index than scoliotic fish on lateral (K) and dorsal (K') views and (L, L') pictures of rescued straight *rpgr1p1^{-/-}* fish on lateral (L) and dorsal (L') views.



Djebar et al. Figure 7

Figure 7: Results of the comparative proteome analysis on adult brain and initiation of an astrogliosis-like response in *rpgr1^{-/-}* juveniles at the SCO and cerebellum levels

(A) Volcano plot where the log₂ FC in x axis reflects the log₂ of the fold change of the mean expression level for a given protein between *rpgr11^{-/-}* brains (N=5) compared to control brains (N=5). -Log₁₀(p adj-value) in y axis measures the p value for this comparison. Only 26 proteins (red dots) are differentially expressed between mutant and control brains, if the threshold for the P value is 1.10⁻³, 4 are less abundant, 22 more abundant.

(B) Selected proteins of interest that are more abundant or decreased in the brain of *rpgr11^{-/-}* fish with their respective fold change and p value.

(C-D) Metascape pathway enrichment analysis using the *Danio rerio* database for significantly upregulated proteins (C) and significantly downregulated proteins (D) identified in the proteomic analysis of 13 wpf brains, taking into account p values inferior to 5.10⁻² together with fold change above 1.5 or minus 0.7. The full list of proteins and GO terms are given in Supplementary Table 3.

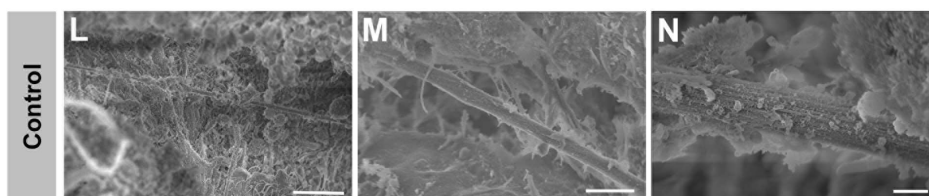
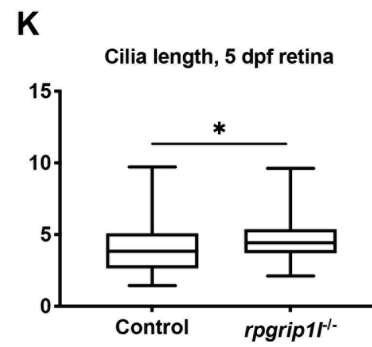
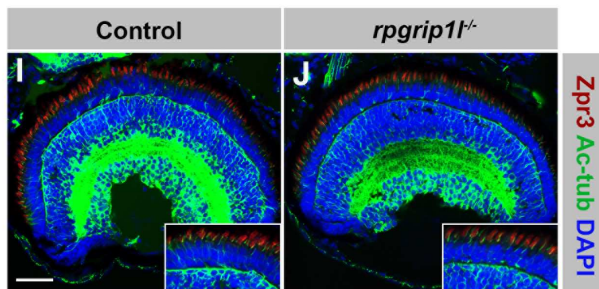
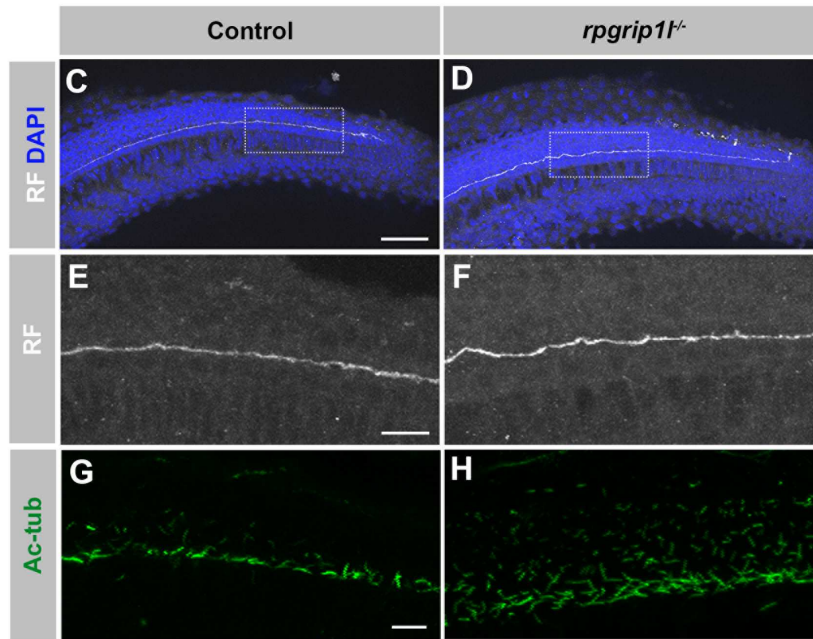
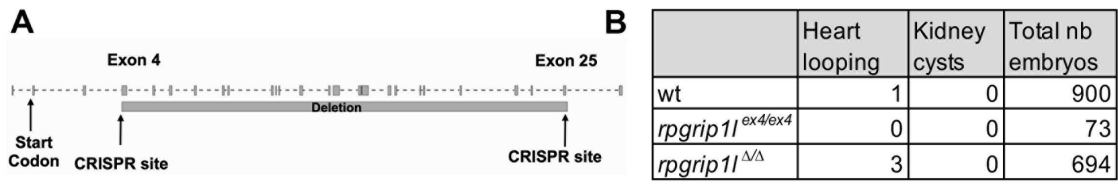
(E-L) Immunostaining of glial fibrillary acidic protein (magenta) using antibody against GFAP and DAPI (white) on brain transverse sections at the SCO level in controls (n=4) (E), straight *rpgr11^{-/-}* (n=4) (F-G) and *rpgr11^{-/-}* fish at scoliosis onset (n=3) (H) or at the cerebellum level of controls (n=4) (I), straight *rpgr11^{-/-}* (n=4) (J-K) and *rpgr11^{-/-}* at scoliosis onset (n=3) (L) at 8 wpf stage. Straight *rpgr11^{-/-}* present an astrogliosis-like response on secretory cells from the SCO and ventrally along rhombencephalic ventricle, in a heterogenous manner (G; n=2/4) compared to (F; n=2/4) and controls (E; n=4/4). The astrogliosis-like response is maintained in curved mutants (H; n=3/3). Scale bar: for E-H: 20µm and for I-L:100µm.

(M) GFAP positive cells density mean among the total number of SCO secretory cells compared between controls (n=4), straight *rpgr11^{-/-}* (n=4), and *rpgr11^{-/-}* fish at scoliosis onset (n=3) (N=1). Each dot represents the mean of GFAP cells present in 3-6 sections per fish. Green dots correspond to fish without any GFAP+ secretory cells, red dots to fish with GFAP+ secretory cells. Statistical analysis was performed with Tukey's multiple comparisons test where ns means non significative, ** means P-value < 0.01 and *** P-value < 0.001 with error bars represent s.d "str" means straight and "sco" means scoliotic.

(N-Q') Immunostaining of LCP1 cells (magenta) on brain transverse sections at SCO levels in controls (n=4) (N, N'), straight *rpgr11^{-/-}* (n=4) (O-P') and *rpgr11^{-/-}* at scoliosis onset (n=3) (Q, Q') of 8 weeks fish (N=1). 2/4 *rpgr11^{-/-}* straight fish present a few Lcp1

positive amoeboid cells around the SCO (Compare P' with O'; n=2/4 and with controls N'; n=4/4). Lcp1 cells are also detected around the SCO of scoliotic mutants (Q'; n=3/3). Scale bar: 20 μ m.

(R) Quantification of LCP1+ cells density mean around the SCO region in controls (n=4), straight *rpgr11*^{-/-} (n=4) and *rpgr11*^{-/-} at scoliosis onset (n=3) at 8 weeks. 23 sections were counted for control, 21 sections for *rpgr11*^{-/-} straight and 18 sections for *rpgr11*^{-/-} scoliotic fish. Each dot represents the mean value for one fish. Green dots correspond to the fish without any GFAP+ secretory cells, red dots correspond to the fish with GFAP+ secretory cells. Note that straight *rpgr11*^{-/-} fish with GFAP+ secretory cells present a higher number of LCP1+ cells (N=1 and second experiment is undergoing). Statistical analysis was performed with Tukey's multiple comparisons test where ns means non significant with error bars represent s.e.m. "str" means straight and "sco" means scoliotic.



Djebar et al. Supplementary Figure 1

Supplementary figure 1: Production and characterization of the *rpgr1p1^{ex4}* and *rpgr1p1^Δ* mutant fish alleles.

(A) Graph showing the exon-intron structure of the *Danio rerio rpgr1p1* gene. Two alleles were produced by CRISPR/cas9-mediated genome engineering, *rpgr1p1^{ex4}* with a nonsense mutation in exon 4 and *rpgr1p1^{Δ4-25}* with a large deletion between exon 4 and 25, so encompassing most of the protein coding sequence. Both alleles had identical phenotype (panel B and data not shown). Only *rpgr1p1^Δ* was further studied and renamed *rpgr1p1^{l/-}*.

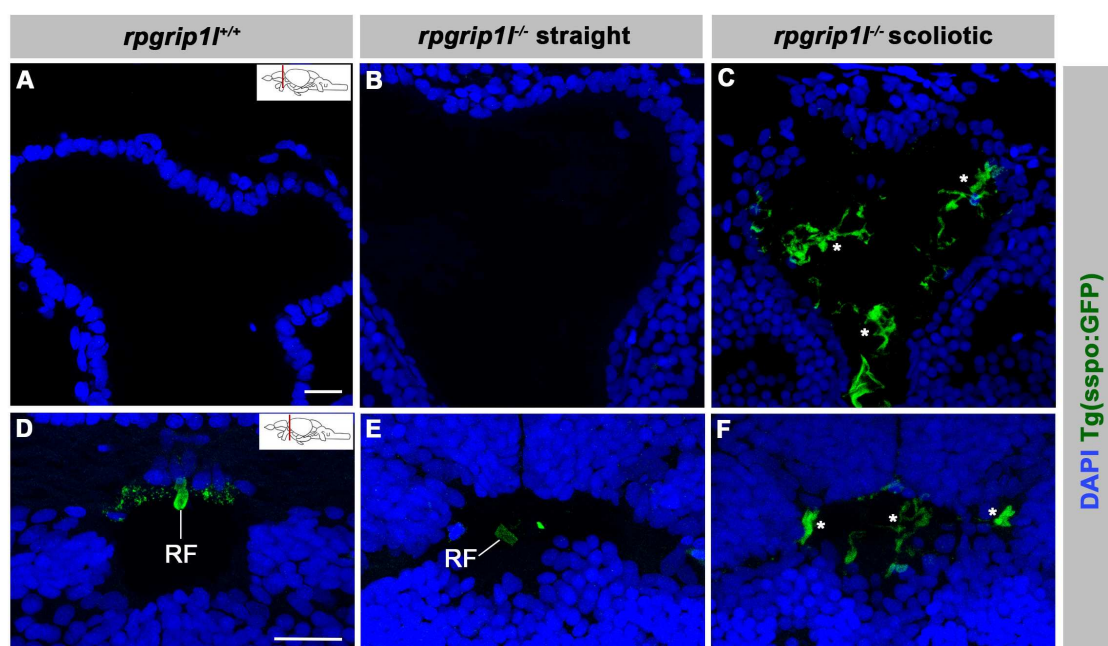
(B) Absence of laterality defects and kidney cysts in *rpgr1p1^{Δ/Δ}* and *rpgr1p1^{ex4/ex4}* embryos.

(C-H) Immunofluorescence on whole 30 hpf control (C, E, G) and *rpgr1p1^{l/-}* (D,F,H) embryos to visualize the RF (anti-RF antibody) and cilia (acetylated tubulin antibody). Nuclei are stained with DAPI. The RF is present in the central canal *rpgr1p1^{l/-}* embryos. Scale bar: 6μm for C, D; 15 μm for E to H.

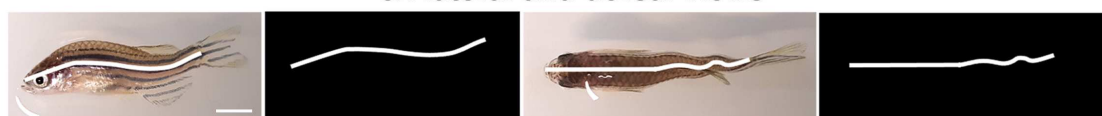
(I-J) Absence of retinal defects and normal photoreceptor cilia in 5 dpf *rpgr1p1^{l/-}* larvae. Retinal sections of control (I) and *rpgr1p1^{l/-}* (J) were immunostained with Zpr3 (red, to label the external segment of photoreceptors) and Acetylated Tubulin (Ac Tub, green) to label cilia. Insets in K and L focus on the photoreceptor cilia. Scale bar: 50 μm.

(K) Graph of photoreceptor cilia length between control (n=131 cilia) and *rpgr1p1^{l/-}* (n=101 cilia) retinas.

(L-N) SEM on control adult brain to visualize the RF in brain ventricles. Scale bars: 20 μm for N; 10 μm for O and 1 μm for P.



G Combined curvature index measured from traced line on lateral and dorsal views



Djebar et al. Supplementary Figure 2

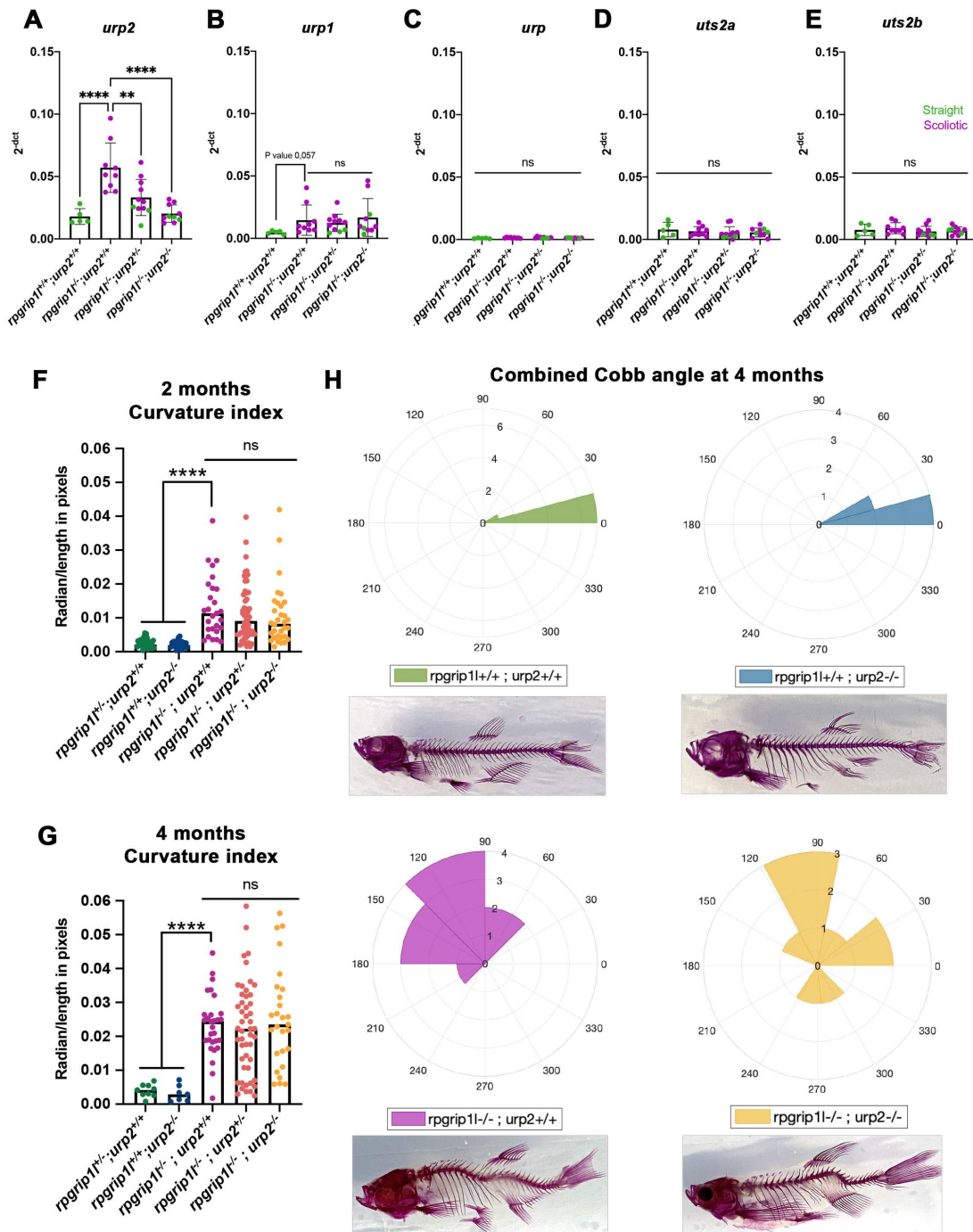
Supplementary figure 2: Presence of sco-spondin aggregates within choroid plexus and optic tectum ventricles in scoliotic *rpgrip1^{-/-}*

(A-C) Immunostaining of sco-spondin using the transgenic line tg(sspo:sspo-GFP) on transverse section of the forebrain choroid plexus in *rpgrip1^{+/+}* (n=7), straight *rpgrip1^{-/-}* *rpgrip1^{-/-}* (n=4) and scoliotic *rpgrip1^{-/-}* (n=5) in 8 weeks juvenile fish (N=2). Scoliotic *rpgrip1^{-/-}* present filamentous material and aggregates within the ventricle (C) whereas no signal is detected in control (A) or straight *rpgrip1^{-/-}* (B). * indicate aggregates.

(D-F) Immunostaining of sco-spondin using the transgenic line tg(sspo:sspo-GFP) on transverse sections of anterior optic tectum in *rpgrip1^{+/+}* (n=7), straight *rpgrip1^{-/-}* (n=4) and scoliotic *rpgrip1^{-/-}* (n=5) in 8 weeks juvenile fish (N=2). Scoliotic *rpgrip1^{-/-}* present filamentous material and aggregates within the ventricle, while a small RF fragment is present within the ventricle of control (D) and straight mutant (E). * indicate aggregates.

(G) Illustration of combined curvature index measurement from traced lines on lateral and dorsal views of fish. The curvature index of both traced lines were measured using

a modified MATLAB program (LineCurvature2D function) which gave us a measurement in radian/length in pixels. Scale bar: 5 μ m



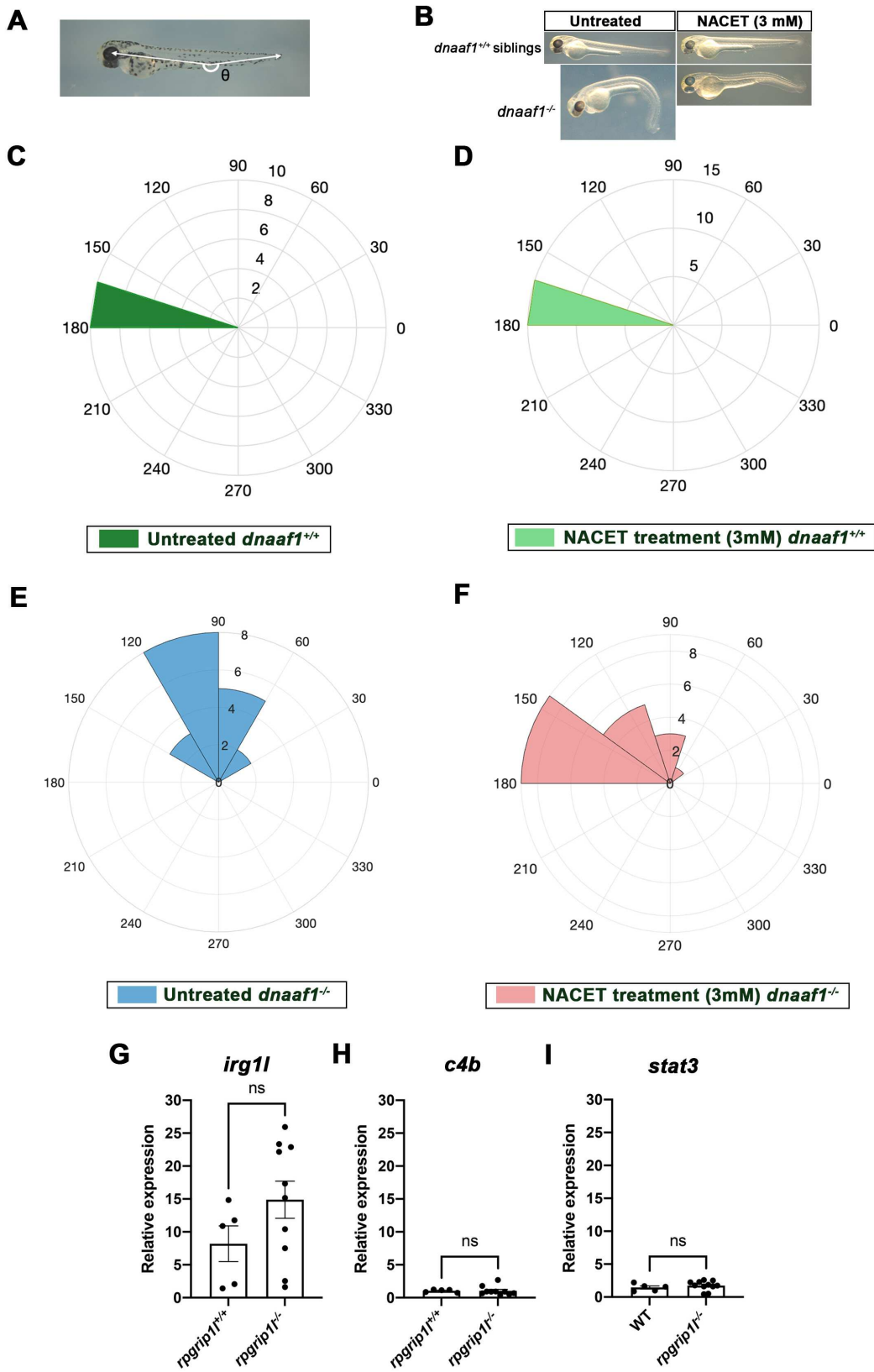
Djebar et al. Supplementary Figure 3

Supplementary figure 3: Genetic deletion of *urp2* in *rpgr1p1^{-/-}* fish does not have any beneficial effect on scoliosis penetrance or severity and absence of compensatory upregulation of *urp* family members in *urp2^{-/-}*.

(A-E) Expression levels of *urp2* (A), *urp1* (B), *urp* (C), *uts2a* (D), *uts2b* (E) in zebrafish at adult stage (13 weeks). Each dot represents the value measured for one fish, dots for straight fish are green and dots for curved fish are purple. (n=5 *rpgr1p1^{+/+}*; *urp2^{+/+}*, n=9 *rpgr1p1^{+/+}*; *urp2^{-/-}*, n=11 *rpgr1p1^{-/-}*; *urp2^{+/+}*, n=10 *rpgr1p1^{-/-}*; *urp2^{-/-}*). Expression levels for each gene are compared to *lsm12b* housekeeping gene. Statistical analysis was performed using Turkey test where ns means non significant, ** P < 0.01, **** P < 0.0001 with error bars represent s.d. None of the *urp* family member is upregulated in *rpgr1p1^{-/-}*; *urp2^{-/-}* fish.

(F-G) Quantification of body axis curvature on dorsal and lateral positions at 2 (B) and 4 months (C). Each dot represents the curvature index of one fish. Statistical analysis was done using Tukey's multiple comparisons test where ****P < 0.0001, with error bars representing s.d. At 2 months: n=30 *rpgr1p1^{+/+}*; *urp2^{+/+}*, n=26 *rpgr1p1^{+/+}*; *urp2^{-/-}*, n=27 *rpgr1p1^{-/-}*; *urp2^{+/+}*, n=55 *rpgr1p1^{-/-}*; *urp2^{-/-}*, n=32 *rpgr1p1^{-/-}*; *urp2^{-/-}*. At 4 months: n=9 *rpgr1p1^{+/+}*; *urp2^{+/+}*, n=7 *rpgr1p1^{+/+}*; *urp2^{-/-}*, n=27 *rpgr1p1^{-/-}*; *urp2^{+/+}*, n=48 *rpgr1p1^{-/-}*; *urp2^{+/+}*, n=27 *rpgr1p1^{-/-}*; *urp2^{-/-}*.

(H) Rose plot representing combined Cobb angle measurement at 4 months of *rpgr1p1^{+/+}*; *urp2^{+/+}* (n=7) in green, *rpgr1p1^{+/+}*; *urp2^{-/-}* (n=6) in blue, *rpgr1p1^{-/-}*; *urp2^{+/+}* (n=10) in pink and *rpgr1p1^{-/-}*; *urp2^{-/-}* (n=7) in yellow. Cobb angle measurement were performed on digested fish skeleton. One example of digested skeleton for each genotype is presented below its corresponding rose-plot.



Djebar et al. Supplementary Figure 4

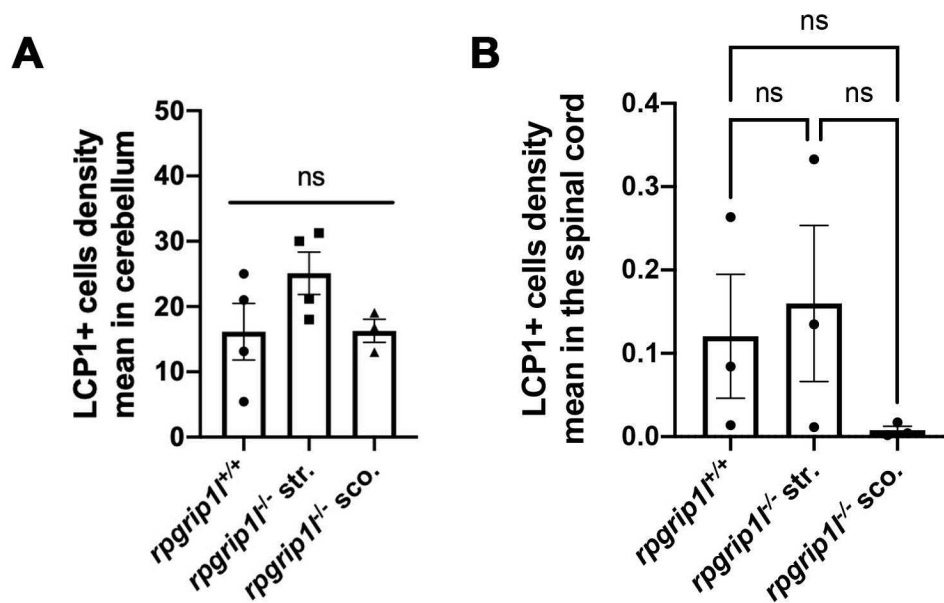
Supplementary figure 4: Biological assay of NACET activity on *dnaaf1*^{-/-} embryos and expression level of three immune markers at adult stage.

(A) Angle theta (θ) measurement between the eye and the tail extremity corresponding to the curvature index on embryo.

(B) Lateral views of 60-hpf representative embryos showing axial curvature phenotypes. *dnaaf1*^{+/+} siblings exhibits a straight axis (untreated condition) and *dnaaf1*^{-/-} embryos demonstrate characteristic curly tail down (CTD) phenotype (untreated condition). Treatment of *dnaaf1*^{-/-} mutants at 27 hpf with 3 mM NACET can suppress CTD defects. In contrast, treatment of *dnaaf1*^{+/+} siblings embryos with 3 mM NACET does not affect axis curvature. Embryos measured around 2.5 to 3 mm.

(C-F) Roseplots representing the theta angle of *dnaaf1*^{+/+} and *dnaaf1*^{-/-} in untreated and NACET treated (3mM) conditions. Embryos were treated from 27hpf to 2.5 dpf and angles were measured at the end of the treatment. Untreated *dnaaf1*^{+/+} are represented in (C – dark green), and treated ones (D – light green). Untreated *dnaaf1*^{-/-} are represented in (E – blue) and treated ones (F – red). NACET treatment (3 mM) is able to rescue curly tail down phenotype in *dnaaf1*^{-/-} without affecting the controls.

(G-I) Comparison of expression levels of *irg1l* (G), *c4b* (H), *stat3* (I) at adult stage (13 weeks) between *rpgr1p1*^{+/+} siblings and *rpgr1p1*^{-/-}. Each dot represents the expression level of one fish. For *irg1l* and *c4b* markers, 5 *rpgr1p1*^{+/+} siblings and 10 *rpgr1p1*^{-/-} were analysed. For *stat3* marker, 5 *rpgr1p1*^{+/+} siblings and 11 *rpgr1p1*^{-/-} were analysed. Expression levels are compared to *lsm12b* housekeeping gene. Statistical analysis was performed using unpaired t-test where ns means non significative, with error bars represent s.d.

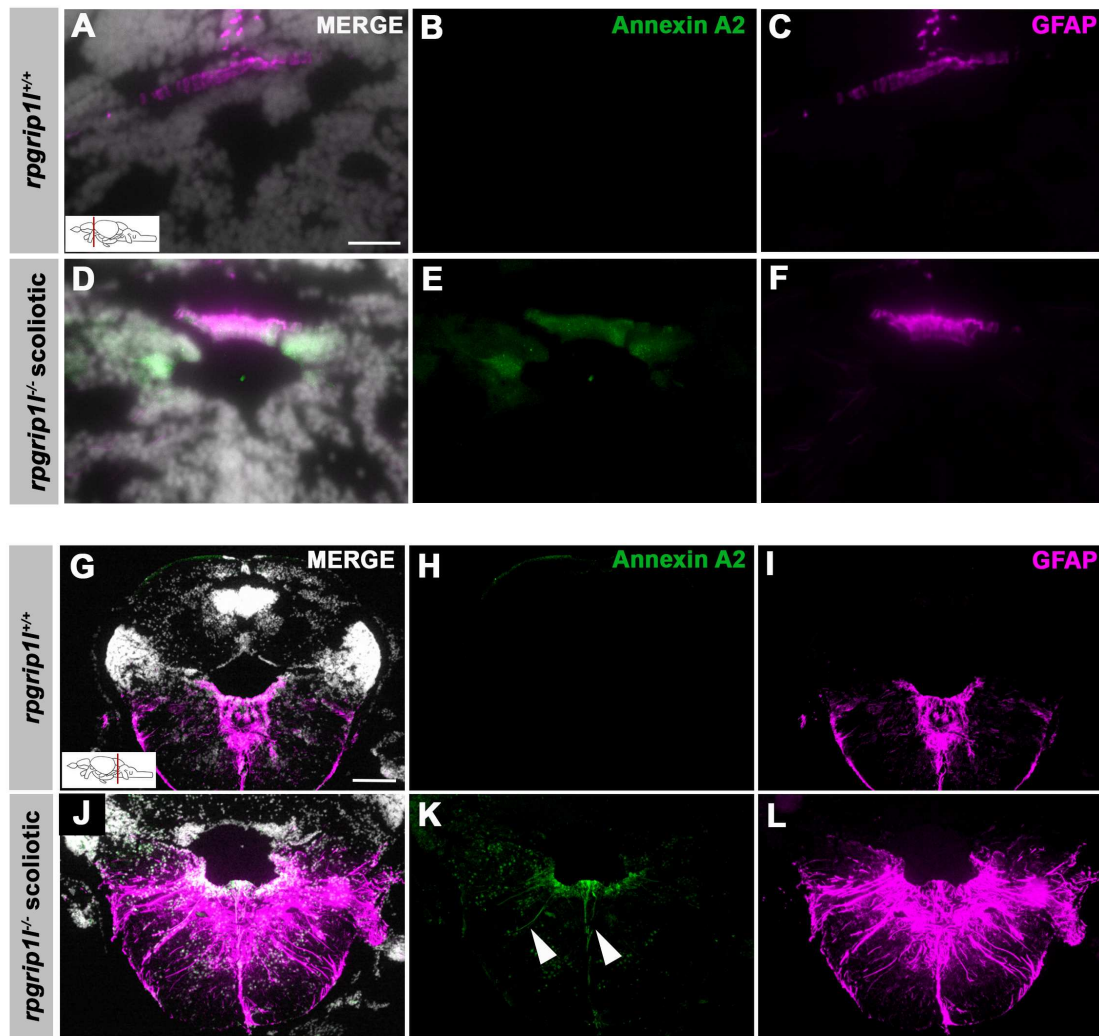


Djebar et al. Supplementary Figure 5

Supplementary figure 5: LCP1+ cells density quantification in different regions of the central nervous system

(A) Quantification of LCP1+ cells density mean in cerebellum region of 8 weeks juvenile fish (N=1). The analysis compared straight *rpgrip1^{-/-}* (n=4) and scoliotic *rpgrip1^{-/-}* fish (n=3) to *rpgrip1^{+/+}* siblings (n=4). Statistical analysis was performed using Tukey's multiple comparisons test where ns means non significant with error bars represent s.d. "str" means straight and "sco" means scoliotic.

(B) Quantification of LCP1+ cells density mean in the spinal cord of 8 weeks juvenile fish (N=1). The analysis compared straight *rpgrip1^{-/-}* (n=4) and scoliotic *rpgrip1^{-/-}* fish (n=3) to *rpgrip1^{+/+}* siblings (n=4). Statistical analysis was performed using Tukey's multiple comparisons test where ns means non significant with error bars represent s.d. "str" means straight and "sco" means scoliotic.



Djebar et al. Supplementary Figure 6

Supplementary figure 6: Increased amount of Annexin A2 and GFAP in SCO secretory cells and cells lining the rhombencephalic ventricle of *rpgrip1^{-/-}* scoliotic fish

(A-F) Immunostaining of Annexin A2 (green) and Glial fibrillary acidic protein (magenta) with DAPI (white) on transverse brain sections at the SCO level in controls (A-C) and scoliotic *rpgrip1^{-/-}* fish (D-F) at 8 wpf. Scoliotic *rpgrip1^{-/-}* fish upregulate Annexin A2 and GFAP in overlapping territories. Scale bar: 20 μ m.

(G-L) Immunostaining of Annexin A2 (green) and Glial fibrillary acidic protein (magenta) with DAPI (white) on transverse brain sections at the cerebellum level in controls (G-I) and scoliotic *rpgrip1^{-/-}* fish (J-L) at 8wpf. Scoliotic *rpgrip1^{-/-}* fish present an upregulation of annexin A2 expression in GFAP+ cells (K-L). Scoliotic *rpgrip1^{-/-}* fish upregulate Annexin A2 and GFAP in overlapping territories. Some Anxa2 labelled cells

have a longue protrusion (white arrow) projecting towards the pial membrane of the neural tube. Scale bar: 100 μm .

Discussion et perspectives

Mon projet de thèse a eu pour objectif de comprendre la cascade d'évènements participant à l'émergence de la scoliose chez le mutant de ZT *rpgr11*^{-/-}. Nous avons déterminé que la perte de *rpgr11* conduit à l'apparition de plusieurs défauts du système nerveux n'étant pas directement impliqués dans l'émergence de la scoliose chez le poisson-zèbre. Nous discuterons de ces résultats dans la partie 4. de la discussion.

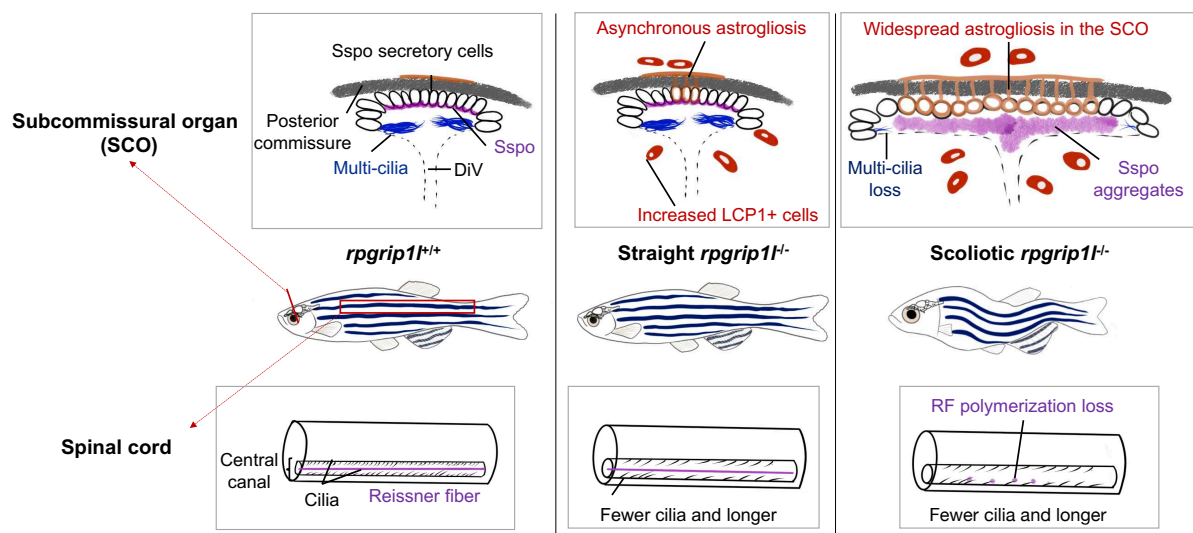


Figure 33 : Schéma résumant les principaux résultats obtenus pendant la thèse.

La partie supérieure se concentre sur l'organe subcommissural (SCO) : Les mutants *rpgr11*^{-/-} droits présentent un phénomène d'astrogliose asynchrone sur les cellules sécrétrices de l'organe subcommissural, qui s'accompagne d'augmentation de cellules immunitaires autour de cet organe. Les mutants scoliotiques perdent les multi-cils bordant l'organe subcommissural, coïncidant avec la perte de la polymérisation de la fibre de Reissner. L'astrogliose se généralise à toutes les cellules sécrétrices du SCO. La partie inférieure se localise sur la moelle épinière : les mutants *rpgr11*^{-/-} présentent une diminution du nombre de cils dans le canal central associée une augmentation de la longueur. Les mutants scoliotiques perdent la polymérisation de la fibre de Reissner dans le canal central, avec uniquement la présence d'agrégats (Schéma réalisé manuellement).

De plus, nous avons observé un nouveau phénomène d'astrogliose qui apparaît de manière asynchrone chez les mutants droits *rpgr11*^{-/-} et qui se maintient chez les mutants scoliotiques (Figure 33). Cet événement est accompagné d'une augmentation de cellules immunitaires dans le parenchyme du système nerveux central et

notamment au niveau du SCO. Leur localisation coïncide avec la perte de touffes multiciliées situées latéralement au SCO et la perte de polymérisation de la FR chez les mutants scoliotiques. Nous aborderons ces différents évènements en détails dans la partie 5. de la discussion. Nous procéderons ensuite à une comparaison avec les phénotypes observés chez d'autres modèles de poisson-zèbre de SI identifiés. Enfin, nous aborderons la pertinence de notre étude pour mieux comprendre l'étiologie de la SI chez l'homme dans la partie 6. de la discussion.

4. Défauts du système nerveux du mutant *rpgr11*^{-/-} ne contribuant pas directement à la courbure de l'axe

4.1. Défauts de la porte sélective ciliaire et des mono-cils

Rpgr11 est une protéine de la zone de transition qui contrôle l'entrée et la sortie des protéines du cil. Nous avons observé une diminution de la localisation ciliaire de la protéine Arl13b dans le cil, déjà présente chez un mutant *rpgr11*^{-/-} droit, suggérant une altération de la fonction de porte sélective ciliaire. Ce phénotype est également observé chez d'autres modèles déficients pour le gène *Rpgr11* comme dans les cellules en culture NIH3T3 *Rpgr11*^{-/-} (Wiegering et al. 2021). Ces résultats suggèrent donc que la perte de *Rpgr11* pourrait conduire à une altération de la composition de la zone de transition et du transport dépendant de la présence d'Arl13b. Ceci pourrait conduire à un défaut de différentes voies de signalisation suite à une mauvaise localisation d'effecteurs et/ou de leur récepteur respectif dans le cil. Nous avons notamment observé une surexpression du gène *pkd1* (x19,4 dans le tronc, et x6,9 dans le cerveau) au cours de notre analyse transcriptomique. Le gène *pkd1* code pour la protéine PC1 qui est capable de se localiser au cil pour agir comme mécano-senseur. Il serait donc intéressant de voir si la protéine PC1 est toujours capable de se localiser au cil dans les mutants *rpgr11*^{-/-}, si nous disposions d'un anticorps reconnaissant cette protéine chez le poisson. Dans le cas où la fonction de porte ciliaire est altérée, une surexpression du gène *pkd1* pourrait alors être expliquée pour compenser un défaut de localisation de la protéine au cil. Cette hypothèse pourrait également être testée chez les mammifères, par immuno-marquage de protéine étiquetée après transfection à défaut d'anticorps satisfaisant.

De manière intéressante, nous avons observé par microscopie électronique à balayage la présence de mono-cils avec des renflements au niveau de la partie distale dans le rhombencéphale. Ces défauts rappellent les phénotypes retrouvés en cas de défaut de transport rétrograde, comme chez le mutant murin pour la dynéine cytoplasmique 2 chaîne lourde 1 (*dnchc2*) : les cils présentent des renflements au niveau distal des cils (Huangfu et Anderson 2005). Les protéines du complexe BBSome participent également au transport rétrograde dans le cil. Les souris déficientes pour *Bbs4*^{-/-} présentent au niveau du tractus respiratoire des cils motiles anormaux avec la présence de protrusions à l'extrémité du cil (Shah et al. 2008). La

microscopie électronique avait révélé une accumulation de vésicules dans le cil. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse d'un défaut de transport rétrograde dans le cil chez les mutants *rpgr11^{-/-}*, qui expliquerait à la fois une accumulation de matériel à l'extrémité du cil et une longueur plus importante.

IFT family/motors	IFT particles and motors associated genes	Fold change	-Log10(p-value)
IFT-A	<i>ift43</i>	1,86	2,01
IFT-B	<i>ift81</i>	1,92	4,75
	<i>ift22</i>	1,85	2,81
	<i>ift57</i>	1,65	2,87
	<i>ift46</i>	1,65	2,77
	<i>ift172</i>	1,48	3,00
	<i>ift52</i>	1,42	2,16
	<i>ift74</i>	1,38	2,11
Motors	<i>kif3a</i>	1,31	2,0
	<i>kif17</i>	2,03	2,9

Tableau 2 : Gènes surexprimés dans l'analyse transcriptomique impliqués dans le transport antérograde.

L'analyse transcriptomique révèle une surexpression de plusieurs gènes codant pour des IFT-B et des moteurs couplés aux IFT-B (Tableau 2) impliqués dans le transport antérograde. Cette surexpression chez le mutant *rpgr11^{-/-}* pourrait traduire une compensation des défauts de transport rétrograde plutôt qu'un transport rétrograde accru. De plus, les IFT possèdent une similitude au niveau de la séquence et de la structure avec les composants de la protéine d'enveloppe I (COPI) et des enveloppes de clathrine (Jékely et Arendt 2006). Si les protéines IFT-B s'accumulent dans le cil du fait d'un défaut de transport rétrograde, elles pourraient alors initier la formation de vésicules, qui conduiraient à la formation de ces protrusions dans le cil.

4.2. Dilatation des cavités du système nerveux

Nous avons observé que les mutants *rpgr11^{-/-}* présentent un élargissement des ventricules au niveau du rhombencéphale (visualisés par transparenisation du cerveau),

mais également dans d'autres régions du cerveau (résultats non montrés dans l'article), ainsi qu'un élargissement du canal central, avant l'apparition de la scoliose.

4.2.1. Hypothèse de défaut de motilité des cils conduisant à une réduction de flux du LCS

La dilatation des cavités est généralement causée par une accumulation de LCS, dû à un défaut de circulation de ce dernier, qui entraîne alors une hydrocéphalie. Nous n'avons pas mesuré la circulation du LCS mais nous pouvons faire l'hypothèse que les mutants scoliotiques *rpgr1^{1/-}* présentent une altération de la circulation du LCS pour deux raisons. La première est que de nombreuses cellules épendymaires ont perdu leurs touffes multi-ciliées, qui participent activement à la circulation du LCS. La seconde est la présence d'agrégats de sco-spondine dans les ventricules du cerveau, antérieurement au SCO, au niveau des plexus choroïdes et donc situés dans la direction opposée au flux de LCS qui s'écoule normalement vers la région postérieure du tectum. Ce phénotype est très souvent observé chez des mutants scoliotiques présentant une altération de la circulation du LCS (Grimes et al. 2016; Van Gennip, Boswell, et Ciruna 2018; Rose et al. 2020; Bearce et al. 2022). Pour tester expérimentalement l'existence d'un défaut de circulation du LCS avant l'apparition de la scoliose et donc la perte de la plupart des touffes de multi-cils et la présence d'agrégats de sco-spondine, nous pourrions injecter un colorant fluorescent dans les ventricules du cerveau de mutants *rpgr1^{1/-}* âgés de 3-4 semaines, et ensuite évaluer la progression de ce colorant dans le canal central. Faire cette analyse plus tardivement à l'émergence de la scoliose est cependant compliquée car la pigmentation du poisson empêche la visualisation de la progression du colorant fluorescent. De plus, l'ossification de la boîte crânienne du poisson rend difficile l'injection du colorant.

La dilatation survient avant l'apparition de la scoliose, à un stade où les touffes multi-ciliées sont encore présentes chez le mutant *rpgr1^{1/-}*. Nous pouvons donc émettre plusieurs hypothèses permettant d'expliquer l'élargissement des cavités du système nerveux.

4.2.2. Hypothèse d'un élargissement de la surface apicale des cellules conduisant à un élargissement des cavités

La première hypothèse implique une augmentation de la surface apicale des cellules, ce qui conduirait à une augmentation de la taille des cavités. En effet, la voie de signalisation mTORC1 est impliquée dans la morphogénèse des ventricules du cerveau chez la souris (Foerster et al. 2016). La perte conditionnelle de Kif3a dans les cellules de glie radiaire chez la souris à E10.5 conduit à un élargissement progressif des ventricules du cerveau. Les cellules de glie radiaire mutées pour Kif3a présentent une augmentation de leur surface apicale suite à une sur-activation de la voie mTORC1. Un traitement par la rapamycine, un inhibiteur de cette voie est capable de sauver le phénotype. La protéine Rpgrip1l possède des fonctions non ciliaires, où elle peut agir positivement sur l'autophagie via la diminution de mTORC1 du fait de l'inhibition de la signalisation d'Akt (Struchtrup et al. 2018). La perte de Rpgrip1l dans des fibroblastes murins conduit à une sur-activation de mTORC1, et une inhibition de l'autophagie. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que dans le poisson-zèbre, la perte de Rpgrip1l conduit à une sur-activation de mTORC1, entraînant une augmentation de la surface apicale des cellules. Pour confirmer cela, nous pourrions tester s'il existe un élargissement de la surface apicale des cellules du cerveau en utilisant un anticorps anti-Claudin 5 sur cerveau juvéniles disséqués comme (Xie et al. 2023). Si c'est le cas, nous pourrions mesurer le niveau d'activité de mTORC1 par western blot sur ses cibles pS6 ou p4Ebp1 sur des extraits de cerveaux disséqués de contrôles et de mutants *rprip1^{-/-}*.

4.2.3. Hypothèse d'une altération du contenu du LCS

4.2.3.1. Augmentation de la production de LCS par le plexus choroïde

La seconde hypothèse implique une modification de la production du LCS, suite à une altération du plexus choroïde conduisant alors à une dilatation des ventricules. Le LCS est produit par le plexus choroïde où le cil joue un rôle important dans la composition

ionique (Na^+ , HCO_3^- , Cl^-). Les échanges d'ions sont permis grâce à des transporteurs spécifiques situés à la surface des cellules du plexus choroïde et ceci influence le pH du LCS (Banizs et al. 2007). La sécrétion du LCS et de ces ions est contrôlée positivement par l'AMP cyclique (AMPC). Le mutant hypomorphe murin $\text{Tg737}^{\text{orpK}}$ présente une altération de la morphologie des cils des cellules de l'épendyme et du plexus choroïde et développe une hydrocéphalie pendant la période périnatale (Banizs et al. 2005). Chez ce mutant, l'hydrocéphalie est liée à une altération de la fonction du plexus choroïde qui produit plus d'AMPC ce qui conduit à une augmentation des concentrations de Na^+ , HCO_3^- , mesurées dans le milieu extracellulaire des explants de plexus choroïde mis en culture. Au cours de notre analyse du plexus choroïde, nous avons observé chez certains mutants $\text{rpgrip1}^{-/-}$, une altération de la morphologie des mono et des multi-cils (mono cils plus longs ou absents, présence de protrusion au niveau proximal des cils). Cette altération et/ou l'absence de cils pourrait conduire alors à un défaut de localisation des canaux impliqués dans le transport ionique et la production du LCS.

4.2.3.2. Altération de la composition ionique du LCS

La troisième hypothèse repose sur l'augmentation de l'expression du transporteur *Cftr* chez le mutant $\text{rpgrip1}^{-/-}$ qui pourrait conduire à une augmentation de LCS dans les cavités (Tableau 3).

Tableau 3 : Gène *cftr* surexprimé dans l'analyse transcriptomique impliqué dans le transport d'ions chlorure et d'eau

Process	Gene	Trunk		Brain	
		Fold change	-Log10(p-value)	Fold change	-Log10(p-value)
Transporter	<i>cftr</i>	11,62	7,63	7,322	4,05

En effet, ce transporteur promeut le transport vers la lumière des cavités d'ions Cl^- et d'eau, conduisant à une augmentation du volume de liquide dans la vésicule de Kupffer chez le poisson-zèbre (Roxo-Rosa et al. 2015), et dans les kystes rénaux retrouvés dans des modèles de la maladie ADPKD (Torres et Harris 2014). Les morphants *pkd2* présentent une augmentation significative de la sécrétion de liquide médiée par la *Cftr* conduisant à un élargissement du lumen de la vésicule de Kupffer

(Roxo-Rosa et al. 2015; Oliveira et al. 2021). Un traitement de drogue inhibant spécifiquement le transporteur Cftr est difficilement réalisable chez le poisson-zèbre au stade juvénile. Nous pourrions alors tenter d'enlever un allèle de ce gène chez le mutant *rpgr11^{-/-}* grâce à l'outil génétique CRISPR-Cas9 afin de voir si la réduction d'expression de ce transporteur permet de réduire la dilatation des cavités.

5. Défauts du système nerveux contribuant à la scoliose

5.1. Proposition de cascade d'événements participant à la scoliose

5.1.1. Phénomène d'astrogliose-like

Les mutants *rpgr11^{-/-}* expriment fortement la GFAP au niveau des cellules sécrétrices du SCO (Figure 33) et les cellules bordant le ventricule rhombencéphalique au niveau du cervelet par rapport aux contrôles. Cet événement apparaît de manière asynchrone chez les mutants droits mais persiste chez les mutants scoliotiques. La GFAP est un marqueur de plusieurs types cellulaires : les cellules de la glie radiaire, et les astrocytes. Chez les mammifères, l'activation des astrocytes, appelée astrogliose, conduit à une augmentation de l'expression de la GFAP au sein de ces cellules. Cette astrogliose est caractérisée par l'activation des astrocytes suite à un dommage du système nerveux, comme une blessure ou une infection (Eddleston et Mucke 1993; Pekny et Nilsson 2005). Elle résulte en une modification de la morphologie des cellules et de l'expression des différents marqueurs moléculaires, notamment des filaments intermédiaires (une augmentation de la GFAP, vimentine, nestine, S100 β , glutamine synthétase). Le poisson-zèbre ne possède cependant pas d'astrocytes mais un type cellulaire appelé astroglie radiaire qui exprime plusieurs marqueurs d'astrocytes comme S100 β et la glutamine synthétase (Cuoghi et Mola 2009). Elles peuvent s'activer pour jouer le rôle d'astrocytes comme chez les mammifères. En fonction du défaut dans le système nerveux, leur activation peut être en faveur d'une réparation, ou peut-être délétère pour le tissu (Lyons et Talbot 2015). Par exemple en cas de blessure dans la région du télencéphale chez des poissons de 8-10 mois, les cellules de la glie radiaire présentent une réponse de type astrogliose (avec une augmentation de la GFAP) dans un environnement présentant des cellules immuno-marquées par LCP1 (L-plastine, marqueur de macrophages/microglie (Narra et al. 2023)) (Kroehne et al. 2011). Ce processus d'astrogliose est une réponse favorisant la prolifération des précurseurs neuraux et a pour conséquence une augmentation de la neurogénèse. Au contraire chez la souris, le processus inflammatoire et l'astrogliose contribuent à la formation de cicatrices gliales qui persistent après la blessure sans contribution à la neurogénèse (Sofroniew 2009).

Chez le mutant *rpgr11^{-/-}*, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses qui pourraient expliquer l'origine de l'augmentation du phénomène d'astroglie-like dans le SCO et dans les cellules ventrales bordant le ventricule rhombencéphalique du cervelet.

5.1.2. Dysfonctionnement du métabolisme mitochondrial et de l'expression de la protéine GSK3 β

Nos deux premières hypothèses reposent sur l'analyse Métascape sur des cerveaux disséqués de mutants *rpgr11^{-/-}* et contrôles. Nous avons observé une diminution de plusieurs enzymes appartenant au métabolisme du pyruvate chez les mutants *rpgr11^{-/-}* (tableau 4).

Tableau 4 : Protéines d'intérêts sélectionnées dans l'analyse protéomique. Ici sont représentées des protéines diminuées appartenant au métabolisme du pyruvate.

Process	Protein	Expression variation (%)	p-value
Pyruvate metabolism	Glo1	-40%	0,015
	Aldh3a2a	-40%	0,022
	Grhpra	-30%	0,045

Le pyruvate est un intermédiaire important pour plusieurs processus biologiques qui participent à la production d'énergie dans la mitochondrie (McCommis et Finck 2015). De manière très intéressante, une étude récente a mis en évidence que la perte de Peroxiredoxin 5, une enzyme mitochondriale anti-oxydante, par injection de morpholino chez l'embryon Xénope, conduit à une réduction du niveau d'expression transcriptionnelle de l'enzyme pyruvate kinase, une enzyme impliquée dans le métabolisme du pyruvate (Ji et al. 2019). Les deux protéines Peroxiredoxin 5 et Pyruvate kinase sont exprimées dans les cellules multi-ciliées chez le xénope et leur déplétion conduit alors à une réduction importante voire à leur perte dans le cas de Peroxiredoxin 5 des touffes multi-ciliées de l'épiderme de xénope. De la même manière, les morphants *peroxiredoxin 5* perdent leur cil primaire au niveau du tube neural. Une analyse fonctionnelle sur les cellules en culture RPE a révélé que la perte de l'une de ces deux protéines conduit à une augmentation des ROS et que cette augmentation est responsable de la perte des cils. Les mitochondries présentent alors

une morphologie anormale avec des bourgeonnements et une réduction de leur nombre. Ces résultats nous permettent de suggérer que la perte de *rpgr11^{-/-}* conduirait à un dysfonctionnement du métabolisme du pyruvate et un dysfonctionnement mitochondrial conduisant *in fine* à la perte des cils. Ce dysfonctionnement mitochondrial pourrait être en faveur d'une activation du phénomène d'astroglie déclenché par la production de ROS par la mitochondrie. Pour confirmer cela, il serait intéressant d'analyser par microscopie électronique à transmission, la morphologie des mitochondries dans les cellules sécrétrices du SCO et les cellules de glie radiaires.

En parallèle de ces observations, nous avons également observé une augmentation de l'enzyme glycogène synthase kinase-3 bêta ($Gsk3\beta$) chez le mutant *rpgr11^{-/-}* (x2,4 et P : 0,001). Cette enzyme est impliquée dans le développement du système nerveux, et dans la transduction de plusieurs voies de signalisation cellulaire dans le cerveau, notamment Wnt et Hedgehog (Duda et al. 2018). Elle est retrouvée augmentée dans plusieurs pathologies neurodégénératives telles que Alzheimer ou Parkinson (Silva et al. 2014; Nagao et Hayashi 2009). La suractivation de $Gsk3\beta$ promeut la stimulation des astrocytes et la microglie. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'une augmentation aberrante de la protéine $Gsk3\beta$ chez le mutant *rpgr11^{-/-}* est responsable d'une activation du processus d'astroglie.

5.1.3. Recrutement de cellules immunitaires au sein du territoire du SCO

Le phénomène d'astroglie est généralement couplé au recrutement de cellules de l'inflammation comme la microglie/les macrophages (Sofroniew 2009). Suite à son activation, la microglie va adopter une morphologie amiboïde pour migrer sur le site de la blessure où elle phagocyte les débris cellulaires (Neumann, Kotter, et Franklin 2008; Narra et al. 2023). La microglie participe à la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires qui stimule la réponse astrogliale radiaire créant alors une boucle d'auto-régulation positive. Nous avons en effet observé la présence de cellules ramifiées dans les tissus du système nerveux, et des cellules amiboïdes autour du SCO LCP1+, proche des vaisseaux sanguins lorsque les cellules sécrétrices du SCO expriment fortement la GFAP. Ces deux événements concomitants suggèrent que la présence de ces cellules LCP1+ proche des cellules sécrétrices du SCO GFAP+

réguleraient positivement le phénomène d'astrogliose. Il serait intéressant d'utiliser une lignée transgénique *tg(il1 β :GFP-F)* (Nguyen-Chi et al. 2014) ou *tgBAC(tnfa:eGFP)* (Marjoram et al. 2015) pour déterminer si les cellules de la microglie sécrètent des facteurs pro-inflammatoires qui participeraient alors à l'activation de la GFAP dans les cellules sécrétrices du SCO. Il reste à déterminer pourquoi les mutants *rpgr11^{-/-}* présentent une invasion de cellules LCP1+ dans différents territoires du cerveau. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un dysfonctionnement du métabolisme du pyruvate conduit à défaut mitochondrial, induisant la mort neuronale ou la mort d'autres types cellulaires. L'analyse protéomique a en effet révélé une surexpression de plusieurs protéines impliquées dans l'induction du processus de mort cellulaire. Les cellules LCP1 seraient donc recrutées au sein du système nerveux pour phagocyter les débris cellulaires. Nous pourrions alors réaliser un marquage Caspase-3 sur des coupes de cerveau afin d'évaluer si le mutant *rpgr11^{-/-}* expérimente une vague de mort cellulaire.

5.1.4. Perte ciblée des touffes multi-ciliées dans le SCO

Nous avons observé que la perte des touffes multi-ciliées dans le SCO des mutants *rpgr11^{-/-}* coïncide avec l'apparition de la scoliose (Figure 33). La microscopie électronique à balayage a également mis en évidence que les mutants scoliotiques *rpgr11^{-/-}* perdent les cellules multi-ciliées du cervelet. Dans le choroïde plexus antérieur, la perte de *rpgr11^{-/-}* ne conduit pas inévitablement à un défaut de morphologie ciliaire, comme chez le mutant *katbn1^{-/-}* (Meyer-Miner et al. 2022) nous permettant de conclure que *Rpgr11* n'est pas requis pour le maintien des multi-cils et des mono-cils dans le choroïde plexus. La localisation des multi-cils sur les cellules situées latéralement au SCO suggère un rôle clé dans la polymérisation de la FR, grâce à leur battement qui pourrait permettre de générer un flux favorisant la polymérisation de la sco-spondine. Comme chez le poisson-zèbre, une analyse par microscopie électronique à balayage chez le rat a mis en évidence la présence de cellules multi-ciliées situées latéralement au SCO et la présence de mono-cils sur les cellules neuro-épithéliales sécrétrices de la sco-spondine (Collins et Woollam 1978), ce qui montre la conservation du voisinage de ces deux types cellulaires ciliés. Nous sommes les premiers à rapporter la perte des cellules multi-ciliées en sortie du SCO, visualisées sur sections transverses de cerveau de mutant scoliotique de poisson-

zèbre. Les autres équipes de recherche ayant plutôt analysé les multi-cils du cervelet par microscopie à balayage (Grimes et al. 2016; Rose et al. 2020) ou les multi-cils des plexus choroïdes en montage dorsal du poisson entier (Meyer-Miner et al. 2022).

Nous émettons donc l'hypothèse que la perte des touffes multi-ciliées des cellules situées latéralement au SCO initie l'apparition de la scoliose. Les cellules sécrétrices du SCO possèdent des caractéristiques de cellules neuro-épithéliales immatures sécrétrices qui expriment la GFAP chez la souris adulte (Corales et al. 2022). Ainsi en cas de dysfonctionnement de ces cellules, tel qu'un dysfonctionnement mitochondrial, une surexpression de la GFAP surviendrait dans ces cellules et pourrait conduire à un phénomène d'astrogliose radiaire. Comme mentionné précédemment, ce phénomène est souvent couplé au recrutement de cellules inflammatoires (macrophages ou microglie immuno-marquée par l'anticorps L-plastine). La microglie peut adopter plusieurs morphologies dont une forme ramifiée et une forme amiboïde. La microglie adopte une morphologie ramifiée lorsqu'elle est dans les tissus, et amiboïde lorsqu'elle se trouve proche des vaisseaux endothéliaux, ou proche des niches de cellules souches neurales. En cas de blessure dans une région du cerveau, les cellules LCP1+ sont recrutées au niveau du site de lésion transitoirement (Kyritsis et al. 2012; Baumgart et al. 2012; Ghaddar et al. 2021; Narra et al. 2023) et une augmentation de marqueurs oxydants sont observés. Chez le modèle murin, la présence d'une forme constitutivement active de Nf-kB dans les astrocytes est suffisante au stade précoce post-natale (P2) pour induire un recrutement de macrophages dans les tissus, et favoriser la perte des touffes multi-ciliées. L'enrichissement de ces deux types cellulaires favorise alors un environnement neuro-inflammatoire (Lattke et al. 2012). Au cours de notre analyse par immunofluorescence, nous avons observé le recrutement de cellules LCP1+ avec une forme amiboïde. La présence du phénomène d'astrogliose en présence de cellules immunitaires à proximité des cellules multi-ciliées du SCO suggère qu'elles pourraient participer à la perte de ces touffes et initier l'apparition de la scoliose.

5.1.5. Déficit de maintenance de la FR

La perte de la polymérisation de la FR coïncide avec l'apparition de la scoliose chez les mutants *rprip1^{-/-}* (Figure 33). Les mutants scoliotiques *rprip1^{-/-}* présentent uniquement la présence d'agrégats dans les ventricules du SCO et du canal central

de la moelle épinière. Nous pouvons de plus affirmer que la perte de polymérisation de la FR n'est pas due à un défaut de sécrétion de la sco-spondine par le SCO, car nous observons l'accumulation de matériel au sein du ventricule. Notre analyse protéomique est davantage en faveur d'une augmentation du processus de transport vésiculaire, et donc potentiellement d'une augmentation de la sécrétion de sco-spondine. La perte de polymérisation de la FR est présente chez plusieurs modèles de scoliose idiopathique comme le mutant *ptk7^{-/-}*, *cfap298^{-/-}* (Grimes et al. 2016; Rose et al. 2020). Ce défaut de polymérisation coïncide avec une réduction de la vitesse de circulation du flux du LCS chez ces mutants, suggérant un défaut de motilité ciliaire. Chez le mutant *rpgr1^{-/-}*, nous émettons l'hypothèse que la perte spécifique des touffes multi-ciliées bordant le SCO diminue le flux du LCS et contribue à la perte de polymérisation de la FR, initiant l'apparition de la scoliose.

5.2. Validation de la cascade d'événements grâce aux expériences de sauvetage

5.2.1. Expérience de traitement anti-inflammatoire/anti-oxydant

Notre analyse suggère que les mutants droits *rpgr1^{-/-}* expérimentent une invasion précoce de cellules immunitaires marquées par l'anticorps L-Plastine, au niveau des régions internes du cerveau, peu riches en noyaux et riches en fibres nerveuses. Un traitement sur le long terme anti-inflammatoire/antioxydant pendant la période juvénile est capable de diminuer significativement la pénétrance d'un facteur x2 et de manière importante la sévérité de la scoliose. Nous avons ainsi conclu qu'un processus inflammatoire participe à l'émergence de la scoliose.

Cet épisode inflammatoire est précoce et transitoire car les marqueurs d'inflammation sont absents par RT-qPCR à l'âge adulte et l'enrichissement en cellules Lcp1 est diminué chez les juvéniles scoliotiques, contrairement aux marqueurs d'inflammation observés chez les mutants scoliotiques *sspo^{dmh4/+}* et *ptk7^{-/-}* qui sont maintenus dans les mutants scoliotiques sévères jusqu'au stade de 3 à 4 semaines (7 à 8 mm) (Rose et al. 2020; Van Gennip, Boswell, et Ciruna 2018). De plus, l'analyse protéomique sur des cerveaux disséqués adultes scoliotiques a mis en évidence une quantité plus importante de facteurs du complément. Cela souligne donc que le processus inflammatoire se présente sous la forme de deux vagues, la première correspond à une invasion de cellules immunitaires (microglie ou macrophages) dans le

parenchyme du système nerveux qui est visiblement résolue chez des mutants scoliotiques, puis une autre population de cellules se met à exprimer des facteurs du complément chez l'adulte. Cette population pourrait correspondre aux cellules astrogliales présentant une augmentation de GFAP qui expriment les molécules du complément (Pekna et Pekny 2021). Au niveau du SCO, l'astroglie est accompagnée d'invasion de cellules immunitaires. Il serait alors particulièrement intéressant de déterminer si le traitement anti-inflammatoire par le NACET a permis de diminuer l'astroglie radiaire et de réduire l'invasion de cellules immunitaires dans le SCO chez les mutants *rpgr11*^{-/-} sauvés. Cette expérience nous permettrait de déterminer si la réduction de l'astroglie au niveau du SCO permet de prévenir la perte des touffes multi-ciliées chez les mutants sauvés *rpgr11*^{-/-}. Il serait également intéressant d'évaluer si les mutants sauvés ont maintenu une FR. Au stade embryonnaire chez le mutant *cfap298*^{-/-}, le processus inflammatoire intervient après la perte de la FR et n'est pas capable de la restaurer (Rose et al. 2020). Ainsi, dans le cas où l'astroglie et la perte de la FR ne seraient pas résolues, nous pourrions affirmer que ces processus sont en aval de la perte de la FR.

5.2.2. Sauvetage tissu spécifique dans les cellules ciliées motiles

Puisque *rpgr11* code une protéine ciliaire ubiquitaire et que le mutant développe une scoliose pendant la période juvénile, nous nous sommes demandées quelle(s) population(s) de cils exprimant Rpgr11 est importante pour maintenir un axe droit. Au cours de notre analyse, nous avons déterminé que le mutant *rpgr11*^{-/-} présente une perte des multi-cils qui bordent le SCO seulement dans les poissons qui ont débuté le processus de courbure de l'axe ainsi qu'une perte des multi-cils du cervelet. La réintroduction de RPGRIP1L sous le contrôle d'un promoteur de cellules ciliées *foxj1a* conduit à un sauvetage de la courbure chez les mutants *rpgr11*^{-/-}. De manière intéressante, *foxj1a* et *foxj1b* sont exprimés au stade embryonnaire chez le poisson-zèbre (2 et 4 dpf) dans le SCO (Olstad et al. 2019), mais aucune donnée n'a rapporté leur territoire d'expression au niveau du SCO plus tardivement dans le développement. Chez le Xénope, *foxj1* n'a pas de paralogue, et l'analyse entre les stades 36-53 a également révélé son expression au niveau du SCO (Hagenlocher et al. 2013). Grâce à la microscopie électronique à balayage, ils ont pu distinguer des cils au niveau de son territoire d'expression, mais la résolution n'a pas permis de distinguer s'il s'agit de

mono ou multi-cils. Les morphants *foxj1* chez le Xénope présentent une réduction drastique des cils au niveau du SCO avec la présence d'agrégats à la surface des cellules, qui correspondent probablement à des agrégats de sco-spondine non polymérisée (Hagenlocher et al. 2013). Chez le poisson-zèbre, le mutant *foxj1a^{-/-}* présente une courbure de l'axe, létale au stade larvaire, et D'Gama et al. ont montré que les double-mutants *foxj1b^{-/-}*, *gmnc^{-/-}*, *foxj1b^{-/-};gmnc^{-/-}* ne présentent aucune déformation de l'axe (D'Gama et al. 2021), tandis que la perte d'une copie de *foxj1a* dans le mutant *foxj1b^{-/-};gmnc^{-/-}* conduit à l'apparition d'une scoliose. Cela suggère un rôle déterminant du facteur de transcription *foxj1a* dans la droiture de l'axe. De par son territoire d'expression, nous pouvons émettre l'hypothèse que la motilité des cils dans les CMC en sortie de SCO est déterminante pour maintenir un axe droit. Pour confirmer notre hypothèse, il serait intéressant d'évaluer si la protéine 5xmyc-RPGRIP1L chez les mutants sauvés *rpgrip1^{l/-}*; Tg(*foxj1a:5xmyc-RPGRIP1L*) se localise au niveau des cellules multi-ciliées bordant le SCO et si leurs cils sont morphologiquement intègres.

5.3. Comparaison avec les autres modèles de SI de poisson-zèbre

Il existe plusieurs mutants de poisson-zèbre qui développent une SI. Nous verrons que le mutant *rpgrip1^{l/-}* présentent des similarités et des différences mettant en évidence plusieurs voies de contrôle de la courbure de l'axe.

5.3.1. Phénotypes similaires observés avec les modèles de SI

Les phénotypes observés chez le mutant *rpgrip1^{l/-}* participant à la scoliose sont similaires à deux mutants de PCP : les mutants *vangl2^{sfGFP/sfGFP};zGrad;foxj1a::iCre* et *ptk7^{-/-}* (Jussila et al. 2022; Grimes et al. 2016; Van Gennip, Boswell, et Ciruna 2018) et au mutant hypomorphe *sspo^{dmh4/+}* (Rose et al. 2020). Le mutant *vangl2^{sfGFP/sfGFP};zGrad;foxj1a::iCre* présente une perte de *vangl2* spécifiquement dans les cellules ciliées grâce à méthode de dégradation conditionnelle appelée « zGrad » (N. Yamaguchi, Colak-Champollion, et Knaut 2019). Il développe une scoliose au stade juvénile sans anomalie vertébrale. Chez les mutants *vangl2^{sfGFP/sfGFP};zGrad;foxj1a::iCre*, *ptk7^{-/-}* et *sspo^{dmh4/+}*, la scoliose est corrélée à la perte de la polymérisation de la FR et à une augmentation du niveau d'expression de

urp2 chez le mutant *ptk7*^{-/-} tandis qu'à une diminution chez le mutant *sspo*^{dmh4/+}. Ces deux mutants présentent un processus inflammatoire qui peut être contré par un traitement au NAC ou au NACET respectivement (Van Gennip, Boswell, et Ciruna 2018; Rose et al. 2020). La réintroduction de *ptk7* sous le contrôle du promoteur de cellules ciliées motiles *foxf1a* permet de sauver l'apparition de la scoliose (Grimes et al. 2016). Ces résultats établissent alors un rôle critique des protéines Ptk7 et Vangl2 au sein des cellules ciliées motiles pour le maintien d'un axe droit de la colonne vertébrale chez le poisson zèbre, ce qui suggère un lien entre les défauts de PCP et la pathogenèse de la scoliose idiopathique. De manière intéressante, au stade embryonnaire chez le poisson-zèbre, Mahuzier et al. ont notamment montré que Rpgrip1l joue un rôle dans la PCP en participant au positionnement du corps basal grâce à la stabilisation de la protéine Dsh à la base du cil dans le plancher de la moelle épinière ainsi que dans des cellules rénales en culture (Mahuzier et al. 2012). Nous proposons donc que la perte de protéines de PCP participe à l'émergence de la scoliose, en jouant sur le positionnement du corps basal des cils des cellules épendymaires et donc la production d'un flux directionnel, ce qui pourrait impacter indirectement leur maintien dans le système nerveux et la polymérisation de la RF.

5.3.2. Implication d'une autre cascade génétique contrôlant la courbure de l'axe

Grâce à la production de double-mutants, nous avons montré que l'élimination de la signalisation *urp2* chez *rpgr11*^{-/-} n'a aucun effet bénéfique sur le phénotype de courbure de l'axe. Nous concluons donc que l'augmentation de la signalisation URP chez le mutant *rpgr11* ne contribue pas à la courbure de l'axe. Étonnamment, nous observons que chez les modèles de SI, les niveaux d'expression d'*urp2* peuvent varier de manière opposée: chez les mutants scoliotiques *sspo*^{dmh4/+} (Rose et al. 2020) et *cfap298*^{-/-} (Bearce et al. 2022), le niveau d'expression d'*urp2* est diminué, tandis que chez les mutants *ptk7*^{-/-} (Meyer-Miner et al. 2022), *ccdc57*^{-/-}, *tmem67*^{-/-} (Xie et al. 2023) le niveau d'expression d'*urp2* est augmenté. Chez le mutant *katbn1*^{-/-} (Meyer-Miner et al. 2022), le niveau d'expression d'*urp2* reste inchangé. Les doubles mutants *urp1*^{-/-}; *urp2*^{-/-} (Gaillard et al. 2023; Bearce et al. 2022) développent une kyphose au stade juvénile qui évolue vers une scoliose sévère chez l'adulte, tout comme la mutation de leur récepteur Uts2r3 (Gaillard et al. 2023; Bearce et al. 2022) et ce phénotype de

courbure est différent de celui de *rpgrip1^{-/-}*. Ces données nous indiquent qu'il existe probablement un ou plusieurs mécanisme(s) indépendant des URPs permettant de contrôler la droiture de l'axe au stade juvénile, et donc différent(s) du modèle proposé pour le maintien de la courbure de l'axe chez l'embryon présentée en introduction 3.1.5. De plus, les neuropeptides *urp1* et *urp2* sont exprimés par les CSF-cNs qui bordent le canal central. Les mutants *pkd211^{-/-}*, un canal normalement exprimé par les CSF-cNs, conduit à une kyphose au stade juvénile (Sternberg et al. 2018; Marie-Hardy et al. 2023). Ce phénotype, plus léger que la scoliose celui des doubles mutants *urp1^{-/-};urp2^{-/-}* suggère une compensation fonctionnelle par des canaux de la même famille.

5.3.3. La perte de la polymérisation de la FR n'explique pas l'apparition de la scoliose chez tous les modèles de SI

Récemment, deux nouveaux modèles de SI ont émergé et présentent des phénotypes distincts des autres modèles de scoliose : le mutant *katnb1^{-/-}* présente une perte des cils du plexus choroïde qui corrèle avec l'apparition de la scoliose (Meyer-Miner et al. 2022). La réintroduction de *katnb1* sous le contrôle du promoteur *foxj1a* est capable de sauver la courbure de l'axe. Le mutant de PCP *ccdc57^{-/-}* présente un battement non coordonné des cils des cellules épendymaires conduisant à une circulation altérée du LCS et à une hydrocéphalie au stade juvénile (Xie et al. 2023). *Ccdc57* régule le positionnement des corps basaux dans les cellules épendymaires, alors que la PCP est correcte au stade embryonnaire et larvaire. Le mutant *ccdc57^{-/-}* présente une sur-expression de *urp2* dans la tête et une diminution du niveau d'expression dans le milieu du tronc. Dans les deux cas, ces mutants scoliotiques ne présentent pas de défauts de polymérisation de la FR, cependant la fibre présente un aspect ondulant avec un diamètre irrégulier et une intensité de marquage plus faible. Il est donc possible que cette fibre de morphologie altérée ne puisse exercer ses fonctions physiologiques normales, comme la stimulation de l'activité électrique des CSF-cNs ou le contrôle du niveau d'expression des URPs dans les CSF-cNs, deux « read-out » qui n'ont pas été testés dans ces modèles.

6. Pertinence du modèle pour déterminer les cascades d'événements pouvant participer à la scoliose idiopathique chez l'homme

6.1. Absence de contribution de la motilité ciliaire dans la circulation du LCS chez l'homme

Nos expériences de microscopie électronique à balayage et d'immunohistochimie ont révélé une altération de la morphologie ciliaire (multi et mono-cils) et de leur nombre dans différentes régions du cerveau : le cervelet, le rhombencéphale et dans le canal central de la moelle épinière. Ces résultats ont été associés à une dilatation des cavités du système nerveux chez les mutants *rprip11*. Le battement des multi-cils des cellules épendymaires du cerveau est très importante pour la circulation du LCS chez le poisson-zèbre. Leur perte associée à cette dilatation chez *rprip11^{-/-}* suggère donc une altération de la circulation du LCS. La réintroduction de *rprip11* sous le contrôle du promoteur de cils motiles *foxj1a* est capable de restaurer un axe droit chez les mutants *rprip11*, tout comme chez les mutants *katbn1^{-/-}* (Meyer-Miner et al. 2022) et *ptk7^{-/-}* (Grimes et al. 2016) qui présentent également une altération des cils du système nerveux et une dilatation des ventricules. Cela met alors en évidence un rôle clé d'un flux de LCS directionnel et des cils motiles pour maintenir un axe droit chez le poisson-zèbre. Mais quand est-il de l'importance de la motilité ciliaire dans la circulation du LCS chez l'homme ? Chez l'homme, la circulation du LCS se fait principalement par le système artériel pulsatif, où l'afflux du sang dans le cerveau et la contraction des artères permet de comprimer les ventricules, tandis que la relaxation des veines permet une expansion des ventricules et une progression du LCS (Preuss et al. 2013). De la même manière chez le poisson-zèbre au stade embryonnaire, le système artériel pulsatif participe à l'échange du LCS entre les cavités du cerveau, mais n'est pas l'acteur principal (Olstad et al. 2019). De plus, même si un défaut de motilité ciliaire/perte des cils sur les cellules épendymaires conduit la plupart du temps à une hydrocéphalie chez le poisson-zèbre et la souris (Grimes et al. 2016; Meyer-Miner et al. 2022; Lee 2013), c'est rarement le cas chez les patients atteints de dyskinésie ciliaire primaire. La différence d'anatomie du cerveau, notamment du volume des ventricules chez l'homme, pourrait expliquer la différence de sensibilité au développement d'une hydrocéphalie en cas de dysfonctionnement des cils des cellules épendymaires. Enfin, si l'importance de la

motilité ciliaire dans la circulation du LCS semble dépendre de l'espèce et n'est pas conservée chez l'homme, d'autres mécanismes pourraient donc participer au développement de la scoliose chez l'homme.

6.2. Absence d'évidence de la présence de fibre de Reissner chez l'homme

La perte de la polymérisation de la FR coïncide avec le développement d'une scoliose chez de nombreux mutants de poisson-zèbre, identifiés comme des modèles de la SI mais pas tous. Il serait donc intéressant de se poser la question de la pertinence d'une perte de la FR chez l'homme pour expliquer les scolioses idiopathiques. En effet, plusieurs travaux ont mis en évidence que le SCO (l'organe sécrétoire de la sco-spondine), est une des premières structures à se différencier durant le développement chez l'homme et son activité sécrétoire est bien documentée au stade fœtal et néonatal (Oksche, Rodríguez, et Fernández-Llebrez 1993; E. M. Rodríguez, Rodríguez, et Hein 1998). Cependant, le SCO va ensuite régresser pendant la puberté (E. M. Rodríguez, Oksche, et Montecinos 2001). Au stade fœtal, la sco-spondine sécrétée par le SCO est incapable de former une fibre détectée par l'utilisation de l'anticorps dirigé contre la protéine bovine. Une hypothèse plausible serait que la structure de la protéine humaine sco-spondine diffère probablement de celle des autres espèces et est probablement remplacée par la production de plusieurs peptides plus courts et solubles (S. Rodríguez et al. 1990; E. M. Rodríguez, Oksche, et Montecinos 2001). La difficulté d'obtenir du matériel humain comprenant des rares cellules du SCO viables exprimant le gène n'a pas permis de cloner son messenger géant (12 Kb), ni de déterminer avec précision les produits transcrits à partir du locus. D'après les expériences de RNA-seq, le locus est activement transcrit sur plusieurs sous-régions mais l'assemblage est uniquement prédictif pour le moment. Il est de plus très délicat de visualiser la fibre dans le cerveau ou le canal central par microscopie électronique ou immuno-marquage sur des prélèvements de tissus de bonne qualité. D'autres études ont besoin d'être réalisées chez l'homme pour réellement évaluer l'importance de la FR ou des peptides issus du locus pour le maintien d'un axe droit.

6.3. Importance du processus inflammatoire dans l'émergence de la scoliose chez l'homme

Au cours de notre étude, nous avons montré que le mutant *rpgrip11^{-/-}* expérimente une activation aberrante d'un processus inflammatoire/oxydatif qui participe à la scoliose, et qui peut être contré par un traitement anti-inflammatoire/antioxydant. Cette activation non contrôlée est conservée entre plusieurs modèles de poisson-zèbre de SI, *ptk7^{-/-}* et *sspo^{dmh4/+}* (Van Gennip, Boswell, et Ciruna 2018; Rose et al. 2020). Un processus inflammatoire pourrait donc expliquer l'apparition de la scoliose idiopathique chez l'homme. En effet, il existe une maladie appelée la malformation de Chiari de type I (MC-I) qui présente un défaut de circulation du LCS et peut conduire à une inflammation locale au niveau des cervicales et à l'émergence d'une scoliose. La MC-I correspond à un positionnement des amygdales cérébelleuses qui sont anormalement basses et viennent s'engager au travers du foramen magnum (qui correspond au trou au centre des vertèbres) lui-même malformé de 3-5 mm (Shaffer, Martin, et Loth 2011). Cette maladie est souvent accompagnée d'une formation anormale d'une ou plusieurs cavités à l'intérieur de la moelle épinière appelée syringomyélie et impacte la circulation du LCS. La syringomyélie peut conduire à l'apparition d'une arachnoïdite, c'est-à-dire, une inflammation chronique du feuillet arachnoïdien des méninges (Nadeem et al. 2022). La prévalence de la scoliose chez les patients atteints de MC-I est de 20%, et augmente à 60% si elle est associée à une syringomyélie (Kelly, Guillaume, et Lenke 2015). La décompression du Chiari est un acte chirurgical qui permet de dégager suffisamment de place autour de la malformation de manière à retrouver une circulation normale du LCS. Elle est souvent nécessaire pour prévenir une progression de la scoliose chez les patients jeunes ou âgés. Ces résultats suggèrent alors qu'une obstruction du LCS au niveau des cervicales, associés dans certains cas à un processus inflammatoire, conduit à l'apparition d'une scoliose idiopathique chez l'homme. La piste neuro-inflammatoire serait à investiguer chez les patients atteints de scoliose idiopathique, afin de tester si cela peut participer ou non à la progression de la maladie. L'utilisation de la résonance magnétique nucléaire à très haute résolution serait une manière d'évaluer si les patients présentent une altération de la vitesse de circulation du LCS dans le tronc par rapport aux sujets sains. Des études pilotes sont en cours de réalisation (Dr Catanzariti, Fondation Cotrel).

Ainsi, nos résultats ont mis en évidence une nouvelle cascade d'événements participant à la scoliose chez le mutant ciliaire *rpgr11^{-/-}*. Les mutants droits expérimentent un phénomène d'astroglie de manière asynchrone dans les cellules sécrétrices de la sco-spondine du SCO, et les cellules ventrales bordant le ventricule rhombencéphalique du cervelet. Cet événement s'accompagne d'invasion de cellules immunitaires dans le parenchyme du système nerveux, et à proximité du SCO. Les mutants scoliotiques *rpgr11^{-/-}* perdent les touffes multi-ciliées bordant le SCO associée à une perte de la polymérisation de la FR. Nous faisons l'hypothèse que l'astroglie participe à la perte de ces touffes multi-ciliées conduisant à une polymérisation défectueuse de la FR et de l'apparition de la scoliose. Nos résultats apporteront une nouvelle vision des acteurs participant à la scoliose chez le poisson-zèbre.

Bibliographie

Aamar, Emil, et Igor B. Dawid. 2008. « Isolation and Expression Analysis of Foxj1 and Foxj1.2 in Zebrafish Embryos ». *The International Journal of Developmental Biology* 52 (7): 985-91. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072477ea>.

Abd-El-Barr, Muhammad M., Kristen Sykoudis, Sara Andrabi, Erica R. Eichers, Mark E. Pennesi, Perciliz L. Tan, John H. Wilson, Nicholas Katsanis, James R. Lupski, et Samuel M. Wu. 2007. « Impaired Photoreceptor Protein Transport and Synaptic Transmission in a Mouse Model of Bardet–Biedl Syndrome ». *Vision Research* 47 (27): 3394-3407. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2007.09.016>.

Abdelhamed, Zakia, Shawn M. Vuong, Lauren Hill, Crystal Shula, Andrew Timms, David Beier, Kenneth Campbell, Francesco T. Mangano, Rolf W. Stottmann, et June Goto. 2018. « A Mutation in *Ccdc39* Causes Neonatal Hydrocephalus with Abnormal Motile Cilia Development in Mice ». *Development* 145 (1): dev154500. <https://doi.org/10.1242/dev.154500>.

Aftab, Syed, Lucie Semeneć, Jeffrey Shih-Chieh Chu, et Nansheng Chen. 2008. « Identification and Characterization of Novel Human Tissue-Specific RFX Transcription Factors ». *BMC Evolutionary Biology* 8 (1): 226. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-226>.

Akel, Ibrahim, Gokhan Demirkiran, Ahmet Alanay, Sevilay Karahan, Ralph Marcucio, et Emre Acaroglu. 2009. « The Effect of Calmodulin Antagonists on Scoliosis: Bipedal C57BL/6 Mice Model ». *European Spine Journal: Official Publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 18 (4): 499-505. <https://doi.org/10.1007/s00586-009-0912-1>.

Al Jord, Adel, Anne-Iris Lemaître, Nathalie Delgehr, Marion Faucourt, Nathalie Spassky, et Alice Meunier. 2014. « Centriole Amplification by Mother and Daughter Centrioles Differs in Multiciliated Cells ». *Nature* 516 (7529): 104-7. <https://doi.org/10.1038/nature13770>.

Alibardi, Lorenzo. 1990. « Cerebrospinal Fluid Contacting Neurons inside the Regenerating Caudal Spinal Cord of *Xenopus* Tadpoles ». *Bolletino Di Zoologia* 57 (4): 309-15. <https://doi.org/10.1080/11250009009355713>.

Alten, Leonie, Karin Schuster-Gossler, Anja Beckers, Stephanie Groos, Bärbel Ulmer, Jan Hegemann, Matthias Ochs, et Achim Gossler. 2012. « Differential Regulation of Node Formation, Nodal Ciliogenesis and Cilia Positioning by *Noto* and *Foxj1* ». *Development* 139 (7): 1276-84. <https://doi.org/10.1242/dev.072728>.

Andreu-Cervera, Abraham, Isabelle Anselme, Alice Karam, Christine Laclef, Martin Catala, et Sylvie Schneider-Maunoury. 2019. « The Ciliopathy Gene *Ftm/Rpgrip1l* Controls Mouse Forebrain Patterning via Region-Specific Modulation of Hedgehog/Gli Signaling ». *The Journal of Neuroscience*, janvier, 2199-18. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2199-18.2019>.

Andreu-Cervera, Abraham, Martin Catala, et Sylvie Schneider-Maunoury. 2021.

« Cilia, Ciliopathies and Hedgehog-Related Forebrain Developmental Disorders ». *Neurobiology of Disease* 150 (mars): 105236. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105236>.

Angelaki, Dora E., et Kathleen E. Cullen. 2008. « Vestibular System: The Many Facets of a Multimodal Sense ». *Annual Review of Neuroscience* 31: 125-50. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125555>.

Arbi, Marina, Dafni-Eleftheria Pefani, Christina Kyrousi, Maria-Eleni Lalioti, Argyro Kalogeropoulou, Anastasios D Papanastasiou, Stavros Taraviras, et Zoi Lygerou. 2016. « GemC1 Controls Multiciliogenesis in the Airway Epithelium ». *EMBO Reports* 17 (3): 400-413. <https://doi.org/10.15252/embr.201540882>.

Arendt, J. 1998. « Melatonin and the Pineal Gland: Influence on Mammalian Seasonal and Circadian Physiology ». *Reviews of Reproduction* 3 (1): 13-22. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0030013>.

Arlet, V., Th. Odent, et M. Aebi. 2003. « Congenital scoliosis ». *European Spine Journal* 12 (5): 456-63. <https://doi.org/10.1007/s00586-003-0555-6>.

Arts, Heleen H, Dan Doherty, Sylvia E C van Beersum, Melissa A Parisi, Stef J F Letteboer, Nicholas T Gordon, Theo A Peters, et al. 2007. « Mutations in the Gene Encoding the Basal Body Protein RPGRIP1L, a Nephrocystin-4 Interactor, Cause Joubert Syndrome ». *Nature Genetics* 39 (7): 882-88. <https://doi.org/10.1038/ng2069>.

Ashique, Amir M., Youngshik Choe, Mattias Karlen, Scott R. May, Khanhky Phamluong, Mark J. Solloway, Johan Ericson, et Andrew S. Peterson. 2009. « The Rfx4 Transcription Factor Modulates Shh Signaling by Regional Control of Ciliogenesis ». *Science Signaling* 2 (95). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000602>.

Assaraf, Eran, Ronen Blecher, Lia Heinemann-Yerushalmi, Sharon Krief, Ron Carmel Vinestock, Inbal E. Biton, Vlad Brumfeld, et al. 2020. « Piezo2 Expressed in Proprioceptive Neurons Is Essential for Skeletal Integrity ». *Nature Communications* 11 (1): 3168. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16971-6>.

Austin-Tse, Christina, Jan Halbritter, Maimoona A. Zariwala, Renée M. Gilberti, Heon Yung Gee, Nathan Hellman, Narendra Pathak, et al. 2013. « Zebrafish Ciliopathy Screen Plus Human Mutational Analysis Identifies C21orf59 and CCDC65 Defects as Causing Primary Ciliary Dyskinesia ». *The American Journal of Human Genetics* 93 (4): 672-86. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.08.015>.

Aw, Wen Yih, et Danelle Devenport. 2017. « Planar Cell Polarity: Global Inputs Establishing Cellular Asymmetry ». *Current Opinion in Cell Biology* 44 (février): 110-16. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.08.002>.

Awata, Junya, Saeko Takada, Clive Standley, Karl F. Lehtreck, Karl D. Bellvé, Gregory J. Pazour, Kevin E. Fogarty, et George B. Witman. 2014. « Nephrocystin-4 Controls Ciliary Trafficking of Membrane and Large Soluble Proteins at the Transition Zone ». *Journal of Cell Science*, janvier, jcs.155275. <https://doi.org/10.1242/jcs.155275>.

Azimzadeh, Juliette, Polla Hergert, Annie Delouvé, Ursula Euteneuer, Etienne Formstecher, Alexey Khodjakov, et Michel Bornens. 2009. « HPOC5 Is a Centrin-Binding Protein Required for Assembly of Full-Length Centrioles ». *Journal of Cell Biology* 185 (1): 101-14. <https://doi.org/10.1083/jcb.200808082>.

Baas, D., A. Meiniel, C. Benadiba, E. Bonnafe, O. Meiniel, W. Reith, et B. Durand.

2006. « A Deficiency in RFX3 Causes Hydrocephalus Associated with Abnormal Differentiation of Ependymal Cells ». *European Journal of Neuroscience* 24 (4): 1020-30. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05002.x>.
- Bachmann-Gagescu, R., J. C. Dempsey, I. G. Phelps, B. J. O’Roak, D. M. Knutzen, T. C. Rue, G. E. Ishak, et al. 2015. « Joubert Syndrome: A Model for Untangling Recessive Disorders with Extreme Genetic Heterogeneity ». *Journal of Medical Genetics* 52 (8): 514-22. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103087>.
- Bachmann-Gagescu, Ruxandra. 2014. « Complexité génétique des ciliopathies et identification de nouveaux gènes ». *médecine/sciences* 30 (11): 1011-23. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143011016>.
- Bachmann-Gagescu, Ruxandra, et Stephan CF Neuhauss. 2019. « The Photoreceptor Cilium and Its Diseases ». *Current Opinion in Genetics & Development* 56 (juin): 22-33. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2019.05.004>.
- Bachmann-Gagescu, Ruxandra, Ian G. Phelps, George Stearns, Brian A. Link, Susan E. Bockerhoff, Cecilia B. Moens, et Dan Doherty. 2011. « The Ciliopathy Gene Cc2d2a Controls Zebrafish Photoreceptor Outer Segment Development through a Role in Rab8-Dependent Vesicle Trafficking ». *Human Molecular Genetics* 20 (20): 4041-55. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr332>.
- Badgandi, Hemant B., Sun-hee Hwang, Issei S. Shimada, Evan Lorient, et Saikat Mukhopadhyay. 2017. « Tubby Family Proteins Are Adapters for Ciliary Trafficking of Integral Membrane Proteins ». *Journal of Cell Biology* 216 (3): 743-60. <https://doi.org/10.1083/jcb.201607095>.
- Bagnat, Michel, et Ryan S. Gray. 2020. « Development of a Straight Vertebrate Body Axis ». Édité par Sally Dunwoodie et John Wallingford. *Development* 147 (21): dev175794. <https://doi.org/10.1242/dev.175794>.
- Bagwell, Jennifer, James Norman, Kathryn Ellis, Brianna Peskin, James Hwang, Xiaoyan Ge, Stacy V Nguyen, Sarah K McMenamin, Didier YR Stainier, et Michel Bagnat. 2020. « Notochord Vacuoles Absorb Compressive Bone Growth during Zebrafish Spine Formation ». *ELife* 9 (janvier): e51221. <https://doi.org/10.7554/eLife.51221>.
- Bang, Pascal I., William F. Sewell, et Jarema J. Malicki. 2001. « Morphology and Cell Type Heterogeneities of the Inner Ear Epithelia in Adult and Juvenile Zebrafish (Danio Rerio) ». *The Journal of Comparative Neurology* 438 (2): 173-90. <https://doi.org/10.1002/cne.1308>.
- Banizs, Boglarka, Peter Komlosi, Mark O. Bevenssee, Erik M. Schwiebert, Phillip D. Bell, et Bradley K. Yoder. 2007. « Altered PH_i Regulation and Na⁺/HCO₃⁻ Transporter Activity in Choroid Plexus of Cilia-Defective *Tg737^{orpk}* Mutant Mouse ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 292 (4): C1409-16. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00408.2006>.
- Banizs, Boglarka, Martin M. Pike, C. Leigh Millican, William B. Ferguson, Peter Komlosi, James Sheetz, Phillip D. Bell, Erik M. Schwiebert, et Bradley K. Yoder. 2005. « Dysfunctional Cilia Lead to Altered Ependyma and Choroid Plexus Function, and Result in the Formation of Hydrocephalus ». *Development* 132 (23): 5329-39. <https://doi.org/10.1242/dev.02153>.
- Banks, Robert W. 2005. « The Muscle Spindle ». In *Peripheral Neuropathy*, 131-50.

Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7216-9491-7.50009-0>.

Baschal, Erin E, Cambria I Wethey, Kandice Swindle, Robin M Baschal, Katherine Gowan, Nelson L S Tang, David M Alvarado, et al. 2015. « Exome Sequencing Identifies a Rare *HSPG2* Variant Associated with Familial Idiopathic Scoliosis ». *G3 Genes|Genomes|Genetics* 5 (2): 167-74. <https://doi.org/10.1534/g3.114.015669>.

Basiri, Marcus L., Andrew Ha, Abhishek Chadha, Nicole M. Clark, Andrey Polyanovsky, Boaz Cook, et Tomer Avidor-Reiss. 2014. « A Migrating Ciliary Gate Compartmentalizes the Site of Axoneme Assembly in *Drosophila* Spermatids ». *Current Biology* 24 (22): 2622-31. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.047>.

Baumgart, Emily Violette, Joana S. Barbosa, Laure Bally-cuif, Magdalena Götz, et Jovica Ninkovic. 2012. « Stab Wound Injury of the Zebrafish Telencephalon: A Model for Comparative Analysis of Reactive Gliosis ». *Glia* 60 (3): 343-57. <https://doi.org/10.1002/glia.22269>.

Bayly-Jones, Charles, Siew Siew Pang, Bradley A. Spicer, James C. Whisstock, et Michelle A. Dunstone. 2020. « Ancient but Not Forgotten: New Insights Into MPEG1, a Macrophage Perforin-Like Immune Effector ». *Frontiers in Immunology* 11 (octobre): 581906. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.581906>.

Bearce, Elizabeth A, Zoe H Irons, Johnathan R O'Hara-Smith, Colin J Kuhns, Sophie I Fisher, William E Crow, et Daniel T Grimes. 2022. « Urotensin II-Related Peptides, Urp1 and Urp2, Control Zebrafish Spine Morphology ». *ELife* 11 (décembre): e83883. <https://doi.org/10.7554/eLife.83883>.

Becker-Heck, Anita, Irene E Zohn, Noriko Okabe, Andrew Pollock, Kari Baker Lenhart, Jessica Sullivan-Brown, Jason McSheene, et al. 2011. « The Coiled-Coil Domain Containing Protein CCDC40 Is Essential for Motile Cilia Function and Left-Right Axis Formation ». *Nature Genetics* 43 (1): 79-84. <https://doi.org/10.1038/ng.727>.

Bellegarda, Celine, Guillaume Zavad, Lionel Moisan, Ryan S. Gray, Françoise Brochard-Wyart, Jean-François Joanny, Yasmine Cantaut-Belarif, et Claire Wyart. 2023. « The Reissner Fiber under Tension in Vivo Shows Dynamic Interaction with Ciliated Cells Contacting the Cerebrospinal Fluid ». Preprint. Biophysics. <https://doi.org/10.1101/2023.02.22.529498>.

Bendrioua, Loubna, Maria Smedh, Joachim Almquist, Marija Cvijovic, Mats Jirstrand, Mattias Goksör, Caroline B. Adiels, et Stefan Hohmann. 2014. « Yeast AMP-Activated Protein Kinase Monitors Glucose Concentration Changes and Absolute Glucose Levels ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (18): 12863-75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.547976>.

Berberi, Nicolas F., Jacqueline S. Lewis, Georgia A. Bishop, Candice C. Askwith, et Kirk Mykityn. 2008. « Bardet–Biedl Syndrome Proteins Are Required for the Localization of G Protein-Coupled Receptors to Primary Cilia ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (11): 4242-46. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711027105>.

Bernhardt, Robert R., Chetan K. Patel, Stephen W. Wilson, et John Y. Kuwada. 1992. « Axonal Trajectories and Distribution of GABAergic Spinal Neurons in Wildtype and Mutant Zebrafish Lacking Floor Plate Cells ». *The Journal of Comparative Neurology* 326 (2): 263-72. <https://doi.org/10.1002/cne.903260208>.

Besse, Laurianne, Mariame Neti, Isabelle Anselme, Christoph Gerhardt, Ulrich Rüter,

- Christine Laclef, et Sylvie Schneider-Maunoury. 2011. « Primary Cilia Control Telencephalic Patterning and Morphogenesis via Gli3 Proteolytic Processing ». *Development* 138 (10): 2079-88. <https://doi.org/10.1242/dev.059808>.
- Beuerlein, M., X. Wang, M. Moreau, J. Raso, J. Mahood, et K. Bagnall. 2001. « Development of Scoliosis Following Pinealectomy in Young Chickens Is Not the Result of an Artifact of the Surgical Procedure ». *Microscopy Research and Technique* 53 (1): 81-86. <https://doi.org/10.1002/jemt.1071>.
- Bhogaraju, Sagar, Benjamin D Engel, et Esben Lorentzen. 2013. « Intraflagellar Transport Complex Structure and Cargo Interactions ». *Cilia* 2 (1): 10. <https://doi.org/10.1186/2046-2530-2-10>.
- Bill, Brent R., Darius Balciunas, Joshua A. McCarra, Eric D. Young, Toua Xiong, Ashley M. Spahn, Marta Garcia-Lecea, Vladimir Korzh, Stephen C. Ekker, et Lisa A. Schimmenti. 2008. « Development and Notch Signaling Requirements of the Zebrafish Choroid Plexus ». Édité par Hernan Lopez-Schier. *PLoS ONE* 3 (9): e3114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003114>.
- Bisgrove, Brent W., Svetlana Makova, H. Joseph Yost, et Martina Brueckner. 2012. « RFX2 Is Essential in the Ciliated Organ of Asymmetry and an RFX2 Transgene Identifies a Population of Ciliated Cells Sufficient for Fluid Flow ». *Developmental Biology* 363 (1): 166-78. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.12.030>.
- Blackshear, Perry J., Joan P. Graves, Deborah J. Stumpo, Inma Cobos, John L. R. Rubenstein, et Darryl C. Zeldin. 2003. « Graded Phenotypic Response to Partial and Complete Deficiency of a Brain-Specific Transcript Variant of the Winged Helix Transcription Factor RFX4 ». *Development* 130 (19): 4539-52. <https://doi.org/10.1242/dev.00661>.
- Blacque, Oliver E., Elliot A. Perens, Keith A. Borojevich, Peter N. Inglis, Chunmei Li, Adam Warner, Jaswinder Khattra, et al. 2005. « Functional Genomics of the Cilium, a Sensory Organelle ». *Current Biology* 15 (10): 935-41. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.04.059>.
- Blecher, Ronen, Sharon Krief, Tal Galili, Inbal E. Biton, Tomer Stern, Eran Assaraf, Ditsa Levanon, et al. 2017. « The Proprioceptive System Masterminds Spinal Alignment: Insight into the Mechanism of Scoliosis ». *Developmental Cell* 42 (4): 388-399.e3. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.07.022>.
- Bobyn, Justin D., David G. Little, Randolph Gray, et Aaron Schindeler. 2015. « Animal Models of Scoliosis: ANIMAL MODELS OF SCOLIOSIS ». *Journal of Orthopaedic Research* 33 (4): 458-67. <https://doi.org/10.1002/jor.22797>.
- Böhm, Urs Lucas, Andrew Prendergast, Lydia Djenoune, Sophie Nunes Figueiredo, Johanna Gomez, Caleb Stokes, Sonya Kaiser, et al. 2016. « CSF-Contacting Neurons Regulate Locomotion by Relaying Mechanical Stimuli to Spinal Circuits ». *Nature Communications* 7 (1): 10866. <https://doi.org/10.1038/ncomms10866>.
- Borovina, Antonia, Simone Superina, Daniel Voskas, et Brian Ciruna. 2010. « Vangl2 Directs the Posterior Tilting and Asymmetric Localization of Motile Primary Cilia ». *Nature Cell Biology* 12 (4): 407-12. <https://doi.org/10.1038/ncb2042>.
- Boutin, Camille, Paul Labedan, Jordane Dimidschstein, Fabrice Richard, Harold Cremer, Philipp André, Yingzi Yang, Mireille Montcouquiol, Andre M. Goffinet, et Fadel Tissir. 2014. « A Dual Role for Planar Cell Polarity Genes in Ciliated Cells ».

Proceedings of the National Academy of Sciences 111 (30).
<https://doi.org/10.1073/pnas.1404988111>.

Breslow, David K., Elena F. Koslover, Federica Seydel, Andrew J. Spakowitz, et Maxence V. Nachury. 2013. « An in Vitro Assay for Entry into Cilia Reveals Unique Properties of the Soluble Diffusion Barrier ». *Journal of Cell Biology* 203 (1): 129-47.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201212024>.

Breslow, D.K., and Holland, A.J. (2019). Mechanism and Regulation of Centriole and Cilium Biogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 88, 691–724. [10.1146/annurev-biochem-013118-111153](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111153).

Bridges, Andrew A., et Amy S. Gladfelter. 2015. « Septin Form and Function at the Cell Cortex ». *Journal of Biological Chemistry* 290 (28): 17173-80.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R114.634444>.

Briggs, Laura J, Jacqueline A Davidge, Bill Wickstead, Michael L Ginger, et Keith Gull. 2004. « More than One Way to Build a Flagellum: Comparative Genomics of Parasitic Protozoa ». *Current Biology* 14 (15): R611-12.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.07.041>.

Brightman, M. W., et S. L. Palay. 1963. « THE FINE STRUCTURE OF EPENDYMA IN THE BRAIN OF THE RAT ». *Journal of Cell Biology* 19 (2): 415-39.
<https://doi.org/10.1083/jcb.19.2.415>.

Brody, Steven L., Xiu Hua Yan, Mary K. Wuerffel, Sheng-Kwei Song, et Steven D. Shapiro. 2000. « Ciliogenesis and Left–Right Axis Defects in Forkhead Factor HFH-4–Null Mice ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 23 (1): 45-51.
<https://doi.org/10.1165/ajrcmb.23.1.4070>.

Brooks, Eric R., et John B. Wallingford. 2014. « Multiciliated Cells ». *Current Biology* 24 (19): R973-82. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.047>.

Brown, G. M. 1994. « Light, Melatonin and the Sleep-Wake Cycle ». *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN* 19 (5): 345-53.

Buchan, Jillian G., David M. Alvarado, Gabe E. Haller, Carlos Cruchaga, Matthew B. Harms, Tianxiao Zhang, Marcia C. Willing, et al. 2014. « Rare Variants in FBN1 and FBN2 Are Associated with Severe Adolescent Idiopathic Scoliosis ». *Human Molecular Genetics* 23 (19): 5271-82. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu224>.

Buchan, Jillian G., Ryan S. Gray, John M. Gansner, David M. Alvarado, Lydia Burgert, Jonathan D. Gitlin, Christina A. Gurnett, et Matthew I. Goldsmith. 2014. « Kinesin Family Member 6 (Kif6) Is Necessary for Spine Development in Zebrafish: *KIF6* in Zebrafish Spine Development ». *Developmental Dynamics* 243 (12): 1646-57.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.24208>.

Buckingham, Margaret, Lola Bajard, Ted Chang, Philippe Daubas, Juliette Hadchouel, Sigolene Meilhac, Didier Montarras, Didier Rocancourt, et Frederic Relaix. 2003. « The Formation of Skeletal Muscle: From Somite to Limb ». *Journal of Anatomy* 202 (1): 59-68. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2003.00139.x>.

Butler, Mitchell T., et John B. Wallingford. 2017. « Planar Cell Polarity in Development and Disease ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (6): 375-88.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.11>.

- Cairns, Dana M., Mie Elissa Sato, Philip G. Lee, Andrew B. Lassar, et Li Zeng. 2008. « A Gradient of Shh Establishes Mutually Repressing Somitic Cell Fates Induced by Nkx3.2 and Pax3 ». *Developmental Biology* 323 (2): 152-65. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.08.024>.
- Cantaut-Belarif, Yasmine, Adeline Orts Del'Imagine, Margot Penru, Guillaume Pézeron, Claire Wyart, et Pierre-Luc Bardet. 2020. « Adrenergic Activation Modulates the Signal from the Reissner Fiber to Cerebrospinal Fluid-Contacting Neurons during Development ». *ELife* 9 (octobre). <https://doi.org/10.7554/eLife.59469>.
- Cantaut-Belarif, Yasmine, Jenna R. Sternberg, Olivier Thouvenin, Claire Wyart, et Pierre-Luc Bardet. 2018. « The Reissner Fiber in the Cerebrospinal Fluid Controls Morphogenesis of the Body Axis ». *Current Biology* 28 (15): 2479-2486.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.079>.
- Cao, Y., Semanchik, N., Lee, S.H., Somlo, S., Barbano, P.E., Coifman, R., and Sun, Z. (2009). Chemical modifier screen identifies HDAC inhibitors as suppressors of PKD models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 21819–21824. [10.1073/pnas.0911987106](https://doi.org/10.1073/pnas.0911987106).
- Cardenas-Rodriguez, Magdalena, Christina Austin-Tse, Judith G. M. Bergboer, Elisa Molinari, Yuya Sugano, Ruxandra Bachmann-Gagescu, John A. Sayer, et Iain A. Drummond. 2021. « Genetic Compensation for Cilia Defects in Cep290 Mutants by Upregulation of Cilia-Associated Small GTPases ». *Journal of Cell Science* 134 (14): jcs258568. <https://doi.org/10.1242/jcs.258568>.
- Carrière, Audrey, Anne Galinier, Yvette Fernandez, Maria-Carmen Carmona, Luc Pénicaud, et Louis Casteilla. 2006. « Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie ». *médecine/sciences* 22 (1): 47-53. <https://doi.org/10.1051/medsci/200622147>.
- Carvajal-Gonzalez, Jose Maria, Sonia Mulero-Navarro, et Marek Mlodzik. 2016. « Centriole Positioning in Epithelial Cells and Its Intimate Relationship with Planar Cell Polarity ». *BioEssays* 38 (12): 1234-45. <https://doi.org/10.1002/bies.201600154>.
- Cha, Sang-Wook, Emmanuel Tadjuidje, Qinghua Tao, Christopher Wylie, et Janet Heasman. 2008. « Wnt5a and Wnt11 Interact in a Maternal Dkk1-Regulated Fashion to Activate Both Canonical and Non-Canonical Signaling in *Xenopus* Axis Formation ». *Development* 135 (22): 3719-29. <https://doi.org/10.1242/dev.029025>.
- Chang, Bo, Hemant Khanna, Norman Hawes, David Jimeno, Shirley He, Concepcion Lillo, Sunil K. Parapuram, et al. 2006. « In-Frame Deletion in a Novel Centrosomal/Ciliary Protein CEP290/NPHP6 Perturbs Its Interaction with RPGR and Results in Early-Onset Retinal Degeneration in the Rd16 Mouse ». *Human Molecular Genetics* 15 (11): 1847-57. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl107>.
- Chang, Jessica T., Maria K. Lehtinen, et Hazel Sive. 2016. « Zebrafish Cerebrospinal Fluid Mediates Cell Survival through a Retinoid Signaling Pathway ». *Developmental Neurobiology* 76 (1): 75-92. <https://doi.org/10.1002/dneu.22300>.
- Chávez, Marcelo, Sabrina Ena, Jacqueline Van Sande, Alban de Kerchove d'Exaerde, Stéphane Schurmans, et Serge N. Schiffmann. 2015. « Modulation of Ciliary Phosphoinositide Content Regulates Trafficking and Sonic Hedgehog Signaling Output ». *Developmental Cell* 34 (3): 338-50. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.06.016>.

- Chen, Hsiao-Huei, et Eric Frank. 1999. « Development and Specification of Muscle Sensory Neurons ». *Current Opinion in Neurobiology* 9 (4): 405-9. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(99\)80061-0](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(99)80061-0).
- Chen, Hsiao-Huei, Warren G. Tourtellotte, et Eric Frank. 2002. « Muscle Spindle-Derived Neurotrophin 3 Regulates Synaptic Connectivity between Muscle Sensory and Motor Neurons ». *The Journal of Neuroscience* 22 (9): 3512-19. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-09-03512.2002>.
- Chen, Zhijun, Nelson L S Tang, Xingbin Cao, Di Qiao, Long Yi, Jack C Y Cheng, et Yong Qiu. 2009. « Promoter Polymorphism of Matrilin-1 Gene Predisposes to Adolescent Idiopathic Scoliosis in a Chinese Population ». *European Journal of Human Genetics* 17 (4): 525-32. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.203>.
- Cheng, Jack C., René M. Castelein, Winnie C. Chu, Aina J. Danielsson, Matthew B. Dobbs, Theodoros B. Grivas, Christina A. Gurnett, et al. 2015. « Adolescent Idiopathic Scoliosis ». *Nature Reviews Disease Primers* 1 (1): 15030. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.30>.
- Chiang, Chin, Ying Litingtung, Eric Lee, Keith E. Young, Jeffrey L Corden, Heiner Westphal, et Philip A. Beachy. 1996. « Cyclopia and Defective Axial Patterning in Mice Lacking Sonic Hedgehog Gene Function ». *Nature* 383 (6599): 407-13. <https://doi.org/10.1038/383407a0>.
- Chih, Ben, Peter Liu, Yvonne Chinn, Cecile Chalouni, Laszlo G. Komuves, Philip E. Hass, Wendy Sandoval, et Andrew S. Peterson. 2012. « A Ciliopathy Complex at the Transition Zone Protects the Cilia as a Privileged Membrane Domain ». *Nature Cell Biology* 14 (1): 61-72. <https://doi.org/10.1038/ncb2410>.
- Cho, Kyeong Jee, Shin Hye Noh, Soo Min Han, Won-Il Choi, Hye-Youn Kim, Seyoung Yu, Joon Suk Lee, et al. 2018. « ZMYND10 Stabilizes Intermediate Chain Proteins in the Cytoplasmic Pre-Assembly of Dynein Arms ». Édité par Susan K. Dutcher. *PLOS Genetics* 14 (3): e1007316. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007316>.
- Choksi, Semil P., Gilbert Lauter, Peter Swoboda, et Sudipto Roy. 2014. « Switching on Cilia: Transcriptional Networks Regulating Ciliogenesis ». *Development* 141 (7): 1427-41. <https://doi.org/10.1242/dev.074666>.
- Chung, Mei-I, Sara M. Peyrot, Sarah LeBoeuf, Tae Joo Park, Kriston L. McGary, Edward M. Marcotte, et John B. Wallingford. 2012. « RFX2 Is Broadly Required for Ciliogenesis during Vertebrate Development ». *Developmental Biology* 363 (1): 155-65. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.12.029>.
- Coillard, C., et C. H. Rivard. 1996. « Vertebral Deformities and Scoliosis ». *European Spine Journal* 5 (2): 91-100. <https://doi.org/10.1007/BF00298387>.
- Cole, Douglas G., Dennis R. Diener, Amy L. Himelblau, Peter L. Beech, Jason C. Fuster, et Joel L. Rosenbaum. 1998. « Chlamydomonas Kinesin-II-Dependent Intraflagellar Transport (IFT): IFT Particles Contain Proteins Required for Ciliary Assembly in Caenorhabditis Elegans Sensory Neurons ». *Journal of Cell Biology* 141 (4): 993-1008. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.4.993>.
- Collins, Patricia, et D H M Woollam. 1978. « The Ventricular Surface of the Subcommissural Organ: A Scanning and Transmission Electron Microscopic Study », novembre.
- Colonna, Marco, et Oleg Butovsky. 2017. « Microglia Function in the Central Nervous

System During Health and Neurodegeneration ». *Annual Review of Immunology* 35 (1): 441-68. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>.

Considine, R. V., M. K. Sinha, M. L. Heiman, A. Kriauciunas, T. W. Stephens, M. R. Nyce, J. P. Ohannesian, C. C. Marco, L. J. McKee, et T. L. Bauer. 1996. « Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Humans ». *The New England Journal of Medicine* 334 (5): 292-95. <https://doi.org/10.1056/NEJM199602013340503>.

Corales, Laarni Grace, Hitoshi Inada, Kotaro Hiraoka, Shun Araki, Shinya Yamanaka, Takako Kikkawa, et Noriko Osumi. 2022. « The Subcommissural Organ Maintains Features of Neuroepithelial Cells in the Adult Mouse ». *Journal of Anatomy* 241 (3): 820-30. <https://doi.org/10.1111/joa.13709>.

Craige, Branch, Che-Chia Tsao, Dennis R. Diener, Yuqing Hou, Karl-Ferdinand Lehtreck, Joel L. Rosenbaum, et George B. Witman. 2010. « CEP290 Tethers Flagellar Transition Zone Microtubules to the Membrane and Regulates Flagellar Protein Content ». *Journal of Cell Biology* 190 (5): 927-40. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006105>.

Cuoghi, Barbara, et Lucrezia Mola. 2009. « Macroglial Cells of the Teleost Central Nervous System: A Survey of the Main Types ». *Cell and Tissue Research* 338 (3): 319-32. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0870-2>.

Czarnecki, Peter G., et Jagesh V. Shah. 2012. « The Ciliary Transition Zone: From Morphology and Molecules to Medicine ». *Trends in Cell Biology* 22 (4): 201-10. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.02.001>.

Dale, N., A. Roberts, O. P. Ottersen, et J. Storm-Mathisen. 1987. « The Morphology and Distribution of “Kolmer-Agduhr Cells”, a Class of Cerebrospinal-Fluid-Contacting Neurons Revealed in the Frog Embryo Spinal Cord by GABA Immunocytochemistry ». *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 232 (1267): 193-203. <https://doi.org/10.1098/rspb.1987.0068>.

Davis, Roger E., Ruth E. Swiderski, Kamal Rahmouni, Darryl Y. Nishimura, Robert F. Mullins, Khristofor Agassandian, Alisdair R. Philp, et al. 2007. « A Knockin Mouse Model of the Bardet–Biedl Syndrome 1 M390R Mutation Has Cilia Defects, Ventriculomegaly, Retinopathy, and Obesity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (49): 19422-27. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708571104>.

Delous, Marion, Lekbir Baala, Rémi Salomon, Christine Laclef, Jeanette Vierkotten, Kálmán Tory, Christelle Golzio, et al. 2007. « The Ciliary Gene RPGRIP1L Is Mutated in Cerebello-Oculo-Renal Syndrome (Joubert Syndrome Type B) and Meckel Syndrome ». *Nature Genetics* 39 (7): 875-81. <https://doi.org/10.1038/ng2039>.

D’Gama, Percival P., Tao Qiu, Mehmet Ilyas Cosacak, Dheeraj Rayamajhi, Ahsen Konac, Jan Niklas Hansen, Christa Ringers, et al. 2021. « Diversity and Function of Motile Ciliated Cell Types within Ependymal Lineages of the Zebrafish Brain ». *Cell Reports* 37 (1): 109775. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109775>.

Didon, Lukas, Rachel K Zwick, Ion Wa Chao, Matthew S Walters, Rui Wang, Neil R Hackett, et Ronald G Crystal. 2013. « RFX3 Modulation of FOXJ1 Regulation of Cilia Genes in the Human Airway Epithelium ». *Respiratory Research* 14 (1): 70. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-14-70>.

Djenoune, Lydia, Laura Desban, Johanna Gomez, Jenna R. Sternberg, Andrew

Prendergast, Dominique Langui, Feng B. Quan, et al. 2017. « The Dual Developmental Origin of Spinal Cerebrospinal Fluid-Contacting Neurons Gives Rise to Distinct Functional Subtypes ». *Scientific Reports* 7 (1): 719. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00350-1>.

Djenoune, Lydia, Hanen Khabou, Fanny Joubert, Feng B. Quan, Sophie Nunes Figueiredo, Laurence Bodineau, Filippo Del Bene, C line Burckl , Herv  Tostivint, et Claire Wyart. 2014. « Investigation of spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons expressing PKD2L1: evidence for a conserved system from fish to primates ». *Frontiers in Neuroanatomy* 8 (mai). <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00026>.

Djenoune, Lydia, Mohammed Mahamdeh, Thai V. Truong, Christopher T. Nguyen, Scott E. Fraser, Martina Brueckner, Jonathon Howard, et Shiaulou Yuan. 2023. « Cilia Function as Calcium-Mediated Mechanosensors That Instruct Left-Right Asymmetry ». *Science* 379 (6627): 71-78. <https://doi.org/10.1126/science.abq7317>.

Djenoune, Lydia, et Claire Wyart. 2017. « Light on a Sensory Interface Linking the Cerebrospinal Fluid to Motor Circuits in Vertebrates ». *Journal of Neurogenetics* 31 (3): 113-27. <https://doi.org/10.1080/01677063.2017.1359833>.

Dobin, A., W. J. Kimberling, W. Pettinger, J. E. Bailey-Wilson, Y. Y. Shugart, et P. Gabow. 1993. « Segregation Analysis of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease ». *Genetic Epidemiology* 10 (3): 189-200. <https://doi.org/10.1002/gepi.1370100305>.

Donati, Antoine, Isabelle Anselme, Sylvie Schneider-Maunoury, et Christine Vesque. 2021. « Planar Polarization of Cilia in the Zebrafish Floor-Plate Involves Par3-Mediated Posterior Localization of Highly Motile Basal Bodies ». *Development (Cambridge, England)* 148 (13): dev196386. <https://doi.org/10.1242/dev.196386>.

Dong, Fenglan, Kyosuke Shinohara, Yanick Botilde, Ryo Nabeshima, Yasuko Asai, Akemi Fukumoto, Toshiaki Hasegawa, et al. 2014. « Pih1d3 Is Required for Cytoplasmic Preassembly of Axonemal Dynein in Mouse Sperm ». *Journal of Cell Biology* 204 (2): 203-13. <https://doi.org/10.1083/jcb.201304076>.

Drummond, Iain A., Arindam Majumdar, Hartmut Hentschel, Marlies Elger, Lila Solnica-Krezel, Alexander F. Schier, Stephan C. F. Neuhauss, et al. 1998. « Early Development of the Zebrafish Pronephros and Analysis of Mutations Affecting Pronephric Function ». *Development* 125 (23): 4655-67. <https://doi.org/10.1242/dev.125.23.4655>.

Dryja, Thaddeus P., Scott M. Adams, Jonna L. Grimsby, Terri L. McGee, Dong-Hyun Hong, Tiansen Li, Sten Andr asson, et Eliot L. Berson. 2001. « Null RPGRIP1 Alleles in Patients with Leber Congenital Amaurosis ». *The American Journal of Human Genetics* 68 (5): 1295-98. <https://doi.org/10.1086/320113>.

Dubruille, Rapha lle, Anne Lauren on, Camille Vandaele, Emiko Shishido, Madeleine Coulon-Bublex, Peter Swoboda, Pierre Couble, Maurice Kernan, et B n dicte Durand. 2002. « *Drosophila* Regulatory Factor X Is Necessary for Ciliated Sensory Neuron Differentiation ». *Development* 129 (23): 5487-98. <https://doi.org/10.1242/dev.00148>.

Duda, Przemys aw, Janusz Wi niewski, Tomasz W jtcwicz, Olga W jcicka, Micha  Ja kiewicz, Dominika Drulis-Fajdasz, Dariusz Rakus, James A. McCubrey, et Agnieszka Gizak. 2018. « Targeting GSK3 Signaling as a Potential Therapy of Neurodegenerative Diseases and Aging ». *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 22 (10): 833-48. <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1526925>.

Duldulao, N.A., Lee, S., and Sun, Z. (2009). Cilia localization is essential for in vivo functions of the Joubert syndrome protein Arl13b/Scorpion. *Development* 136, 4033–4042. [10.1242/dev.036350](https://doi.org/10.1242/dev.036350).

Dunkelberger, Jason R, et Wen-Chao Song. 2010. « Complement and Its Role in Innate and Adaptive Immune Responses ». *Cell Research* 20 (1): 34-50. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.139>.

Dyson, Jennifer M., Sarah E. Conduit, Sandra J. Feeney, Sandra Hakim, Tia DiTommaso, Alex J. Fulcher, Absorn Sriratana, et al. 2017. « INPP5E Regulates Phosphoinositide-Dependent Cilia Transition Zone Function ». *Journal of Cell Biology* 216 (1): 247-63. <https://doi.org/10.1083/jcb.201511055>.

Eddleston, M., et L. Mucke. 1993. « Molecular Profile of Reactive Astrocytes—Implications for Their Role in Neurologic Disease ». *Neuroscience* 54 (1): 15-36. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90380-X](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90380-X).

Efimenko, Evgeni, Kerry Bubb, Ho Yi Mak, Ted Holzman, Michel R. Leroux, Gary Ruvkun, James H. Thomas, et Peter Swoboda. 2005. « Analysis of *Xbx* Genes in *C. Elegans* ». *Development* 132 (8): 1923-34. <https://doi.org/10.1242/dev.01775>.

Eguether, Thibaut, Jovenal T. San Agustin, Brian T. Keady, Julie A. Jonassen, Yinwen Liang, Richard Francis, Kimimasa Tobita, et al. 2014. « IFT27 Links the BBSome to IFT for Maintenance of the Ciliary Signaling Compartment ». *Developmental Cell* 31 (3): 279-90. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.09.011>.

Eichele, Gregor, Eberhard Bodenschatz, Zuzana Ditte, Ann-Kathrin Günther, Shoba Kapoor, Yong Wang, et Christian Westendorf. 2020. « Cilia-Driven Flows in the Brain Third Ventricle ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 375 (1792): 20190154. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0154>.

El Zein, Loubna, Aouatef Ait-Lounis, Laurette Morlé, Joëlle Thomas, Brigitte Chhin, Nathalie Spassky, Walter Reith, et Bénédicte Durand. 2009. « RFX3 Governs Growth and Beating Efficiency of Motile Cilia in Mouse and Controls the Expression of Genes Involved in Human Ciliopathies ». *Journal of Cell Science* 122 (17): 3180-89. <https://doi.org/10.1242/jcs.048348>.

Emery, P., B. Durand, B. Mach, et W. Reith. 1996. « RFX Proteins, a Novel Family of DNA Binding Proteins Conserved in the Eukaryotic Kingdom ». *Nucleic Acids Research* 24 (5): 803-7. <https://doi.org/10.1093/nar/24.5.803>.

Essner, Jeffrey J., Jeffrey D. Amack, Molly K. Nyholm, Erin B. Harris, et H. Joseph Yost. 2005. « Kupffer's Vesicle Is a Ciliated Organ of Asymmetry in the Zebrafish Embryo That Initiates Left-Right Development of the Brain, Heart and Gut ». *Development* 132 (6): 1247-60. <https://doi.org/10.1242/dev.01663>.

Fahy, John V. 2010. « Airway Mucus Function and Dysfunction ». *The New England Journal of Medicine*.

Fame, Ryann M., Christian Cortés-Campos, et Hazel L. Sive. 2020. « Brain Ventricular System and Cerebrospinal Fluid Development and Function: Light at the End of the Tube: A Primer with Latest Insights ». *BioEssays* 42 (3): 1900186. <https://doi.org/10.1002/bies.201900186>.

Fame, Ryann M., et Maria K. Lehtinen. 2020. « Emergence and Developmental Roles of the Cerebrospinal Fluid System ». *Developmental Cell* 52 (3): 261-75.

<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.01.027>.

Fidelin, Kevin, Lydia Djenoune, Caleb Stokes, Andrew Prendergast, Johanna Gomez, Audrey Baradel, Filippo Del Bene, et Claire Wyart. 2015. « State-Dependent Modulation of Locomotion by GABAergic Spinal Sensory Neurons ». *Current Biology* 25 (23): 3035-47. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.070>.

Fleming, Angeleen, Roger Keynes, et David Tannahill. 2004. « A Central Role for the Notochord in Vertebral Patterning ». *Development* 131 (4): 873-80. <https://doi.org/10.1242/dev.00952>.

Foerster, Philippe, Marie Daclin, Shihavuddin Asm, Marion Faucourt, Alessandra Boletta, Auguste Genovesio, et Nathalie Spassky. 2016. « MTORC1 Signaling and Primary Cilia Are Required for Brain Ventricle Morphogenesis ». *Development*, janvier, dev.138271. <https://doi.org/10.1242/dev.138271>.

Ford, Matthew J., Patricia L. Yeyati, Girish R. Mali, Margaret A. Keighren, Scott H. Waddell, Heidi K. Mjoseng, Adam T. Douglas, et al. 2018. « A Cell/Cilia Cycle Biosensor for Single-Cell Kinetics Reveals Persistence of Cilia after G1/S Transition Is a General Property in Cells and Mice ». *Developmental Cell* 47 (4): 509-523.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.10.027>.

Fung, Karen Y.Y., Lu Dai, et William S. Trimble. 2014. « Cell and Molecular Biology of Septins ». In *International Review of Cell and Molecular Biology*, 310:289-339. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800180-6.00007-4>.

Gaillard, Anne-Laure, Teddy Mohamad, Feng B. Quan, Anne de Cian, Christian Mosimann, Hervé Tostivint, et Guillaume Pézéron. 2023. « Urp1 and Urp2 Act Redundantly to Maintain Spine Shape in Zebrafish Larvae ». *Developmental Biology* 496 (avril): 36-51. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2023.01.010>.

Gajiwala, Ketan S., Hua Chen, Fabrice Cornille, Bernard P. Roques, Walter Reith, Bernard Mach, et Stephen K. Burley. 2000. « Structure of the Winged-Helix Protein HRFX1 Reveals a New Mode of DNA Binding ». *Nature* 403 (6772): 916-21. <https://doi.org/10.1038/35002634>.

Garcia-Gonzalo, Francesc R, Kevin C Corbit, María Salomé Sirerol-Piquer, Gokul Ramaswami, Edgar A Otto, Thomas R Noriega, Allen D Seol, et al. 2011. « A Transition Zone Complex Regulates Mammalian Ciliogenesis and Ciliary Membrane Composition ». *Nature Genetics* 43 (8): 776-84. <https://doi.org/10.1038/ng.891>.

Garcia-Gonzalo, Francesc R., Siew Cheng Phua, Elle C. Roberson, Galo Garcia, Monika Abedin, Stéphane Schurmans, Takanari Inoue, et Jeremy F. Reiter. 2015. « Phosphoinositides Regulate Ciliary Protein Trafficking to Modulate Hedgehog Signaling ». *Developmental Cell* 34 (4): 400-409. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.08.001>.

García-Lecea, Marta, Igor Kondrychyn, Steven H. Fong, Zhang-Rui Ye, et Vladimir Korzh. 2008. « In Vivo Analysis of Choroid Plexus Morphogenesis in Zebrafish ». Édité par Hernan Lopez-Schier. *PLoS ONE* 3 (9): e3090. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003090>.

Gerber, Sylvie, Isabelle Perrault, Sylvain Hanein, Fabienne Barbet, Dominique Ducroq, Imad Ghazi, Dominique Martin-Coignard, et al. 2001. « Complete Exon-Intron Structure of the RPGR-Interacting Protein (RPGRIP1) Gene Allows the Identification of Mutations Underlying Leber Congenital Amaurosis ». *European Journal of Human*

Genetics 9 (8): 561-71. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200689>.

Gerhardt, Christoph, Johanna M. Lier, Stefanie Kuschel, et Ulrich Rüter. 2013. « The Ciliary Protein Ftm Is Required for Ventricular Wall and Septal Development ». Édité par Robert Dettman. *PLoS ONE* 8 (2): e57545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057545>.

Gerhardt, Christoph, Johanna Maria Lier, Stephan Burmühl, Andreas Struchtrup, Kathleen Deutschmann, Maik Vetter, Tristan Leu, Sandra Reeg, Tilman Grune, et Ulrich Rüter. 2015. « The Transition Zone Protein Rpgrip1l Regulates Proteasomal Activity at the Primary Cilium ». *Journal of Cell Biology* 210 (1): 1027-45. <https://doi.org/10.1083/jcb.201408060>.

Getchell, T, F Margolis, et M Getchell. 1984. « Perireceptor and Receptor Events in Vertebrate Olfaction ». *Progress in Neurobiology* 23 (4): 317-45. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(84\)90008-X](https://doi.org/10.1016/0301-0082(84)90008-X).

Ghaddar, Batoul, Luisa Lübke, David Couret, Sepand Rastegar, et Nicolas Diotel. 2021. « Cellular Mechanisms Participating in Brain Repair of Adult Zebrafish and Mammals after Injury ». *Cells* 10 (2): 391. <https://doi.org/10.3390/cells10020391>.

Giampietro, P. F., R. D. Blank, C. L. Raggio, S. Merchant, F. S. Jacobsen, T. Faciszewski, S. K. Shukla, A. R. Greenlee, C. Reynolds, et D. B. Schowalter. 2003. « Congenital and Idiopathic Scoliosis: Clinical and Genetic Aspects ». *Clinical Medicine & Research* 1 (2): 125-36. <https://doi.org/10.3121/cm.1.2.125>.

Giampietro, Pf, Cl Raggio, Ce Reynolds, Sk Shukla, E McPherson, N Ghebraniou, Fs Jacobsen, et al. 2005. « An Analysis of PAX1 in the Development of Vertebral Malformations: PAX1 and Vertebral Malformations ». *Clinical Genetics* 68 (5): 448-53. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2005.00520.x>.

Giampietro, Philip F. 2012. « Genetic Aspects of Congenital and Idiopathic Scoliosis ». *Scientifica* 2012: 1-15. <https://doi.org/10.6064/2012/152365>.

Giampietro, Philip F., Sally L. Dunwoodie, Kenro Kusumi, Olivier Pourquié, Olivier Tassy, Amaka C. Offiah, Alberto S. Cornier, et al. 2009. « Progress in the Understanding of the Genetic Etiology of Vertebral Segmentation Disorders in Humans ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1151 (1): 38-67. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03452.x>.

Gibbons, I. R., et A. V. Grimstone. 1960. « On Flagellar Structure in Certain Flagellates ». *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 7 (4): 697-716. <https://doi.org/10.1083/jcb.7.4.697>.

Gilula, Norton B., et Peter Satir. 1972. « THE CILIARY NECKLACE ». *Journal of Cell Biology* 53 (2): 494-509. <https://doi.org/10.1083/jcb.53.2.494>.

Goetz, Jacky G., Emily Steed, Rita R. Ferreira, Stéphane Roth, Caroline Ramspacher, Francesco Boselli, Gilles Charvin, et al. 2014. « Endothelial Cilia Mediate Low Flow Sensing during Zebrafish Vascular Development ». *Cell Reports* 6 (5): 799-808. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.01.032>.

Goetz, Sarah C., et Kathryn V. Anderson. 2010. « The Primary Cilium: A Signalling Centre during Vertebrate Development ». *Nature Reviews Genetics* 11 (5): 331-44. <https://doi.org/10.1038/nrg2774>.

Goetz, Sarah C., Karel F. Liem, et Kathryn V. Anderson. 2012. « The Spinocerebellar

Ataxia-Associated Gene Tau Tubulin Kinase 2 Controls the Initiation of Ciliogenesis ». *Cell* 151 (4): 847-58. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.010>.

Gordy, Clayton, et Hans Straka. 2021. « Vestibular Influence on Vertebrate Skeletal Symmetry and Body Shape ». *Frontiers in Systems Neuroscience* 15 (octobre): 753207. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2021.753207>.

Gorden, N.T., Arts, H.H., Parisi, M.A., Coene, K.L.M., Letteboer, S.J.F., Van Beersum, S.E.C., Mans, D.A., Hikida, A., Eckert, M., Knutzen, D., et al. (2008). CC2D2A Is Mutated in Joubert Syndrome and Interacts with the Ciliopathy-Associated Basal Body Protein CEP290. *The American Journal of Human Genetics* 83, 559–571. [10.1016/j.ajhg.2008.10.002](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.10.002).

Gorman, Kristen F., et Felix Breden. 2009. « Idiopathic-Type Scoliosis Is Not Exclusive to Bipedalism ». *Medical Hypotheses* 72 (3): 348-52. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2008.09.052>.

Gray, R.S., Wilm, T.P., Smith, J., Bagnat, M., Dale, R.M., Topczewski, J., Johnson, S.L., and Solnica-Krezel, L. (2014). Loss of col8a1a function during zebrafish embryogenesis results in congenital vertebral malformations. *Dev Biol* 386, 72–85. [10.1016/j.ydbio.2013.11.028](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.11.028).

Green, Jill A., Cullen L. Schmid, Elizabeth Bley, Paula C. Monsma, Anthony Brown, Laura M. Bohn, et Kirk Mykytyn. 2016. « Recruitment of β -Arrestin into Neuronal Cilia Modulates Somatostatin Receptor Subtype 3 Ciliary Localization ». *Molecular and Cellular Biology* 36 (1): 223-35. <https://doi.org/10.1128/MCB.00765-15>.

Grimes, D. T., C. W. Boswell, N. F. C. Morante, R. M. Henkelman, R. D. Burdine, et B. Ciruna. 2016. « Zebrafish Models of Idiopathic Scoliosis Link Cerebrospinal Fluid Flow Defects to Spine Curvature ». *Science* 352 (6291): 1341-44. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6419>.

Guirao, Boris, Alice Meunier, Stéphane Mortaud, Andrea Aguilar, Jean-Marc Corsi, Laetitia Strehl, Yuki Hirota, et al. 2010. « Coupling between Hydrodynamic Forces and Planar Cell Polarity Orients Mammalian Motile Cilia ». *Nature Cell Biology* 12 (4): 341-50. <https://doi.org/10.1038/ncb2040>.

Hackett, B P, S L Brody, M Liang, I D Zeitz, L A Bruns, et J D Gitlin. 1995. « Primary Structure of Hepatocyte Nuclear Factor/Forkhead Homologue 4 and Characterization of Gene Expression in the Developing Respiratory and Reproductive Epithelium. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (10): 4249-53. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4249>.

Hagenlocher, Cathrin, Peter Walentek, Christina Müller, Thomas Thumberger, et Kerstin Feistel. 2013. « Ciliogenesis and Cerebrospinal Fluid Flow in the Developing Xenopus Brain Are Regulated by Foxj1 ». *Cilia* 2 (1): 12. <https://doi.org/10.1186/2046-2530-2-12>.

Hall, Christopher J., Rachel H. Boyle, Xueying Sun, Sophie M. Wicker, June P Misa, Geoffrey W. Krissansen, Cristin G. Print, Kathryn E. Crosier, et Philip S. Crosier. 2014. « Epidermal Cells Help Coordinate Leukocyte Migration during Inflammation through Fatty Acid-Fuelled Matrix Metalloproteinase Production ». *Nature Communications* 5 (1): 3880. <https://doi.org/10.1038/ncomms4880>.

- Halloran, Daniel, Hilary W. Durbano, et Anja Nohe. 2020. « Bone Morphogenetic Protein-2 in Development and Bone Homeostasis ». *Journal of Developmental Biology* 8 (3): 19. <https://doi.org/10.3390/jdb8030019>.
- Hameed, A. 2003. « Evidence of RPGRIP1 Gene Mutations Associated with Recessive Cone-Rod Dystrophy ». *Journal of Medical Genetics* 40 (8): 616-19. <https://doi.org/10.1136/jmg.40.8.616>.
- Han, Young-Goo, Benjamin H. Kwok, et Maurice J. Kernan. 2003. « Intraflagellar Transport Is Required in Drosophila to Differentiate Sensory Cilia but Not Sperm ». *Current Biology* 13 (19): 1679-86. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.08.034>.
- Hanein, Sylvain, Isabelle Perrault, Sylvie Gerber, Gaëlle Tanguy, Fabienne Barbet, Dominique Ducroq, Patrick Calvas, et al. 2004. « Leber Congenital Amaurosis: Comprehensive Survey of the Genetic Heterogeneity, Refinement of the Clinical Definition, and Genotype-Phenotype Correlations as a Strategy for Molecular Diagnosis ». *Human Mutation* 23 (4): 306-17. <https://doi.org/10.1002/humu.20010>.
- Hansen, A., et E. Zeiske. 1998. « The Peripheral Olfactory Organ of the Zebrafish, Danio Rerio: An Ultrastructural Study ». *Chemical Senses* 23 (1): 39-48. <https://doi.org/10.1093/chemse/23.1.39>.
- Harris, J. Aaron, Yi Liu, Pinfen Yang, Peter Kner, et Karl F. Lehtreck. 2016. « Single-Particle Imaging Reveals Intraflagellar Transport-Independent Transport and Accumulation of EB1 in *Chlamydomonas* Flagella ». Édité par Erika Holzbaur. *Molecular Biology of the Cell* 27 (2): 295-307. <https://doi.org/10.1091/mbc.e15-08-0608>.
- Harris, Peter C., Kyongtae T. Bae, Sandro Rossetti, Vicente E. Torres, Jared J. Grantham, Arlene B. Chapman, Lisa M. Guay-Woodford, et al. 2006. « Cyst Number but Not the Rate of Cystic Growth Is Associated with the Mutated Gene in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 17 (11): 3013-19. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006080835>.
- Hateboer, N., M. A. v Dijk, N. Bogdanova, E. Coto, A. K. Saggarr-Malik, J. L. San Millan, R. Torra, M. Breuning, et D. Ravine. 1999. « Comparison of Phenotypes of Polycystic Kidney Disease Types 1 and 2. European PKD1-PKD2 Study Group ». *Lancet (London, England)* 353 (9147): 103-7. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)03495-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(98)03495-3).
- Hayes, Madeline, Mizue Naito, Avais Daulat, Stephane Angers, et Brian Ciruna. 2013. « Ptk7 Promotes Non-Canonical Wnt/PCP-Mediated Morphogenesis and Inhibits Wnt/ β -Catenin-Dependent Cell Fate Decisions during Vertebrate Development ». *Development* 140 (10): 2245-2245. <https://doi.org/10.1242/dev.096974>.
- Heisenberg, Carl-Philipp, Masazumi Tada, Leonor Sau de, Miguel L Concha, Robert Geisler, Derek L Stemple, James C Smith, et Stephen W Wilson. 2000. « Silberblick/Wnt11 Mediates Convergent Extension Movements during Zebrafish Gastrulation » 405.
- Higashijima, Shin-Ichi, Gail Mandel, et Joseph R. Fetcho. 2004. « Distribution of Prospective Glutamatergic, Glycinergic, and GABAergic Neurons in Embryonic and Larval Zebrafish ». *The Journal of Comparative Neurology* 480 (1): 1-18. <https://doi.org/10.1002/cne.20278>.
- Hiraki, Madoka, Yuki Nakazawa, Ritsu Kamiya, et Masafumi Hirono. 2007. « Bld10p

Constitutes the Cartwheel-Spoke Tip and Stabilizes the 9-Fold Symmetry of the Centriole ». *Current Biology* 17 (20): 1778-83. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.09.021>.

Hirono, Masafumi. 2014. « Cartwheel Assembly ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369 (1650): 20130458. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0458>.

Hjeij, Rim, Alexandros Onoufriadis, Christopher M. Watson, Christopher E. Slagle, Nikolai T. Klena, Gerard W. Dougherty, Małgorzata Kurkowiak, et al. 2014. « CCDC151 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia by Disruption of the Outer Dynein Arm Docking Complex Formation ». *The American Journal of Human Genetics* 95 (3): 257-74. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.08.005>.

Ho, Kim Hoa, Valentina Scarpetta, Chiara Salio, Elisa D'Este, Martin Meschkat, Christian A. Wurm, Matthias Kneussel, et al. 2023. « Intrinsic Microtubule Destabilization of Multiciliated Choroid Plexus Epithelial Cells during Postnatal Lifetime ». Preprint. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1101/2023.01.10.523428>.

Horiguchi, Hiroyuki, Tyler J. Loftus, Russell B. Hawkins, Steven L. Raymond, Julie A. Stortz, McKenzie K. Hollen, Brett P. Weiss, et al. 2018. « Innate Immunity in the Persistent Inflammation, Immunosuppression, and Catabolism Syndrome and Its Implications for Therapy ». *Frontiers in Immunology* 9 (avril): 595. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00595>.

Hsu, John D., et Ros Quinlivan. 2013. « Scoliosis in Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) ». *Neuromuscular Disorders* 23 (8): 611-17. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2013.05.003>.

Hu, Qicong, Ljiljana Milenkovic, Hua Jin, Matthew P. Scott, Maxence V. Nachury, Elias T. Spiliotis, et W. James Nelson. 2010. « A Septin Diffusion Barrier at the Base of the Primary Cilium Maintains Ciliary Membrane Protein Distribution ». *Science* 329 (5990): 436-39. <https://doi.org/10.1126/science.1191054>.

Hu, Wen F., Oz Pomp, Tawfeg Ben-Omran, Andrew Kodani, Katrin Henke, Ganeshwaran H. Mochida, Timothy W. Yu, et al. 2014. « Katanin P80 Regulates Human Cortical Development by Limiting Centriole and Cilia Number ». *Neuron* 84 (6): 1240-57. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.017>.

Huang, Hui, Ying Wang, Huishuang Chen, Yanhua Chen, Jing Wu, Pei-Wen Chiang, Ning Fan, et al. 2017. « Targeted next Generation Sequencing Identified Novel Mutations in RPGRIP1 Associated with Both Retinitis Pigmentosa and Leber's Congenital Amaurosis in Unrelated Chinese Patients ». *Oncotarget* 8 (21): 35176-83. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17052>.

Huang, Mingxia, Zheng Zhou, et Stephen J Elledge. 1998. « The DNA Replication and Damage Checkpoint Pathways Induce Transcription by Inhibition of the Crt1 Repressor ». *Cell* 94 (5): 595-605. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81601-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81601-3).

Huang, Ning, Donghui Zhang, Fangyuan Li, Peiyuan Chai, Song Wang, Junlin Teng, et Jianguo Chen. 2018. « M-Phase Phosphoprotein 9 Regulates Ciliogenesis by Modulating CP110-CEP97 Complex Localization at the Mother Centriole ». *Nature Communications* 9 (1): 4511. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06990-9>.

Huang, Peng, et Alexander F. Schier. 2009. « Dampened Hedgehog Signaling but

Normal Wnt Signaling in Zebrafish without Cilia ». *Development* 136 (18): 3089-98. <https://doi.org/10.1242/dev.041343>.

Huang, Xi, Jiang Liu, Tatiana Ketova, Jonathan T. Fleming, Vandana K. Grover, Michael K. Cooper, Ying Litingtung, et Chin Chiang. 2010. « Transventricular Delivery of Sonic Hedgehog Is Essential to Cerebellar Ventricular Zone Development ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (18): 8422-27. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911838107>.

Huangfu, Danwei, et Kathryn V. Anderson. 2005. « Cilia and Hedgehog Responsiveness in the Mouse ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (32): 11325-30. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505328102>.

Huangfu, Danwei, Aimin Liu, Andrew S. Rakeman, Noel S. Murcia, Lee Niswander, et Kathryn V. Anderson. 2003. « Hedgehog Signalling in the Mouse Requires Intraflagellar Transport Proteins ». *Nature* 426 (6962): 83-87. <https://doi.org/10.1038/nature02061>.

Hubbard, Jeffrey Michael, Urs Lucas Böhm, Andrew Prendergast, Po-En Brian Tseng, Morgan Newman, Caleb Stokes, et Claire Wyart. 2016. « Intraspinal Sensory Neurons Provide Powerful Inhibition to Motor Circuits Ensuring Postural Control during Locomotion ». *Current Biology* 26 (21): 2841-53. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.026>.

Ibañez-Tallon, Inés, Axel Pagenstecher, Manfred Fliegauf, Heike Olbrich, Andreas Kispert, Uwe-Peter Ketelsen, Alison North, Nathaniel Heintz, et Heymut Omran. 2004. « Dysfunction of Axonemal Dynein Heavy Chain Mdnah5 Inhibits Ependymal Flow and Reveals a Novel Mechanism for Hydrocephalus Formation ». *Human Molecular Genetics* 13 (18): 2133-41. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh219>.

Inoue, Ken-ichi, Shigeru Ozaki, Takashi Shiga, Kosei Ito, Tomoyuki Masuda, Nobuo Okado, Tsutomu Iseda, et al. 2002. « Runx3 Controls the Axonal Projection of Proprioceptive Dorsal Root Ganglion Neurons ». *Nature Neuroscience* 5 (10): 946-54. <https://doi.org/10.1038/nn925>.

Insinna, Christine, Quanlong Lu, Isabella Teixeira, Adam Harned, Elizabeth M. Semler, Jim Stauffer, Valentin Magidson, et al. 2019. « Investigation of F-BAR Domain PACSIN Proteins Uncovers Membrane Tubulation Function in Cilia Assembly and Transport ». *Nature Communications* 10 (1): 428. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08192-9>.

Jacquet, Benoit V., Raul Salinas-Mondragon, Huixuan Liang, Blair Therit, Justin D. Buie, Michael Dykstra, Kenneth Campbell, Lawrence E. Ostrowski, Steven L. Brody, et H. Troy Ghashghaei. 2009. « FoxJ1-Dependent Gene Expression Is Required for Differentiation of Radial Glia into Ependymal Cells and a Subset of Astrocytes in the Postnatal Brain ». *Development* 136 (23): 4021-31. <https://doi.org/10.1242/dev.041129>.

Jami, L. 1992. « Golgi Tendon Organs in Mammalian Skeletal Muscle: Functional Properties and Central Actions ». *Physiological Reviews* 72 (3): 623-66. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.3.623>.

Jana, Swadhin Chandra, Gaëlle Marteil, et Mónica Bettencourt-Dias. 2014. « Mapping Molecules to Structure: Unveiling Secrets of Centriole and Cilia Assembly with near-Atomic Resolution ». *Current Opinion in Cell Biology* 26 (février): 96-106. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.12.001>.

- Jékely, Gáspár, et Detlev Arendt. 2006. « Evolution of Intraflagellar Transport from Coated Vesicles and Autogenous Origin of the Eukaryotic Cilium ». *BioEssays* 28 (2): 191-98. <https://doi.org/10.1002/bies.20369>.
- Jenkins, P. M., D. P. McEwen, et J. R. Martens. 2009. « Olfactory Cilia: Linking Sensory Cilia Function and Human Disease ». *Chemical Senses* 34 (5): 451-64. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjp020>.
- Jensen, Victor L, Chunmei Li, Rachel V Bowie, Lara Clarke, Swetha Mohan, Oliver E Blacque, et Michel R Leroux. 2015. « Formation of the Transition Zone by Mks5/Rpgrip1L Establishes a Ciliary Zone of Exclusion (CIZE) That Compartmentalises Ciliary Signalling Proteins and Controls PIP₂ Ciliary Abundance ». *The EMBO Journal* 34 (20): 2537-56. <https://doi.org/10.15252/embj.201488044>.
- Ji, Yurim, Soomin Chae, Hyun-Kyung Lee, Inji Park, Chowon Kim, Tayaba Ismail, Youni Kim, et al. 2019. « Peroxiredoxin5 Controls Vertebrate Ciliogenesis by Modulating Mitochondrial Reactive Oxygen Species ». *Antioxidants & Redox Signaling* 30 (14): 1731-45. <https://doi.org/10.1089/ars.2018.7507>.
- Jin, Xiaowei, Charlotte von Gall, Rick L. Pieschl, Valentin K. Gribkoff, Jorg H. Stehle, Steven M. Reppert, et David R. Weaver. 2003. « Targeted Disruption of the Mouse Mel_{1b} Melatonin Receptor ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (3): 1054-60. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.3.1054-1060.2003>.
- Joo, Kwangsic, Chang Gun Kim, Mi-Sun Lee, Hyun-Yi Moon, Sang-Hee Lee, Mi Jeong Kim, Hee-Seok Kweon, et al. 2013. « CCDC41 Is Required for Ciliary Vesicle Docking to the Mother Centriole ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (15): 5987-92. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220927110>.
- Jussila, Maria, Curtis W. Boswell, Nigel W. Griffiths, Patrick G. Pumputis, et Brian Ciruna. 2022. « Live Imaging and Conditional Disruption of Native PCP Activity Using Endogenously Tagged Zebrafish SfGFP-Vangl2 ». *Nature Communications* 13 (1): 5598. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33322-9>.
- Justice, Cristina M, Kevin Bishop, Blake Carrington, Jim C Mullikin, Kandice Swindle, Beth Marosy, Raman Sood, Nancy H Miller, et Alexander F Wilson. 2016. « Evaluation of *IRX* Genes and Conserved Noncoding Elements in a Region on 5p13.3 Linked to Families with Familial Idiopathic Scoliosis and Kyphosis ». *G3 Genes|Genomes|Genetics* 6 (6): 1707-12. <https://doi.org/10.1534/g3.116.029975>.
- Kanemura, T., N. Kawakami, M. Deguchi, K. Mimatsu, et H. Iwata. 1997. « Natural Course of Experimental Scoliosis in Pinealectomized Chickens ». *Spine* 22 (14): 1563-67. <https://doi.org/10.1097/00007632-199707150-00006>.
- Karlstrom, Rolf O., Oksana V. Tyurina, Atsushi Kawakami, Noriyuki Nishioka, William S. Talbot, Hiroshi Sasaki, et Alexander F. Schier. 2003. « Genetic Analysis of Zebrafish *Gli1* and *Gli2* Reveals Divergent Requirements for *Gli* Genes in Vertebrate Development ». *Development* 130 (8): 1549-64. <https://doi.org/10.1242/dev.00364>.
- Karner, Courtney M., Fanxin Long, Lilianna Solnica-Krezel, Kelly R. Monk, et Ryan S. Gray. 2015. « Gpr126/Adgrg6 Deletion in Cartilage Models Idiopathic Scoliosis and Pectus Excavatum in Mice ». *Human Molecular Genetics* 24 (15): 4365-73. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv170>.
- Kasahara, Takaoki, Kuniya Abe, Kazuyuki Mekada, Atsushi Yoshiki, et Tadafumi Kato. 2010. « Genetic Variation of Melatonin Productivity in Laboratory Mice under

- Domestication ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (14): 6412-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914399107>.
- Kawai, T, et S Akira. 2006. « TLR Signaling ». *Cell Death & Differentiation* 13 (5): 816-25. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401850>.
- Kawai, Taro, et Shizuo Akira. 2010. « The Role of Pattern-Recognition Receptors in Innate Immunity: Update on Toll-like Receptors ». *Nature Immunology* 11 (5): 373-84. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>.
- Kee, Hooi Lynn, John F. Dishinger, T. Lynne Blasius, Chia-Jen Liu, Ben Margolis, et Kristen J. Verhey. 2012. « A Size-Exclusion Permeability Barrier and Nucleoporins Characterize a Ciliary Pore Complex That Regulates Transport into Cilia ». *Nature Cell Biology* 14 (4): 431-37. <https://doi.org/10.1038/ncb2450>.
- Kelly, Michael P., Tenner J. Guillaume, et Lawrence G. Lenke. 2015. « Spinal Deformity Associated with Chiari Malformation ». *Neurosurgery Clinics of North America* 26 (4): 579-85. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2015.06.005>.
- Kennedy, Breandán, et Jarema Malicki. 2009. « What Drives Cell Morphogenesis: A Look inside the Vertebrate Photoreceptor ». *Developmental Dynamics* 238 (9): 2115-38. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22010>.
- Khanna, Hemant, Erica E Davis, Carlos A Murga-Zamalloa, Alejandro Estrada-Cuzcano, Irma Lopez, Anneke I den Hollander, Marijke N Zonneveld, et al. 2009. « A Common Allele in RPGRIP1L Is a Modifier of Retinal Degeneration in Ciliopathies ». *Nature Genetics* 41 (6): 739-45. <https://doi.org/10.1038/ng.366>.
- Kilian, Beate, Hannu Mansukoski, Filipa Carreira Barbosa, Florian Ulrich, Masazumi Tada, et Carl-Philipp Heisenberg. 2003. « The Role of Ppt/Wnt5 in Regulating Cell Shape and Movement during Zebrafish Gastrulation ». *Mechanisms of Development* 120 (4): 467-76. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(03\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(03)00004-2).
- Kim, Su Kyoung, Asako Shindo, Tae Joo Park, Edwin C. Oh, Srimoyee Ghosh, Ryan S. Gray, Richard A. Lewis, et al. 2010. « Planar Cell Polarity Acts Through Septins to Control Collective Cell Movement and Ciliogenesis ». *Science* 329 (5997): 1337-40. <https://doi.org/10.1126/science.1191184>.
- Klink, Björn Udo, Eldar Zent, Puneet Juneja, Anne Kuhlee, Stefan Raunser, et Alfred Wittinghofer. 2017. « A Recombinant BBSome Core Complex and How It Interacts with Ciliary Cargo ». *ELife* 6 (novembre): e27434. <https://doi.org/10.7554/eLife.27434>.
- Klos Dehring, Deborah A., Eszter K. Vadar, Michael E. Werner, Jennifer W. Mitchell, Peter Hwang, et Brian J. Mitchell. 2013. « Deuterosome-Mediated Centriole Biogenesis ». *Developmental Cell* 27 (1): 103-12. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.08.021>.
- Kobayashi, Tetsuo, et Brian D. Dynlacht. 2011. « Regulating the Transition from Centriole to Basal Body ». *Journal of Cell Biology* 193 (3): 435-44. <https://doi.org/10.1083/jcb.201101005>.
- Konjikusic, Mia J., Patra Yeetong, Curtis W. Boswell, Chanjae Lee, Elle C. Roberson, Rungnapa Ittiwut, Kanya Suphapeetiporn, et al. 2018. « Mutations in Kinesin Family Member 6 Reveal Specific Role in Ependymal Cell Ciliogenesis and Human Neurological Development ». Édité par Gregory J. Pazour. *PLOS Genetics* 14 (11): e1007817. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007817>.

- Kou, Ikuyo, Yohei Takahashi, Todd A Johnson, Atsushi Takahashi, Long Guo, Jin Dai, Xusheng Qiu, et al. 2013. « Genetic Variants in GPR126 Are Associated with Adolescent Idiopathic Scoliosis ». *Nature Genetics* 45 (6): 676-79. <https://doi.org/10.1038/ng.2639>.
- Kozminski, K G, K A Johnson, P Forscher, et J L Rosenbaum. 1993. « A Motility in the Eukaryotic Flagellum Unrelated to Flagellar Beating. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (12): 5519-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.12.5519>.
- Kramer-Zucker, Albrecht G., Felix Olale, Courtney J. Haycraft, Bradley K. Yoder, Alexander F. Schier, et Iain A. Drummond. 2005. « Cilia-Driven Fluid Flow in the Zebrafish Pronephros, Brain and Kupffer's Vesicle Is Required for Normal Organogenesis ». *Development* 132 (8): 1907-21. <https://doi.org/10.1242/dev.01772>.
- Krock, Bryan L., Ishara Mills-Henry, et Brian D. Perkins. 2009. « Retrograde Intraflagellar Transport by Cytoplasmic Dynein-2 Is Required for Outer Segment Extension in Vertebrate Photoreceptors but Not Arrestin Translocation ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50 (11): 5463. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-3828>.
- Kroehne, Volker, Dorian Freudenreich, Stefan Hans, Jan Kaslin, et Michael Brand. 2011. « Regeneration of the Adult Zebrafish Brain from Neurogenic Radial Glia-Type Progenitors ». *Development* 138 (22): 4831-41. <https://doi.org/10.1242/dev.072587>.
- Kunimoto, Koshi, Yuji Yamazaki, Tomoki Nishida, Kyosuke Shinohara, Hiroaki Ishikawa, Toshiaki Hasegawa, Takeshi Okanoue, et al. 2012. « Coordinated Ciliary Beating Requires Odf2-Mediated Polarization of Basal Bodies via Basal Feet ». *Cell* 148 (1-2): 189-200. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.052>.
- Kwak, Mi-Kyoung, Jeong-Min Cho, Bo Huang, Soona Shin, et Thomas W. Kensler. 2007. « Role of Increased Expression of the Proteasome in the Protective Effects of Sulforaphane against Hydrogen Peroxide-Mediated Cytotoxicity in Murine Neuroblastoma Cells ». *Free Radical Biology and Medicine* 43 (5): 809-17. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.029>.
- Kyritsis, Nikos, Caghan Kizil, Sara Zocher, Volker Kroehne, Jan Kaslin, Dorian Freudenreich, Anne Iltzsche, et Michael Brand. 2012. « Acute Inflammation Initiates the Regenerative Response in the Adult Zebrafish Brain ». *Science* 338 (6112): 1353-56. <https://doi.org/10.1126/science.1228773>.
- Kyrousi, Christina, Marina Arbi, Gregor-Alexander Pilz, Dafni-Eleftheria Pefani, Maria-Eleni Lalioti, Jovica Ninkovic, Magdalena Götz, Zoi Lygerou, et Stavros Taraviras. 2015. « Mcdas and GemC1/Lynkeas Are Key Regulators for the Generation of Multiciliated Ependymal Cells in the Adult Neurogenic Niche ». *Development*, janvier, dev.126342. <https://doi.org/10.1242/dev.126342>.
- Laclef, Christine, Isabelle Anselme, Laurianne Besse, Martin Catala, Aurélien Palmyre, Dominique Baas, Marie Paschaki, et al. 2015. « The Role of Primary Cilia in Corpus Callosum Formation Is Mediated by Production of the Gli3 Repressor ». *Human Molecular Genetics* 24 (17): 4997-5014. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv221>.
- Lambert, François M., David Malinvaud, Joan Glaunès, Catherine Bergot, Hans Straka, et Pierre-Paul Vidal. 2009. « Vestibular Asymmetry as the Cause of Idiopathic Scoliosis: A Possible Answer from *Xenopus* ». *The Journal of Neuroscience* 29 (40): 12477-83. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2583-09.2009>.
- Lambert, François M., David Malinvaud, Maxime Gratacap, Hans Straka, et Pierre-

- Paul Vidal. 2013. « Restricted Neural Plasticity in Vestibulospinal Pathways after Unilateral Labyrinthectomy as the Origin for Scoliotic Deformations ». *The Journal of Neuroscience* 33 (16): 6845-56. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4842-12.2013>.
- LaMotte, C. C. 1987. « Vasoactive Intestinal Polypeptide Cerebrospinal Fluid-Contacting Neurons of the Monkey and Cat Spinal Central Canal ». *The Journal of Comparative Neurology* 258 (4): 527-41. <https://doi.org/10.1002/cne.902580405>.
- Langousis, Gerasimos, Michelle M. Shimogawa, Edwin A. Saada, Ajay A. Vashisht, Roberto Spreafico, Andrew R. Nager, William D. Barshop, Maxence V. Nachury, James A. Wohlschlegel, et Kent L. Hill. 2016. « Loss of the BBSome Perturbs Endocytic Trafficking and Disrupts Virulence of *Trypanosoma Brucei* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (3): 632-37. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518079113>.
- Latour, Brooke L., Julie C. Van De Weghe, Tamara D.S. Rusterholz, Stef J.F. Letteboer, Arianna Gomez, Ranad Shaheen, Matthias Gesemann, et al. 2020. « Dysfunction of the Ciliary ARMC9/TOGARAM1 Protein Module Causes Joubert Syndrome ». *Journal of Clinical Investigation*, mai. <https://doi.org/10.1172/JCI131656>.
- Lattke, Michael, Alexander Magnutzki, Paul Walther, Thomas Wirth, et Bernd Baumann. 2012. « Nuclear Factor KB Activation Impairs Ependymal Ciliogenesis and Links Neuroinflammation to Hydrocephalus Formation ». *The Journal of Neuroscience* 32 (34): 11511-23. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0182-12.2012>.
- Laurençon, Anne, Raphaëlle Dubruille, Evgeni Efimenko, Guillaume Grenier, Ryan Bissett, Elisabeth Cortier, Vivien Rolland, Peter Swoboda, et Bénédicte Durand. 2007. « Identification of Novel Regulatory Factor X (RFX) Target Genes by Comparative Genomics in *Drosophila* Species ». *Genome Biology* 8 (9): R195. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-r195>.
- Lechtreck, Karl-Ferdinand, Eric C. Johnson, Tsuyoshi Sakai, Deborah Cochran, Bryan A. Ballif, John Rush, Gregory J. Pazour, Mitsuo Ikebe, et George B. Witman. 2009. « The Chlamydomonas Reinhardtii BBSome Is an IFT Cargo Required for Export of Specific Signaling Proteins from Flagella ». *Journal of Cell Biology* 187 (7): 1117-32. <https://doi.org/10.1083/jcb.200909183>.
- Lee, Lance. 2013. « Riding the Wave of Ependymal Cilia: Genetic Susceptibility to Hydrocephalus in Primary Ciliary Dyskinesia: Ependymal Cilia and PCD ». *Journal of Neuroscience Research* 91 (9): 1117-32. <https://doi.org/10.1002/jnr.23238>.
- Leeuwen, Lianne Martine van, Robert J. Evans, Kin Ki Jim, Theo Verboom, Xiaoming Fang, Aleksandra Bojarczuk, Jarema Malicki, Simon Andrew Johnston, et Astrid Marijke van der Sar. 2018. « A Transgenic Zebrafish Model for the *in Vivo* Study of the Blood and Choroid Plexus Brain Barriers Using *Claudin 5* ». *Biology Open* 7 (2): bio030494. <https://doi.org/10.1242/bio.030494>.
- Lehtinen, Maria K., Mauro W. Zappaterra, Xi Chen, Yawei J. Yang, Anthony D. Hill, Melody Lun, Thomas Maynard, et al. 2011. « The Cerebrospinal Fluid Provides a Proliferative Niche for Neural Progenitor Cells ». *Neuron* 69 (5): 893-905. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.023>.
- Levanon, D. 2002. « The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons ». *The EMBO Journal* 21 (13): 3454-63. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf370>.

Leventea, E., Hazime, K., Zhao, C., and Malicki, J. (2016). Analysis of cilia structure and function in zebrafish. In *Methods in Cell Biology* (Elsevier), pp. 179–227. [10.1016/bs.mcb.2016.04.016](https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.04.016).

Li, Lin, Xueshan Xiao, Shiqiang Li, Xiaoyun Jia, Panfeng Wang, Xiangming Guo, Xiaodong Jiao, Qingjiong Zhang, et J. Fielding Hejtmancik. 2011. « Detection of Variants in 15 Genes in 87 Unrelated Chinese Patients with Leber Congenital Amaurosis ». Édité par Amanda Ewart Toland. *PLoS ONE* 6 (5): e19458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019458>.

Lichtenfeld, J., J. Viehweg, J. Schutzenmeister, et W. W. Naumann. 1999. « Reissner's Substance Expressed as a Transient Pattern in Vertebrate Floor Plate ». *Anatomy and Embryology* 200 (2): 161-74. <https://doi.org/10.1007/s004290050270>.

Liew, Gerald M., Fan Ye, Andrew R. Nager, J. Patrick Murphy, Jaclyn S. Lee, Mike Aguiar, David K. Breslow, Steven P. Gygi, et Maxence V. Nachury. 2014. « The Intraflagellar Transport Protein IFT27 Promotes BBSome Exit from Cilia through the GTPase ARL6/BBS3 ». *Developmental Cell* 31 (3): 265-78. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.09.004>.

Lim, Lorena, Heping Zhou, et Robert H. Costa. 1997. « The Winged Helix Transcription Factor HFH-4 Is Expressed during Choroid Plexus Epithelial Development in the Mouse Embryo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (7): 3094-99. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.3094>.

Lin, Huawen, Suyang Guo, et Susan K. Dutcher. 2018. « RPGRIP1L Helps to Establish the Ciliary Gate for Entry of Proteins ». *Journal of Cell Science*, janvier, jcs.220905. <https://doi.org/10.1242/jcs.220905>.

Liu, Aimin, Baolin Wang, et Lee A. Niswander. 2005. « Mouse Intraflagellar Transport Proteins Regulate Both the Activator and Repressor Functions of Gli Transcription Factors ». *Development* 132 (13): 3103-11. <https://doi.org/10.1242/dev.01894>.

Liu, Yan, Narendra Pathak, Albrecht Kramer-Zucker, et Iain A. Drummond. 2007. « Notch Signaling Controls the Differentiation of Transporting Epithelia and Multiciliated Cells in the Zebrafish Pronephros ». *Development* 134 (6): 1111-22. <https://doi.org/10.1242/dev.02806>.

Loges, Niki Tomas, Heike Olbrich, Anita Becker-Heck, Karsten Häffner, Angelina Heer, Christina Reinhard, Miriam Schmidts, et al. 2009. « Deletions and Point Mutations of LRRC50 Cause Primary Ciliary Dyskinesia Due to Dynein Arm Defects ». *The American Journal of Human Genetics* 85 (6): 883-89. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.10.018>.

Londono, Douglas, Ikuyo Kou, Todd A Johnson, Swarkar Sharma, Yoji Ogura, Tatsuhiko Tsunoda, Atsushi Takahashi, et al. 2014. « A Meta-Analysis Identifies Adolescent Idiopathic Scoliosis Association with *LBX1* Locus in Multiple Ethnic Groups ». *Journal of Medical Genetics* 51 (6): 401-6. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-102067>.

Lu, Hao, Aidana Shagirova, Julian L. Goggi, Hui Li Yeo, et Sudipto Roy. 2020. « Reissner Fibre-Induced Urotensin Signalling from Cerebrospinal Fluid-Contacting Neurons Prevents Scoliosis of the Vertebrate Spine ». *Biology Open* 9 (5): bio052027. <https://doi.org/10.1242/bio.052027>.

- Lu, Quanlong, Christine Insinna, Carolyn Ott, Jimmy Stauffer, Petra A. Pintado, Juliati Rahajeng, Ulrich Baxa, et al. 2015. « Early Steps in Primary Cilium Assembly Require EHD1/EHD3-Dependent Ciliary Vesicle Formation ». *Nature Cell Biology* 17 (3): 228-40. <https://doi.org/10.1038/ncb3109>.
- Lun, Melody P., Edwin S. Monuki, et Maria K. Lehtinen. 2015. « Development and Functions of the Choroid Plexus–Cerebrospinal Fluid System ». *Nature Reviews Neuroscience* 16 (8): 445-57. <https://doi.org/10.1038/nrn3921>.
- Lunt, Shannon C., Tony Haynes, et Brian D. Perkins. 2009. « Zebrafish *Ift57*, *Ift88*, and *Ift172* Intraflagellar Transport Mutants Disrupt Cilia but Do Not Affect Hedgehog Signaling ». *Developmental Dynamics* 238 (7): 1744-59. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21999>.
- Lyons, David A., et William S. Talbot. 2015. « Glial Cell Development and Function in Zebrafish ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (2): a020586. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020586>.
- Ma, Q., C. Fode, F. Guillemot, et D. J. Anderson. 1999. « Neurogenin1 and Neurogenin2 Control Two Distinct Waves of Neurogenesis in Developing Dorsal Root Ganglia ». *Genes & Development* 13 (13): 1717-28. <https://doi.org/10.1101/gad.13.13.1717>.
- Machida, M., J. Dubousset, Y. Imamura, T. Iwaya, T. Yamada, et J. Kimura. 1993. « An Experimental Study in Chickens for the Pathogenesis of Idiopathic Scoliosis ». *Spine* 18 (12): 1609-15. <https://doi.org/10.1097/00007632-199309000-00007>.
- . 1995. « Role of Melatonin Deficiency in the Development of Scoliosis in Pinealectomised Chickens ». *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 77 (1): 134-38.
- Machida, M., J. Dubousset, Y. Imamura, T. Iwaya, T. Yamada, J. Kimura, et S. Toriyama. 1994. « Pathogenesis of Idiopathic Scoliosis: SEPs in Chicken with Experimentally Induced Scoliosis and in Patients with Idiopathic Scoliosis ». *Journal of Pediatric Orthopedics* 14 (3): 329-35. <https://doi.org/10.1097/01241398-199405000-00010>.
- Machida, M., Y. Miyashita, I. Murai, J. Dubousset, T. Yamada, et J. Kimura. 1997. « Role of Serotonin for Scoliotic Deformity in Pinealectomized Chicken ». *Spine* 22 (12): 1297-1301. <https://doi.org/10.1097/00007632-199706150-00004>.
- Machida, Masafumi, Ichiro Murai, Yukiko Miyashita, Jean Dubousset, Thoru Yamada, et Jun Kimura. 1999. « Pathogenesis of Idiopathic Scoliosis: Experimental Study in Rats ». *Spine* 24 (19): 1985. <https://doi.org/10.1097/00007632-199910010-00004>.
- Machida, Masafumi, Masashi Saito, Jean Dubousset, Thoru Yamada, Jun Kimura, et Keiichi Shibasaki. 2005. « Pathological Mechanism of Idiopathic Scoliosis: Experimental Scoliosis in Pinealectomized Rats ». *European Spine Journal* 14 (9): 843-48. <https://doi.org/10.1007/s00586-004-0806-1>.
- Mahuzier, Alexia, Helori-Mael Gaudé, Valentina Grampa, Isabelle Anselme, Flora Silbermann, Margot Leroux-Berger, Delphine Delacour, et al. 2012. « Dishevelled Stabilization by the Ciliopathy Protein Rpgrip1l Is Essential for Planar Cell Polarity ». *Journal of Cell Biology* 198 (5): 927-40. <https://doi.org/10.1083/jcb.201111009>.
- Malicki, Jarema, et Tomer Avidor-Reiss. 2014. « From the Cytoplasm into the Cilium: Bon Voyage ». *Organogenesis* 10 (1): 138-57. <https://doi.org/10.4161/org.29055>.

Mangos, S., Lam, P., Zhao, A., Liu, Y., Mudumana, S., Vasilyev, A., Liu, A., and Drummond, I.A. (2010). The ADPKD genes *pkd1a/b* and *pkd2* regulate extracellular matrix formation. *Disease Models & Mechanisms* 3, 354–365. [10.1242/dmm.003194](https://doi.org/10.1242/dmm.003194).

Marie-Hardy, Laura, Lotfi Slimani, Giulia Messa, Zaineb El Bourakkadi, Annick Prigent, Celia Sayetta, Fanny Koëth, Hugues Pascal-Moussellard, Claire Wyart, et Yasmine Cantaut-Belarif. 2023. « Loss of CSF-Contacting Neuron Sensory Function Is Associated with a Hyper-Kyphosis of the Spine Reminiscent of Scheuermann's Disease ». *Scientific Reports* 13 (1): 5529. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32536-1>.

Marjoram, Lindsay, Ashley Alvers, M. Elizabeth Deerhake, Jennifer Bagwell, Jamie Mankiewicz, Jordan L. Cocchiaro, Rebecca W. Beerman, et al. 2015. « Epigenetic Control of Intestinal Barrier Function and Inflammation in Zebrafish ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (9): 2770-75. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424089112>.

Martín, C., D. Bueno, M.I. Alonso, J.A. Moro, S. Callejo, C. Parada, P. Martín, E. Carnicero, et A. Gato. 2006. « FGF2 Plays a Key Role in Embryonic Cerebrospinal Fluid Trophic Properties over Chick Embryo Neuroepithelial Stem Cells ». *Developmental Biology* 297 (2): 402-16. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.010>.

Mary, P., L. Servais, et R. Vialle. 2018. « Neuromuscular Diseases: Diagnosis and Management ». *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research* 104 (1): S89-95. <https://doi.org/10.1016/j.otsr.2017.04.019>.

Masek, Markus, Christelle Etard, Claudia Hofmann, Andreas J. Hülsmeier, Jingjing Zang, Masanari Takamiya, Matthias Gesemann, et al. 2022. « Loss of the Bardet-Biedl Protein *Bbs1* Alters Photoreceptor Outer Segment Protein and Lipid Composition ». *Nature Communications* 13 (1): 1282. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28982-6>.

McCommis, Kyle S., et Brian N. Finck. 2015. « Mitochondrial Pyruvate Transport: A Historical Perspective and Future Research Directions ». *Biochemical Journal* 466 (3): 443-54. <https://doi.org/10.1042/BJ20141171>.

McGrath, James, Stefan Somlo, Svetlana Makova, Xin Tian, et Martina Brueckner. 2003. « Two Populations of Node Monocilia Initiate Left-Right Asymmetry in the Mouse ». *Cell* 114 (1): 61-73. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00511-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00511-7).

Meiniel, Olivier, et Annie Meiniel. 2007. « The Complex Multidomain Organization of SCO-Spondin Protein Is Highly Conserved in Mammals ». *Brain Research Reviews* 53 (2): 321-27. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.09.007>.

Mercey, O., Levine, M.S., LoMastro, G.M., Rostaing, P., Brotslaw, E., Gomez, V., Kumar, A., Spassky, N., Mitchell, B.J., Meunier, A., et al. (2019). Massive centriole production can occur in the absence of deuterosomes in multiciliated cells. *Nat Cell Biol* 21, 1544–1552. [10.1038/s41556-019-0427-x](https://doi.org/10.1038/s41556-019-0427-x).

Metzner, A., Griffiths, J.D., Streets, A.J., Markham, E., Philippou, T., Van Eeden, F.J.M., and Ong, A.C.M. (2020). A high throughput zebrafish chemical screen reveals ALK5 and non-canonical androgen signalling as modulators of the *pkd2*^{-/-} phenotype. *Sci Rep* 10, 72. [10.1038/s41598-019-56995-7](https://doi.org/10.1038/s41598-019-56995-7).

Meunier, Alice, et Juliette Azimzadeh. 2016. « Multiciliated Cells in Animals ». *Cold*

Spring Harbor Perspectives in Biology 8 (12): a028233.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028233>.

Meyer-Miner, Anne, Jenica L.M. Van Gennip, Katrin Henke, Matthew P. Harris, et Brian Ciruna. 2022. « Resolving Primary Pathomechanisms Driving Idiopathic-like Spinal Curvature Using a New *Katnb1* Scoliosis Model ». *IScience* 25 (9): 105028.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105028>.

Migdal, Camille, et Mireille Serres. 2011. « Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant ». *médecine/sciences* 27 (4): 405-12.
<https://doi.org/10.1051/medsci/2011274017>.

Miki, Harukata, Yasushi Okada, et Nobutaka Hirokawa. 2005. « Analysis of the Kinesin Superfamily: Insights into Structure and Function ». *Trends in Cell Biology* 15 (9): 467-76. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.07.006>.

Mitchison, Hannah M, et Enza Maria Valente. 2017a. « Motile and Non-Motile Cilia in Human Pathology: From Function to Phenotypes: Motile and Non-Motile Ciliopathies ». *The Journal of Pathology* 241 (2): 294-309.
<https://doi.org/10.1002/path.4843>.

———. 2017b. « Motile and Non-Motile Cilia in Human Pathology: From Function to Phenotypes: Motile and Non-Motile Ciliopathies ». *The Journal of Pathology* 241 (2): 294-309. <https://doi.org/10.1002/path.4843>.

Miyamichi, Daisuke, Sachiko Nishina, Katsuhiko Hosono, Tadashi Yokoi, Kentaro Kurata, Miho Sato, Yoshihiro Hotta, et Noriyuki Azuma. 2019. « Retinal Structure in Leber's Congenital Amaurosis Caused by RPGRIP1 Mutations ». *Human Genome Variation* 6 (1): 32. <https://doi.org/10.1038/s41439-019-0064-8>.

Mostowy, Serge, et Pascale Cossart. 2012. « Septins: The Fourth Component of the Cytoskeleton ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (3): 183-94.
<https://doi.org/10.1038/nrm3284>.

Mukhopadhyay, Saikat, Xiaohui Wen, Ben Chih, Christopher D. Nelson, William S. Lane, Suzie J. Scales, et Peter K. Jackson. 2010. « TULP3 Bridges the IFT-A Complex and Membrane Phosphoinositides to Promote Trafficking of G Protein-Coupled Receptors into Primary Cilia ». *Genes & Development* 24 (19): 2180-93.
<https://doi.org/10.1101/gad.1966210>.

Mukhopadhyay, Saikat, Xiaohui Wen, Navneet Ratti, Alexander Loktev, Linda Rangell, Suzie J. Scales, et Peter K. Jackson. 2013. « The Ciliary G-Protein-Coupled Receptor Gpr161 Negatively Regulates the Sonic Hedgehog Pathway via CAMP Signaling ». *Cell* 152 (1-2): 210-23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.026>.

Muñoz, Rosa I., Thilo Kähne, Hernán Herrera, Sara Rodríguez, Ma. Montserrat Guerra, Karin Vío, René Hennig, Erdmann Rapp, et Esteban Rodríguez. 2019. « The Subcommissural Organ and the Reissner Fiber: Old Friends Revisited ». *Cell and Tissue Research* 375 (2): 507-29. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2917-8>.

Nachury, Maxence V., Alexander V. Loktev, Qihong Zhang, Christopher J. Westlake, Johan Peränen, Andreas Merdes, Diane C. Slusarski, et al. 2007. « A Core Complex of BBS Proteins Cooperates with the GTPase Rab8 to Promote Ciliary Membrane Biogenesis ». *Cell* 129 (6): 1201-13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.053>.

Nachury, Maxence V., et David U. Mick. 2019. « Establishing and Regulating the Composition of Cilia for Signal Transduction ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology*

20 (7): 389-405. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0116-4>.

Nachury, Maxence V., E. Scott Seeley, et Hua Jin. 2010. « Trafficking to the Ciliary Membrane: How to Get Across the Periciliary Diffusion Barrier? » *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 26 (1): 59-87. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113337>.

Nadeem, Syed Faisal, Ahmer Nasir Baig, Qurat ul Ain Tariq, et Muhammad Shahzad Shamim. 2022. « Spinal Arachnoiditis and Syringomyelia: Review of Literature with Emphasis on Postinfectious Inflammation and Treatment ». *Surgical Neurology International* 13 (juillet): 299. https://doi.org/10.25259/SNI_383_2022.

Nagao, Masahiro, et Hideaki Hayashi. 2009. « Glycogen Synthase Kinase-3beta Is Associated with Parkinson's Disease ». *Neuroscience Letters* 449 (2): 103-7. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.10.104>.

Nakazawa, Yuki, Madoka Hiraki, Ritsu Kamiya, et Masafumi Hirono. 2007. « SAS-6 Is a Cartwheel Protein That Establishes the 9-Fold Symmetry of the Centriole ». *Current Biology* 17 (24): 2169-74. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.11.046>.

Narita, Keishi, Hiroko Kozuka-Hata, Yuta Nonami, Hiroko Ao-Kondo, Toshimitsu Suzuki, Hideki Nakamura, Kazuhiro Yamakawa, Masaaki Oyama, Takafumi Inoue, et Sen Takeda. 2012. « Proteomic Analysis of Multiple Primary Cilia Reveals a Novel Mode of Ciliary Development in Mammals ». *Biology Open* 1 (8): 815-25. <https://doi.org/10.1242/bio.20121081>.

Narra, Sai Sandhya, Philippe Rondeau, Danielle Fernezelian, Laura Gence, Batoul Ghaddar, Emmanuel Bourdon, Christian Lefebvre d'Hellencourt, Sepand Rastegar, et Nicolas Diotel. 2023. « Distribution of Microglia/Immune Cells in the Brain of Adult Zebrafish in Homeostatic and Regenerative Conditions: Focus on Oxidative Stress during Brain Repair ». *Journal of Comparative Neurology* 531 (2): 238-55. <https://doi.org/10.1002/cne.25421>.

Nauli, Surya M., Francis J. Alenghat, Ying Luo, Eric Williams, Peter Vassilev, Xiaogang Li, Andrew E. H. Elia, et al. 2003. « Polycystins 1 and 2 Mediate Mechanosensation in the Primary Cilium of Kidney Cells ». *Nature Genetics* 33 (2): 129-37. <https://doi.org/10.1038/ng1076>.

Neumann, H., M. R. Kotter, et R. J. M. Franklin. 2008. « Debris Clearance by Microglia: An Essential Link between Degeneration and Regeneration ». *Brain* 132 (2): 288-95. <https://doi.org/10.1093/brain/awn109>.

Nguyen-Chi, Mai, Quang Tien Phan, Catherine Gonzalez, Jean-François Dubremetz, Jean-Pierre Levraud, et Georges Lutfalla. 2014. « Transient Infection of the Zebrafish Notochord with *E. Coli* Induces Chronic Inflammation ». *Disease Models & Mechanisms* 7 (7): 871-82. <https://doi.org/10.1242/dmm.014498>.

Ninkovic, Jovica, Christian Stigloher, Christina Lillesaar, et Laure Bally-Cuif. 2008. « Gsk3 β /PKA and Gli1 Regulate the Maintenance of Neural Progenitors at the Midbrain-Hindbrain Boundary in Concert with E(Spl) Factor Activity ». *Development* 135 (18): 3137-48. <https://doi.org/10.1242/dev.020479>.

Nishimura, Darryl Y., Melissa Fath, Robert F. Mullins, Charles Searby, Michael Andrews, Roger Davis, Jeaneen L. Andorf, et al. 2004. « *Bbs2* -Null Mice Have Neurosensory Deficits, a Defect in Social Dominance, and Retinopathy Associated with Mislocalization of Rhodopsin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences*

101 (47): 16588-93. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405496101>.

Nonaka, Shigenori, Yosuke Tanaka, Yasushi Okada, Sen Takeda, Akihiro Harada, Yoshimitsu Kanai, Mizuho Kido, et Nobutaka Hirokawa. s. d. « Randomization of Left–Right Asymmetry Due to Loss of Nodal Cilia Generating Leftward Flow of Extraembryonic Fluid in Mice Lacking KIF3B Motor Protein ».

Ogura, Yoji, Ikuyo Kou, Shigenori Miura, Atsushi Takahashi, Leilei Xu, Kazuki Takeda, Yohei Takahashi, et al. 2015. « A Functional SNP in BNC2 Is Associated with Adolescent Idiopathic Scoliosis ». *The American Journal of Human Genetics* 97 (2): 337-42. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.06.012>.

Ohata, Shinya, Jin Nakatani, Vicente Herranz-Pérez, JrGang Cheng, Haim Belinson, Toshiro Inubushi, William D. Snider, Jose Manuel García-Verdugo, Anthony Wynshaw-Boris, et Arturo Álvarez-Buylla. 2014. « Loss of Dishevelleds Disrupts Planar Polarity in Ependymal Motile Cilia and Results in Hydrocephalus ». *Neuron* 83 (3): 558-71. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.022>.

Okabe, Noriko, Bo Xu, et Rebecca D. Burdine. 2008. « Fluid Dynamics in Zebrafish Kupffer's Vesicle ». *Developmental Dynamics* 237 (12): 3602-12. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21730>.

Oksche, Andreas, Esteban M. Rodríguez, et Pedro Fernández-Llebrez, éd. 1993. *The Subcommissural Organ*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-78013-4>.

Oliazadeh, Niaz, Kristen F. Gorman, Robert Eveleigh, Guillaume Bourque, et Alain Moreau. 2017. « Identification of Elongated Primary Cilia with Impaired Mechanotransduction in Idiopathic Scoliosis Patients ». *Scientific Reports* 7 (1): 44260. <https://doi.org/10.1038/srep44260>.

Oliveira Fernandes, Michelle, et Warren G. Tourtellotte. 2015. « Egr3-Dependent Muscle Spindle Stretch Receptor Intrafusar Muscle Fiber Differentiation and Fusimotor Innervation Homeostasis ». *The Journal of Neuroscience* 35 (14): 5566-78. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0241-15.2015>.

Oliveira, Inês, Raquel Jacinto, Sara Pestana, Fernando Nolasco, Joaquim Calado, Susana Santos Lopes, et Mónica Roxo-Rosa. 2021. « Zebrafish Model as a Screen to Prevent Cyst Inflation in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (16): 9013. <https://doi.org/10.3390/ijms22169013>.

Olstad, Emilie W., Christa Ringers, Jan N. Hansen, Adinda Wens, Cecilia Brandt, Dagmar Wachten, Emre Yaksi, et Nathalie Jurisch-Yaksi. 2019. « Ciliary Beating Compartmentalizes Cerebrospinal Fluid Flow in the Brain and Regulates Ventricular Development ». *Current Biology* 29 (2): 229-241.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.11.059>.

Omran, Heymut, Daisuke Kobayashi, Heike Olbrich, Tatsuya Tsukahara, Niki T. Loges, Haruo Hagiwara, Qi Zhang, et al. 2008. « Ktu/PF13 Is Required for Cytoplasmic Pre-Assembly of Axonemal Dyneins ». *Nature* 456 (7222): 611-16. <https://doi.org/10.1038/nature07471>.

Omori, Y., Zhao, C., Saras, A., Mukhopadhyay, S., Kim, W., Furukawa, T., Sengupta, P., Veraksa, A., and Malicki, J. (2008). *elipsa* is an early determinant of ciliogenesis

that links the IFT particle to membrane-associated small GTPase Rab8. *Nat Cell Biol* 10, 437–444. [10.1038/ncb1706](https://doi.org/10.1038/ncb1706).

Orts-Del'Imagine, Adeline, Yasmine Cantaut-Belarif, Olivier Thouvenin, Julian Roussel, Asha Baskaran, Dominique Langui, Fanny Koëth, et al. 2020. « Sensory Neurons Contacting the Cerebrospinal Fluid Require the Reissner Fiber to Detect Spinal Curvature In Vivo ». *Current Biology* 30 (5): 827-839.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.12.071>.

Orts-Del'Imagine, Adeline, Anne Kastner, Vanessa Tillement, Catherine Tardivel, Jérôme Trouslard, et Nicolas Wanaverbecq. 2014. « Morphology, Distribution and Phenotype of Polycystin Kidney Disease 2-like 1-Positive Cerebrospinal Fluid Contacting Neurons in The Brainstem of Adult Mice ». Édité par Filippo Del Bene. *PLoS ONE* 9 (2): e87748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087748>.

Orts-Del'Imagine, Adeline, Nicolas Wanaverbecq, Catherine Tardivel, Vanessa Tillement, Michel Dallaporta, et Jérôme Trouslard. 2012. « Properties of Subependymal Cerebrospinal Fluid Contacting Neurons in the Dorsal Vagal Complex of the Mouse Brainstem: Medullar Cerebrospinal Fluid Contacting Neurons ». *The Journal of Physiology* 590 (16): 3719-41. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.227959>.

Otto, Edgar A., Gokul Ramaswami, Sabine Janssen, Moumita Chaki, Susan J. Allen, Weibin Zhou, Rannar Airik, et al. 2011. « Mutation Analysis of 18 Nephronophthisis Associated Ciliopathy Disease Genes Using a DNA Pooling and next Generation Sequencing Strategy ». *Journal of Medical Genetics* 48 (2): 105-16. <https://doi.org/10.1136/jmg.2010.082552>.

Pal, Kasturi, Sun-hee Hwang, Bandarigoda Somatilaka, Hemant Badgandi, Peter K. Jackson, Kathryn DeFea, et Saikat Mukhopadhyay. 2016. « Smoothed Determines β -Arrestin–Mediated Removal of the G Protein–Coupled Receptor Gpr161 from the Primary Cilium ». *Journal of Cell Biology* 212 (7): 861-75. <https://doi.org/10.1083/jcb.201506132>.

Parent, Stefan, Peter O. Newton, et Dennis R. Wenger. 2005. « Adolescent Idiopathic Scoliosis: Etiology, Anatomy, Natural History, and Bracing ». *Instructional Course Lectures* 54: 529-36.

Park, Tae Joo, Brian J Mitchell, Philip B Abitua, Chris Kintner, et John B Wallingford. 2008. « Dishevelled Controls Apical Docking and Planar Polarization of Basal Bodies in Ciliated Epithelial Cells ». *Nature Genetics* 40 (7): 871-79. <https://doi.org/10.1038/ng.104>.

Parmentier, Caroline, Emilie Hameury, Christophe Dubessy, Feng B. Quan, Damien Habert, André Calas, Hubert Vaudry, Isabelle Lihmann, et Hervé Tostivint. 2011. « Occurrence of Two Distinct Urotensin II-Related Peptides in Zebrafish Provides New Insight into the Evolutionary History of the Urotensin II Gene Family ». *Endocrinology* 152 (6): 2330-41. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1500>.

Pasco, J. A., M. J. Henry, M. A. Kotowicz, G. R. Collier, M. J. Ball, A. M. Ugoni, et G. C. Nicholson. 2001. « Serum Leptin Levels Are Associated with Bone Mass in Nonobese Women ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86 (5): 1884-87. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.5.7417>.

Patel, Sandeep, et A. James Barkovich. 2002. « Analysis and Classification of

- Cerebellar Malformations ». *AJNR. American Journal of Neuroradiology* 23 (7): 1074-87.
- Patil, H, N Tserentsoodol, A Saha, Y Hao, M Webb, et P A Ferreira. 2012. « Selective Loss of RPGRIP1-Dependent Ciliary Targeting of NPHP4, RPGR and SDCCAG8 Underlies the Degeneration of Photoreceptor Neurons ». *Cell Death & Disease* 3 (7): e355-e355. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.96>.
- Pattappa, Girish, Zhen Li, Marianna Peroglio, Nadine Wismer, Mauro Alini, et Sibylle Grad. 2012. « Diversity of Intervertebral Disc Cells: Phenotype and Function: Diversity of Intervertebral Disc Cells ». *Journal of Anatomy* 221 (6): 480-96. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2012.01521.x>.
- Patten, Shunmoogum A., Patricia Margaritte-Jeannin, Jean-Claude Bernard, Eudeline Alix, Audrey Labalme, Alicia Besson, Simon L. Girard, et al. 2015. « Functional Variants of POC5 Identified in Patients with Idiopathic Scoliosis ». *Journal of Clinical Investigation* 125 (3): 1124-28. <https://doi.org/10.1172/JCI77262>.
- Pedersen, Lotte B., Stefan Geimer, Roger D. Sloboda, et Joel L. Rosenbaum. 2003. « The Microtubule Plus End-Tracking Protein EB1 Is Localized to the Flagellar Tip and Basal Bodies in *Chlamydomonas Reinhardtii* ». *Current Biology* 13 (22): 1969-74. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.058>.
- Pekna, Marcela, et Milos Pekny. 2021. « The Complement System: A Powerful Modulator and Effector of Astrocyte Function in the Healthy and Diseased Central Nervous System ». *Cells* 10 (7): 1812. <https://doi.org/10.3390/cells10071812>.
- Pekny, Milos, et Michael Nilsson. 2005. « Astrocyte Activation and Reactive Gliosis ». *Glia* 50 (4): 427-34. <https://doi.org/10.1002/glia.20207>.
- Peters, D. J., et L. A. Sandkuijl. 1992. « Genetic Heterogeneity of Polycystic Kidney Disease in Europe ». *Contributions to Nephrology* 97: 128-39. <https://doi.org/10.1159/000421651>.
- Phirke, Prasad, Evgeni Efimenko, Swetha Mohan, Jan Burghoorn, Filip Crona, Mathieu W. Bakhoun, Maria Trieb, et al. 2011. « Transcriptional Profiling of *C. Elegans* DAF-19 Uncovers a Ciliary Base-Associated Protein and a CDK/CCRK/LF2p-Related Kinase Required for Intraflagellar Transport ». *Developmental Biology* 357 (1): 235-47. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.06.028>.
- Pinero-Pinto, Elena, Verónica Pérez-Cabezas, Cristina Tous-Rivera, José-María Sánchez-González, Carmen Ruiz-Molinero, José-Jesús Jiménez-Rejano, María-Luisa Benítez-Lugo, et María Carmen Sánchez-González. 2020. « Mutation in ROBO3 Gene in Patients with Horizontal Gaze Palsy with Progressive Scoliosis Syndrome: A Systematic Review ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17 (12): 4467. <https://doi.org/10.3390/ijerph17124467>.
- Polakis, P. 2012. « Wnt Signaling in Cancer ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (5): a008052-a008052. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008052>.
- Pourquié, Olivier. 2011. « Vertebrate Segmentation: From Cyclic Gene Networks to Scoliosis ». *Cell* 145 (5): 650-63. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.011>.
- Praetorius, Helle A., et Jens Leipziger. 2013. « Primary Cilium-Dependent Sensing of Urinary Flow and Paracrine Purinergic Signaling ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24 (1): 3-10. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.10.003>.

- Preuss, M., K.-T. Hoffmann, M. Reiss-Zimmermann, W. Hirsch, A. Merckenschlager, J. Meixensberger, et M. Dengl. 2013. « Updated Physiology and Pathophysiology of CSF Circulation—the Pulsatile Vector Theory ». *Child's Nervous System* 29 (10): 1811-25. <https://doi.org/10.1007/s00381-013-2219-0>.
- Proske, Uwe, et Simon C. Gandevia. 2012. « The Proprioceptive Senses: Their Roles in Signaling Body Shape, Body Position and Movement, and Muscle Force ». *Physiological Reviews* 92 (4): 1651-97. <https://doi.org/10.1152/physrev.00048.2011>.
- Qiao, Renping, Gabriela Cabral, Molly M Lettman, Alexander Dammermann, et Gang Dong. 2012. « SAS-6 Coiled-Coil Structure and Interaction with SAS-5 Suggest a Regulatory Mechanism in *C. Elegans* Centriole Assembly: SAS-6 Coiled-Coil Structure and Interaction with SAS-5 ». *The EMBO Journal* 31 (22): 4334-47. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.280>.
- Qiu, Yong, Xu Sun, Xusheng Qiu, Weiguo Li, Zezhang Zhu, Feng Zhu, Bin Wang, Yang Yu, et Bangping Qian. 2007. « Decreased Circulating Leptin Level and Its Association With Body and Bone Mass in Girls With Adolescent Idiopathic Scoliosis ». *Spine* 32 (24): 2703-10. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31815a59e5>.
- Quan, Feng B., Christophe Dubessy, Sonya Galant, Natalia B. Kenigfest, Lydia Djenoune, Jérôme Leprince, Claire Wyart, Isabelle Lihmann, et Hervé Tostivint. 2015. « Comparative Distribution and In Vitro Activities of the Urotensin II-Related Peptides URP1 and URP2 in Zebrafish: Evidence for Their Colocalization in Spinal Cerebrospinal Fluid-Contacting Neurons ». Édité par Patrick Prunet. *PLOS ONE* 10 (3): e0119290. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119290>.
- Reiten, Ingrid, Fazil Emre Uslu, Stephanie Fore, Robbrecht Pelgrims, Christa Ringers, Carmen Diaz Verdugo, Maximillian Hoffman, et al. 2017. « Motile-Cilia-Mediated Flow Improves Sensitivity and Temporal Resolution of Olfactory Computations ». *Current Biology* 27 (2): 166-74. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.036>.
- Reiter, Jeremy F, Oliver E Blacque, et Michel R Leroux. 2012. « The Base of the Cilium: Roles for Transition Fibres and the Transition Zone in Ciliary Formation, Maintenance and Compartmentalization ». *EMBO Reports* 13 (7): 608-18. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.73>.
- Reiter, Jeremy F., et Michel R. Leroux. 2017. « Genes and Molecular Pathways Underpinning Ciliopathies ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (9): 533-47. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.60>.
- Rhodin, Johannes, et Tore Dalhamn. 1956. « Electron Microscopy of the Tracheal Ciliated Mucosa in Rat ». *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie* 44 (4): 345-412. <https://doi.org/10.1007/BF00345847>.
- Ribes, V., et J. Briscoe. 2009. « Establishing and Interpreting Graded Sonic Hedgehog Signaling during Vertebrate Neural Tube Patterning: The Role of Negative Feedback ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1 (2): a002014-a002014. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002014>.
- Ringers, Christa, et Nathalie Jurisch-Yaksi. 2020. « Development: How the Reissner Fiber Keeps Our Back Straight ». *Current Biology* 30 (12): R705-8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.04.073>.
- Rivera, Amariliz, Mark C Siracusa, George S Yap, et William C Gause. 2016. « Innate Cell Communication Kick-Starts Pathogen-Specific Immunity ». *Nature Immunology*

17 (4): 356-63. <https://doi.org/10.1038/ni.3375>.

Rodríguez, Esteban M., Andreas Oksche, et Hernan Montecinos. 2001. « Human Subcommissural Organ, with Particular Emphasis on Its Secretory Activity during the Fetal Life ». *Microscopy Research and Technique* 52 (5): 573-90. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20010301\)52:5<573::AID-JEMT1042>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20010301)52:5<573::AID-JEMT1042>3.0.CO;2-6).

Rodríguez, Esteban M., Sara Rodríguez, et Silvia Hein. 1998. « The Subcommissural Organ ». *Microscopy Research and Technique* 41 (2): 98-123. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19980415\)41:2<98::AID-JEMT2>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980415)41:2<98::AID-JEMT2>3.0.CO;2-M).

Rodríguez, S., E.M. Rodríguez, P. Jara, B. Peruzzo, et A. Oksche. 1990. « Single Injection into the Cerebrospinal Fluid of Antibodies against the Secretory Material of the Subcommissural Organ Reversibly Blocks Formation of Reissner's Fiber: Immunocytochemical Investigations in the Rat ». *Experimental Brain Research* 81 (1). <https://doi.org/10.1007/BF00230107>.

Rohatgi, Rajat, Ljiljana Milenkovic, et Matthew P. Scott. 2007. « Patched1 Regulates Hedgehog Signaling at the Primary Cilium ». *Science* 317 (5836): 372-76. <https://doi.org/10.1126/science.1139740>.

Rose, Chloe D., David Pompili, Katrin Henke, Jenica L.M. Van Gennip, Anne Meyer-Miner, Rahul Rana, Stéphane Gobron, Matthew P. Harris, Mark Nitz, et Brian Ciruna. 2020. « SCO-Spondin Defects and Neuroinflammation Are Conserved Mechanisms Driving Spinal Deformity across Genetic Models of Idiopathic Scoliosis ». *Current Biology* 30 (12): 2363-2373.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.04.020>.

Rosenbaum, Joel L., et George B. Witman. 2002. « Intraflagellar Transport ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3 (11): 813-25. <https://doi.org/10.1038/nrm952>.

Rousan, Liqa A., Abu Baker L. Qased, Ziad A. Audat, Laila T. Ababneh, et Saied A. Jaradat. 2019. « Horizontal Gaze Palsy and Progressive Scoliosis with Two Novel ROBO3 Gene Mutations in Two Jordanian Families ». *Ophthalmic Genetics* 40 (2): 150-56. <https://doi.org/10.1080/13816810.2019.1592199>.

Roxo-Rosa, Mónica, Raquel Jacinto, Pedro Sampaio, et Susana Santos Lopes. 2015. « The Zebrafish Kupffer's Vesicle as a Model System for the Molecular Mechanisms by Which the Lack of Polycystin-2 Leads to Stimulation of CFTR ». *Biology Open* 4 (11): 1356-66. <https://doi.org/10.1242/bio.014076>.

Ruba, Andrew, Mark Tingey, Wangxi Luo, Jingjie Yu, Athanasios Evangelou, Rachel Higgins, Saovleak Khim, et Weidong Yang. 2023. « The Ciliary Lumen Accommodates Passive Diffusion and Vesicle-Assisted Trafficking in Cytoplasm-Ciliary Transport ». Édité par Wallace F Marshall. *Molecular Biology of the Cell*, mars, mbc.E22-10-0452. <https://doi.org/10.1091/mbc.E22-10-0452>.

Sabatier, Christelle, Andrew S Plump, Le Ma, Katja Brose, Atsushi Tamada, Fujio Murakami, Eva Y.-H.P Lee, et Marc Tessier-Lavigne. 2004. « The Divergent Robo Family Protein Rig-1/Robo3 Is a Negative Regulator of Slit Responsiveness Required for Midline Crossing by Commissural Axons ». *Cell* 117 (2): 157-69. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00303-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00303-4).

Sampaio, Pedro, Rita R. Ferreira, Adán Guerrero, Petra Pintado, Bárbara Tavares, Joana Amaro, Andrew A. Smith, Thomas Montenegro-Johnson, David J. Smith, et Susana S. Lopes. 2014. « Left-Right Organizer Flow Dynamics: How Much Cilia

Activity Reliably Yields Laterality? » *Developmental Cell* 29 (6): 716-28. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.04.030>.

Samuni, Yuval, Sara Goldstein, Olivia M. Dean, et Michael Berk. 2013. « The Chemistry and Biological Activities of N-Acetylcysteine ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830 (8): 4117-29. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.016>.

Sanchez, Gonzalo M., Liza Alkhori, Eduardo Hatano, Sebastian W. Schultz, Anujaianthi Kuzhandaivel, Shadi Jafari, Björn Granseth, et Mattias Alenius. 2016. « Hedgehog Signaling Regulates the Ciliary Transport of Odorant Receptors in *Drosophila* ». *Cell Reports* 14 (3): 464-70. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.059>.

Sanchez-Navarro, Iker, Luciana R J da Silva, Fiona Blanco-Kelly, Olga Zurita, Noelia Sanchez-Bolivar, Cristina Villaverde, Maria Isabel Lopez-Molina, et al. 2018. « Combining Targeted Panel-Based Resequencing and Copy-Number Variation Analysis for the Diagnosis of Inherited Syndromic Retinopathies and Associated Ciliopathies ». *Scientific Reports* 8 (1): 5285. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23520-1>.

Sanders, J. L., V. Watral, et M. L. Kent. 2012. « Microsporidiosis in Zebrafish Research Facilities ». *ILAR Journal* 53 (2): 106-13. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.106>.

Sang, Liyun, Julie J. Miller, Kevin C. Corbit, Rachel H. Giles, Matthew J. Brauer, Edgar A. Otto, Lisa M. Baye, et al. 2011. « Mapping the NPHP-JBTS-MKS Protein Network Reveals Ciliopathy Disease Genes and Pathways ». *Cell* 145 (4): 513-28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.019>.

Sarpal, Ritu, Sokol V. Todi, Elena Sivan-Loukianova, Seema Shirolkar, Narayan Subramanian, Elizabeth C. Raff, James W. Erickson, Krishanu Ray, et Daniel F. Eberl. 2003. « *Drosophila* KAP Interacts with the Kinesin II Motor Subunit KLP64D to Assemble Chordotonal Sensory Cilia, but Not Sperm Tails ». *Current Biology* 13 (19): 1687-96. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.09.025>.

Schmidt, Kerstin N., Stefanie Kuhns, Annett Neuner, Birgit Hub, Hanswalter Zentgraf, et Gislene Pereira. 2012. « Cep164 Mediates Vesicular Docking to the Mother Centriole during Early Steps of Ciliogenesis ». *Journal of Cell Biology* 199 (7): 1083-1101. <https://doi.org/10.1083/jcb.201202126>.

Schottenfeld, Jodi, Jessica Sullivan-Brown, et Rebecca D. Burdine. 2007. « Zebrafish Curly up Encodes a Pkd2 Ortholog That Restricts Left-Side-Specific Expression of Southpaw ». *Development (Cambridge, England)* 134 (8): 1605-15. <https://doi.org/10.1242/dev.02827>.

Schweickert, Axel, Thomas Weber, Tina Beyer, Philipp Vick, Susanne Bogusch, Kerstin Feistel, et Martin Blum. 2007. « Cilia-Driven Leftward Flow Determines Laterality in *Xenopus* ». *Current Biology* 17 (1): 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.067>.

Sedmak, Tina, et Uwe Wolfrum. 2011. « Intraflagellar Transport Proteins in Ciliogenesis of Photoreceptor Cells ». *Biology of the Cell* 103 (10): 449-66. <https://doi.org/10.1042/BC20110034>.

Seong, Moon-Woo, Seong Yeon Kim, Young Suk Yu, Jeong-Min Hwang, Ji Yeon Kim, et Sung Sup Park. 2008. « Molecular Characterization of Leber Congenital Amaurosis

in Koreans ». *Molecular Vision* 14 (août): 1429-36.

Shaffer, Nicholas, Bryn Martin, et Francis Loth. 2011. « Cerebrospinal Fluid Hydrodynamics in Type I Chiari Malformation ». *Neurological Research* 33 (3): 247-60. <https://doi.org/10.1179/016164111X12962202723805>.

Shah, Alok S., Sara L. Farnen, Thomas O. Moninger, Thomas R. Businga, Michael P. Andrews, Kevin Bugge, Charles C. Searby, et al. 2008. « Loss of Bardet–Biedl Syndrome Proteins Alters the Morphology and Function of Motile Cilia in Airway Epithelia ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (9): 3380-85. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712327105>.

Sharma, Swarkar, Douglas Londono, Walter L. Eckalbar, Xiaochong Gao, Dongping Zhang, Kristen Mauldin, Ikuyo Kou, et al. 2015. « A PAX1 Enhancer Locus Is Associated with Susceptibility to Idiopathic Scoliosis in Females ». *Nature Communications* 6 (1): 6452. <https://doi.org/10.1038/ncomms7452>.

Shi, De-Li. 2023. « Planar Cell Polarity Regulators in Asymmetric Organogenesis during Development and Disease ». *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao* 50 (2): 63-76. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2022.06.007>.

Shi, Dongbo, Kouji Komatsu, Mayumi Hirao, Yayoi Toyooka, Hiroshi Koyama, Fadel Tissir, André M. Goffinet, Tadashi Uemura, et Toshihiko Fujimori. 2014. « Celsr1 Is Required for the Generation of Polarity at Multiple Levels of the Mouse Oviduct ». *Development* 141 (23): 4558-68. <https://doi.org/10.1242/dev.115659>.

Shi, Dongbo, Fumiko Usami, Kouji Komatsu, Sanae Oka, Takaya Abe, Tadashi Uemura, et Toshihiko Fujimori. 2016. « Dynamics of Planar Cell Polarity Protein Vangl2 in the Mouse Oviduct Epithelium ». *Mechanisms of Development* 141 (août): 78-89. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2016.05.002>.

Silva, Tiago, Joana Reis, José Teixeira, et Fernanda Borges. 2014. « Alzheimer's Disease, Enzyme Targets and Drug Discovery Struggles: From Natural Products to Drug Prototypes ». *Ageing Research Reviews* 15 (mai): 116-45. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.03.008>.

Sinden, Re, A Talman, Sr Marques, Mn Wass, et Mje Sternberg. 2010. « The Flagellum in Malarial Parasites ». *Current Opinion in Microbiology* 13 (4): 491-500. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.05.016>.

Smeyne, Richard J., Rüdiger Klein, Andreas Schnapp, Linda K. Long, Sherri Bryant, Anne Lewin, Sergio A. Lira, et Mariano Barbacid. 1994. « Severe Sensory and Sympathetic Neuropathies in Mice Carrying a Disrupted Trk/NGF Receptor Gene ». *Nature* 368 (6468): 246-49. <https://doi.org/10.1038/368246a0>.

Sofroniew, Michael V. 2009. « Molecular Dissection of Reactive Astroglial Scar Formation ». *Trends in Neurosciences* 32 (12): 638-47. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>.

Song, Z., Zhang, X., Jia, S., Yelick, P.C., and Zhao, C. (2016). Zebrafish as a Model for Human Ciliopathies. *Journal of Genetics and Genomics* 43, 107–120. [10.1016/j.jgg.2016.02.001](https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.02.001)

Sorokin, S. P. 1968. « Reconstructions of Centriole Formation and Ciliogenesis in Mammalian Lungs ». *Journal of Cell Science* 3 (2): 207-30. <https://doi.org/10.1242/jcs.3.2.207>.

- Sorokin, Sergei. 1962. « CENTRIOLES AND THE FORMATION OF RUDIMENTARY CILIA BY FIBROBLASTS AND SMOOTH MUSCLE CELLS ». *Journal of Cell Biology* 15 (2): 363-77. <https://doi.org/10.1083/jcb.15.2.363>.
- Spassky, Nathalie, et Alice Meunier. 2017. « The Development and Functions of Multiciliated Epithelia ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (7): 423-36. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.21>.
- Spektor, Alexander, William Y. Tsang, David Khoo, et Brian David Dynlacht. 2007. « Cep97 and CP110 Suppress a Cilia Assembly Program ». *Cell* 130 (4): 678-90. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.027>.
- Steinman, Ralph M. 1968. « An Electron Microscopic Study of Ciliogenesis in Developing Epidermis and Trachea in the Embryo Of *Xenopus Laevis* ». *American Journal of Anatomy* 122 (1): 19-55. <https://doi.org/10.1002/aja.1001220103>.
- Sternberg, Jenna R., Andrew E. Prendergast, Lucie Brosse, Yasmine Cantaut-Belarif, Olivier Thouvenin, Adeline Orts-Del'Imagine, Laura Castillo, et al. 2018. « Pkd2l1 Is Required for Mechanosensation in Cerebrospinal Fluid-Contacting Neurons and Maintenance of Spine Curvature ». *Nature Communications* 9 (1): 3804. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06225-x>.
- Stevens, Naomi R., Hélio Roque, et Jordan W. Raff. 2010. « DSas-6 and Ana2 Coassemble into Tubules to Promote Centriole Duplication and Engagement ». *Developmental Cell* 19 (6): 913-19. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.11.010>.
- Stratigopoulos, George, Lisa Cole Burnett, Richard Rausch, Richard Gill, David Barth Penn, Alicja A. Skowronski, Charles A. LeDuc, et al. 2016. « Hypomorphism of Fto and Rpgrip1l Causes Obesity in Mice ». *Journal of Clinical Investigation* 126 (5): 1897-1910. <https://doi.org/10.1172/JCI85526>.
- Stratigopoulos, George, Charles A. LeDuc, Maria L. Cremona, Wendy K. Chung, et Rudolph L. Leibel. 2011. « Cut-like Homeobox 1 (CUX1) Regulates Expression of the Fat Mass and Obesity-Associated and Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator-Interacting Protein-1-like (RPGRIP1L) Genes and Coordinates Leptin Receptor Signaling ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (3): 2155-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.188482>.
- Stratigopoulos, George, Jayne F. Martin Carli, Diana R. O'Day, Liheng Wang, Charles A. LeDuc, Patricia Lanzano, Wendy K. Chung, et al. 2014. « Hypomorphism for RPGRIP1L, a Ciliary Gene Vicinal to the FTO Locus, Causes Increased Adiposity in Mice ». *Cell Metabolism* 19 (5): 767-79. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.04.009>.
- Struchtrup, Andreas, Antonia Wiegering, Björn Stork, Ulrich Rütger, et Christoph Gerhardt. 2018. « The Ciliary Protein RPGRIP1L Governs Autophagy Independently of Its Proteasome-Regulating Function at the Ciliary Base in Mouse Embryonic Fibroblasts ». *Autophagy* 14 (4): 567-83. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1429874>.
- Stubbs, J. L., E. K. Vldar, J. D. Axelrod, et C. Kintner. 2012. « Multicilin Promotes Centriole Assembly and Ciliogenesis during Multiciliate Cell Differentiation ». *Nature Cell Biology* 14 (2): 140-47. <https://doi.org/10.1038/ncb2406>.
- Sulik, K., D. B. Dehart, T. Inagaki, J. L. Carson, T. Vrablic, K. Gesteland, et G. C. Schoenwolf. 1994. « Morphogenesis of the Murine Node and Notochordal Plate ». *Developmental Dynamics* 201 (3): 260-78. <https://doi.org/10.1002/aja.1002010309>.

- Sullivan-Brown, Jessica, Jodi Schottenfeld, Noriko Okabe, Christine L. Hostetter, Fabrizio C. Serluca, Stephan Y. Thiberge, et Rebecca D. Burdine. 2008. « Zebrafish Mutations Affecting Cilia Motility Share Similar Cystic Phenotypes and Suggest a Mechanism of Cyst Formation That Differs from Pkd2 Morphants ». *Developmental Biology* 314 (2): 261-75. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.11.025>.
- Summers, Angela C., Joseph Snow, Edythe Wiggs, Alexander G. Liu, Camilo Toro, Andrea Poretti, Wadih M. Zein, et al. 2017. « Neuropsychological Phenotypes of 76 Individuals with Joubert Syndrome Evaluated at a Single Center ». *American Journal of Medical Genetics Part A* 173 (7): 1796-1812. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38272>.
- Sun, Xun, James Haley, Oleg V Bulgakov, Xue Cai, James McGinnis, et Tiansen Li. 2012. « Tubby Is Required for Trafficking G Protein-Coupled Receptors to Neuronal Cilia ». *Cilia* 1 (1): 21. <https://doi.org/10.1186/2046-2530-1-21>.
- Swoboda, Peter, Haskell T. Adler, et James H. Thomas. 2000. « The RFX-Type Transcription Factor DAF-19 Regulates Sensory Neuron Cilium Formation in *C. Elegans* ». *Molecular Cell* 5 (3): 411-21. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80436-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80436-0).
- Szymanska, Katarzyna, Ian Berry, Clare V Logan, Simon RR Cousins, Helen Lindsay, Hussain Jafri, Yasmin Raashid, et al. 2012. « Founder Mutations and Genotype-Phenotype Correlations in Meckel-Gruber Syndrome and Associated Ciliopathies ». *Cilia* 1 (1): 18. <https://doi.org/10.1186/2046-2530-1-18>.
- Tada, M, et J C Smith. s. d. « Xwnt11 Regulates Gastrulation Movements ».
- Takagishi, Maki, Masato Sawada, Shinya Ohata, Naoya Asai, Atsushi Enomoto, Kunihiko Takahashi, Liang Weng, et al. 2017. « Daple Coordinates Planar Polarized Microtubule Dynamics in Ependymal Cells and Contributes to Hydrocephalus ». *Cell Reports* 20 (4): 960-72. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.089>.
- Takahashi, Yohei, Ikuyo Kou, Atsushi Takahashi, Todd A Johnson, Katsuki Kono, Noriaki Kawakami, Koki Uno, et al. 2011. « A Genome-Wide Association Study Identifies Common Variants near LBX1 Associated with Adolescent Idiopathic Scoliosis ». *Nature Genetics* 43 (12): 1237-40. <https://doi.org/10.1038/ng.974>.
- Tan, Fraser E., Eszter K. Vlado, Lina Ma, Luis C. Fuentealba, Ramona Hoh, F. Hernán Espinoza, Jeffrey D. Axelrod, et al. 2013. « Myb Promotes Centriole Amplification and Later Steps of the Multiciliogenesis Program ». *Development* 140 (20): 4277-86. <https://doi.org/10.1242/dev.094102>.
- Tani, Shoichiro, Ung-il Chung, Shinsuke Ohba, et Hironori Hojo. 2020. « Understanding Paraxial Mesoderm Development and Sclerotome Specification for Skeletal Repair ». *Experimental & Molecular Medicine* 52 (8): 1166-77. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0482-1>.
- Tateishi, Kazuhiro, Yuji Yamazaki, Tomoki Nishida, Shin Watanabe, Koshi Kunitomo, Hiroaki Ishikawa, et Sachiko Tsukita. 2013. « Two Appendages Homologous between Basal Bodies and Centrioles Are Formed Using Distinct Odf2 Domains ». *Journal of Cell Biology* 203 (3): 417-25. <https://doi.org/10.1083/jcb.201303071>.
- Tavares, Barbara, Raquel Jacinto, Pedro Sampaio, Sara Pestana, Andreia Pinto, Andreia Vaz, Mónica Roxo-Rosa, et al. 2017. « Notch/Her12 Signalling Modulates, Motile/Immotile Cilia Ratio Downstream of Foxj1a in Zebrafish Left-Right Organizer ». *ELife* 6 (septembre): e25165. <https://doi.org/10.7554/eLife.25165>.

- Terré, Berta, Gabriele Piergiovanni, Sandra Segura-Bayona, Gabriel Gil-Gómez, Sameh A Youssef, Camille Stephan-Otto Attolini, Michaela Wilsch-Bräuning, et al. 2016. « GEMC 1 Is a Critical Regulator of Multiciliated Cell Differentiation ». *The EMBO Journal* 35 (9): 942-60. <https://doi.org/10.15252/embj.201592821>.
- Thouvenin, Olivier, Ludovic Keiser, Yasmine Cantaut-Belarif, Martin Carbo-Tano, Frederik Verweij, Nathalie Jurisch-Yaksi, Pierre-Luc Bardet, Guillaume van Niel, Francois Gallaire, et Claire Wyart. 2020. « Origin and Role of the Cerebrospinal Fluid Bidirectional Flow in the Central Canal ». *ELife* 9 (janvier): e47699. <https://doi.org/10.7554/eLife.47699>.
- Tissir, Fadel, Yibo Qu, Mireille Montcouquiol, Libing Zhou, Kouji Komatsu, Dongbo Shi, Toshihiko Fujimori, et al. 2010. « Lack of Cadherins Celsr2 and Celsr3 Impairs Ependymal Ciliogenesis, Leading to Fatal Hydrocephalus ». *Nature Neuroscience* 13 (6): 700-707. <https://doi.org/10.1038/nn.2555>.
- Torres, Vicente E., et Peter C. Harris. 2014. « Strategies Targeting CAMP Signaling in the Treatment of Polycystic Kidney Disease ». *Journal of the American Society of Nephrology* 25 (1): 18-32. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013040398>.
- Tostivint, Hervé, Lucille Joly, Isabelle Lihmann, Caroline Parmentier, Alexis Lebon, Mireille Morisson, André Calas, Marc Ekker, et Hubert Vaudry. 2006. « Comparative Genomics Provides Evidence for Close Evolutionary Relationships between the Urotensin II and Somatostatin Gene Families ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (7): 2237-42. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510700103>.
- Tostivint, Hervé, Daniel Ocampo Daza, Christina A Bergqvist, Feng B Quan, Marion Bougerol, Isabelle Lihmann, et Dan Larhammar. 2014. « MOLECULAR EVOLUTION OF GPCRS: Somatostatin/urotensin II receptors ». *Journal of Molecular Endocrinology* 52 (3): T61-86. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0274>.
- Tostivint, Hervé, Feng B. Quan, Marion Bougerol, Natalia B. Kenigfest, et Isabelle Lihmann. 2013. « Impact of Gene/Genome Duplications on the Evolution of the Urotensin II and Somatostatin Families ». *General and Comparative Endocrinology* 188 (juillet): 110-17. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.12.015>.
- Tourtellotte, Warren G., Cynthia Keller-Peck, Jeffrey Milbrandt, et Jan Kucera. 2001. « The Transcription Factor Egr3 Modulates Sensory Axon–Myotube Interactions during Muscle Spindle Morphogenesis ». *Developmental Biology* 232 (2): 388-99. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0202>.
- Troutwine, Benjamin R., Paul Gontarz, Mia J. Konjikusic, Ryoko Minowa, Adrian Monstad-Rios, Diane S. Sepich, Ronald Y. Kwon, Lilianna Solnica-Krezel, et Ryan S. Gray. 2020. « The Reissner Fiber Is Highly Dynamic In Vivo and Controls Morphogenesis of the Spine ». *Current Biology* 30 (12): 2353-2362.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.04.015>.
- Tsujikawa, Motokazu, et Jarema Malicki. 2004. « Intraflagellar Transport Genes Are Essential for Differentiation and Survival of Vertebrate Sensory Neurons ». *Neuron* 42 (5): 703-16. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00268-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00268-5).
- Ueno, Masaki, Masashi Takaso, Toshiyuki Nakazawa, Takayuki Imura, Wataru Saito, Ryousuke Shintani, Kentaro Uchida, et al. 2011. « A 5-Year Epidemiological Study on the Prevalence Rate of Idiopathic Scoliosis in Tokyo: School Screening of More than 250,000 Children ». *Journal of Orthopaedic Science* 16 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1007/s00776-010-0009-z>.

- UK10K, Aarti Tarkar, Niki T Loges, Christopher E Slagle, Richard Francis, Gerard W Dougherty, Joel V Tamayo, et al. 2013. « DYX1C1 Is Required for Axonemal Dynein Assembly and Ciliary Motility ». *Nature Genetics* 45 (9): 995-1003. <https://doi.org/10.1038/ng.2707>.
- Valentine, Megan Smith, Anbazhagan Rajendran, Junji Yano, S Dilhan Weeraratne, Janine Beisson, Jean Cohen, France Koll, et Judith Van Houten. 2012. « ParameciumBBS Genes Are Key to Presence of Channels in Cilia ». *Cilia* 1 (1): 16. <https://doi.org/10.1186/2046-2530-1-16>.
- Van Gennip, J. L. M., C. W. Boswell, et B. Ciruna. 2018. « Neuroinflammatory Signals Drive Spinal Curve Formation in Zebrafish Models of Idiopathic Scoliosis ». *Science Advances* 4 (12): eaav1781. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav1781>.
- Vaudry, Hubert, Jérôme Leprince, David Chatenet, Alain Fournier, David G. Lambert, Jean-Claude Le Mével, Eliot H. Ohlstein, Adel Schwertani, Hervé Tostivint, et David Vaudry. 2015. « International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCII. Urotensin II, Urotensin II-Related Peptide, and Their Receptor: From Structure to Function ». Édité par David R. Sibley. *Pharmacological Reviews* 67 (1): 214-58. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009480>.
- Vierkotten, Jeanette, Renate Dildrop, Thomas Peters, Baolin Wang, et Ulrich Rütger. 2007. « Ftm Is a Novel Basal Body Protein of Cilia Involved in Shh Signalling ». *Development* 134 (14): 2569-77. <https://doi.org/10.1242/dev.003715>.
- Vigh, B., I. Vigh-Teichmann, et B. Aros. 1977. « Special Dendritic and Axonal Endings Formed by the Cerebrospinal Fluid Contacting Neurons of the Spinal Cord ». *Cell and Tissue Research* 183 (4). <https://doi.org/10.1007/BF00225666>.
- Vigh, B., I. Vigh-Teichmann, M. J. Manzano e Silva, et A. N. van den Pol. 1983. « Cerebrospinal Fluid-Contacting Neurons of the Central Canal and Terminal Ventricle in Various Vertebrates ». *Cell and Tissue Research* 231 (3): 615-21. <https://doi.org/10.1007/BF00218119>.
- Vigh, Béla, et Ingeborg Vigh-Teichmann. 1998. « Actual Problems of the Cerebrospinal Fluid-Contacting Neurons ». *Microscopy Research and Technique* 41 (1): 57-83. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19980401\)41:1<57::AID-JEMT6>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980401)41:1<57::AID-JEMT6>3.0.CO;2-R).
- Vize, Peter D., Daniel W. Seufert, Thomas J. Carroll, et John B. Wallingford. 1997. « Model Systems for the Study of Kidney Development: Use of the Pronephros in the Analysis of Organ Induction and Patterning ». *Developmental Biology* 188 (2): 189-204. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8629>.
- Vladar, Eszter K., Roy D. Bayly, Ashvin M. Sangoram, Matthew P. Scott, et Jeffrey D. Axelrod. 2012. « Microtubules Enable the Planar Cell Polarity of Airway Cilia ». *Current Biology* 22 (23): 2203-12. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.09.046>.
- Wai, Man, Wang Jun, Yim Yee, Wong Ho, Ng Bun, Lam Ping, Lee Man, et al. 2014. « A Review of Pinealectomy-Induced Melatonin-Deficient Animal Models for the Study of Etiopathogenesis of Adolescent Idiopathic Scoliosis ». *International Journal of Molecular Sciences* 15 (9): 16484-99. <https://doi.org/10.3390/ijms150916484>.
- Wallin, J., J. Wilting, H. Koseki, R. Fritsch, B. Christ, et R. Balling. 1994. « The Role of Pax-1 in Axial Skeleton Development ». *Development (Cambridge, England)* 120 (5): 1109-21. <https://doi.org/10.1242/dev.120.5.1109>.

- Wallingford, John B. 2010. « Planar Cell Polarity Signaling, Cilia and Polarized Ciliary Beating ». *Current Opinion in Cell Biology* 22 (5): 597-604. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.07.011>.
- Wang, Huiping, Wensha Nie, Chunxia Wang, Zuohua Wang, et Yuxia Zheng. 2023. « Novel *CPLANE1* c.8948dupT (p.P2984Tfs*7) Variant in a Child Patient with Joubert Syndrome ». *Open Life Sciences* 18 (1): 20220542. <https://doi.org/10.1515/biol-2022-0542>.
- Wang, J., Thomas, H.R., Thompson, R.G., Waldrep, S.C., Fogerty, J., Song, P., Li, Z., Ma, Y., Santra, P., Hoover, J.D., et al. (2022). Variable phenotypes and penetrance between and within different zebrafish ciliary transition zone mutants. *Disease Models & Mechanisms* 15, dmm049568. [10.1242/dmm.049568](https://doi.org/10.1242/dmm.049568).
- Wang, Lei, Cong Fu, Hongbo Fan, Tingting Du, Mei Dong, Yi Chen, Yi Jin, et al. 2013. « MiR-34b Regulates Multiciliogenesis during Organ Formation in Zebrafish ». *Development* 140 (13): 2755-64. <https://doi.org/10.1242/dev.092825>.
- Webber, W. A., et J. Lee. 1975. « Fine Structure of Mammalian Renal Cilia ». *The Anatomical Record* 182 (3): 339-43. <https://doi.org/10.1002/ar.1091820307>.
- Wheway, Gabrielle, David A Parry, et Colin A Johnson. 2014. « The Role of Primary Cilia in the Development and Disease of the Retina ». *Organogenesis* 10 (1): 69-85. <https://doi.org/10.4161/org.26710>.
- Wiegering, Antonia, Renate Dildrop, Lisa Kalfhues, André Spsychala, Stefanie Kuschel, Johanna Maria Lier, Thomas Zobel, et al. 2018. « Cell Type-specific Regulation of Ciliary Transition Zone Assembly in Vertebrates ». *The EMBO Journal* 37 (10). <https://doi.org/10.15252/emboj.201797791>.
- Wiegering, Antonia, Renate Dildrop, Christine Vesque, Hemant Khanna, Sylvie Schneider-Maunoury, et Christoph Gerhardt. 2021. « Rpgrip1l Controls Ciliary Gating by Ensuring the Proper Amount of Cep290 at the Vertebrate Transition Zone ». Édité par Francis Barr. *Molecular Biology of the Cell* 32 (8): 675-89. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-03-0190>.
- Wiegering, Antonia, Renate Dildrop, Christine Vesque, Sylvie Schneider-Maunoury, et Christoph Gerhardt. 2020. « Rpgrip1l Controls Ciliary Gating by Ensuring the Proper Amount of Cep290 at the Vertebrate Transition Zone ». Preprint. *Cell Biology*. <https://doi.org/10.1101/2020.02.10.942300>.
- Williams, Corey L., Chunmei Li, Katarzyna Kida, Peter N. Inglis, Swetha Mohan, Lucie Semenc, Nathan J. Bialas, et al. 2011. « MKS and NPHP Modules Cooperate to Establish Basal Body/Transition Zone Membrane Associations and Ciliary Gate Function during Ciliogenesis ». *Journal of Cell Biology* 192 (6): 1023-41. <https://doi.org/10.1083/jcb.201012116>.
- Wishart, Brian D., et Emily Kivlehan. 2021. « Neuromuscular Scoliosis ». *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America* 32 (3): 547-56. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2021.02.007>.
- Won, Jungyeon, Elaine Gifford, Richard S. Smith, Haiqing Yi, Paulo A. Ferreira, Wanda L. Hicks, Tiansen Li, Jürgen K. Naggert, et Patsy M. Nishina. 2009. « RPGRIP1 Is Essential for Normal Rod Photoreceptor Outer Segment Elaboration and Morphogenesis ». *Human Molecular Genetics* 18 (22): 4329-39.

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddp385>.

Woo, Seung-Hyun, Viktor Lukacs, Joriene C de Nooij, Dasha Zaytseva, Connor R Criddle, Allain Francisco, Thomas M Jessell, Katherine A Wilkinson, et Ardem Patapoutian. 2015. « Piezo2 Is the Principal Mechanotransduction Channel for Proprioception ». *Nature Neuroscience* 18 (12): 1756-62. <https://doi.org/10.1038/nn.4162>.

Wopat, Susan, Jennifer Bagwell, Kaelyn D. Sumigray, Amy L. Dickson, Leonie F.A. Huitema, Kenneth D. Poss, Stefan Schulte-Merker, et Michel Bagnat. 2018. « Spine Patterning Is Guided by Segmentation of the Notochord Sheath ». *Cell Reports* 22 (8): 2026-38. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.084>.

Worthington, W. Curtis, et Robert S. Cathcart. 1963. « Ependymal Cilia: Distribution and Activity in the Adult Human Brain ». *Science* 139 (3551): 221-22. <https://doi.org/10.1126/science.139.3551.221>.

———. 2006. « CILIARY CURRENTS ON EPENDYMAL SURFACES ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 130 (3): 944-50. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1966.tb12638.x>.

Wu, Chien-Ting, Hsin-Yi Chen, et Tang K. Tang. 2018. « Myosin-Va Is Required for Preciliary Vesicle Transportation to the Mother Centriole during Ciliogenesis ». *Nature Cell Biology* 20 (2): 175-85. <https://doi.org/10.1038/s41556-017-0018-7>.

Wu, Tao, Xu Sun, Zezhang Zhu, Huang Yan, Jing Guo, Jack C. Y. Cheng, et Yong Qiu. 2015. « Role of Enhanced Central Leptin Activity in a Scoliosis Model Created in Bipedal Amputated Mice ». *Spine* 40 (19): E1041-45. <https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000001060>.

Wu, Zhimao, Nan Pang, Yingying Zhang, Huicheng Chen, Ying Peng, Jingyan Fu, et Qing Wei. 2020. « CEP290 Is Essential for the Initiation of Ciliary Transition Zone Assembly ». Édité par Renata Basto. *PLOS Biology* 18 (12): e3001034. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001034>.

Wyart, Claire, Filippo Del Bene, Erica Warp, Ethan K. Scott, Dirk Trauner, Herwig Baier, et Ehud Y. Isacoff. 2009. « Optogenetic Dissection of a Behavioural Module in the Vertebrate Spinal Cord ». *Nature* 461 (7262): 407-10. <https://doi.org/10.1038/nature08323>.

Xie, Haibo, Yunsi Kang, Junjun Liu, Min Huang, Zhicheng Dai, Jiale Shi, Shuo Wang, et al. 2023. « Ependymal Polarity Defects Coupled with Disorganized Ciliary Beating Drive Abnormal Cerebrospinal Fluid Flow and Spine Curvature in Zebrafish ». Édité par Dagmar Wachten. *PLOS Biology* 21 (3): e3002008. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002008>.

Yamaguchi, Hiroshi, Toshiyuki Oda, Masahide Kikkawa, et Hiroyuki Takeda. 2018. « Systematic Studies of All PIH Proteins in Zebrafish Reveal Their Distinct Roles in Axonemal Dynein Assembly ». *ELife* 7 (mai): e36979. <https://doi.org/10.7554/eLife.36979>.

Yamaguchi, Naoya, Tugba Colak-Champollion, et Holger Knaut. 2019. « ZGrad Is a Nanobody-Based Degron System That Inactivates Proteins in Zebrafish ». *ELife* 8 (février): e43125. <https://doi.org/10.7554/eLife.43125>.

Yamamoto, Ryosuke, Masafumi Hirono, et Ritsu Kamiya. 2010. « Discrete PIH Proteins Function in the Cytoplasmic Preassembly of Different Subsets of Axonemal

Dyneins ». *Journal of Cell Biology* 190 (1): 65-71. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002081>.

Yang, Lixin, Sepand Rastegar, et Uwe Strähle. 2010. « Regulatory Interactions Specifying Kolmer-Agdühr Interneurons ». *Development* 137 (16): 2713-22. <https://doi.org/10.1242/dev.048470>.

Yang, Mingyuan, Xianzhao Wei, Wu Yang, Yanming Li, Haijian Ni, Yingchuan Zhao, Ziqiang Chen, Yushu Bai, et Ming Li. 2015. « The Polymorphisms of Melatonin Receptor 1B Gene (MTNR1B) (Rs4753426 and Rs10830963) and Susceptibility to Adolescent Idiopathic Scoliosis: A Meta-Analysis ». *Journal of Orthopaedic Science* 20 (4): 593-600. <https://doi.org/10.1007/s00776-015-0725-5>.

Ye, Fan, Andrew R. Nager, et Maxence V. Nachury. 2018. « BBSome Trains Remove Activated GPCRs from Cilia by Enabling Passage through the Transition Zone ». *Journal of Cell Biology* 217 (5): 1847-68. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709041>.

Yoshida, Satoko, Hidetaka Shiratori, Ivana Y. Kuo, Aiko Kawasumi, Kyosuke Shinohara, Shigenori Nonaka, Yasuko Asai, et al. 2012. « Cilia at the Node of Mouse Embryos Sense Fluid Flow for Left-Right Determination via Pkd2 ». *Science* 338 (6104): 226-31. <https://doi.org/10.1126/science.1222538>.

Yu, Xianwen, Doreen Lau, Chee Peng Ng, et Sudipto Roy. 2011. « Cilia-Driven Fluid Flow as an Epigenetic Cue for Otolith Biomineralization on Sensory Hair Cells of the Inner Ear ». *Development* 138 (3): 487-94. <https://doi.org/10.1242/dev.057752>.

Yu, Xianwen, Chee Peng Ng, Hermann Habacher, et Sudipto Roy. 2008. « Foxj1 Transcription Factors Are Master Regulators of the Motile Ciliogenic Program ». *Nature Genetics* 40 (12): 1445-53. <https://doi.org/10.1038/ng.263>.

Zernant, Jana, Maigi Külm, Sharola Dharmaraj, Anneke I. den Hollander, Isabelle Perrault, Markus N. Preising, Birgit Lorenz, et al. 2005. « Genotyping Microarray (Disease Chip) for Leber Congenital Amaurosis: Detection of Modifier Alleles ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46 (9): 3052. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0111>.

Zhang, Chongyang, Shannon J. Clough, Ekue B. Adamah-Biassi, Michele H. Sveinsson, Anthony J. Hutchinson, Ikuo Miura, Tamio Furuse, et al. 2021. « Impact of Endogenous Melatonin on Rhythmic Behaviors, Reproduction, and Survival Revealed in Melatonin-proficient C57BL/6J Congenic Mice ». *Journal of Pineal Research* 71 (2). <https://doi.org/10.1111/jpi.12748>.

Zhang, Ping, Bingbing Wu, Yaqiong Wang, Yunyun Ren, Gang Li, Yanyan Qan, Caixia Lei, et Huijun Wang. 2022. « Identification of Pathogenic Variants in RPGRIP1L with Meckel Syndrome and Preimplantation Genetic Testing in a Chinese Family ». *Reproductive Sciences* 29 (8): 2200-2207. <https://doi.org/10.1007/s43032-022-00898-y>.

Zhang, Qihong, Darryl Nishimura, Tim Vogel, Jianqiang Shao, Ruth Swiderski, Terry Yin, Charles Searby, et al. 2013. « BBS7 Is Required for BBSome Formation and Its Absence in Mice Results in Bardet-Biedl Syndrome Phenotypes and Selective Abnormalities in Membrane Protein Trafficking ». *Journal of Cell Science*, janvier, jcs.111740. <https://doi.org/10.1242/jcs.111740>.

Zhang, Xiaoli, Shuo Jia, Zhe Chen, Yan Ling Chong, Haibo Xie, Dong Feng, Xiaotong Wu, Don Zhu Song, Sudipto Roy, et Chengtian Zhao. 2018. « Cilia-Driven

Cerebrospinal Fluid Flow Directs Expression of Urotensin Neuropeptides to Straighten the Vertebrate Body Axis ». *Nature Genetics* 50 (12): 1666-73. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0260-3>.

Zhang, Xinping, Edward M. Schwarz, Donald A. Young, J. Edward Puzas, Randy N. Rosier, et Regis J. O'Keefe. 2002. « Cyclooxygenase-2 Regulates Mesenchymal Cell Differentiation into the Osteoblast Lineage and Is Critically Involved in Bone Repair ». *Journal of Clinical Investigation* 109 (11): 1405-15. <https://doi.org/10.1172/JCI0215681>.

Zhang, Xiujuan, Yue Shen, Ping Li, Ruikun Cai, Chao Lu, Qian Li, Cuixia Chen, et al. 2021. « Clinical Heterogeneity and Intrafamilial Variability of Joubert Syndrome in Two Siblings with CPLANE1 Variants ». *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 9 (6): e1682. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1682>.

Zhao, Yun, Dong-Hyun Hong, Basil Pawlyk, Guohua Yue, Michael Adamian, Marcin Grynberg, Adam Godzik, et Tiansen Li. 2003. « The Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator (RPGR)- Interacting Protein: Subserving RPGR Function and Participating in Disk Morphogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (7): 3965-70. <https://doi.org/10.1073/pnas.0637349100>.

Zheng, Liwei, Yong Cao, Shuangfei Ni, Huabin Qi, Zemin Ling, Xin Xu, Xuenong Zou, et al. 2018. « Ciliary Parathyroid Hormone Signaling Activates Transforming Growth Factor- β to Maintain Intervertebral Disc Homeostasis during Aging ». *Bone Research* 6 (1): 21. <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0022-y>.

Zhou, Feng, Vijay Narasimhan, Mohammad Shboul, Yan Ling Chong, Bruno Reversade, et Sudipto Roy. 2015. « Gmnc Is a Master Regulator of the Multiciliated Cell Differentiation Program ». *Current Biology* 25 (24): 3267-73. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.062>.

Zhu, Ping, Qi Qiu, Peter C. Harris, Xiaolei Xu, et Xueying Lin. 2021. « Mtor Haploinsufficiency Ameliorates Renal Cysts and Cilia Abnormality in Adult Zebrafish Tmem67 Mutants ». *Journal of the American Society of Nephrology* 32 (4): 822-36. <https://doi.org/10.1681/ASN.2020070991>.

Zou, Wenzheng, Yuqing Lv, Zuxiang Liu, Pengyan Xia, Hong Li, et Jianwei Jiao. 2020. « Loss of Rsph9 Causes Neonatal Hydrocephalus with Abnormal Development of Motile Cilia in Mice ». *Scientific Reports* 10 (1): 12435. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69447-4>.