



HAL
open science

Bases moléculaires et cellulaires de l'assemblage de l'axonème des cils mobiles

Lucie Thomas

► **To cite this version:**

Lucie Thomas. Bases moléculaires et cellulaires de l'assemblage de l'axonème des cils mobiles. Génétique humaine. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS097 . tel-04578971

HAL Id: tel-04578971

<https://theses.hal.science/tel-04578971>

Submitted on 17 May 2024

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.

Sorbonne Université

École doctorale : Complexité du vivant

UMR_S933 : Maladies génétiques d'expression pédiatrique

Bases moléculaires et cellulaires de l'assemblage de l'axonème des cils mobiles

Par **Lucie THOMAS**

Thèse de doctorat en Science

Spécialité : Biologie Cellulaire

Dirigée par : Dr **Marie Legendre** et Pr **Serge Amselem**

Présentée et soutenue publiquement le **mardi 16 mai 2023 à 9h30**

Devant un jury composé de :

Marc Humbert , Pr	Université Paris-Saclay	Président
Alice Meunier , Dr	PSL Paris	Rapporteur
Julie Steffann , Pr	Sorbonne Paris-Cité	Rapporteur
Laurent Gouya , Pr	Sorbonne Paris-Cité	Examineur
Harriet Corvol , Pr	Sorbonne Université	Examineur
Marie Legendre , Dr	Sorbonne Université	Co-Directeur de Thèse
Serge Amselem , Pr	Sorbonne Université	Co-Directeur de Thèse



Résumé anglais

Molecular and cellular bases of the axoneme assembly in motile cilia

Dynein arms (DAs), the motors of ciliary and flagella beating, are anchored with a regular spacing along cilia and flagella axonemes. Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a rare respiratory disease due to defects in motile cilia. This mainly recessive condition combines laterality defects in half of the patients and frequent male and female hypofertility. About 25% of PCD patients show an absence of both outer and inner DAs. Those patients carry mutations in one of the 13 implicated genes that drive, for most of them, the cytoplasmic assembly of DAs.

The aim of this thesis was to clarify the role of two co-chaperones, part of the cytoplasmic DA assembly complexes and encoded by PCD genes newly (*TTC12*) or recently (*PIH1D3*) identified.

Our work on *TTC12* revealed for the first time the existence of different mechanisms of DA assembly between respiratory cilia and sperm flagella in humans. This is in keeping with the peculiar phenotype of patients with *TTC12* mutations: a predominant male infertility associated with mild respiratory signs. Our data also show the existence of a distinct DA assembly process for the different subspecies of inner DAs. Within the framework of this study, we developed an original cellular model of human airway epithelial cells (HAECs) differentiated *in vitro* at air-liquid interface, in which genes can be CRISPR-Cas9-invalidated. This tool opens new avenues for the study of the pathophysiology of airway diseases.

Our study on *PIH1D3*, which mutations underlie the unique known X-linked non-syndromic PCD, showed that women who carry a heterozygous *PIH1D3* mutation displayed variable airway phenotypes (from asymptomatic to severe respiratory symptoms) in close relation to the X-inactivation rate of the mutated allele. This has been shown by two approaches that assess DNA methylation of CG dimers: enzymatic digestion at the HUMARA locus and bisulfite conversion at the *PIH1D3* locus. Those results prompt to search for heterozygous mutations in *PIH1D3*, in anticipation of a genetic counselling, in (i) females relatives of male PCD patients with a *PIH1D3* defect, and (ii) females with mild chronic respiratory symptoms of unknown etiology. In both cases, diagnosis is difficult to establish in those women given the absence of *situs inversus*, mild respiratory signs, and normal nasal NO. At the prospect of gene or RNA therapy, this work suggests that reaching 30% of *PIH1D3* expression could significantly improve the airway phenotype in patients.

Keywords: primary ciliary dyskinesia, axoneme, cilia, dynein arms, assembly, X-inactivation

Contenu

Résumé anglais.....	2
Abréviations	5
I- Introduction	6
I.1. Les cils mobiles.....	6
I.1.1. Structure : l'axonème	6
I.1.2. Localisation et fonction	7
I.2. Les bras de dynéine.....	9
I.2.1. Bras de dynéine externes	9
I.2.2. Bras de dynéine internes	13
I.3. Mise en place des bras de dynéines	15
I.3.1. Pré-assemblage cytoplasmique	15
I.3.2. Transport jusqu'au cil	21
I.3.3. Ancrage à l'axonème	23
I.4. Les dyskinésies ciliaires primitives	28
I.4.1. Manifestations cliniques.....	28
I.4.2. Diagnostic	28
I.4.3. Gènes responsables de DCP	31
I.4.4. Corrélations génotype/phénotype	34
I.5. Modèles d'étude des DCP	36
I.5.1. Organismes unicellulaires.....	36
I.5.2. Embryons de vertébrés.....	39
I.5.3. Invertébrés et mammifères	40
I.5.4. Modèles cellulaires	44
II- Objectifs de la thèse.....	49
III- Patients.....	50
IV- Matériels et méthodes.....	53
IV.1. Matériel : cellules épithéliales nasales humaines (CENH)	53
IV.2. Principales méthodes d'étude fonctionnelle.....	53
V- Résultats.....	55
V.1. <i>TTC12</i> , nouveau gène de DCP, code une protéine d'assemblage des BDs dont la fonction diffère entre flagelles et cils respiratoires	55
V.1.1. Introduction.....	55
V.1.2. Article 1.....	58
V.2. Identification de manifestations pulmonaires variables chez des femmes porteuses à l'état hétérozygote de mutations de <i>PIH1D3</i>	59
V.2.1. Introduction.....	59
V.2.2. Article 2.....	63
VI- Discussion.....	64

VII- Conclusion et perspectives	72
Références.....	74
Résumé français.....	86

Abréviations

ALI	Air-liquide interface
BD	Bras de dynéine
BDE	Bras de dynéine externe
BDI	Bras de dynéine interne
Cas9	CRISPR associated protein 9
CC	Complexe central
CENH	Cellules épithéliales nasales humaines
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DC	Docking complex
DCP	Dyskinésie ciliaire primitive
DNAAF	Dynein axonemal assembly factor
DNAH	Dynein axonemal heavy chain
DNAI	Dynein axonemal intermediate chain
DNAL	Dynein axonemal light chain
DynAPs	Dynein axonemal particles
HSVM	High speed video microscopy
IF	Immunofluorescence
IFT	Intraflagellar transport
ME	Microscopie électronique
MIA	Modifier of inner arms
MIP	Microtubules inner proteins
MT	Microtubules
N-DRC	Nexin-dynein regulatory complex
NGS	Next generation sequencing
NO	Monoxyde d'azote
ODAD	Outer dynein arms docking complex
RS	Radial spoke
WB	Western blot
XCI	X chromosome inactivation

Le cil mobile est une organelle très anciennement connue avec, en 1675, le tout premier témoignage, par le hollandais Leeuwenhoek, de l'existence de protozoaires qui possèdent « d'innombrables et fins petits pieds en mouvement », communément appelés « cils » à partir de 1786 (Satir, 1995).

Il existe deux principaux types de cils qui se distinguent par leur cytosquelette interne, appelé axonème : les cils mobiles et les cils primaires. Ces derniers, immobiles et de taille inférieure, n'ont été découverts qu'en 1898 (Bloodgood, 2009).

Les cils primaires sont des organelles sensorielles répondant à des stimuli mécaniques (mécánorécepteurs) et chimiques (chemorécepteurs). Ils sont présents en un seul exemplaire, de façon constitutive ou transitoire, sur toutes les cellules de l'organisme à l'exception des cellules sanguines. Des dérivés ciliés existent également au niveau des cellules sensorielles (cils connecteurs des photorécepteurs, cils olfactifs, kinocilium des cellules de l'oreille interne) (Satir and Christensen, 2007).

Les cils mobiles sont, quant à eux, présents dans des tissus très spécialisés (tractus respiratoire, tractus génital masculin et féminin, ventricules cérébraux) où ils ont pour rôle de faciliter le déplacement de fluide biologique (mucus, liquide céphalo-rachidien...). Ils sont présents en plusieurs exemplaires sur chaque cellule ciliée, allant d'une dizaine par cellule pour les cils épendymaires à plusieurs centaines par cellule pour les cils respiratoires. On trouve également un cil mobile unique sur les cellules embryonnaires nodales à l'origine de la latéralisation des organes au cours du développement.

Mon travail de thèse a porté sur ces cils mobiles et sur les dyskinésies ciliaires primitives, maladies associées à des anomalies génétiques de ces cils mobiles.

Je détaillerai en introduction la structure, la fonction et la mise en place des cils mobiles, puis j'aborderai la physiopathologie des dyskinésies ciliaires primitives (DCP) ainsi que leurs modèles d'étude.

I- Introduction

I.1. Les cils mobiles

I.1.1. Structure : l'axonème

L'axonème constitue le cytosquelette microtubulaire des cils primaires, des cils mobiles et des flagelles. Alors que l'axonème du cil primaire est composé de 9 doublets périphériques de microtubules (9+0), celui des cils mobiles et des flagelles présente en outre deux microtubules centraux (9+2) entourés d'une gaine constituée d'une quarantaine de protéine. Les microtubules centraux et la gaine forment le complexe central (CC). Chaque doublet périphérique est constitué d'un microtubule B incomplet, s'imbriquant dans un microtubule A complet au long duquel sont fixés les

moteurs des cils mobiles : les bras de dynéine externes (BDE) et internes (BDI). Les doublets périphériques de microtubule sont reliés entre eux par les complexes N-DRC (*Nexin-dynein regulatory complex*) indispensables à l'activation des dynéines, tandis que les ponts radiaux (RS, *radial spoke*) relient les doublets périphériques au CC. (**Figure 1**).

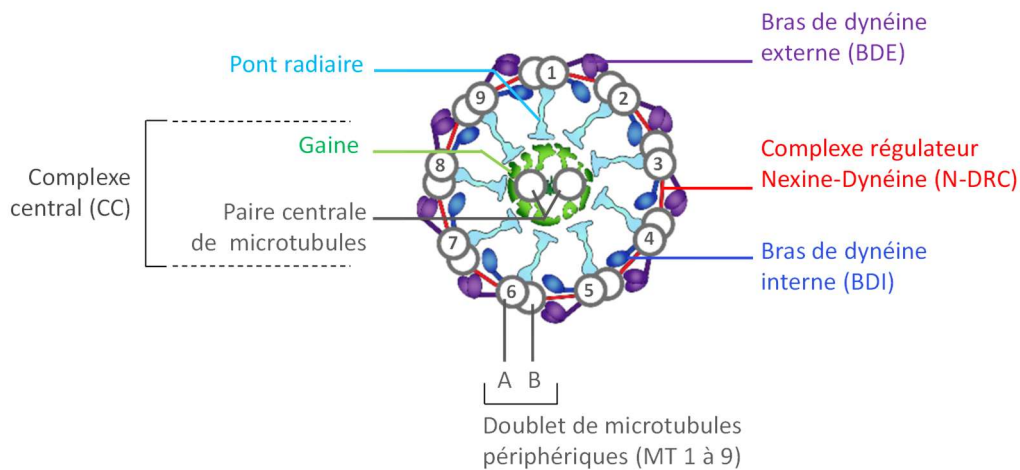


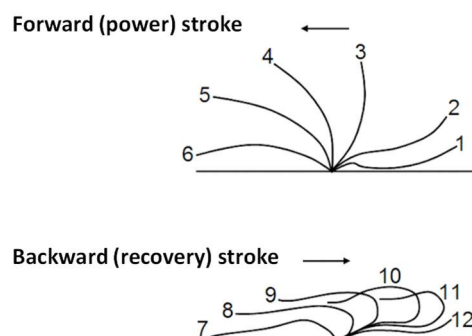
Figure 1. Représentation schématique d'une coupe transversale d'un axonème de cil mobile (modifié d'après Niziolek et al., 2022).

I.1.2. Localisation et fonction

Les cils mobiles sont présents dans plusieurs tissus de l'organisme. Ils tapissent notamment l'épithélium du tractus respiratoire où ils ont pour rôle de mobiliser le mucus et les micro-organismes qu'il contient. Ils sont également présents au niveau des épithéliums épendymaires et tubaires où ils assurent, respectivement, le flux de liquide céphalo rachidien (LCR) et le déplacement de l'ovocyte puis du zygote au niveau des trompes de Fallope.

Au sein des épithéliums multiciliés, le mouvement des cils s'effectue de façon coordonnée au sein d'un plan. Les cils s'étendent à l'aller (*power stroke*) puis se courbent pour regagner leur position originale (*recovery stroke*) (Sanderson and Sleight, 1981) (**Figure 2**).

Figure 2. Schématisation 2D des deux phases du battement ciliaire (modifié d'après Sanderson and Sleight, 1981).



D'une cellule à l'autre de l'épithélium respiratoire, le battement des cils présente un léger décalage de phase qui augmente avec la distance, créant ainsi une onde métachrone (<https://www.youtube.com/watch?v=j3CuqRDGPmU>) participant au déplacement du mucus (Okamoto and Nakaka, 1994).

Les cellules embryonnaires nodales comportent un cil mobile unique : le cil nodal. Celui-ci comporte des BDE et des BDI mais, contrairement aux autres cils mobiles, il est dépourvu de ponts radiaires et de complexe central (structure 9+0). Le mouvement giratoire du cil nodal et l'inclinaison de son axe par rapport à la surface cellulaire induisent un flux du liquide extra-embryonnaire responsable de la latéralisation des organes au cours du développement embryonnaire.

Chez l'homme, des cils mobiles existent aussi au niveau des canaux efférents qui relient le testicule à l'épididyme, assurant le transport des spermatozoïdes. Par ailleurs le flagelle des spermatozoïdes est lui-même constitué d'un axonème similaire à celui des cils mobiles (**Figure 3**). Ces flagelles, plus longs que les cils, se meuvent selon un mouvement lent formant une onde pseudohélicoïdale (<https://youtu.be/AGYechAipbo>).

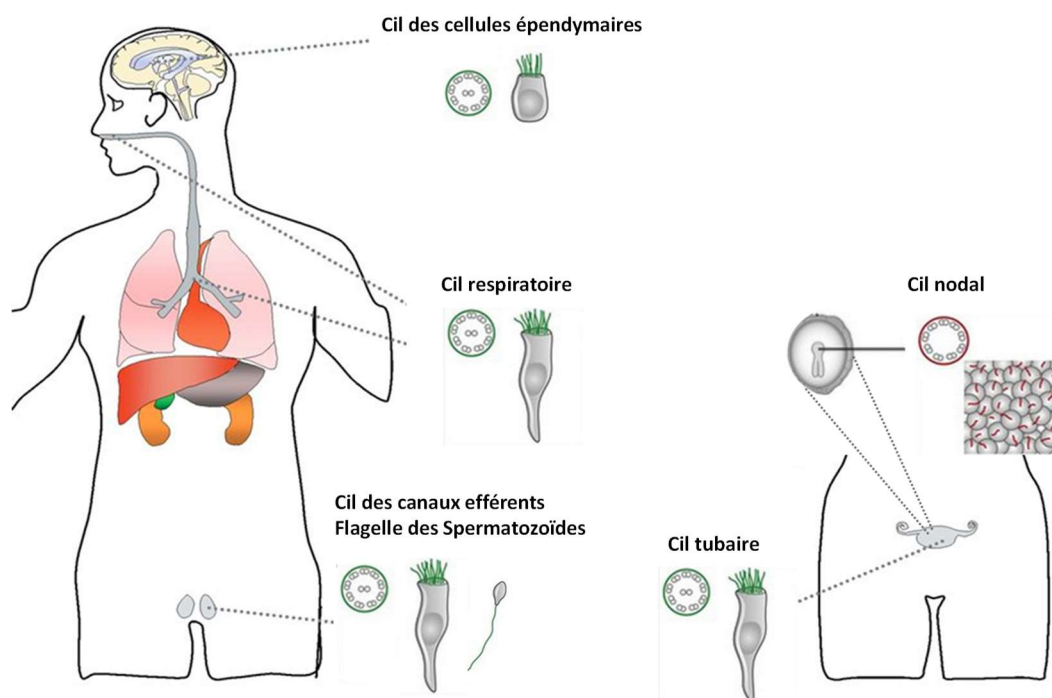


Figure 3. Localisation des cils mobiles dans l'organisme.

I.2. Les bras de dynéine

Tout le long de chaque microtubule sont ancrés des bras de dynéines externes et internes selon une unité fonctionnelle de l'axonème, répétée tous les 96nm. Chaque unité contient 4 BDE identiques et 7 sous-types différents de BDI (Figure 4).

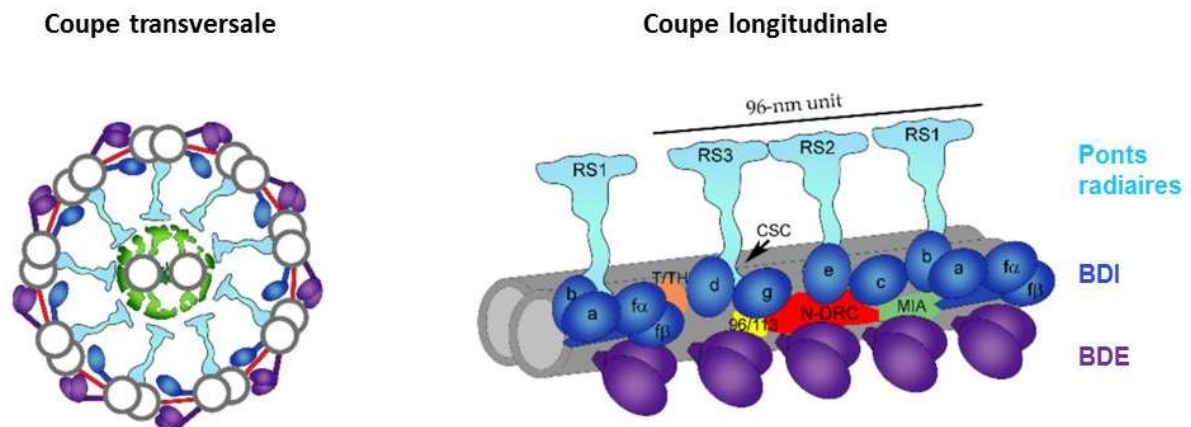


Figure 4. Représentation schématique de l'ultrastructure de l'axonème du cil mobile chez l'Homme (modifié d'après Niziolek et al., 2022) ; a à f : sous-types de bras internes, RS : radial spoke, T/TH : tether/tetherhead, 96/113 : *CCDC96/CCDC113* complex, N-DRC : *nexin-dynein regulatory complex*, MIA : *modifier of inner arms*.

I.2.1. Bras de dynéine externes

Un bras de dynéine est un complexe composé de différentes protéines classées selon leur poids moléculaires : les chaînes lourdes (*DNAH, dynein axonemal heavy chain*) d'environ 500 kDa, les chaînes intermédiaires (*DNAI, dynein axonemal intermediate chain*) allant de 100 à 160 kDa et les chaînes légères (*DNAL, dynein axonemal light chain*) comprises entre 30 et 80 kDa. Ce complexe multiprotéique est ancré au microtubule A via un complexe d'ancrage (*DC, docking complex*).

Alors que chez *Chlamydomonas reinhardtii*, algue verte couramment utilisée comme modèle pour étudier le cil mobile, les BDE sont constitués de trois chaînes lourdes, ils sont composés chez l'Homme de deux chaînes lourdes assemblées en dimère (β et γ), de deux chaînes intermédiaires et, à ce jour, de 8 chaînes légères (Braschi et al., 2022) (Figure 5).

Chaines lourdes	γ	DNAH5
		DNAH8
	β	DNAH9
		DNAH11
		DNAH17
Chaines intermédiaires	DNAI1	
	DNAI2	
Chaines légères	DNAL1	
	DYNLT2	
	NME8	
	DYNLT1	
	DNAL4	
	DYNLL1	
	DYNLRB1	
	DYNLRB2	
Complexe d'ancrage	CCDC114 (ODAD1)	
	ARMC4 (ODAD2)	
	CCDC151 (ODAD3)	
	TTC25 (ODAD4)	
	EFCAB1 (CLXN)	

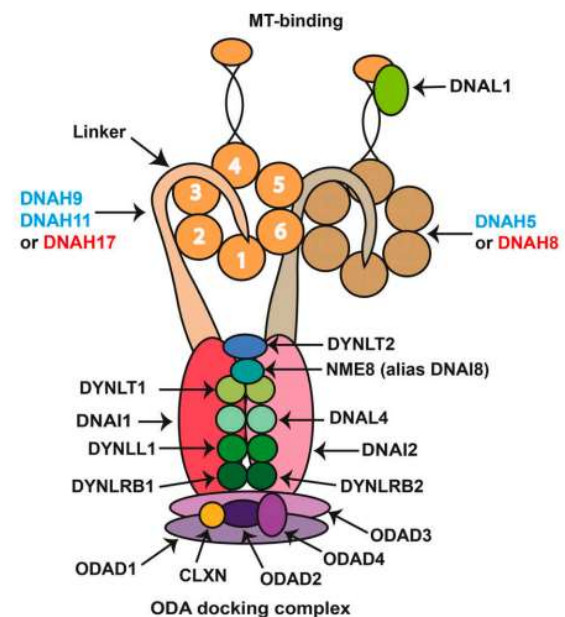


Figure 5. Les différents constituants des BDE connus à ce jour chez l'Homme, et la représentation schématique d'un BDE humain (Braschi et al., 2022). Les chaînes lourdes spécifiques des cils respiratoires sont inscrites en bleu, et les chaînes lourdes spécifiques des flagelles des spermatozoïdes sont inscrites en rouge.

Tandis que les chaînes intermédiaires DNAI1 et DNAI2 participent à l'assemblage et à l'ancrage des bras sur le microtubule A, les chaînes légères ont un rôle dans la régulation de l'activité des dynéines, notamment via des interactions avec des protéines régulatrices dépendantes du calcium comme la calmoduline. Les chaînes lourdes sont quant à elles les moteurs à l'origine du mouvement des cils et des flagelles.

Chaque chaîne lourde comporte un domaine N-terminal (DHC-1N), un lien (*linker*), une tête globulaire composée de six domaines moteurs ATPasiques (*AAA+ ring*, *ATPase Associated with cellular Activities*) et d'une tige (*stalk*) à l'extrémité de laquelle se trouve un domaine de fixation au microtubule B adjacent (*microtubule-binding domain*, *MTBD*) (**Figure 6**). Le domaine N-terminal permet la dimérisation avec une autre chaîne lourde, et l'ancrage au microtubule A.

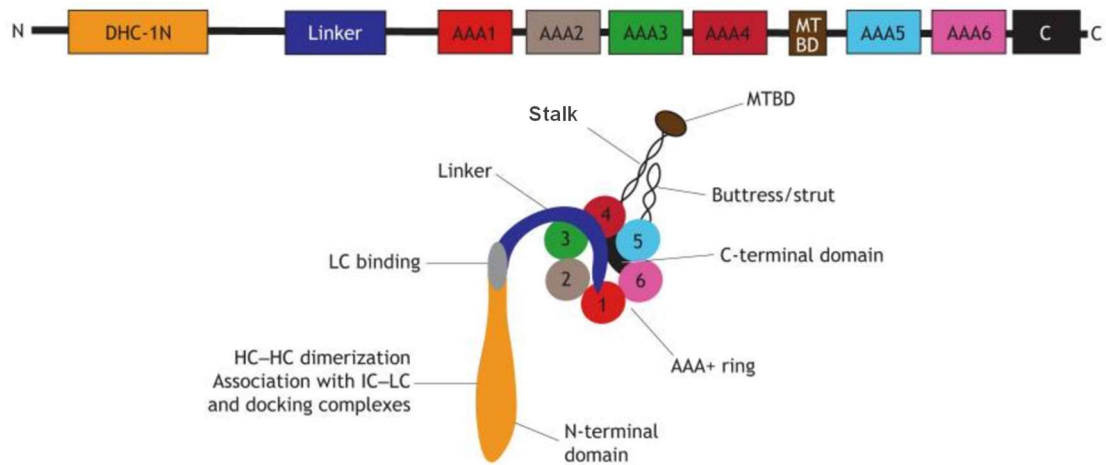


Figure 6. Représentation schématique d'une chaîne lourde de BDE (modifié d'après King, 2021).
 HC : heavy chain, IC : intermediate chain, LC : light chain.

Parmi les 6 domaines AAA+, le domaine AAA1 est l'unique domaine à avoir conservé au cours de l'évolution son activité d'hydrolyse de l'ATP. Celle-ci fournit l'énergie nécessaire au mouvement ciliaire/flagellaire en induisant un changement conformationnel de la tige permettant le mouvement de la tête et de la région MTBD (Carter, 2013). Des analyses de chaînes lourdes de BDE par SPA (*single particle cryo-electron microscopy*) ont démontré un mouvement de balancement de leur domaine « linker » (Roberts et al., 2009) qui interagit avec les domaines AAA3 et AAA4 après la phase d'impulsion alors qu'il interagit avec le domaine AAA2 avant l'impulsion (Carter et al., 2011; Kon et al., 2012; Schmidt et al., 2015). L'angle de fixation du domaine MTBD au microtubule B adjacent varie également pendant l'impulsion (Rao et al., 2021; Redwine et al., 2012) (**Figure 7**).

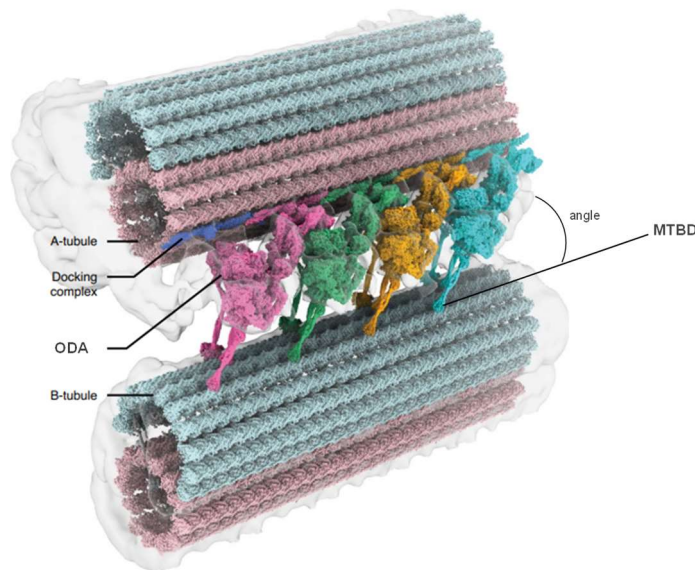


Figure 7. Structure par cryo-microscopie électronique (cryo-ME) de BDE fixés à deux microtubules adjacents chez *Tetrahymena thermophila* (modifié d'après Rao et al., 2021).

Ces différentes conformations de la chaîne lourde (forme inactive pré-impulsion vs forme active post impulsion) induisent un mouvement de glissement entre deux doublets de microtubules adjacents (Kubo et al., 2021). La distribution de ces formes actives/inactives sur les différents doublets de microtubules (MT) est asymétrique, et le changement de conformation entre les côtés opposés de l'axonème induit une flexion de l'axonème qui se propage le long de celui-ci. Il a récemment été montré dans les flagelles des spermatozoïdes d'oursin que les bras externes sont dans leur forme active par défaut, et que l'asymétrie des formes actives/inactives des dynéines provenait d'une inactivation spatialement restreinte à certaines dynéines plutôt qu'à l'activation alternative entre les deux côtés de l'axonème (Lin and Nicastro, 2018).

Les chaînes lourdes sont codées par une famille multigénique conservée au cours de l'évolution. Dans les BDE des cils respiratoires, la composition des dimères γ/β diffère en fonction de leur localisation le long de l'axonème avec des dimères DNAH5/DNAH9 dans la portion distale des cils et des dimères DNAH5/DNAH11 dans la portion proximale (**Figure 8**) (Dougherty et al., 2016). La composition des BDE peut également varier selon les tissus comme nous avons pu le démontrer au laboratoire lors de l'identification de BDE constitués exclusivement de dimères DNAH8/DNAH17 dans le flagelle des spermatozoïdes avec absence des protéines DNAH5, DNAH9 et DNAH11 qui sont spécifiques des cils respiratoires (Whitfield et al., 2019).

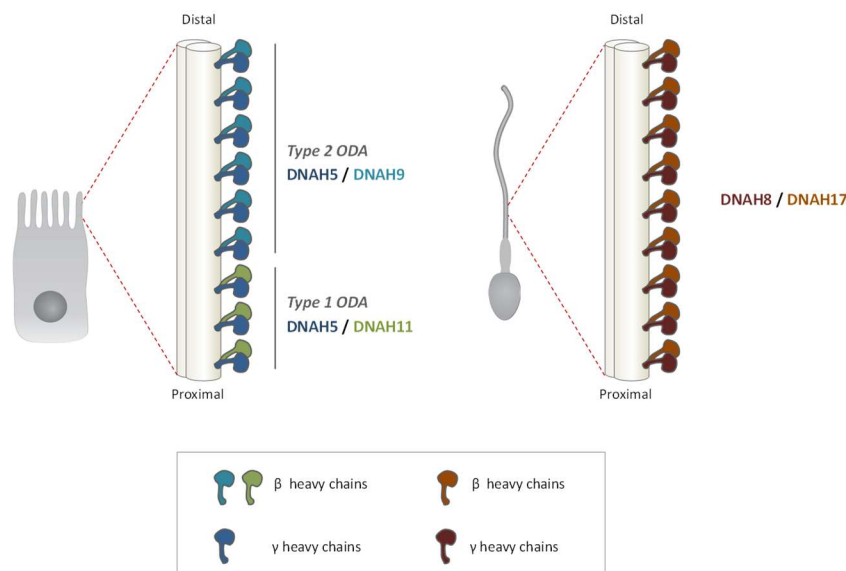


Figure 8. Représentation schématique de la répartition des chaînes lourdes de BDE. A gauche, l'axonème des cellules respiratoires. A droite, l'axonème des flagelles des spermatozoïdes (Legendre et al., 2021).

I.2.2. Bras de dynéine internes

La composition exacte des BDI chez l'Homme n'est pas encore totalement résolue mais des études basées sur l'algue *Chlamydomonas* et la cryo-ME ont permis de progresser au cours des dernières années (Ishikawa, 2015; Osinka et al., 2019).

Chaque unité fonctionnelle axonémale comporte 7 sous types de bras de dynéines internes (BDI) : six monomériques (a, b, c, d, e, g) constituées chacune d'une seule chaîne lourde, et une dimérique I1 (f) composée de deux chaînes lourdes différentes (King, 2016) (**Figure 9**).

	<i>Chlamydomonas</i>	Homme
I1 α (f α)	DHC1a = PF9	DNAH10
I1 β (f β)	DHC1 β = DHC10	DNAH2
a	DHC6	DNAH3/H7/H12/H14 ?
b	DHC5	DNAH3/H7/H12/H14 ?
c	DHC9	DNAH3/H7/H12/H14 ?
e	DHC8	DNAH3/H7/H12/H14 ?
g	DHC7	DNAH6
d	DHC2	DNAH1

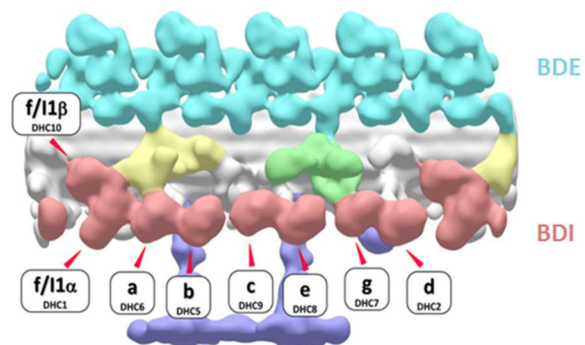


Figure 9. Composition des chaînes lourdes des BDI chez *Chlamydomonas* et protéines orthologues chez l'Homme (d'après Yamamoto et al., 2021).

Chez *Chlamydomonas*, l'isoforme I1 dimérique comporte les chaînes lourdes DHC10 et DHC1 (orthologues de DNAH2 et DNAH10 respectivement), tandis que les isoformes monomériques g et d contiennent les chaînes lourdes DHC7 (orthologue de DNAH6) et DHC2 (orthologue de DNAH1). Les 4 autres isoformes monomériques (a, b, c et e) sont constituées des chaînes lourdes DHC6, DHC5, DHC9 et DHC8 respectivement. Dans les régions proximales de l'axonème, il existe des formes mineures de sous-types g, e et d qui sont composées des chaînes lourdes DHC3, DHC4, et DHC11 respectivement (Yamamoto et al., 2021). En raison de la très grande similarité entre les chaînes lourdes a, b, c et e, la correspondance exacte avec les protéines orthologues humaines (DNAH3, DNAH7, DNAH12 et DNAH14) n'est pas déterminée. Par ailleurs, la présence des sous-types mineurs g, e et d chez *Chlamydomonas* varie selon le doublet de microtubule (MT 1 à 9) (Yamamoto et al., 2021). Ainsi la composition des BDI est particulièrement complexe et reste encore incertaine chez l'Homme.

En dehors des chaînes lourdes, il existe diverses protéines faisant également parties des BDI. D'après les protéines présentes chez *Chlamydomonas*, les chaînes lourdes du bras dimérique I1 seraient associées, chez l'Homme, avec les protéines CASC1/DNAI7, WDR78/DNAI4, WDR63/DNAI3, ainsi qu'avec les dimères [DYNLT1-DYNLT2B], [DYNLL1-DYNLL2] et [DYNLRB1-DYNLRB2] (**Figure 10A**). Les

isoformes monomériques a, c et d seraient associées avec la protéine DNALI1 alors que les isoformes b, e et g seraient associées avec la centrine. Enfin, le sous-type d comporterait également ZMYND12 et TTC29 (Bower et al., 2013; Braschi et al., 2022) (**Figure 10B**).

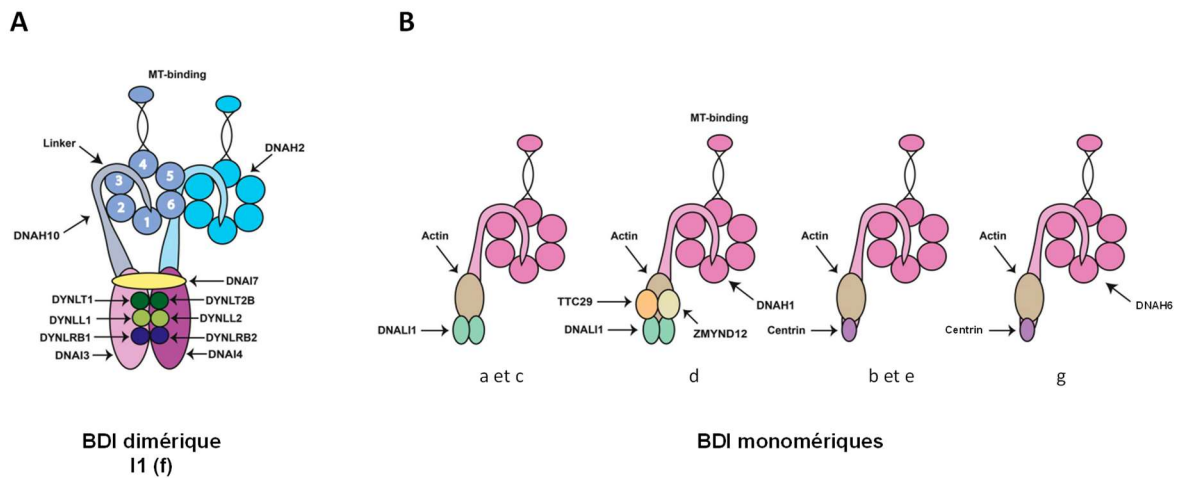
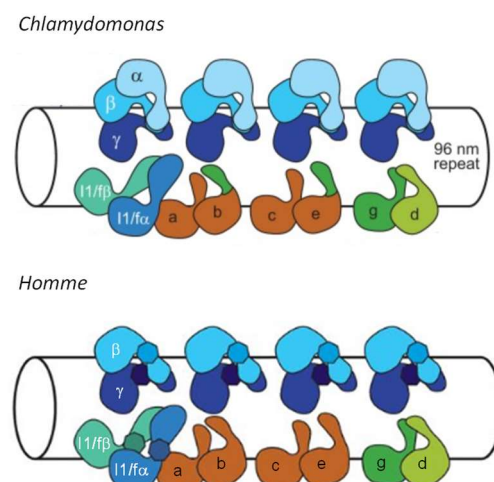


Figure 10. Représentation schématique des 7 sous-types de BDI et leur composition protéique prédite d’après *Chlamydomonas* (modifié d’après Braschi et al., 2022).

Cependant, une version plus précise de la composition des BDI a été proposée suite à des analyses phylogénétiques (Kollmar, 2016). En effet, les sous-types g (associé à la centrine) et d (associé à DNALI1) seraient, dans l’évolution, les deux premiers sous-types monomériques. Puis, les chaînes lourdes des sous-types a, b, c et e seraient issues de duplications du gène codant la chaîne lourde du sous-type d. Chez *Chlamydomonas*, ces duplications auraient été suivies de modifications avec, pour b et e, une partie chimérique en N-terminal provenant du sous-type g fixant la centrine. Ces mécanismes expliquent pourquoi chez *Chlamydomonas*, les sous-types b, e et g sont liés à la centrine, alors que a, c et d sont liés à DNALI1. En revanche, chez l’Homme, les modifications en N-terminal n’auraient pas eu lieu et les sous-types b et e, qui ne sont pas chimériques, fixeraient DNALI1 contrairement à *Chlamydomonas* (**Figure 11**). Ainsi, chez l’Homme, seul le sous-type g fixerait la centrine.

Figure 11. Représentation schématique des bras de dynéines avec les chaînes lourdes des sous-types b et e chimériques (dérivées de celle du sous-type g) chez *Chlamydomonas* et non chimériques chez l’Homme (d’après Kollmar et al., 2016).



Pour toutes ces raisons, il est encore très difficile de connaître exactement la composition complexe des BDI chez l'Homme.

I.3. Mise en place des bras de dynéines

La mise en place des bras de dynéines (DAs) se divise en trois phases : le pré-assemblage des complexes de dynéine dans le cytoplasme, le transport de ces complexes du cytoplasme aux cils, puis leur ancrage sur les microtubules de l'axonème (Desai et al., 2018; Qiu and Roy, 2022).

I.3.1. Pré-assemblage cytoplasmique

I.3.1.1. Les facteurs d'assemblage des dynéines axonémales

Les BDs sont de larges complexes multiprotéiques dont la synthèse de chaque constituant peut être relativement longue (13 minutes par molécule de dynéine) (King, 2021). Une fois les chaînes peptidiques synthétisées, elles sont prises en charge par divers facteurs protéiques appelés DNAAFs, facteurs d'assemblage des dynéines axonémales (DNAAF : *axonemal dynein assembly factors*). Ces protéines chaperonnes/co-chaperonnes assurent dans un premier temps le bon repliement conformationnel des polypeptides (chaînes lourdes, intermédiaires et légères) issus des ribosomes avant d'assembler ces chaînes entre elles.

Sur la base d'études menées chez la souris, le poisson-zèbre et l'algue verte *Chlamydomonas*, une liste de 20 DNAAFs est actuellement connue (**Tableau 1**).

Tableau 1. Facteurs d'assemblage des dynéines axonémales (d'après Braschi et al., 2022). Les deux gènes surlignés (*DNAAF6/PIH1D3* et *TTC12*) font l'objet des résultats de cette thèse.

*gènes impliqués dans les DCP.

Gene	Alias
<i>DNAAF1*</i>	<i>LRRC50</i>
<i>DNAAF2*</i>	<i>KTU</i>
<i>DNAAF3*</i>	<i>C19orf51</i>
<i>DNAAF4*</i>	<i>DYX1C1</i>
<i>DNAAF5*</i>	<i>HEATR2</i>
<i>DNAAF6*</i>	<i>PIH1D3</i>
<i>DNAAF7*</i>	<i>ZMYND10</i>
<i>CFAP300*</i>	<i>C11orf70, DNAAF17</i>
<i>DNAAF8</i>	<i>C16orf71</i>
<i>DNAAF9</i>	<i>C20orf194, (Shulin ?)</i>
<i>DNAAF10</i>	<i>WDR92</i>
<i>LLRC6*</i>	<i>DNAAF11</i>
<i>LRRC56*</i>	<i>DNAAF12</i>
<i>SPAG1*</i>	<i>DNAAF13</i>
<i>PIH1D1</i>	<i>DNAAF14</i>
<i>PIH1D2</i>	<i>DNAAF15</i>
<i>CFAP298*</i>	<i>C21orf59, DNAAF16</i>
<i>CCDC103*</i>	
<i>DAW1</i>	<i>ODA16, WDR69, DNAAF18</i>
<i>TTC12*</i>	

Chez l'Homme ainsi que dans les organismes modèles de DCP, ni les interactions entre les co-chaperonnes ni les sous-types de bras pris en charge par chacune d'elles ne sont précisément caractérisés.

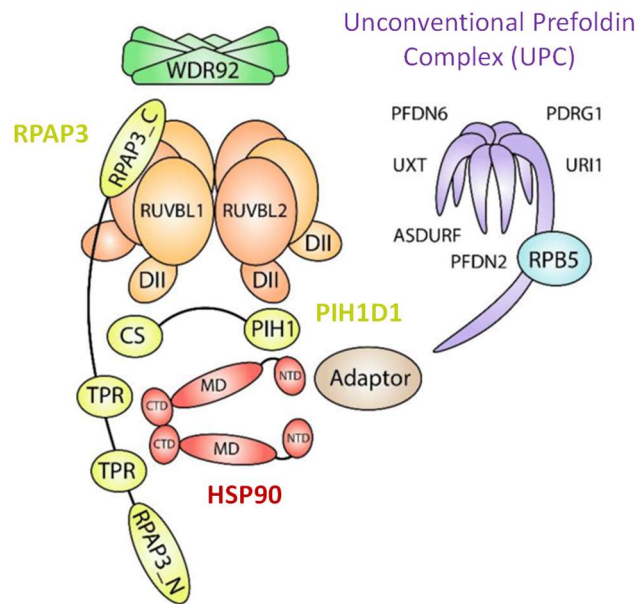
1.3.1.2. HSP90 et les complexes R2TP-like

De nombreuses études (26,27) ont clairement établi un lien entre les DNAAFs et les protéines de la famille HSP (*heat shock protein*), notamment HSP90.

Il existe chez l'Homme un complexe de 4 protéines chaperonnes (RUVBL-1, RUVBL-2, RPAP3 et PIH1D1) appelé le complexe R2TP, correspondant au complexe R2TP décrit initialement chez la levure (Ruvbl-1, Ruvbl-2, Tah1 et Pih1). Chez l'Homme, ce complexe s'associe d'une part avec la sous-unité RPB5 de l'ARN polymérase via le complexe UPC (*unconventional prefoldin complex*), d'autre part avec la protéine WDR92/DNAAF10. Cet ensemble forme un des plus grand complexe de chaperonnes interagissant avec HSP90 : le PAQosome (*particle for arrangement of quaternary structure*).

Le complexe R2TP constitue le composant catalytique du PAQosome. Les protéines RUVBL-1 et RUVBL-2 possèdent des domaines d'hydrolyse de l'ATP (AAA+), tandis que les protéines RPAP3 et PIH1D1 constitueraient des plateformes accueillant HSP90 et les diverses «protéines clientes» (**Figure 12**) (Lynham and Houry, 2022).

Figure 12. Représentation schématique d'un PAQosome associé avec HSP90, et les domaines protéiques impliqués dans les interactions (Lynham & Houry, 2022). Les domaines TPR de RPAP3 interagissent avec HSP90, et avec les domaines CS de PIH1D1. Le domaine C-terminal de RPAP3 se fixe sur RUVBL2. Certaines « protéines clientes » de HSP90 et des complexes R2TP peuvent être recrutés via des adaptateurs. CS : *CHORD domain-containing protein Sgt1 domain*; CTD : *C-terminal domain*; DII : *Domain II*; MD : *middle domain*; NTD : *N-terminal domain*; PIH1 : *Pih1 homology domain*; RPAP3_C : *RPAP3 C-terminal domain*; RPAP3_N : *RPAP3 N-terminal domain*; TPR : *tetratricopeptide domain*.



Ce complexe macromoléculaire d'assemblage et de stabilisation intervient dans de nombreux processus cellulaires dont la réponse aux dommages de l'ADN, la voie de signalisation PIKK (*Phosphatidylinositolkinase-related kinases*), et la transcription de l'ARN (**Figure 13**).

Il intervient également dans le processus d'assemblage des dynéines axonémales au sein duquel la protéine WDR92/DNAAF10 est retrouvée de façon très spécifique d'après plusieurs études (Liu et al., 2019; Patel-King et al., 2019; Patel-King and King, 2016).

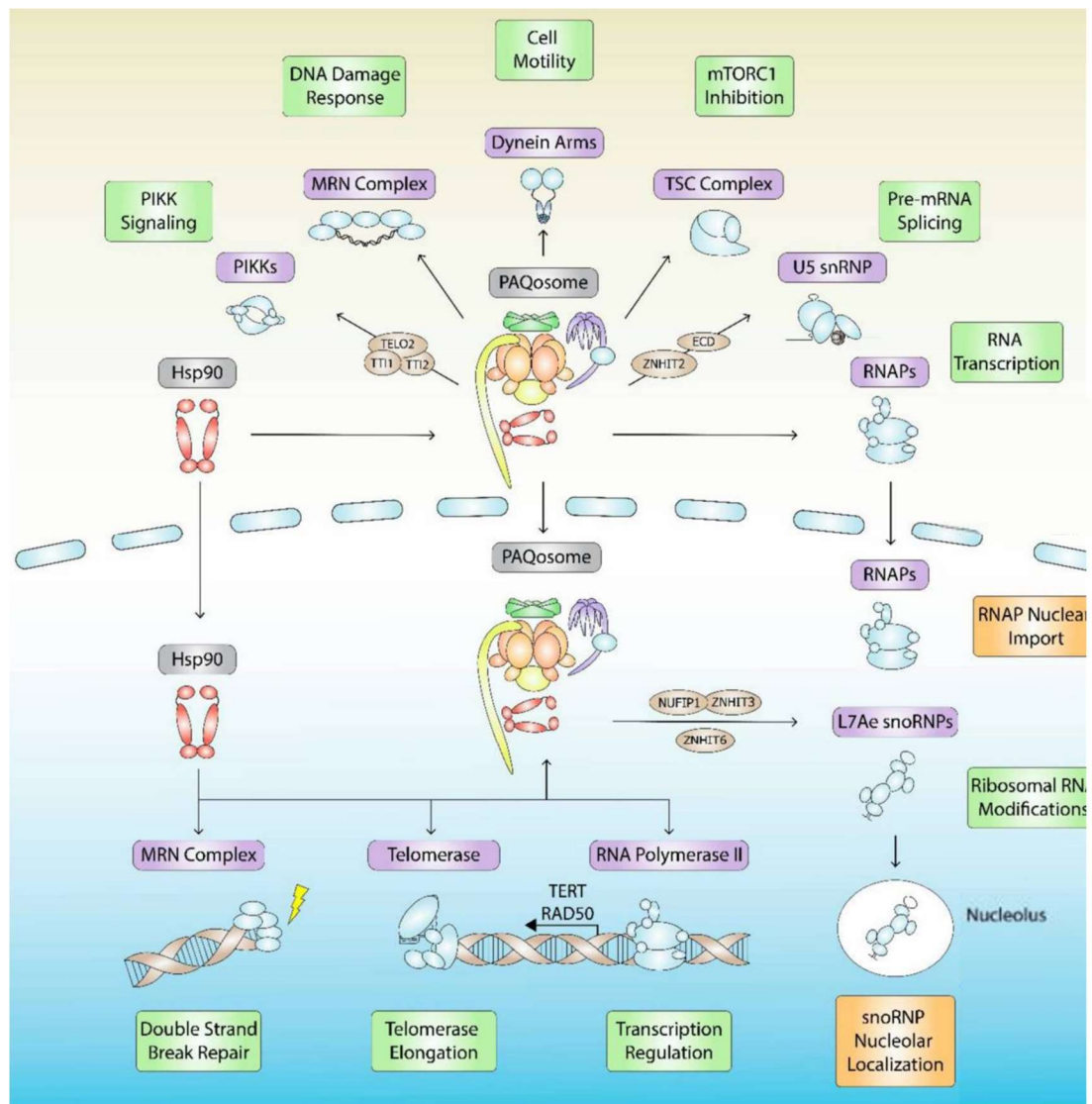


Figure 13. Les différentes voies faisant intervenir le PAQosome et HSP90 (Lynham and Houry, 2022)

Plusieurs DAAAFs possèdent des domaines communs aux protéines du complexe R2TP canonique. En effet, DAAAF2, PIH1D2 et PIH1D3 contiennent des domaines PIH1 (*protein interacting with HSP90*) tout comme la protéine PIH1D1. Comme RPAP3, les protéines SPAG1, TTC12 et DAAAF4 possèdent des domaines TPR (*tetratricopeptide repeat*) d'interaction potentielle avec HSP90 (Kakihara and Houry, 2012). SPAG1 est d'ailleurs le paralogue de RPAP3. Enfin, les protéines DAAAF11/LRRC6 et DAAAF7/ZMYND10 sont des protéines cytoplasmiques étroitement liées à HSP90 mais sans interaction directe avec le complexe R2TP (Lynham and Houry, 2022).

Une combinaison d'études de double hybride chez la levure, de co-immunoprécipitations réalisées dans des cellules HEK293 ou des cellules épithéliales de trachées de souris, a permis de mettre en évidence une interaction directe entre : PIH1D3 et HSP90, DAAAF4 et HSP90, DAAAF4 et HSP70 et DAAAF2 et DAAAF4 (Chen et al., 2009; Paff et al., 2017; Tarkar et al., 2013). Tous ces éléments, ainsi

que les similarités de structure entre ces protéines, suggèrent que DNAAF2 et DNAAF4 pourraient former un complexe semblable au R2TP (*R2TP-like complexe*) impliqué dans l'assemblage des BDs médié par HSP90 (**Figure 14**). Deux complexes R2TP-like ont d'ailleurs déjà été identifiés : R2SP et R2SD formés respectivement de [RUVBL-1, RUVBL-2, SPAG1 et PIH1D2] et [RUVBL-1, RUVBL-2, SPAG1 et DNAAF2](Maurizy et al., 2018; Yamaguchi et al., 2018).

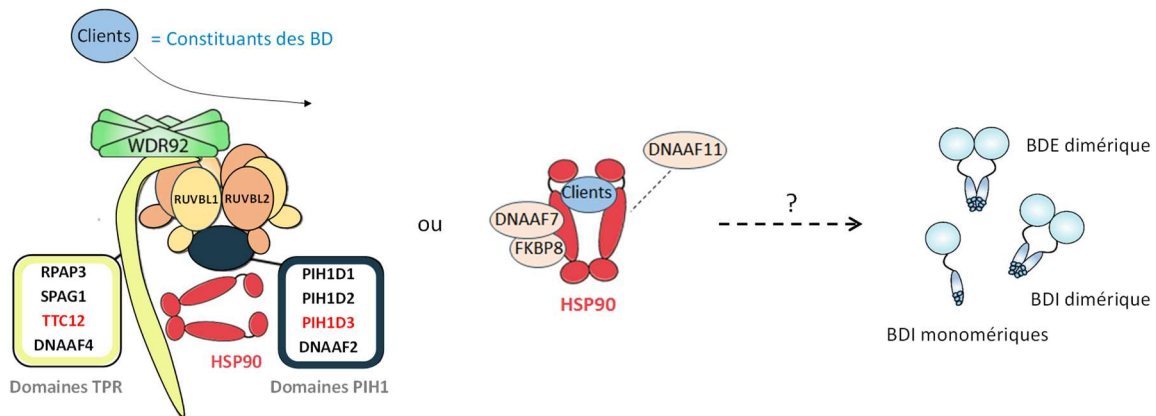


Figure 14. Assemblage des BDs via HSP90 et les complexes R2TP/R2TP-like. Lors de l'assemblage cytoplasmique, certains constituants de bras de dynéine (clients) seraient d'abord repliés via HSP90, DNAAF7 et FKBP8 qui agiraient comme des co-chaperones. DNAAF11 pourrait avoir un rôle dans la libération et le passage des clients du complexe HSP90-DNAAF7-FKBP8 vers les complexes R2TP-like. Certains clients ne nécessiteraient pas de repliement préalable via HSP90, ils interagiraient directement avec les complexes R2TP-like (modifié de Lynham and Houry, 2022)

1.3.1.3. Les DynAPs

Ces 10 dernières années, diverses études (Horani et al., 2012a, 2013; Kott et al., 2012; Serluca et al., 2009) ont mis en évidence que les protéines d'assemblage DNAAF5 et DNAAF11 étaient détectables au sein de structures ponctiformes dans tout le cytoplasme des cellules multiciliées de l'épithélium respiratoire humain, avec une distribution pouvant être plus intense au niveau des corpuscules basaux ou au niveau périnucléaire. L'observation par immunofluorescence de ces *foci*, a démontré qu'ils ne colocalisaient pas avec les endosomes, les lysosomes ou les corpuscules basaux (Horani et al., 2012b). Ces *foci* semblent contenir également SPAG1, DNAAF2, ainsi que des sous-unités de dynéine, telles que DNAI1 (Horani et al., 2018).

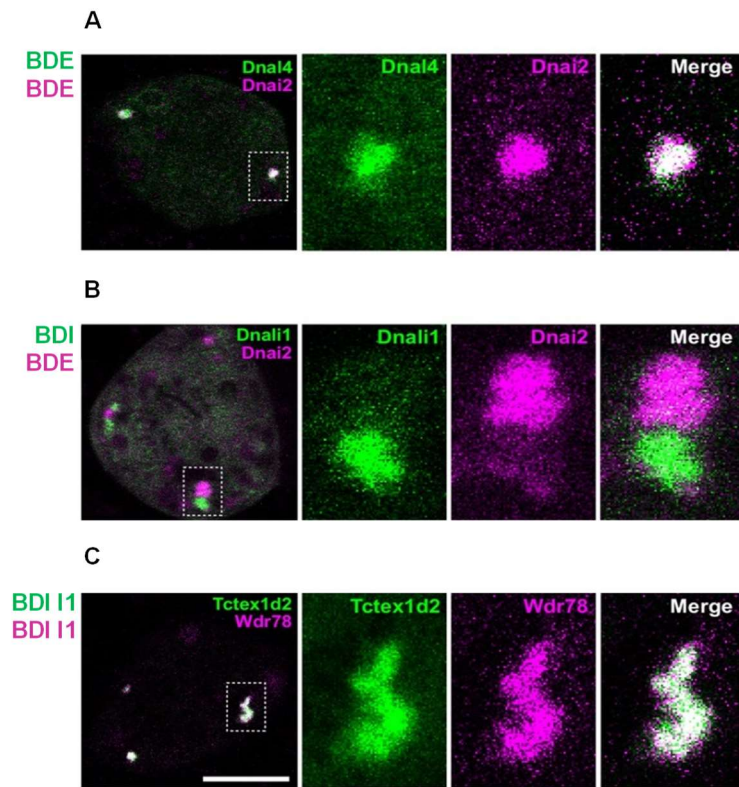
Ces structures ponctiformes ont été étudiées plus en détail chez les embryons de xénope où la concentration et la colocalisation de DNAAFs, de chaperonnes et de sous-unités de dynéines ont été confirmées par immunofluorescence (Huizar et al., 2018). Des études biochimiques basées sur le phénomène de séparation de deux phases liquide-liquide selon leur composition (Lee, 2020) ont mis en évidence que ces structures possédaient des caractéristiques spécifiques à des organelles sans

membrane (*liquid-like organelles*) qui ont été dénommées « particules de dynéines axonémales » (DynAPs, *dynein axonemal particles*) (Huizar et al., 2018).

Ces DynAPs semblent être elles-mêmes compartimentées en différentes zones fonctionnelles dans lesquelles les diverses sous-unités des BDE et BDI se concentrent de façon différentielle (**Figure 15**) (Lee et al., 2020).

Figure 15. Mise en évidence par immunofluorescence de compartiments spécifiques des BDE ou des BDI dans les DynAPs (Lee et al., 2020)

Analyse par microscopie confocale de marquages par immunofluorescence de cellules multiciliées d'embryon de xénope co-exprimant des composants des BDE et/ou des BDI tagués mcherry (violet) ou GFP (vert). En A et C, on observe respectivement, une colocalisation totale de deux composants de BDE (Dnai2 et Dnal4) et de deux composants des BDI (Wdr78 et Tctex1d2=DYNLT2B). En B, on observe l'absence de colocalisation entre un composant des BDE (Dnai2) et un composant des BDI (Dnal11).



Visualisées chez l'Homme, la souris, le xénope et le poisson-zèbre, les DynAPs semblent être un élément conservé au sein des cellules multiciliées (Diggle et al., 2014; Horani et al., 2018; Huizar et al., 2018; Li et al., 2017; Mali et al., 2017). Cependant leur fonction précise n'a pas encore été élucidée. Il est intéressant de noter que toutes les DNAAFs et chaperonnes étudiées jusqu'à présent ont été mises en évidence à la fois de façon diffuse dans tout le cytoplasme, mais aussi enrichies dans les DynAPs. Ainsi l'assemblage des BDs pourrait ne pas être restreint à ces DynAPs et avoir lieu dans le cytoplasme en dehors de ces structures. Cela amène à imaginer que les DynAPs pourraient intervenir dans le stockage des dynéines pour un assemblage rapide ou pour un contrôle qualité des dynéines mal-repliées (Lee et al., 2020).

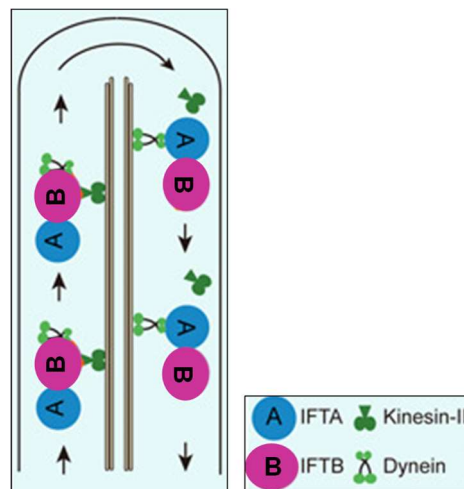
I.3.2. Transport jusqu'au cil

Une fois les complexes de dynéines axonémales assemblés dans le cytoplasme, ils doivent être transportés jusqu'à l'intérieur du cil pour leur mise en place au sein de l'axonème.

I.3.2.1. Le transport intraflagellaire

La formation des cils, primaires et mobiles, ainsi que des flagelles nécessite le transport sélectif de protéines produites au niveau cytoplasmiques jusqu'au sommet du cil. Le cheminement de ces protéines produites et assemblées dans le cytoplasme jusqu'à la base du cil est très peu connu. Une fois localisées à la base du cil, les protéines axonémales d'intérêt sont acheminées le long des microtubules par un transport actif appelé transport intraflagellaire (IFT : *intra-flagellar transport*) décrit pour la première fois en 1993 chez *Chlamydomonas* (Kozminski et al., 1993). Ce transport bidirectionnel le long des doublets périphériques de l'axonème concerne des complexes multiprotéiques dénommés « trains » (Kozminski et al., 1995) qui cheminent sur les microtubules B. Les moteurs de l'IFT correspondent à deux protéines : la kinesine-2 hétérotrimérique (transport antérograde) et la dynéine 2/1b (transport rétrograde), qui s'associent à deux complexes multiprotéiques, IFT-B et IFT-A respectivement (Zhu et al., 2021) (**Figure 16**).

Figure 16. Le transport intraflagellaire
(modifié de Zhu et al., 2021).



Les molécules transportées, appelées « cargos », sont chargées au niveau du corpuscule basal, et majoritairement libérées à l'extrémité du cil. Les complexes d'IFT se réorganisent alors et les moteurs sont recyclés pour mettre en place le transport rétrograde (Rosenbaum and Witman, 2002).

Il existe une grande similarité entre la machinerie de l'IFT et celle du transport de vésicules le long des microtubules cytoplasmiques.

1.3.2.2. Transport des dynéines axonémales

La majorité des connaissances sur le transport des dynéines axonémales dans le cil se base sur des études réalisées chez l'algue verte *Chlamydomonas* ou d'autres organismes unicellulaires plus simple à étudier (cf I.5. Modèles d'étude des DCP).

Plusieurs études chez ces modèles ont démontré que les dynéines axonémales étaient prises en charge par l'IFT avant leur ancrage sur les microtubules A des doublets périphériques (Hou et al., 2007; Piperno et al., 1996; Viswanadha et al., 2014). Bien que les mécanismes précis et les protéines mises en jeu dans ce processus restent mal connus, quelques protéines ont été proposées comme ayant un rôle dans ce transport des bras de dynéines dans le cil (**Tableau 2**). Cependant, aucune étude n'a permis de confirmer la fonction d'une de ces protéines chez l'Homme.

<i>Chlamydomonas</i>			Homme		
Nom	Caractéristiques	Références	Nom	Caractéristiques	Références
ODA8	<ul style="list-style-type: none"> • Colocalisation avec les complexes IFT pendant la construction de l'axonème • Mutants <i>oda8</i> = absence des BDE 	(Desai et al., 2015)	LRRC56	<ul style="list-style-type: none"> • CoIP avec IFT88 dans HEK293 • Impliqué en DCP avec absence distale de BDE 	(Bonney et al., 2018)
ODA16	<ul style="list-style-type: none"> • Interaction avec IFT46 • Mutants <i>oda16</i> : absence de BDE • Partie N-term de ODA16 : fixation des BDE 	(Ahmed et al., 2008; Hou and Witman, 2017; Taschner et al., 2017)	WDR69/DAW1	<ul style="list-style-type: none"> • Pas d'interaction directe avec IFT46 • Cristallisation de WDR69/DAW1 : repliement très différent par rapport au N-term de ODA16 	(Wang et al., 2020)
IDA3	<ul style="list-style-type: none"> • Adaptateur IFT - IDA-I1 pour le transport antérograde dans les flagelles en croissance 	(Hunter et al., 2018)	?		

Tableau 2. Protéines potentiellement impliquées dans le transport des dynéines axonémales dans l'axonème.

Chez *Chlamydomonas*, la protéine ODA8 est retrouvée dans la même fraction cellulaire que les protéines de l'IFT et son altération conduit à une absence des BDE sur l'axonème. Son orthologue humain, LRRC56, dont le défaut est responsable de DCP, interagit avec IFT88 dans des cellules HEK293 sur-exprimant ces deux protéines. Toutefois cette interaction n'a pas été confirmée sur les protéines endogènes dans des cellules respiratoires.

La protéine ODA16, la plus étudiée jusqu'à présent, interagit chez *Chlamydomonas* avec IFT46 et transporte les BDE via son domaine N-terminal. Cependant, cette interaction n'a pas été validée pour WDR69/DAW1, son orthologue humain. De plus la cristallisation de la protéine DAW1 a mis en

évidence un repliement totalement différent de la partie N-terminal par rapport à ODA16, ce qui pourrait suggérer l'existence d'un mécanisme de transport différent chez l'Homme nécessitant l'intervention d'autres facteurs (Qiu and Roy, 2022).

La protéine IDA3 a été décrite chez *Chlamydomonas* comme un adaptateur pour le transport antérograde sur l'IFT de la sous-unité dimérique I1 des BDI. En revanche, aucun orthologue humain n'a été à ce jour associé à cette protéine, suggérant de nouveau des mécanismes distincts chez l'Homme.

Les recherches progressent sur la compréhension du transport des BDs dans les cils. Cependant, un défaut d'une protéine impliquée dans le transport des dynéines au sein des cils conduirait probablement à l'absence des deux bras de dynéine dans l'axonème, même phénotype ciliaire qu'un défaut de protéine d'assemblage. Ceci rend difficile la détermination de la fonction précise de chaque acteur protéique.

Les protéines FBB5 et FBB18, semblant initialement impliquées dans le transport des BDs, joueraient finalement un rôle dans l'assemblage cytoplasmique des BDs. En effet, des analyses biochimiques chez *Chlamydomonas* avaient mis en évidence FBB18 et les protéines de l'IFT dans la même fraction cellulaire (Austin-Tse et al., 2013), mais récemment le rôle de FBB18 dans le complexe de préassemblage R2TP a été décrit chez *Chlamydomonas* (Wang et al., 2022). De façon intéressante, l'orthologue humain de FBB18 (Kurly/C21orf59/CFAP298) est impliqué dans les DCP avec absence des deux BDs. C'est également le cas de C11orf70/CFAP300 (orthologue de FBB5) impliqué chez des patients avec absence des deux BDs. Des études chez *Chlamydomonas* et la Paramécie avaient démontré la présence de FBB5 à la pointe du flagelle en élongation, de façon similaire à IFT46, suggérant un rôle de cette protéine dans l'IFT (Fassad et al., 2018b). Cependant, une interaction entre FBB5 et DNAAF2 a également été décrite, suggérant que FBB5 puisse participer à l'assemblage cytoplasmique (Höben et al., 2018).

De nombreuses recherches restent donc à mener pour approfondir nos connaissances sur le processus de transport des dynéines dans le cil mobile chez l'Homme. Jusqu'à présent, les anomalies de composants connus de l'IFT chez l'Homme conduisent toujours à une atteinte isolée du cil primaire (exemple : Bardet-Biedl syndrome, Joubert syndrome, néphronophtise).

I.3.3. Ancrage à l'axonème

Après avoir été transportés dans le cil, les bras de dynéines sont ancrés de façon stable sur les microtubules.

1.3.3.1. Ancrage des BDE

1.3.3.1.1. Complexe d'ancrage

Même s'il n'est pas totalement résolu, le système d'ancrage des BDE est bien décrit. Chez *Chlamydomonas*, le complexe d'ancrage des BDE est un trimère composé de DC1, DC2 et DC3. Des analyses de cryo-ME haute résolution ont démontré que cet hétérotrimère constituait l'unique point d'attachement des BDE aux microtubules (Walton et al., 2021).

Une étude récente a mis en évidence que le complexe d'ancrage des BDE chez les vertébrés était quant à lui pentamérique, composé de différents ODADs (*outer dynein arms docking complex*) : ODAD1 (CCDC114), ODAD2 (ARMC4), ODAD3 (CCDC151), ODAD4 (TTC25) et ODAD5 (EFCAB1/Calaxin) (Gui et al., 2021a). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les BDE de *Chlamydomonas* sont constitués de trois chaînes lourdes contrairement aux mammifères qui en possèdent deux (**Figure 17**).

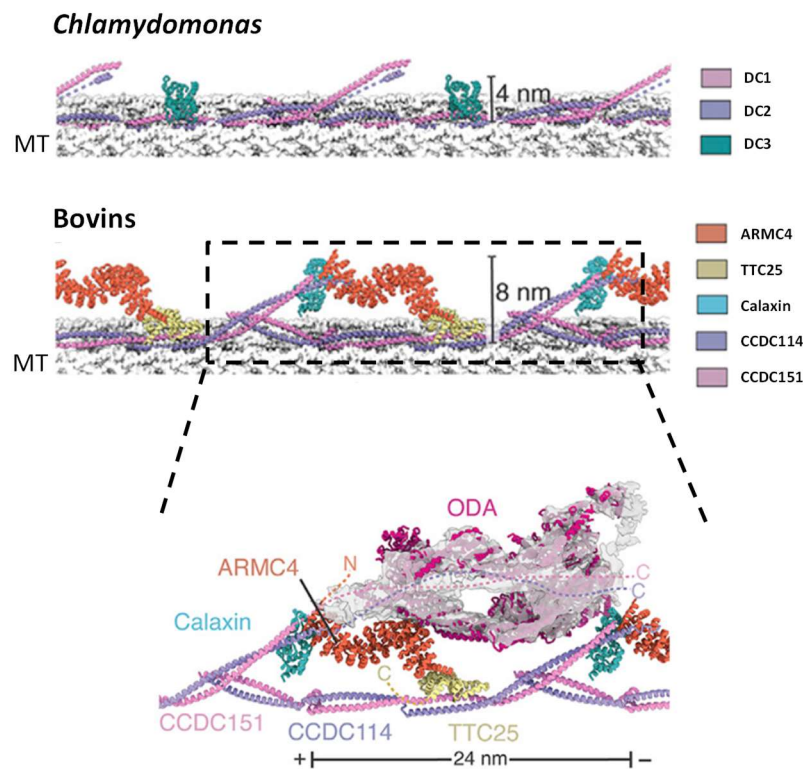


Figure 17. Modèle atomique du complexe d'ancrage des BDE : trimérique chez *Chlamydomonas* et pentamérique chez les mammifères (modifié de Gui et al., 2021).

L'organisation structurale de ODAD3/CCDC151 et ODAD1/CCDC114 se rapproche fortement des complexes DC1 et DC2 de par leurs superhélices analogues (*coiled-coil protein*), tandis que ODAD5/EFCAB1/Calaxin aurait un rôle régulateur dépendant du calcium similaire à DC3. Enfin, les domaines TTC (tétratrico peptide) des protéines TTC25 et ARMC4 permettraient de former un pont

avec ODAD1 et ODAD3 (Gui et al., 2021a). Les mutations des gènes *ODAD1* à *ODAD5* ont été associées à des DCP avec absence des BDE.

I.3.3.1.2. MIPs, protéines internes aux microtubules

Les MIPs (*microtubule inner proteins*) sont des protéines qui tapissent la face interne des doublets de MT formant un maillage le long de la lumière. Chez *Chlamydomonas*, 33 MIPs ont été identifiées à ce jour, et diverses fonctions leur sont attribuées : l'établissement de la structure unique des MT en doublets, le maintien d'une périodicité cohérente le long de l'axonème et la stabilisation des doublets de MT axonémaux face aux pressions mécaniques (Ma et al., 2019; Owa et al., 2019). Par ailleurs, des études récentes suggèrent que certaines MIPs facilitent le processus d'ancrage des BDE aux microtubules.

En effet, que ce soit chez *Chlamydomonas* ou chez les mammifères, les MIPs sont positionnées selon un motif répété tous les 48nm, périodicité cohérente avec les 24nm des DC du côté externe des MT. De plus, deux MIPs, Pierce 1 et Pierce 2, ont récemment été identifiées comme étant le lien, formant un pont, entre les périodicités de 48nm interne et de 24nm externe (Gui et al., 2021a) (**Figure 18**).

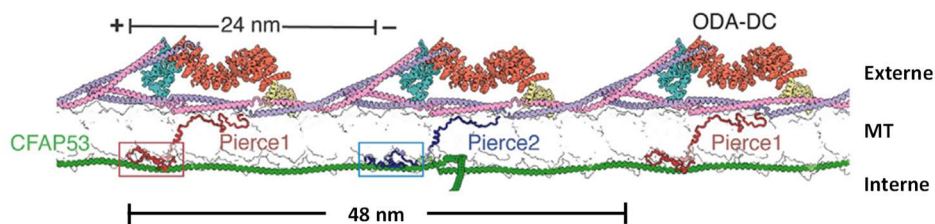


Figure 18. Lien entre les périodicités externes et internes des MT via Pierce1 et Pierce2 (modifié de Gui et al., 2021), ODA-DC : complexe d'ancrage pentamérique des BDE.

D'autres MIPs localisées le long de l'axonème ciliaire pourraient faciliter l'ancrage des BDE à l'axonème. En effet, la protéine MNS1, dont l'absence cause un défaut d'ancrage des BDE, s'associerait avec le complexe d'ancrage via CCDC114 (Ta-Shma et al., 2018). C'est aussi le cas de la protéine CFAP53/CCDC11, récemment identifiée comme MIP (Gui et al., 2021a; Ma et al., 2019), pour laquelle une interaction avec TTC25 a été démontrée dans des cellules HEK293T cotransfectées (Ide et al., 2020) et dont l'absence cause un défaut d'ancrage des BDE chez le poisson-zèbre et la souris (Ide et al., 2020; Narasimhan et al., 2015). Les mutations dans plusieurs gènes de MIPs ont été associées à des défauts de latéralisation isolés (*CFAP45*, *CFAP52*, *CFAP53*, *ENKUR*, *MNS1*).

I.3.3.1.3. CCDC103

La protéine CCDC103 a été décrite comme un facteur supplémentaire absolument nécessaire au processus d'ancrage des BDE aux MT chez *Chlamydomonas*, le poisson-zèbre et l'Homme (King and

Patel-King, 2015; Panizzi et al., 2012). Elle est fixée aux MT tous les 12nm, ce qui pourrait suggérer la présence de deux unités de CCDC103 par BDE. Elle ferait partie intégrante des doublets de MT ; toutefois sa localisation exacte n'a pas pu être déterminée par cryo-ME. De nouvelles études seront nécessaires pour comprendre comment elle s'incorpore dans l'axonème et connaître son rôle précis.

I.3.3.2. Ancrage des BDI

I.3.3.2.1. WDR65/FAP57

Les mécanismes d'ancrage des BDI sont très peu connus. Chez *Chlamydomonas*, un défaut d'*IDA8* codant pour la protéine FAP57 (WDR65 chez l'Homme) mène à un défaut d'assemblage des bras internes (Lin et al., 2019). FAP57 est localisé le long de l'axonème de façon asymétrique. En effet, cette protéine est majoritairement présente sur les doublets de microtubules 1, 5, 6, 7, 8 et 9 (**Figure 19A**). Diverses analyses chez *Chlamydomonas* ont mis en évidence une étroite relation entre FAP57 et le bras interne dimérique I1, le complexe MIA (*modifier of inner arms*), le N-DRC et les sous-unités g et d. WDR65 pourrait donc permettre de stabiliser l'ancrage de certaines de ces protéines à l'axonème (**Figure 19B**) (Lin et al., 2019).

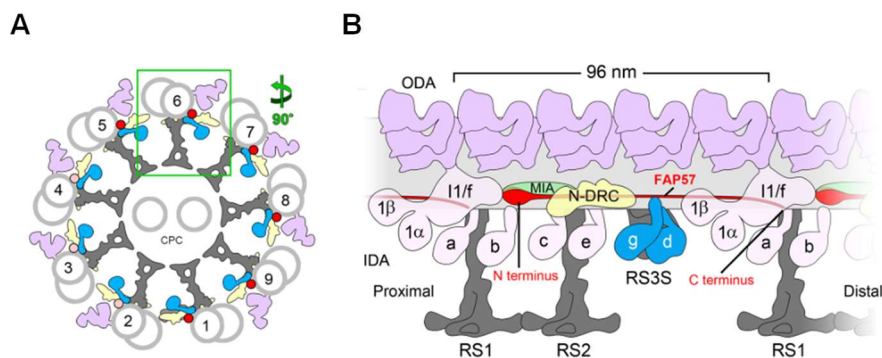


Figure 19. Localisation de FAP57 chez *Chlamydomonas*. A) Les points rouges indiquent la position préférentielle de FAP57 sur 6 des 9 doublets de MT. B) FAP57 (en rouge) sur une coupe transversale d'axonème et ses contacts avec I1, N-DRC, MIA et les sous-unités g et d. (Lin et al., 2019).

I.3.3.2.2. CCDC39/40 et CCDC103

Les protéines CCDC39 et CCDC40 sont désormais bien connues pour être les « règles moléculaires » (*molecular ruler*) définissant l'espacement des unités axonémales le long de la face externe des MT. En effet, elles sont localisées tous les 96nm et leur absence conduit à une absence des BDI et une désorganisation axonémales (Oda et al., 2014) (**Figure 20**). Les protéines CCDC39 et CCDC40 serviraient de point d'ancrage des BDI et des N-DRC. Des études basées sur l'analyse de l'axonème par cryo-ME de mutants de *Chlamydomonas* pour *FAP59* ou *FAP172*, orthologues de *CCDC39* et *CCDC40*

respectivement, montrent que l'absence de ces protéines altère l'espacement de 96nm. Ces études démontrent également que l'allongement de ces protéines par duplication de domaines étend l'unité axonémale de façon proportionnelle au nombre d'acides aminés dupliqués chez les mutants (Oda et al., 2014). Par ailleurs, il a récemment été montré par cryo-ME chez *Chlamydomonas* que les protéines FAP253 et FAP91 étaient nécessaires pour l'ancrage à l'axonème du RS1 et du RS2 respectivement (Grossman-Haham, 2023; Gui et al., 2021b).

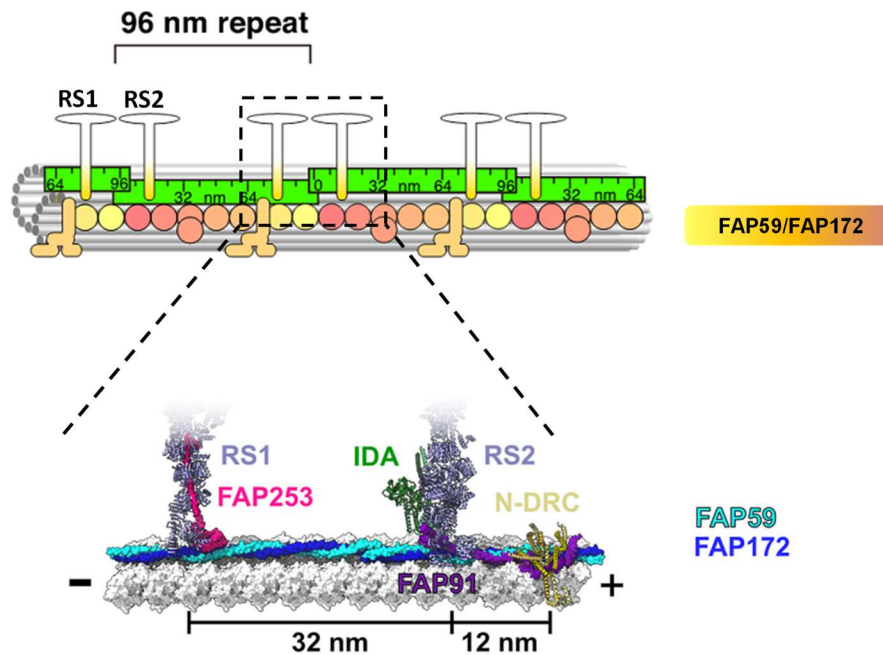


Figure 20. CCDC39 et CCDC40, les règles moléculaires définissant l'unité axonémale chez *Chlamydomonas* (Grossman-Haham, 2023; Oda et al., 2014). Contrairement à l'Homme, *Chlamydomonas* possède deux ponts radiaires (RS) et non trois. FAP59 et FAP172 chez *Chlamydomonas*, orthologues de CCDC39 et CCDC40 chez l'Homme, forment une règle moléculaire où se fixent les ponts radiaires 1 et 2 via le recrutement de FAP253 and FAP91. FAP91 interagit également avec le N-DRC.

Par ailleurs, la protéine CCDC103, dont l'absence conduit à un défaut d'ancrage des BDE (cf I.3.3.1.3. CCDC103) mène également à une anomalie d'ancrage des BDI. Le rôle précis de cette protéine reste à élucider.

I.4. Les dyskinésies ciliaires primitives

I.4.1. Manifestations cliniques

Les dyskinésies ciliaires primitives (DCP) sont des maladies génétiques, de transmission essentiellement récessive, liées à un défaut des cils mobiles se manifestant par des infections respiratoires chroniques (défaut d'épuration mucociliaire dû à l'atteinte des cils mobiles de l'épithélium respiratoire) associées à une infertilité masculine (immobilité des spermatozoïdes et/ou des cils de canaux efférents) ou féminine (dyskinésie des cils tubaires), très rarement une hydrocéphalie (probable dyskinésie des cils épendymaires) et chez environ la moitié des patients, un défaut de latéralisation (défaut de mobilité du cil nodal) pouvant conduire à un *situs inversus* définissant le syndrome de Kartagener (Kartagener and Horlacher, 1935).

Les symptômes respiratoires se caractérisent par des infections chroniques des voies aériennes supérieures (rhinosinusites) et inférieures (broncho-pneumopathies) qui évoluent fréquemment vers une polypose naso-sinusienne et une dilatation des bronches respectivement. Les symptômes respiratoires peuvent apparaître dès la naissance (détresse respiratoire néonatale inexplicée) ou dans la petite enfance. Certaines formes moins typiques (symptomatologie respiratoire plus discrète, sans *situs inversus*) ne sont parfois diagnostiquées qu'à l'âge adulte.

I.4.2. Diagnostic

Face à une suspicion clinique de DCP, le diagnostic est affirmé par l'analyse, sur prélèvement nasal ou bronchique, d'anomalies de la structure ciliaire (observation de l'axonème en microscopie électronique) et/ou du battement ciliaire (vidéomicroscopie à haute vitesse). Des marquages par immunofluorescence de composants ciliaires des cellules épithéliales peuvent également aider au diagnostic de DCP. Dans de nombreux cas, et lorsque l'âge le permet, les patients atteints de DCP ont également un débit nasal de monoxyde d'azote (NO) abaissé ou effondré, ce qui permet d'orienter vers une DCP. Les résultats des explorations ciliaires permettent également de guider les études moléculaires qui sont ensuite réalisées dans le but d'identifier le gène impliqué dans la maladie. Un exemple du parcours diagnostique des patients suspectés de DCP est donné dans la **Figure 21**.

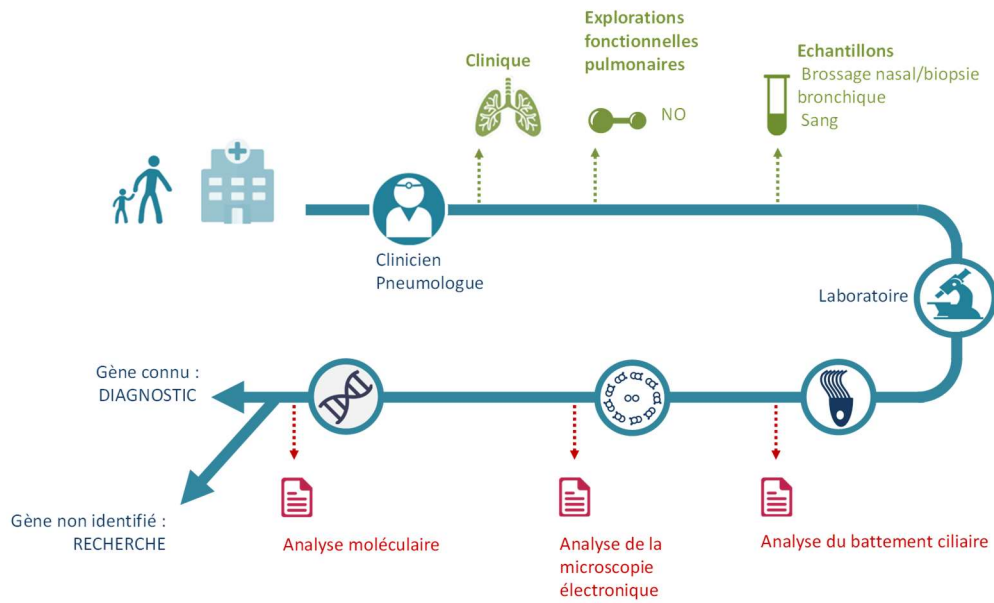
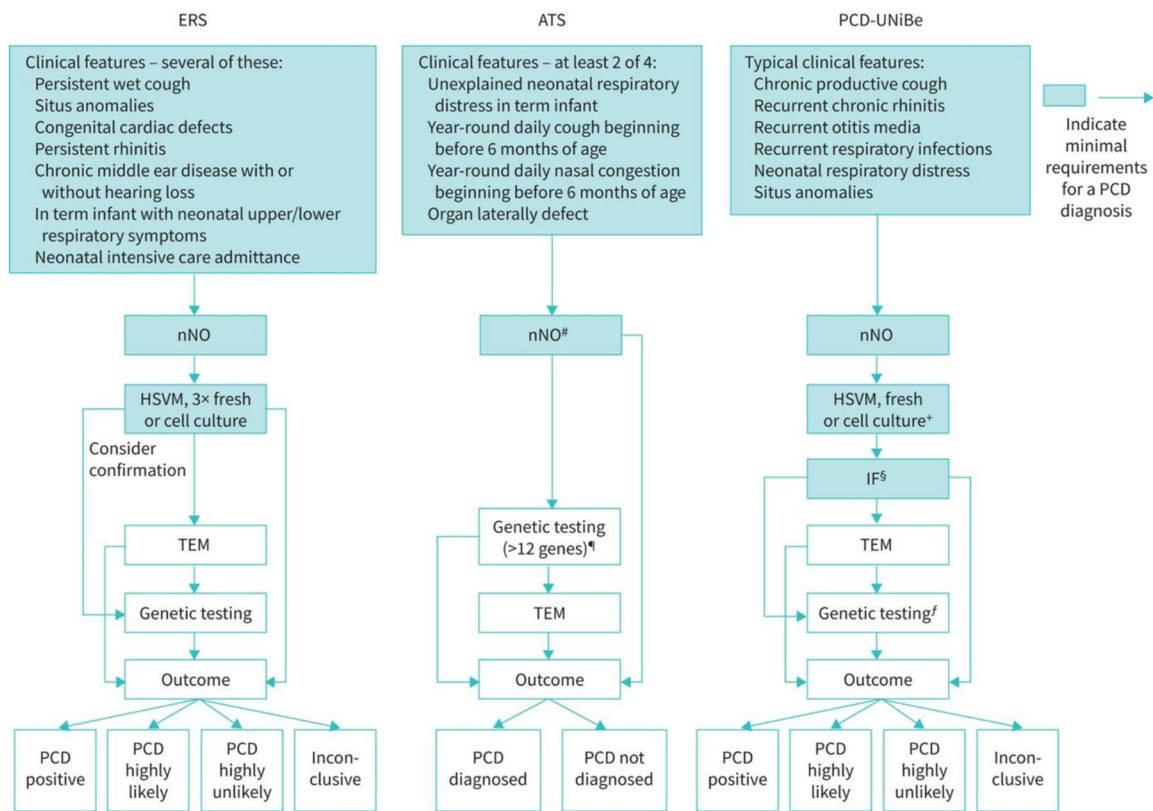


Figure 21. Parcours diagnostique habituellement suivi par les patients suspectés de DCP en France dans les Centres de Référence/Compétence des Maladies Respiratoires Rares dédiés aux DCP (<https://respifil.fr/wp-content/uploads/2020/02/pnds-argumentaire-dyskinesies-ciliaires-primitives.pdf>).

Selon les pays, différents types de recommandations prenant en compte les résultats de ces explorations ont été établis afin d'aider au diagnostic (Lucas et al., 2017; Nussbaumer et al., 2021; Shoemark et al., 2019) (**Figure 22**).



[#] nNO réalisé uniquement si équipement disponible et si le patient a plus de 5 ans.

^{*} Analyse de plus de 12 gènes associés au DCP

⁺ Culture de cellules épithéliales nasales ou bronchiques en ALI (interface air-liquide)

⁵ Investigations supplémentaires (HSV, IF et TEM)

Figure 22. Algorithmes pour le diagnostic des DCP selon les recommandations européennes (gauche), américaines (milieu) et belges (droite). (d'après Nussbaumer et al., 2021)

Les encadrés bleus correspondent au minimum requis pour le diagnostic. ERS : *European Respiratory Society*; ATS : *American Thoracic Society*, PCD-UNiBe : *comprehensive diagnostic centre at the University Children's Hospital of Bern*; nNO : nasal nitric oxide; HSV : *high-speed videomicroscopy*; IF : *immunofluorescence staining*; TEM : *transmission electron microscopy*.

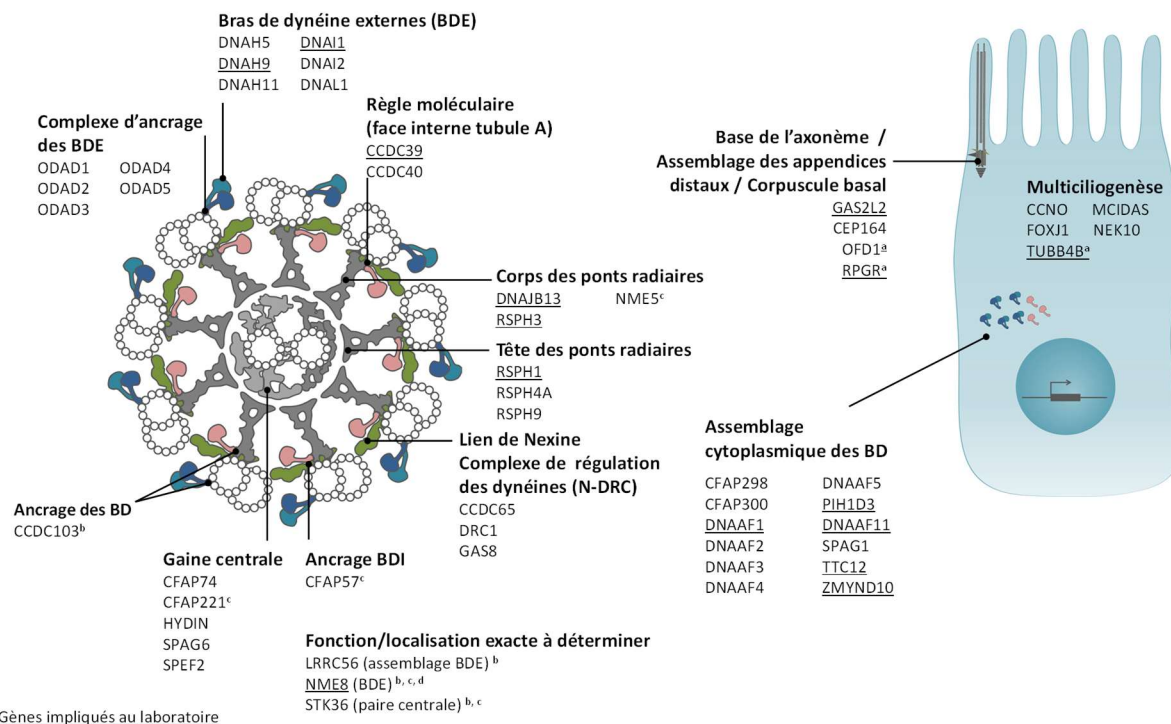
En raison de la grande hétérogénéité génétique de la maladie (plus de 50 gènes) et de la taille considérable de certains gènes impliqués dans les DCP (*DNAH5, DNAH9, DNAH11, HYDIN..*), le diagnostic moléculaire, qui a pour but d'identifier le gène impliqué dans la pathologie, repose maintenant sur des techniques de séquençage à haut débit telles que l'étude de panel de gènes en NGS (*next generations sequencing*), l'analyse d'exome (*WES : whole exome sequencing*) ou beaucoup plus rarement du génome entier (*WGS : whole genome sequencing*).

Le taux de diagnostic moléculaire des DCP atteint 80% chez des patients ayant été bien sélectionnés sur leur phénotype clinique et les résultats des explorations ciliaires.

Lorsqu'aucun gène connu de DCP n'est identifié chez un patient dont le diagnostic de DCP est confirmé ou hautement probable, les explorations génétiques sont poursuivies dans le cadre de la recherche afin de tenter de caractériser une nouvelle étiologie.

I.4.3. Gènes responsables de DCP

Les DCP sont très hétérogènes sur le plan génétique. Environ 50 gènes sont actuellement impliqués dans cette pathologie, ce qui reflète la complexité du fonctionnement des cils et des flagelles. Les gènes responsables de DCP codent des protéines de structure axonémale, des protéines d'assemblage et/ou de transport des constituants de l'axonème, ou encore des facteurs impliqués dans la ciliogenèse des cils mobiles (**Figure 23**).



^a Forme syndromique de DCP (*RPGR* impliqué dans la rétinite pigmentaire et/ou DCP ; mutations dans les exons 20 et 21 de *OFD1* impliquées dans des DCP typiques et autres mutations impliqués dans des ciliopathies syndromiques, *TUBB4B* impliqué dans atteintes neurosensorielles, des néphronophyses et/ou DCP)

^b Fonctions proposées

^c Résultats basées sur une seule famille

^d Non surexprimé pendant la ciliogenèse.

Figure 23. Localisation et fonction des protéines codées par les gènes impliqués dans les DCP chez l'Homme (modifié de Legendre et al., 2021). Les gènes identifiés par notre laboratoire sont soulignés.

En fonction de la nature et de la fonction de la protéine altérée, les mutations dans les différents gènes de DCP n'ont pas les mêmes conséquences sur le cil. Certaines mutations se traduisent par une absence des BDE et/ou BDI, ou des anomalies du CC, ou une désorganisation axonémale. Cependant,

certaines DCP se caractérisent par une ultrastructure de l'axonème qui paraît normale parfois associée à une raréfaction des cils. Cet impact des mutations des gènes sur l'ultrastructure de l'axonème est visualisé en microscopie électronique (ME) et permet de classer les gènes en différentes catégories phénotypiques (**Tableau 3**). La cohérence entre le type d'anomalie d'ultrastructure présenté par le patient et le gène impliqué doit être vérifiée, notamment si une ou les deux variations alléliques mises en évidence sont de signification incertaine.

Gene symbol (previous name)	Chr	Inheritance mode	Original identification
Absence/truncation of outer dynein arms			
<i>ODAD1 (CCDC114)</i>	10	AR	Onoufriadis et al, 2013 ; Knowles et al, 2013
<i>ODAD2 (ARMC4)</i>	19	AR	Hjeij et al, 2013
<i>ODAD3 (CCDC151)</i>	19	AR	Alsaadi et al, 2014 ; Hjeij et al, 2014
<i>ODAD4 (TTC25)</i>	17	AR	Wallmeier et al, 2016
<i>ODAD5 (EFCAB1/CLXN)</i>	8	AR	Hjeij et al, 2023
<i>DNAH5</i>	5	AR	Olbrich et al, 2002
<i>DNAH9</i>	17	AR	Fassad et al, 2018 ; Loges et al, 2018
<i>DNAH11^a</i>	7	AR	Bartoloni et al, 2002
<i>DNAI1</i>	9	AR	Pennarun et al, 1999
<i>DNAI2</i>	17	AR	Loges et al, 2008
<i>DNAL1</i>	14	AR	Horváth et al, 2005
<i>NME8 (TXNDC3)</i>	7	AR	Duriez et al, 2007
Absence of outer and inner dynein arms			
<i>CCDC103</i>	17	AR	Panizzi et al, 2016
<i>CFAP298 (C21orf59)</i>	21	AR	Austin-Tse et al, 2013
<i>CFAP300 (C11orf70)</i>	11	AR	Fassad et al, 2018 ; Höben et al, 2018
<i>DNAAF1 (LRRC50)</i>	16	AR	Duquesnoy et a, 2009 ; Loges et al, 2009
<i>DNAAF2 (KTU)</i>	14	AR	Omran et al, 2008
<i>DNAAF3</i>	19	AR	Mitchison et al, 2012
<i>DNAAF4 (DYX1C1)</i>	15	AR	Tarkar et al, 2013
<i>DNAAF5 (HEATR2)</i>	7	AR	Horani et al, 2012
<i>DNAAF6 (PIH1D3)</i>	X	XLR	Olcese et al, 2017 ; Paff et al, 2017
<i>LRRC6</i>	8	AR	Kott et al, 2012
<i>RPGR</i>	X	XLR	Moore et al, 2006
<i>SPAG1</i>	8	AR	Knowles et al, 2013
<i>ZMYND10</i>	3	AR	Moore et al, 2013 ; Zariwala et al, 2013
Axonemal disorganization and absence of inner dynein arms			
<i>CCDC39</i>	3	AR	Merveille et al, 2011
<i>CCDC40</i>	17	AR	Becker-Heck et al, 2011
<i>TTC12^b</i>	11	AR	Thomas et al, 2020
Nexin dynein regulatory complex defects			
<i>CCDC65 (DRC2)^c</i>	12	AR	Horani et al, 2013 ; Austin-Tse et al, 2013
<i>DRC1^c</i>	2	AR	Wirschell et al, 2013
<i>GAS8^d</i>	16	AR	Olbrich et al, 2015
Central complex defects			
<i>CFAP221^e</i>	2	AR	Bustamante-Marin et al, 2020
<i>DNAJB13</i>	11	AR	El Khouri et al, 2016
<i>HYDIN^f</i>	16	AR	Olbrich et al, 2012
<i>NME5</i>	5	AR	Cho et al, 2020
<i>RSPH1</i>	21	AR	Kott et al, 2013
<i>RSPH3</i>	6	AR	Jeanson et al, 2015
<i>RSPH4A</i>	6	AR	Castleman et al, 2009
<i>RSPH9</i>	6	AR	Castleman et al, 2009
<i>STK36</i>	2	AR	Edelbusch et al, 2017
<i>SPEF2^f</i>	5	AR	Cindrić et al, 2020
<i>SPAG6</i>	10	AR	Wu et al, 2020
Normal ultrastructure			
<i>CFAP57^g</i>	1	AR	Bustamante-Marin et al, 2020
<i>LRRC56^h</i>	11	AR	Bonnefoy et al, 2018
<i>GAS2L2ⁱ</i>	17	AR	Bustamante-Marin et al, 2019
<i>NEK10^j</i>	3	AR	Chivukula et al, 2020
<i>OFD1</i>	X	XLR ^k	Budny et al, 2006 ; Bukowy-Bieryllo et al, 2019
<i>CFAP74</i>	1	AR	Sha et al, 2020 ; Biebach et al, 2022
<i>CEP164</i>	11	AR	Devlin et al, 2023
Multiciliogenesis defect			
<i>CCNO</i>	5	AR	Wallmeier et al, 2014
<i>FOXJ1</i>	17	AD	Wallmeier et al, 2019
<i>MCIDAS</i>	5	AR	Boon et al, 2014
<i>TUBB4B</i>	9	AD	Mechaussier et al, 2023

AR: autosomal recessive; AD: autosomal dominant; XLR: X-linked recessive; XLD: X-linked dominant; MT: microtubule.

^a ODA defects visible by electron tomography, ^b mild MT disorganization with no IDA+ODA in patient sperm ^c some N-DRC links absent in TEM

^d some mis-aligned outer MT doublets in TEM ^e no ultrastructure in TEM yet ^f central MT pair defects can be missed in TEM ^g CFAP57 is

axonemal. Depletion = no IDA in *Chlamydomonas* ^h LRRC56 is axonemal. Depletion = no distal ODAs in *Trypanosoma* ⁱ cilia orientation affected

^j short cilia ^k C-term mutations lead to XLR PCD and other mutations lead to syndromic ciliopathies with XLD or XLR inheritance.

Tableau 3. Gènes impliqués dans les DCP chez l'Homme et leur classification selon le principal défaut ultrastructural auquel leurs mutations conduisent (modifié de Legendre et al., 2021)

I.4.4. Corrélations génotype/phénotype

La sévérité des manifestations cliniques des DCP peut dépendre du gène impliqué ainsi que de la mutation identifiée (Brennan et al., 2021). Parmi la cinquantaine de gènes déjà impliqués, trois sont associés à des formes syndromiques avec atteinte conjointe du cil primaire : *OFD1* (*Orofaciodigital syndrome 1*), associé à des malformations craniofaciales et digitales, *RPGR* (*retinitis pigmentosa GTPase regulator*) responsable d'atteintes oculaires de type rétinite pigmentaire, et *TUBB4B* (*tubulin beta 4B class IVb*) impliqués dans des atteintes neurosensorielles et des néphronophthises.

Après exclusion de ces formes syndromiques, ce sont les patients porteurs de mutations dans *CCDC39* ou *CCDC40*, qui présentent les phénotypes respiratoires les plus sévères (Davis et al., 2019). *CCDC39* et *CCDC40* codent des protéines permettant d'espacer les complexes ancrés sur le tubule A selon l'unité fonctionnelle de 96nm. Une atteinte de ces gènes induit chez les patients une absence des BDI avec désorganisation axonémale majeure. A l'inverse, les MIPs qui ont également un rôle de maintien d'une périodicité cohérente le long de l'axonème (cf I.3.3.1.2. MIPs, protéines internes aux microtubules) n'ont pas été associées à des manifestations pulmonaires à ce jour. En effet, des mutations de *CFAP45*, *CFAP52*, *CFAP53*, *ENKUR*, *MNS1* et *NME7* ont été décrites chez des individus atteints de défauts de latéralité et parfois d'infertilité masculine isolée, sans DCP.

Le défaut de certains gènes mène à des DCP avec des symptômes respiratoires plus modérés. C'est le cas des patients porteurs de mutations dans *GAS2L2*, *LRRC56*, *DNAH9* ou *RSPH1* qui présentent moins de détresse respiratoire néonatale, ou une atteinte respiratoire plus tardive ou restreinte aux voies aériennes supérieures (Legendre et al., 2021).

La composition des bras de dynéines joue également un rôle dans la corrélation génotype/phénotype des DCP. En effet, les BDE du cil respiratoire sont composés de complexes DNAH5/DNAH9 (dans la région distale de l'axonème) et de DNAH5/DNAH11 (région proximale) alors que les flagelles des spermatozoïdes comportent exclusivement des complexes DNAH17/DNAH8 sur toute leur longueur. Ainsi, notre équipe a montré que les patients porteurs de mutations dans *DNAH5* ou *DNAH11* parvenaient à concevoir naturellement (Vanaken et al., 2017), tandis qu'à l'inverse, des mutations de *DNAH17* ou *DNAH8* conduisent à des infertilités masculines sans atteinte respiratoire (C. Liu et al., 2020; Whitfield et al., 2019). Il faut noter toutefois que les individus masculins porteurs de mutations de *DNAH5*, *DNAH9* ou *DNAH11* peuvent présenter une hypofertilité qui pourrait s'expliquer par le défaut de ces protéines présentes dans les cellules multiciliées des canaux efférents conduisant les spermatozoïdes vers l'épididyme. Par ailleurs, la fertilité féminine en fonction du gène impliqué chez

les patientes atteintes de DCP est assez peu documentée, et la composition de l'axonème des cellules multiciliées des trompes de Fallope est pour le moment très peu connue.

La moitié des patients atteints de DCP présente un défaut de latéralité. Toutefois, les mutations dans certains gènes de DCP comme ceux du N-DRC n'engendrent jamais de défaut de latéralité (Olbrich et al., 2015; Wirschell et al., 2013). De même, le cil nodal ne possédant pas de complexe central (structure 9+0), les mutations touchant les protéines du CC ou des ponts radiaires n'affectent pas la latéralisation des organes (Legendre et al., 2021). C'est également le cas de deux gènes codant des acteurs de la multiciliogenèse (voie NOTCH1) : *MCIDAS* et *CCNO* dont les mutations n'ont aucun impact sur la latéralité des organes puisque le cil nodal est un cil unique généré de façon indépendante de cette voie. En revanche, des mutations dans *FOXJ1*, facteur de transcription également impliqué dans la multiciliogenèse, conduisent à un défaut de latéralité dans 50% des cas. Ceci s'explique par le fait que *FOXJ1* intervient non seulement dans la voie NOTCH1 de la multiciliogenèse mais aussi dans la voie *NOTO* impliquée dans la genèse du cil nodal durant l'embryogenèse (Wallmeier et al., 2020).

Les patients porteurs de mutations dans *MCIDAS*, *CCNO* ou *FOXJ1* présentent une forme de DCP nommée « génération réduite des cils multiples » (RGMC, *reduced generation of multiple cilia*). La quantité de cils est drastiquement diminuée chez ces patients pour lesquels il existe une forte prévalence de l'hydrocéphalie, exceptionnellement retrouvée chez les autres patients DCP. Par ailleurs, un défaut de *FOXJ1* est responsable de l'unique forme autosomale dominante non syndromique de la DCP.

Outre le gène impliqué, la nature des mutations peut jouer un rôle dans la sévérité du phénotype. Certains patients porteurs de mutations faux-sens hypomorphes présentent des caractéristiques plus modérées : moindre altération de certains paramètres du battement ciliaire (Sylvain Blanchon et al., 2020), proportion d'anomalies ciliaires inférieure (Z. Liu et al., 2020), NO nasal au dessus du seuil diagnostique (Legendre et al., 2022).

Les patients DCP présentent ainsi une très grande variabilité des symptômes respiratoires et de leur sévérité, reflet de la très grande hétérogénéité génétique de la maladie. Le très large spectre phénotypique inclut des formes de DCP modérées qui peuvent être initialement sous-diagnostiquées. L'identification de l'étiologie moléculaire de la DCP est d'une part essentielle pour une meilleure prise en charge des patients (mise en place précoce d'un traitement symptomatique particulièrement important dans les formes potentiellement sévères) et de leur famille (conseil génétique), et permet d'autre part d'avancer dans la compréhension du fonctionnement du cil mobile et du mécanisme d'assemblage de ses constituants.

Lorsqu'un nouveau gène impliqué dans les DCP est découvert, des études fonctionnelles sont réalisées *in vitro* et/ou *in vivo* dans divers modèles d'études pour valider son implication dans la maladie et tenter de préciser son rôle dans le fonctionnement ciliaire.

I.5. Modèles d'étude des DCP

En raison de la grande conservation des protéines de l'axonème au cours de l'évolution, de nombreux organismes peuvent être utilisés comme modèles d'étude des DCP. Je détaillerai ici les organismes unicellulaires, les embryons de vertébrés, les modèles d'invertébrés et modèles animaux ainsi que les modèles cellulaires.

I.5.1. Organismes unicellulaires

De nombreux organismes unicellulaires possédant des cils ou des flagelles sont utilisés comme modèle des DCP (*Trypanosoma brucei*, *Paramecium tetraurelia*, *Tetrahymena thermophila*) parmi lesquels *Chlamydomonas reinhardtii* est le modèle le plus largement utilisé (Figure 24).

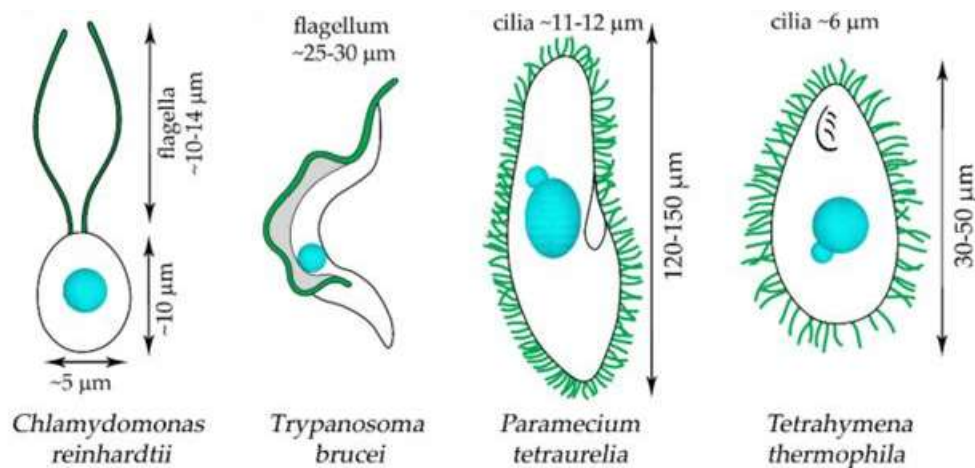


Figure 24. Représentation schématique d'organismes unicellulaires, modèles des DCP (Niziolek et al, 2022(Niziolek et al., 2022))

L'atout principal de ces modèles (en particulier *Chlamydomonas reinhardtii*) repose sur la possibilité d'induire très facilement des mutations dans leur génome (exposition aux UV ou agents chimiques) avant de sélectionner des mutants présentant un défaut de nage ou des anomalies ultrastructurales de l'axonème. Cette méthode permet d'identifier de nouvelles protéines impliquées dans la structure et/ou la fonction ciliaire. La fonction de très nombreux gènes impliqués dans les DCP, codant

majoritairement des protéines de structure de l'axonème, a pu être étudiée chez *Chlamydomonas* (Poprzeczko et al., 2019) (**Tableau 4**). Parmi eux, *DNAI1*, codant une chaîne intermédiaire des BDE, a été le premier gène impliqué dans une ciliopathie chez l'Homme (Pennarun et al., 1999). Ce gène a été identifié par une approche « gène candidat » grâce à son homologie de séquence avec le gène orthologue de *Chlamydomonas* (*IC78/ODA9/DIC1*) pour lequel un mutant spontané était immobile et présentait une absence des BDE dans l'axonème flagellaire.

Homme	<i>C.reinhardtii</i> (mutant)
MCIDAS	----
CCNO	----
CCDC39	FAP59 (pf8)
CCDC40	FAP172 (pf7)
DNAH5	ODA2 (pf28)
DNAH9	ODA4 (oda4)
DNAH11	ODA4 (oda4)
DNAI1	ODA9, DIC1 (oda9)
DNAI2	ODA6, DIC2 (oda6)
DNAL1	DLC1, DLU1
NME8	DLC3, DLX1 DLC5, DLX2
CCDC114/ODAD1	DCC2, ODA1 (oda1)
CCDC151/ODAD3	ODA10 (oda10)
TTC25/ODAD4	----
ARMC4/ODAD2	----
EFCAB1/CLXN/ODAD5	----
CCDC103	PR46b, CCDC103
DNAAF1	ODA7, DAU1 (oda7)
DNAAF2	DAP1, MOT45 (pf13, mot45)
DNAAF3	DAB1, PF22 (pf22)
DNAAF4	PF23 (pf23)
DNAAF5	HEATR2
PIH1D3	TWI1 (twi1)
ZMYND10	ZMYND10
SPAG1	----
CFAP298	FBB18, DAB2
LRRC6	MOT47 (mot47)
CFAP300	FBB5
DRC1	DRC1, PF3 (pf3)
CCDC65	DRC2
GAS8	DRC4, PF2 (pf2)
RSPH1	RSP1
RSPH3	RSP3 (pf14)
RSPH4A	RSP4 (pf1)
RSPH9	RSP9 (pf17)
DNAJB13	RSP16, HSP40 (pf33)
HYDIN	HYDIN
STK36	CHLREDRAFT_104702 (Protéine)
SPEF2	CPC1 (cpc1)
CFAP221	FAP221
RPGR	----
OFD1	OFD1
GAS2L2	----
LRRC56	ODA8, DLU2 (oda8, mot37)
TTC12	----
NME5	RSP23
SPAG6	PF16
FOXJ1	----
CFAP57	FAP57 (fap57)
CFAP74	FAP74 (fap74)
CEP164	----
NEK10	CHLRE_17g747397v5 (Protéine)
TUBB4B	----

Tableau 4. Gènes impliqués dans les DCP et leurs orthologues chez *Chlamydomonas reinhardtii* (modifié de Poprzeczko et al., 2019).

La simplicité de culture *in vitro* de ces organismes unicellulaires et leur multiplication rapide permettent d'obtenir une grande quantité de matériel. L'accessibilité directe à leurs cils/flagelles permet d'analyser facilement différents paramètres tels que la longueur des cils, l'altération de la nage (immobilité, amplitude, fréquence, forme du mouvement), ou encore les anomalies de l'ultrastructure de l'axonème en ME à transmission, balayage ou plus récemment, par cryotomographie électronique (ECT).

I.5.2. Embryons de vertébrés

Les embryons de poisson-zèbre (*Danio rerio*) et de certains xénopes (*Xenopus laevis* and *X. tropicalis*) sont des modèles bien établis pour étudier les cils mobiles qui apparaissent tôt au cours de leur développement embryonnaire. Ces deux vertébrés aquatiques produisent une quantité importante d'ovocytes fertilisés à l'extérieur du corps maternel et dont la transparence permet une observation directe des cils. De façon remarquable, différents type de cils sont présents au cours du développement de ces organismes. Leur centre organisateur droite/gauche (vésicule de Kupffer chez le poisson zèbre et « *gastrocoel roof plate* » chez le xénope) est assimilé au cil nodal des mammifères. Dès les premiers stades embryonnaires, cette structure héberge des cellules monociliées dont le cil est mobile ou immobile. Par ailleurs, dans la suite du développement embryonnaire, l'épiderme des larves de xénope présente des cellules multiciliées pourvues de cils mobiles. En revanche, les larves de poisson-zèbre présentent des cellules multiciliées avec cils mobiles ou immobiles, mais également des cellules au cil mobile unique de structure 9+2 ou 9+0 selon le tissu (**Figure 25**). Une anomalie des cils mobiles chez le poisson-zèbre ou le xénope conduit à une mauvaise latéralisation des organes et/ou à des hydrocéphalies.

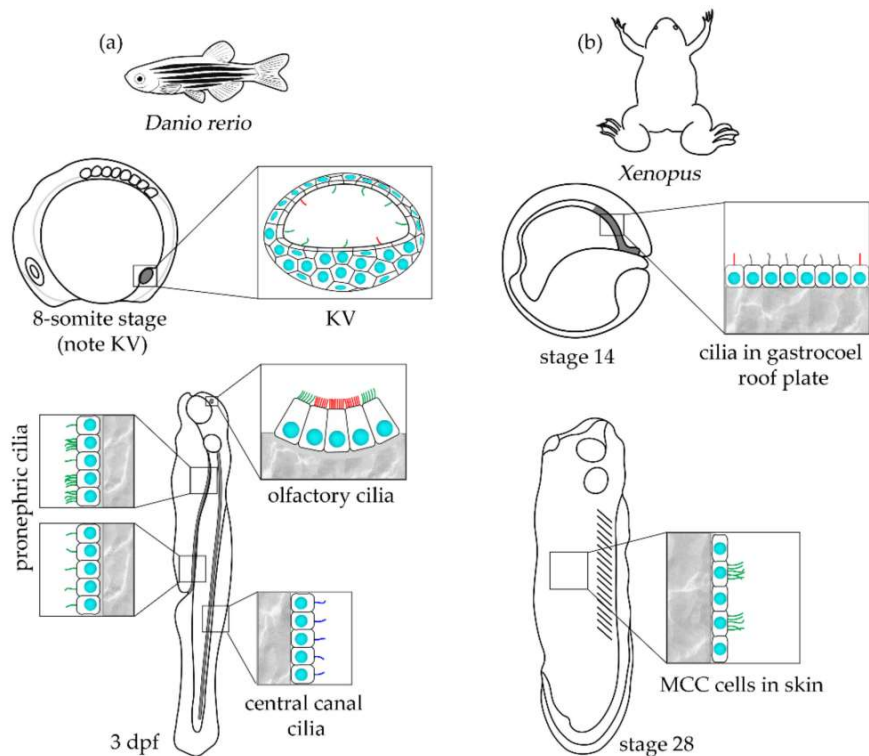


Figure 25. Représentation schématique des embryons et larves de poisson-zèbre (a) et de xénope (b) (Niziolek et al., 2022). Noyau (bleu cyan), cil mobile 9+2 (vert), cil mobile 9+0 du canal central (bleu foncé), cil immobile (rouge), cil mobile du « gastrocoel roof plate » de configuration axonémale inconnue (gris)

La peau des larves de xénope présente un intérêt tout particulier pour l'étude des DCP puisque sa composition cellulaire est relativement similaire à celle de l'épithélium respiratoire, avec présence de cellules à mucus, d'ionocytes, de cellules sécrétrices de protons et de petites cellules sécrétrices (SSC, *small secretory cell*) (Dubaisi et al., 2014). Par ailleurs, contrairement à *Chlamydomonas* et à d'autres organismes munis de flagelles, les cellules multiciliées des larves de xénope expriment les acteurs de la multiciliogenèse.

I.5.3. Invertébrés et mammifères

La drosophile et la souris sont deux modèles qui permettent de se rapprocher davantage des mécanismes existants chez l'Homme.

I.5.3.1. La drosophile

Drosophila melanogaster a émergé comme un bon modèle d'étude des cils mobiles et des ciliopathies. Il existe deux types de cils mobiles chez la drosophile : le flagelle des spermatozoïdes, et les dendrites des neurones mécanosensoriels (neurone chordotonal) dont les caractéristiques sont différentes et se

complètent (**Figure 26**). En effet, ces deux types de cils comportent à eux deux presque tous les composants de la machinerie de la mobilité ciliaire retrouvée chez l'Homme, notamment la quasi-totalité de ceux codés par les gènes de DCP connus (Zur Lage et al., 2019).

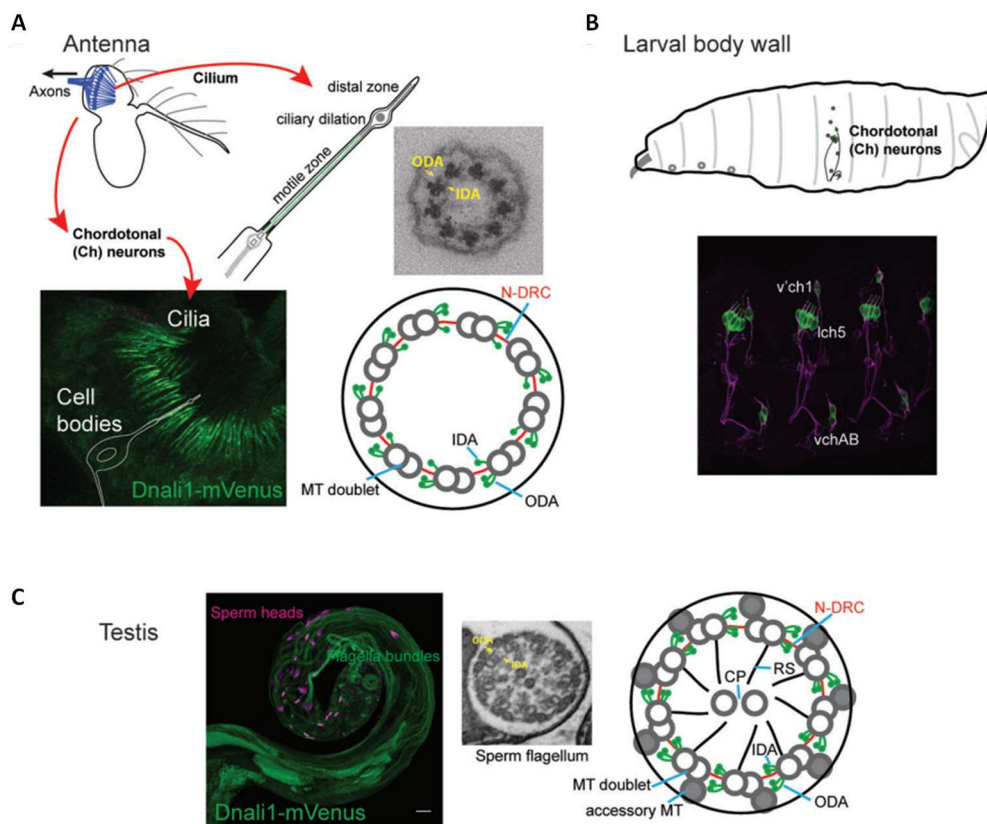


Figure 26. Les cils mobiles chez la drosophile (Zur Lage et al., 2019) A) Chaque neurone chordotal de l'antenne de la drosophile porte un cil mécanosensoriel (9+0) dont la zone proximale contient des bras de dynéines (marquage DNALI1 en vert). B) Des neurones chordonaux sont également présents sur le corps des larves. C) Marquage en vert d'un constituant de BDI (DNALI1) dans les flagelles (9+2) des spermatozoïdes présents dans le testicule de la drosophile.

1.5.3.2. La souris

Contrairement à d'autres mammifères, le maintien des souris est relativement peu coûteux, avec des grossesses fréquentes (5-10 fois/an) et une gestation courte (environ 20 jours). Cependant, bien que les cils mobiles des souris et des Hommes partagent les mêmes localisations dans l'organisme, les conséquences des anomalies moléculaires des gènes responsables de DCP ne sont pas toujours identiques chez les souris et l'Homme.

En effet, si certaines souris présentent des symptômes typiques de DCP (rhinites, sinusites, *situs inversus*), la majorité d'entre elles développent surtout une hydrocéphalie, contrairement à ce qui est observé chez les patients atteints de DCP. Cette différence notable, probablement due aux différences anatomiques des ventricules cérébraux qui existent entre l'Homme et la souris, conduit rapidement à

la mort de ces souris. Par ailleurs, les souris DCP développent également des anomalies cardiaques majeures, conséquences probables du défaut de latéralisation des organes (Ibañez-Tallon et al., 2004; Tan et al., 2007). La viabilité ainsi réduite de ces souris peut masquer l'apparition de symptômes respiratoires.

Malgré ces limites, presque une centaine de gènes liés à la biologie cellulaire des cils mobiles (structure, assemblage, différenciation, transport...) ont été invalidées, de façon artificielle ou spontanée, chez la souris ces dernières années. Parmi ces gènes, 27 sont des gènes impliqués dans les DCP (**Tableau 5**). Ces modèles de souris ont permis d'améliorer considérablement nos connaissances sur les cils mobiles (Lee and Ostrowski, 2021).

Gene	Invalidation	PCD Phenotypes	Cilia Structure	Cilia Function	References
Dynein genes					
DNAH5	KO	HC, HT, OM, sinus	No ODA	Decreased flow	Ibanez-Tallon 2002, 2004
	ENU	HT	No ODA	N/A	Tan 2007
DNAH11	ENU(Dakshi)	N/A	N/A	Reduced CBF, decreased flow	Solomon 2017
	Sp (iv)	HT, OM, sinus	Defects not detected	Immotile	Layton 1976, Supp 1977, Lucas 2012
	ENU (Irm3)	HT	Defects not detected	Immotile	Ermakov 2009, Lucas 2012
	ENU (Irm5)	HT	N/A	N/A	Ermakov 2009
	ENU (avc4)	HT	N/A	N/A	Burnicka-Turek 201
DNAI1	KO	HT	N/A	Immotile	Supp 1999
	Inducible KO	Sinus	No ODA	Decreased flow	Ostrowski 2014
Dynein docking genes					
ARM4/ODAD2	ENU (Aotea)	HC, HT	No ODA	N/A	Hjeij 2013, Onoufriadi 2014
CCDC39	ENU	HC, HT	N/A	Reduced CBF, decreased flow	Solomon 2017
	ENU (prh)	HC	No IDA	Reduced CBF, decreased flow	Abdelhamed 2018
CCDC40	ENU (links)	HT	N/A	N/A	Becker-Heck 2011
CCDC151/ODAD3	ENU (snowball)	HT	No ODA	N/A	Hjeij 2014
	Inducible KO	HC, HT, MI	N/A	N/A	Chiani 2019
TTC25/ODAD4	CRISPR	HT	No ODA	N/A	Wallmeier 2016
EFCAB1/CLXN/ODAD5	KO	HC, HT	Defects not detected	Reduced CBF, decreased flow	Sasaki, 2019
Dynein pre-assembly genes					
DNAAF1/LRRC50	ENU	HC, HT, sinus	N/A	N/A	Ha 2016
DNAAF2/KTU	KO	HC, HT	No IDA, no ODA	N/A	Matsuo 2013
	KO	HT	N/A	N/A	Cheong 2019
DNAAF4/DYX1C1	KO	HC, HT	No IDA, no ODA	N/A	Tarkar 2013
	ENU (sharpei)	HT	N/A	N/A	Tarkar 2013
LRRC6	KO	HC, HT	No ODA	Reduced CBF	Inaba 2016
DNAAF6/PIH1D3	KO	MI	N/A	N/A	Dong 2014
DNAAF7/ZMYND10	KO	HC, sinus	No IDA, no ODA	N/A	Cho 2018
	CRISPR	HC, HT, sinus	No IDA, no ODA	Reduced CBF	Mali 2018
Central pair apparatus (CPA) structure and assembly genes					
CFAP221/PCDP1	Sp (nm1054)	HC, MI, sinus	Defects not detected	Reduced CBF	Lee 2008
HYDIN	Sp (hy3)	HC, sinus	CPA defects	Reduced CBF, decreased flow	Berry 1961, Gruneberg 1943
	Tg insertion (ove459)	HC	N/A	N/A	Lawson 1973, McLone 1973, Raimondi 1973, Davy 2003, Lechtreck 2008
SPAG6	KO	HC, MI, OM	CPA defects	Reduced CBF	Davy 2003
SPEF2/KPL2	Sp (bgh)	HC, MI, sinus	Defects not detected	Reduced CBF	Li 2014, Sapiro 2002, Teves 2014
	Conditional KO	HC, MI	Defects not detected	N/A	Sironen 2011
					Lehti 2017, Lehti 2018
Radial spoke structure and assembly genes					
RSPH1	KO	HC, sinus	CPA defects	Rotational waveform, decreased flow	Yin 2019
RSPH4	KO	HC	RS defects	Rotational waveform	Shinohara 2015, Yoke 2020
DNAJB13	CRISPR	HC	N/A	N/A	Oji 2016
Nexin-dynein regulatory complex (N-DRC) genes					
GAS8/DRC4	Gene trapped	HC, HT	Microtubule defects	Abnormal waveform, Reduced CBF, decreased flow	Lewis 2016
Multiciliated cell differentiation genes.					
MCIDAS	CRISPR	N/A	No cilia, basal body defects	N/A	Lu 2019
FOXJ1/HFH4	KO	HC, HT	No cilia, basal body defects	N/A	Chen 1998, Gomperts 2004, You 2004
	KO	HC, HT	No cilia, basal body defects	N/A	Brody 2000, Gomperts 2004, You 2004
CCNO	KO	HC, sinus	Fewer cilia, centriole defects	N/A	Funk 2015
	KO	HC, MI, FI	No cilia	N/A	Nunez-Olle 2017
Ciliogenesis and IFT genes					
RPGR	KO	N/A	N/A	N/A	Hong 2000, Hong 2003
TUBB4B	Tg overexpression	MI	N/A	N/A	Brunner 2008
	CRISPR	N/A*	Microtubule defects*	N/A	Mechaussier, 2023
Microtubule modification genes					
GAS2L2	Conditional KO	HT, sinus	Abnormal orientation	Increased CBF, decreased flow	Bustamante-Marin 2019

*phenotype variable selon les mutations

ENU: N-ethyl-N nitrosourea mutagenesis, FI: female infertility; HC: hydrocephalus; HT: heterotaxy (including situs inversus and congenital heart defects); KO: knockout; MI: male infertility (including spermatogenesis and sperm motility defects); OM: otitis media; N/A: not reported; Sinus: sinus abnormalities (including mucus accumulation and sinusitis); Sp: spontaneous; Tg: transgene

Tableau 5. Modèles de souris correspondant à 27 gènes impliqués dans les DCP chez l'Homme (modifié de Lance Lee, Lawrence E. Ostrowski, 2021)

Par ailleurs, la physiologie de la souris étant beaucoup plus proche de celle de l'Homme que d'autres modèles, la souris pourrait représenter un bon modèle pré-clinique pour tester l'efficacité de traitements innovants (Lee and Ostrowski, 2021).

I.5.4. Modèles cellulaires

Les modèles cellulaires sont une bonne alternative à l'utilisation de modèles animaux. Il n'existe cependant aucune lignée cellulaire commerciale permettant d'étudier des cils mobiles en culture. En effet, bien qu'une lignée de cellules bronchiques épithéliales humaines (Beas2B) soit commercialisée, ces cellules ne sont pas capables de produire des cils mobiles. Les cellules Beas2B, ainsi que d'autres lignées cellulaires comme les cellules HeLa (issues d'un cancer de l'utérus) permettent toutefois d'étudier le cil primaire.

Différentes techniques, que je détaille ci-après, permettent néanmoins de cultiver des cellules multiciliées des voies aériennes.

I.5.4.1. Interface Air-Liquide (ALI)

La culture de cellules épithéliales respiratoires (AEC = *airway epithelial cells*) en ALI se base sur la capacité des cellules basales de l'épithélium respiratoire à se différencier en cellules ciliées et cellules à mucus lorsqu'elles sont cultivées au contact de l'air. Initialement développé à partir de cellules épithéliales de trachée d'autopsies humaines dans les années 1990 (Gruenert et al., 1995), ce modèle a bénéficié de plusieurs améliorations. Brièvement, les cellules AEC recueillies à partir de pièces opératoires, d'autopsie ou de brossages d'épithélium trachéo-bronchique/nasal, sont dissociées puis ensemencées sur des flasques où les cellules basales (cellules progénitrices) adhèrent et se multiplient. Après cette première phase d'expansion, les cellules basales sont ensemencées sur des inserts où elles continuent de s'expandre pour atteindre l'état de confluence. Les cellules sont ensuite placées en ALI par retrait du milieu situé au-dessus de l'insert. La polarité ainsi induite dans ce système déclenche la ciliogenèse *in-vitro* ce qui permet de reproduire en environ trois semaines un épithélium respiratoire, principalement composé de cellules basales, de cellules à mucus et de cellules ciliées (Coste et al., 2000; Fulcher et al., 2005; Gray et al., 1996) (**Figure 27**).

L'épithélium obtenu en culture présente des caractéristiques très proches de celles d'un épithélium respiratoire normal, avec une morphologie pseudostratifiée, des jonctions serrées, des propriétés électrophysiologiques (avec un transport ionique et une résistance transépithéliale), la sécrétion de mucus et la mise en place d'un battement ciliaire progressivement coordonné et efficace (Chen and Schoen, 2019; Lacroix et al., 2018; Papazian et al., 2016).

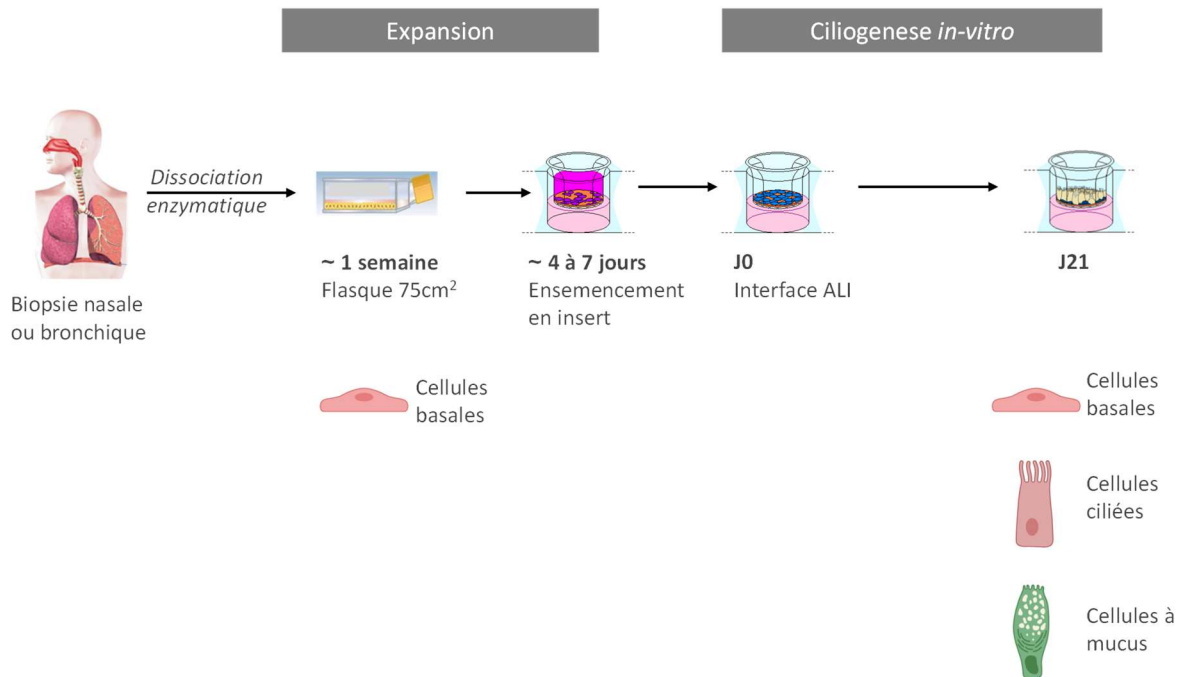


Figure 27. Culture primaire de cellules respiratoires en Interface Air-Liquide (ALI)

Ce modèle de culture peut être aussi réalisé à partir de cellules de trachée de souris préalablement modifiées génétiquement comme vu précédemment. Mais surtout, il permet de cultiver les cellules respiratoires humaines afin d'étudier les cils mobiles chez l'Homme en s'affranchissant des différences inter-espèces.

Dans le cadre de cette thèse, j'ai utilisé la culture en interface ALI de CENH, cellules épithéliales nasales humaines que je détaille dans la partie Matériel de cette thèse (cf IV.1. Matériel : cellules épithéliales nasales humaines (CENH)).

1.5.4.2. Sphéroïdes

Un autre mode de culture primaire d'AEC en 3D a été développé : la culture de sphéroïdes. La première étape de ce modèle, identique à la culture ALI, consiste à mettre en culture en flasque les cellules basales dissociées à partir de cellules épithéliales respiratoires issues d'épithélium trachéo-bronchique ou nasal. Après cette étape d'expansion en flasque, le tapis cellulaire est décollé par digestion enzymatique du collagène, puis ensemencé dans une nouvelle flasque qui est placée en constante rotation afin d'empêcher les cellules d'adhérer. Ces cellules vont alors former des agrégats et s'organiser en structures sphériques monocouches, avant de se différencier en cellules à mucus et cellules ciliées qui apparaissent à la face externe des sphéroïdes après 15 jours de culture (**Figure 28**). La différenciation est plus rapide en suspension qu'en culture ALI, cependant elle est plus asynchrone

et dépend de la taille de chaque sphéroïde (Jorissen and Bessems, 1995; Neugebauer et al., 2003). De plus, il a été démontré qu’une fois différenciées, les sphéroïdes ne contiendraient plus de cellules basales, rendant la culture incapable de se régénérer (Kumar et al., 2011; Laselva and Conese, 2021).

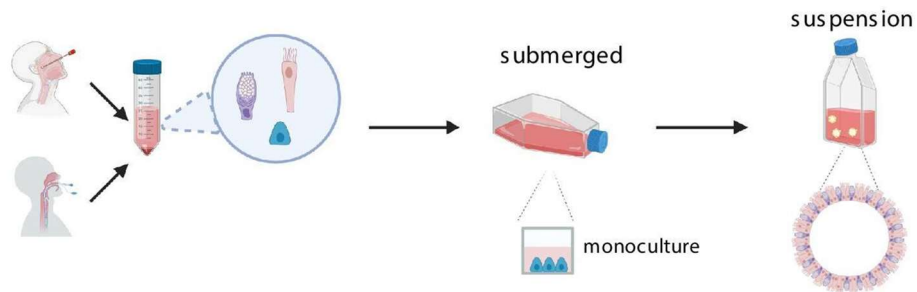


Figure 28. Culture primaire de sphéroïdes de cellules respiratoires en suspension (modifié de Bukowy-Bieryłto, 2021)

1.5.4.3. Organoïdes

La culture d’organoïdes, troisième méthode de culture de cellules respiratoires en 3D (Hild and Jaffe, 2016), consiste à cultiver les AEC issues d’épithélium trachéo-bronchique ou nasal dans du matrigel, mélange complexe de molécules de la matrice extracellulaire, en présence d’un milieu contenant tous les éléments essentiels pour la culture de cellules souches (ex: noggin, inhibiteurs de BMP, inhibiteurs de ROCK). Les cellules forment alors des agrégats puis se différencient petit à petit en structures organoïdes sphériques, au sein desquelles les cellules à mucus et les cellules ciliées tapissent l’intérieur de la lumière, tandis que les cellules basales recouvrent la face externe (Bukowy-Bieryłto, 2021) (**Figure 29**).

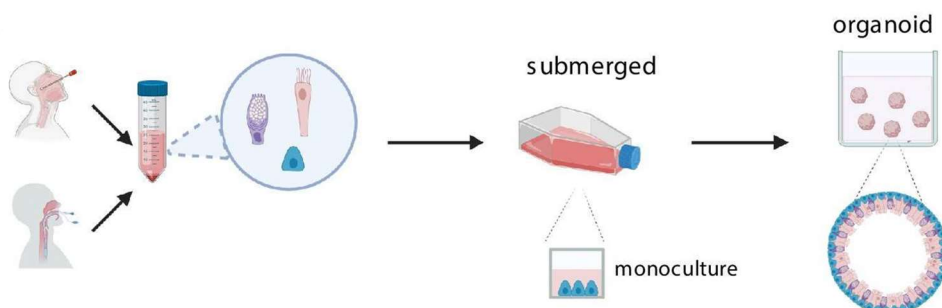


Figure 29. Culture primaire d’organoïdes de cellules respiratoires (modifié de Bukowy-Bieryłto, 2021)

La présence de cellules basales rend les organoïdes capables de se régénérer. En effet, après dissociation, les organoïdes se reforment et se redifférencient. Ils peuvent ainsi être maintenus plus d'un an en culture (Nikolić and Rawlins, 2017; Sachs et al., 2019). Cependant, la structure des organoïdes rend inaccessible la partie apicale des cellules (cils dans la lumière interne) et ne permet pas toutes les analyses nécessaires à l'étude des cils (ex : mesures de la résistance transépithéliales, analyse du battement ciliaire). Les organoïdes sont couramment utilisés comme modèle d'étude de la mucoviscidose puisque les différentes mutations du gène *CFTR* conduisent à un phénotype différent des organoïdes contrôles (gonflement des organoïdes, mesure de l'aire de la lumière)(Laselva and Conese, 2021).

De plus, la taille très variable des organoïdes les rend peu reproductibles pour certains types d'études à haut débit (Hynds et al., 2018; Mou et al., 2015). Cependant, il est possible de dissocier les organoïdes et les mettre en ALI pour permettre davantage d'analyses.

Le terme « organoïde » est restreint aux structures dont la capacité de se régénérer a été prouvée (avec cellules basales), alors que le terme sphéroïde concerne les structures ne pouvant pas se régénérer (Berical et al., 2022; Laselva and Conese, 2021).

1.5.4.4. Cellules reprogrammées et iPSC

Ces trois précédentes techniques (ALI, sphéroïdes, et organoïdes), qui permettent de cultiver un épithélium respiratoire contenant des cellules multiciliées, ont été initialement réalisées à partir de cellules primaires c'est-à-dire de cellules non immortalisées fraîchement extraites de l'épithélium respiratoire humain ou animal.

Afin de s'affranchir du problème d'accès à du matériel humain nécessaire pour chaque culture, l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites (*induced pluripotent stem cells*, iPSC) s'est ensuite développée. Ces iPSC peuvent être stockées par cryo-conservation, modifiées génétiquement, et utilisées en grande quantité afin de générer des cellules basales progénitrices pouvant être ensuite différenciées en ALI, en suspension sphéroïde ou, le plus souvent, en organoïdes. Des cultures ALI ou des organoïdes dérivés d'iPSC ont notamment été largement utilisés pour l'étude de *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) dans le cadre de la mucoviscidose (Bluhmki et al., 2021). Une étude a également généré des organoïdes à partir d'iPSC issus d'un patient DCP présentant un défaut de *DNAH5*. Le phénotype ciliaire engendré par ce défaut a bien été reproduit dans les organoïdes (Hawkins et al., 2021).

Très récemment, un nouveau type de cellules a été développé pour pallier les inconvénients des iPSC (perte des marques épigénétiques, instabilité génétique, tumorigénicité) : les cellules reprogrammées

conditionnellement (*conditionally reprogrammed cells, CRC*) qui représentent une alternative plus rapide et moins coûteuse que les iPSC. En effet, les CRC peuvent être générées rapidement à partir de cellules épithéliales primaires de mammifères, par l'utilisation de l'inhibiteur de Rho kinase, Y-27632, combinés à la co-culture avec des fibroblastes irradiés nourriciers (*feeder cells*). Cette méthode induit un état prolifératif constant permettant de multiplier les cellules, de les modifier génétiquement et de les cryoconserver. Néanmoins cet état prolifératif est réversible par la suppression de l'inhibiteur de Rho kinase et des fibroblastes nourriciers, les cellules basales peuvent alors se différencier normalement en les plaçant en ALI, en suspension (sphéroïdes) ou en matrigel pour former des organoïdes (Awatade et al., 2021; Bukowy-Bieryłło, 2021; Supryniewicz et al., 2012). Les CRC ont un caryotype stable et sont non-tumorigènes. La culture de CRC sans fibroblastes nourriciers a également été décrite avec une monoculture dans un milieu contenant les inhibiteurs appropriés (inhibiteur de : SMAD, mTOR, myosin et PAK...) (Bukowy-Bieryłło, 2021) (**Figure 30**).

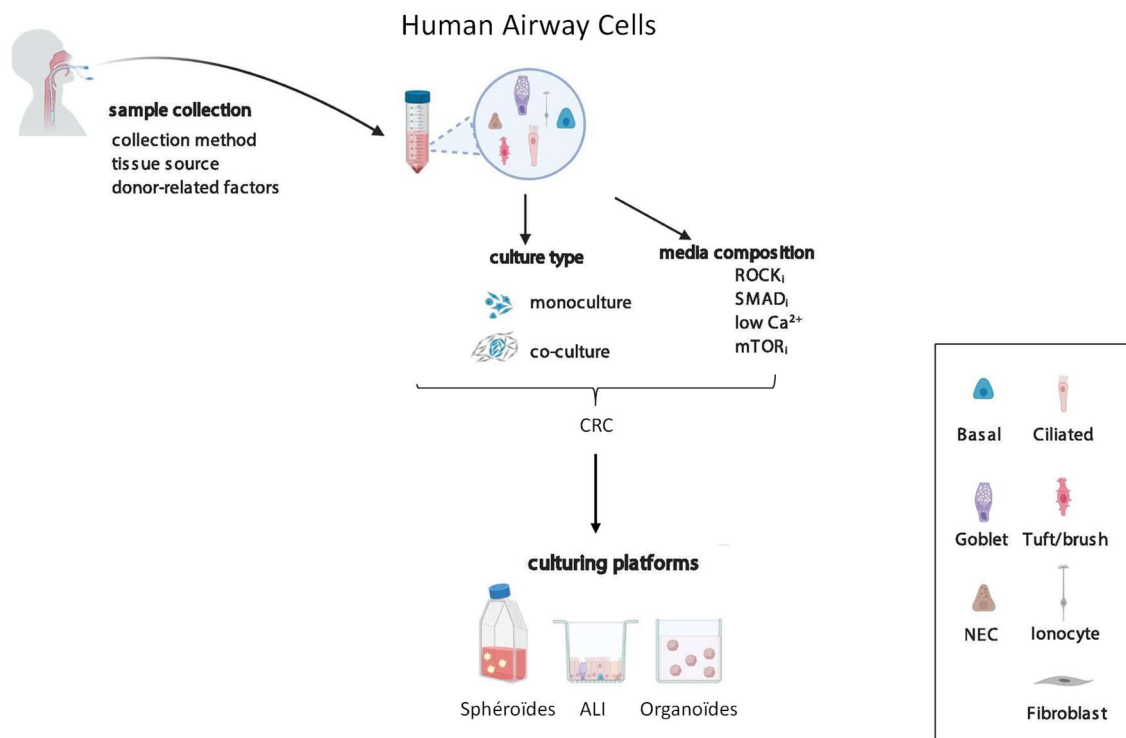


Figure 30. Cellules reprogrammées de façon conditionnelle (CRC) pour la mise en culture de cellules respiratoires (modifié de Bukowy-Bieryłło Z. 2021).

La méthode de culture des CRC doit cependant continuer à être améliorée, en particulier sur le plan physiologique, car les cellules semblent perdre après quelques passages (5 à 8) l'expression de certaines protéines spécialisées (comme CFTR dans le cadre des études sur la mucoviscidose), et la fréquence de battement ciliaire serait diminuée (Awatade et al., 2021).

II- Objectifs de la thèse

Malgré l'implication de plus de 50 gènes dans la DCP, l'étiologie moléculaire reste toujours inconnue pour 20 à 25% des patients, justifiant la poursuite de la recherche de nouveaux gènes de DCP. Les cas non encore élucidés concernent plus particulièrement les DCP sans anomalie de l'ultrastructure ciliaire décelable en microscopie électronique et celles avec absence des deux bras de dynéine. Ces deux phénotypes peuvent correspondre respectivement à des anomalies de la structure fine de l'axonème ou à des défauts d'assemblage des bras de dynéine des cils mobiles, pour lesquels les connaissances chez l'Homme restent encore limitées.

L'objectif de cette thèse était de préciser le rôle de deux protéines codées par des gènes nouvellement (*TTC12*) ou récemment (*PIH1D3*) impliqués dans les DCP par notre équipe, afin de progresser dans la compréhension de cette maladie rare et dans les mécanismes d'assemblage des bras de dynéine dans l'axonème des cils mobiles.

Les premières mutations de *TTC12* ont été identifiées chez un individu masculin présentant une infertilité avec absence des deux BDs dans le flagelle des spermatozoïdes, associée à des symptômes respiratoires discrets. Nous avons d'une part cherché à comprendre le rôle de *TTC12* dans l'assemblage des bras de dynéine dans les cils et dans les flagelles, et d'autre part voulu expliquer la physiopathologie de ce phénotype particulier de DCP avec infertilité masculine prédominante et atteinte respiratoire modérée.

PIH1D3, qui code une protéine impliquée dans l'assemblage cytoplasmique des deux bras de dynéines, est le seul gène lié à l'X responsable de DCP non syndromique. Les patients masculins porteurs d'une mutation pathogène de ce gène présentent des cils avec absence des deux BDs. De manière intéressante, des symptômes respiratoires de sévérité variable ont été retrouvés chez les mères de ces patients. A partir de cette observation, nous avons voulu comprendre quel était le mécanisme responsable de l'existence ou non de manifestations respiratoires chez les individus de sexe féminin porteurs de mutations *PIH1D3* à l'état hétérozygote.

III- Patients

L'UMRS_933 a mis en place depuis 1981 l'une des plus importantes cohortes à l'échelle internationale comportant environ 1300 individus indépendants avec diagnostic de DCP confirmé, un phénotype clinique et ciliaire bien caractérisé, et des ADN disponibles au laboratoire. La grande majorité de ces patients a bénéficié d'une étude génétique réalisée à titre diagnostique, recherchant l'implication d'un gène connu de DCP, basée sur l'analyse globale d'un panel NGS ciblé contenant tous les gènes connus de DCP, suivi d'une analyse plus détaillée des gènes correspondants au phénotype ciliaire observé en ME.

Dans notre cohorte, comme dans la littérature, la proportion de patients atteints de DCP avec absence des deux BDs est estimée à environ 25% (**Tableau 6**).

	Papon <i>et al</i>, 2010 [56] n=190	Stannard <i>et al</i>, 2010 [48] n=68	Olin <i>et al</i>, 2011 [59] n=155	Shoemark <i>et al</i>, 2012 [58] n=214	Boon <i>et al</i>, 2014 [60] n=138	Jackson <i>et al</i>, 2015 [26] n=57	Total
Isolated outer dynein arm defect	33%	26%	54%	41%	59%	46%	44%
Inner and outer dynein arm defect	32%	34%	23%	24%	6%	39%	25%
Inner dynein arm with microtubular disorganisation	13%	6%	7%	9%	16%	9%	10%
Isolated Inner dynein arm defect	4%	21%	15%	13%	0%	0%	9%
Central pair defect	19%	13%	1%	12%	14%	7%	8%
Other *		3%			5%		1%
Total (n=)	190	68	155	214	138	57	

* Other defects reported include ciliary aplasia, disorientation and extra microtubules

Tableau 6. Proportion des défauts ultrastructuraux observés en ME chez des patients DCP issus de 9 études distinctes (Lucas et al., 2017).

A ce jour, 13 gènes sont impliqués dans les DCP avec absence des deux BDs (**Figure 31**).

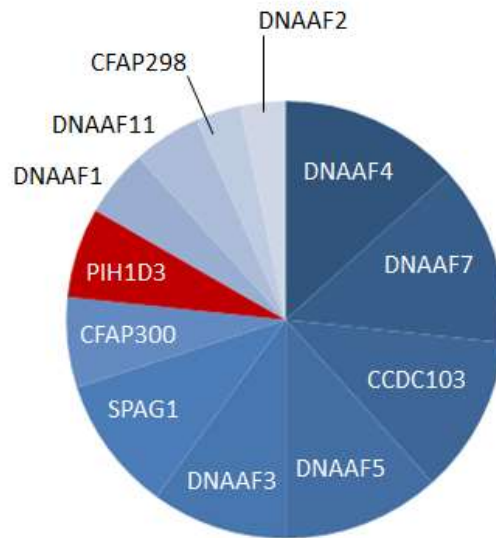


Figure 31. Répartition des 12 gènes responsables de DCP non syndromique avec absence de deux BDs dans l'axonème ciliaire respiratoire, dans la cohorte du laboratoire (426 patients). *PIH1D3* (rouge) représente 6,5% des DCP avec absence de deux BDs. *TTC12* ne figure pas ici puisqu'il est responsable d'une absence de deux BDs uniquement dans le flagelle des spermatozoïdes.

Mon travail de thèse s'est intégré dans la recherche de nouvelles étiologies moléculaires chez les patients atteints de DCP avec absence des deux BDs (au niveau ciliaire et/ou flagellaire) et pour lesquels aucun gène connu de DCP n'avait été identifié lors du parcours diagnostique habituel décrit précédemment. Pour ces patients, des études génétiques plus approfondies sont menées, dans un premier temps par analyse de plus de 300 gènes candidats présents sur le panel NGS de routine, éventuellement couplée à des puces SNPs pour cartographie d'homozygotie, et d'études de WES chez certains patients. C'est dans ce contexte que les deux nouveaux gènes sur lesquels j'ai travaillé ont été identifiés :

- L'étude de *TTC12* a concerné 4 patients issus de 4 familles indépendantes. Deux de ces patients étaient des hommes adultes, présentant une absence des deux BDs dans le flagelle des spermatozoïdes, pour lesquels l'implication du gène *TTC12* avait été identifiée par WES. Chez les deux autres patients, une femme et un enfant de sexe masculin, les mutations du gène *TTC12* ont été identifiées par panel NGS et WES respectivement. Ils présentaient quant à eux une absence de BDI avec légère désorganisation de l'axonème dans leurs cils respiratoires. Mon travail sur *TTC12* a porté sur ces 4 patients.

- *PIH1D3* avait été impliqué dans notre cohorte chez 8 individus masculins, issus de 6 familles indépendantes, atteints de DCP avec absence des deux BDs dans le cil respiratoire (Olcese et al., 2017). L'identification de mutations du gène *PIH1D3* avait été réalisée par panel NGS chez deux patients et par puces SNP chez 4 autres patients porteurs de grandes délétions (UK10K Rare Group et al., 2017). Au cours de l'interrogatoire des patients DCP sur leurs antécédents familiaux, il avait été noté dans certaines familles, l'existence d'infections respiratoires hautes et/ou basses chez les mères porteuses à l'état hétérozygote de la mutation *PIH1D3* qu'elles avaient transmises à leur fils. Mon travail sur *PIH1D3* a porté sur 5 de ces mères ainsi que sur une sixième mère d'un nouveau patient DCP (données non publiées), porteur d'une délétion du gène *PIH1D3*.

IV- Matériels et méthodes

IV.1. Matériel : cellules épithéliales nasales humaines (CENH)

En dehors de l'ADN sanguin des patients étudiés, j'ai été amenée à utiliser pour mon travail de thèse des cellules épithéliales nasales humaines (CENH), étudiées *ex vivo* ou *in vitro* en cultures primaires, provenant des patients ou d'individus contrôles.

Les CENH de patients sont récoltées à partir de brossages des voies aériennes qui fournissent une quantité limitée de cellules pouvant être étudiées *ex vivo*. Ces CENH peuvent néanmoins être étudiées *in vitro* après une mise en culture en ALI qui permet d'obtenir davantage de matériel cellulaire. Des cultures ALI de sujets contrôles non DCP sont également réalisées à partir de déchets opératoires de polyposes nasosinusiennes (PNS) primitives nécessitant une intervention chirurgicale.

Pour les cultures primaires de CENH en ALI, les cellules contrôles issues des déchets opératoires sont d'abord dissociées par la pronase à 4°C (12h) avant d'êtreensemencées en milieu Pneumacult-EXP (StemCell) dans des flasques préalablement coatées au collagène. Les cellules de patients issues de brossage nasal sont quant à elles directementensemencées dans les flasques coatées au collagène dans ce même milieu Pneumacult-EXP. Une fois confluentes, les cellules basales sont dissociées avec de faibles concentrations de trypsine (0,5X) afin de maintenir la présence d'amas cellulaires. Les amas sont alors répartis dans des inserts (Corning) préalablement coatés au collagène, et dont les compartiments inférieurs et supérieurs sont remplis de milieu Pneumacult-EXP. Lorsque les cellules basales atteignent la confluence, le milieu du compartiment inférieur de l'insert est remplacé par du milieu Pneumacult-ALI (StemCell) tandis que le milieu présent dans l'insert au-dessus des cellules est retiré afin de laisser les cellules au contact de l'air. L'interface air-liquide est maintenue pendant environ trois semaines pour permettre la différenciation *in vitro* des cellules basales en cellules à mucus ou en cellules multiciliées (cf I.5.4. Modèles cellulaires).

IV.2. Principales méthodes d'étude fonctionnelle

Différentes analyses peuvent être menées à partir des CENH afin de préciser la fonction de leurs cils (vidéomicroscopie haute vitesse), leur ultrastructure (microscopie électronique), mais aussi l'expression de protéines (immunofluorescence, western blot) et de transcrits (RT-PCR, RT-qPCR).

La **vidéomicroscopie haute vitesse** (HSVM) permet d'étudier le battement ciliaire et de détecter la proportion de cellules ciliées immobiles, mobiles ou dyskinétiques (battement altéré), mais aussi de mesurer les caractéristiques du battement (fréquence, angle de battement, distance parcourue par la pointe du cil).

La **microscopie électronique** (ME) sur coupe transversale de cil permet d'analyser l'ultrastructure de l'axonème pour détecter d'éventuelles anomalies structurales (absence des BDE, des deux BDs, du complexe central..) et de déterminer le pourcentage de cils anormaux. En coupe longitudinale, cette technique permet de visualiser les corpuscules basaux et de détecter des défauts de ciliogenèse (ex : défaut de migration des corpuscules basaux).

L'analyse par **immunofluorescence** (IF) consiste à marquer par un anticorps spécifique une ou plusieurs protéines d'intérêt à l'échelle cellulaire. Elle permet de visualiser la localisation précise d'une protéine dans le cil ou dans le cytoplasme des cellules ciliées et, en cas d'anomalies, d'observer sa diminution ou sa localisation anormale. Le marquage peut directement cibler la protéine impliquée dans la DCP. Par exemple, l'immunomarquage de DNAH11, chaîne lourde des BDE localisée de façon spécifique à la partie proximale des cils respiratoires, permet de visualiser la présence de la protéine exclusivement à la base de l'axonème, et son absence en cas de défaut moléculaire du gène *DNAH11* affectant son expression protéique.

Toutefois le marquage peut aussi cibler des protéines indirectement impactées par le défaut d'une autre protéine. C'est le cas des mutations dans des gènes d'assemblage des deux BDs qui conduisent à la perte de marquage des composants des BDE (e.g. DNAH5, DNAI1) et des BDI (e.g. DNALI1) au sein du cil.

L'analyse de l'expression des protéines, directement ou indirectement impliquées dans les DCP, peut également être effectuée dans le lysat des CENH par **western blot** (WB), technique permettant de détecter une protéine par immunomarquage après l'avoir fait migrer sur un gel d'acrylamide qui sépare les protéines selon leur poids moléculaire. Cette technique permet notamment d'observer la disparition ou la diminution de l'expression d'une protéine, mais aussi de visualiser des isoformes de différents poids moléculaires ou encore d'éventuelles protéines tronquées en cas d'anomalie.

Enfin, l'expression des ARNm, extraits de CENH de contrôles ou de patients, peut être étudiée par **transcription inverse** (RT, *reverse transcription*). Cette méthode permet de transcrire l'ARNm en ADN complémentaire (ADNc) pouvant ensuite être analysé de façon qualitative par dépôt sur gel d'agarose après amplification (RT-PCR) afin d'observer par exemple la présence de diverses isoformes, ou de façon quantitative par RT-qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) qui permet d'évaluer l'expression des transcrits.

V- Résultats

V.1. *TTC12*, nouveau gène de DCP, code une protéine d'assemblage des BDs dont la fonction diffère entre flagelles et cils respiratoires

V.1.1. Introduction

Dans le cadre de la recherche de nouveaux gènes responsables de DCP avec absence des deux BDs, 4 mutations bi-alléliques ont été identifiées au laboratoire chez 4 patients indépendants dans le gène *TTC12* qui code une protéine cytoplasmique. Parmi ces patients, deux hommes adultes étaient atteints d'infertilité masculine due à une asthénospermie (défaut de mobilité des flagelles). L'ultrastructure des flagelles de leurs spermatozoïdes étudiés en ME avait montré une absence des deux BDs. Ces patients présentaient des symptômes respiratoires relativement discrets.

De façon intéressante, des mutations de *TTC12* ont également été identifiées chez une femme et un enfant de sexe masculin pour lesquels l'analyse de l'ultrastructure des cils respiratoire en ME révélait une altération de la structure distincte de celle des spermatozoïdes des deux hommes adultes : une absence de BDI avec légère désorganisation des microtubules périphériques.

Ce premier travail m'a permis de mieux caractériser la protéine *TTC12*, son rôle et les conséquences de son défaut dans les cils et les flagelles afin de mieux comprendre les différences observées entre ces deux organelles.

Pour ce travail, j'ai eu accès aux cellules nasales de trois patients (un homme adulte, la femme et l'enfant) que j'ai pu mettre en culture en ALI afin de réaliser des analyses approfondies des cils respiratoires (VMHV, ME, IF, et WB). Nous avons confirmé que chez ces trois patients, les CENH présentaient une absence des BDI qui contrastait avec l'absence des BDE et des BDI observée dans le flagelle des spermatozoïdes d'un homme adulte. J'ai ensuite eu accès aux spermatozoïdes de ce sujet afin de réaliser des IF qui ont confirmé le phénotype d'absence des deux BDs visualisé en ME.

Dans le cadre d'une collaboration avec Anne-Marie Tassin (I2BC, CRNS, Université Paris-Saclay), nous avons ensuite déplété *TTC12 in vivo* dans le modèle *Paramecium tetraurelia*. Cette approche a précisé la fonction de la protéine codée par ce gène (analyse de la vitesse de nage, *rescue* de la nage par expression de *TTC12*, IF, WB, ME). Chez ce protiste, le défaut de *TTC12* reproduisait le phénotype observé dans le flagelle des spermatozoïdes humains (absence des deux BDs).

Nous avons alors entrepris d'étudier l'effet de l'inactivation de *TTC12* dans un modèle plus physiologique, les cils respiratoires humains en culture. J'ai alors développé au laboratoire la technique d'inactivation de gène par CRISPR-Cas9 dans les CENH en culture ALI. Cette technique basée sur la transduction lentivirale nécessite de travailler sur plusieurs flasques de cellules à 50% de

confluence (en cours de division). Pour cela, j'ai tout d'abord mis au point les conditions de culture et d'infection nécessaires pour que les cellules basales supportent, d'une part un passage supplémentaire, et d'autre part l'infection lentivirale, avant leur mise en insert, tout en m'assurant de n'avoir aucun impact sur leur différenciation en cellules ciliées en ALI. Une fois ces conditions déterminées, les cellules basales issues d'individus non-DCP, ont pu être infectées au stade d'expansion sur flasque avant d'être ensemencées en insert submergé pour une nouvelle étape d'expansion au cours de laquelle les cellules transduites sont sélectionnées par la puromycine. A confluence, les cellules survivantes (transduites) sont mises en ALI où la sélection par la puromycine continue jusqu'à l'obtention d'un épithélium différencié (**Figure 32**).

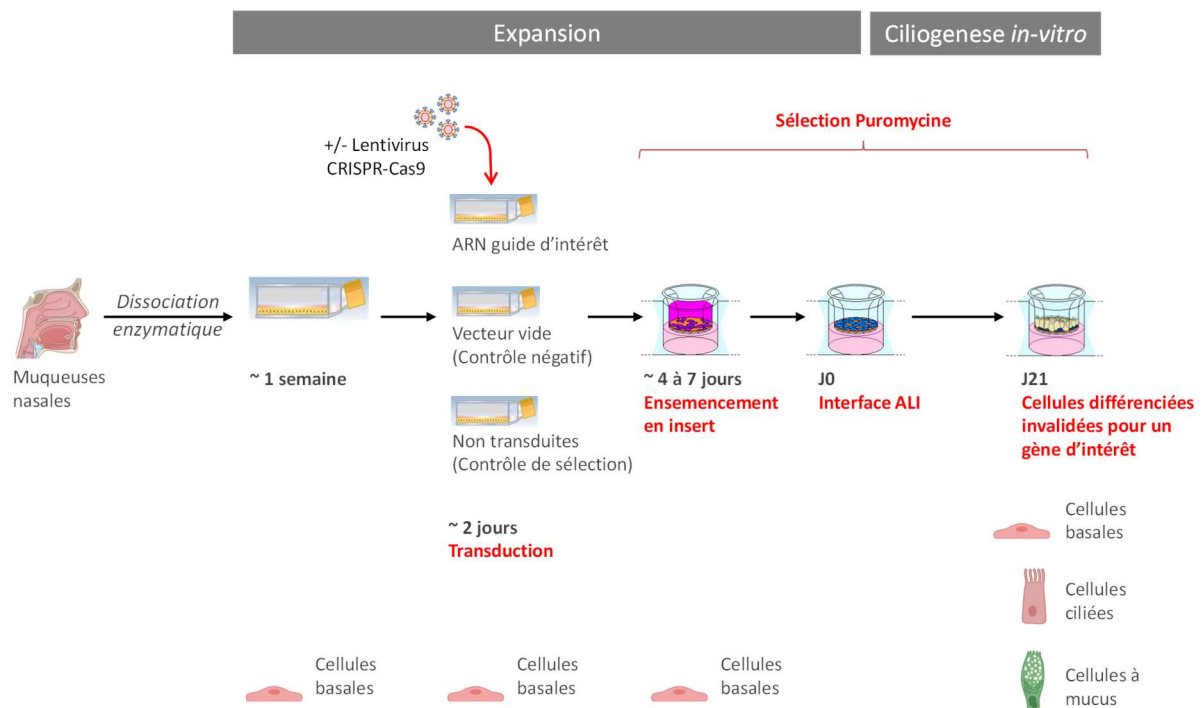


Figure 32. Méthode pour l'inactivation de gène par CRISPR-Cas9 dans des CENH en interface ALI.

Par l'inactivation par CRISPR-Cas9 de *TTC12* dans les CENH, nous avons reproduit le phénotype obtenu dans les cils respiratoires des patients (absence des BDI). Des analyses par immunofluorescence nous ont également permis de mettre en évidence dans ce modèle, comme chez les patients, que le défaut des BDI des cils respiratoires était restreint à certains sous-type de BDI. Ces sous-types de BDI affectés par le défaut de *TTC12* dans les cellules respiratoires se sont avérés différents des sous-types de BDI affectés dans le flagelle des spermatozoïdes de patients porteurs de mutations dans *TTC12*.

Cette étude a d'une part permis d'identifier *TTC12* comme nouveau gène responsable de DCP codant pour un nouvel acteur de l'assemblage cytoplasmique des bras de dynéines. Elle a en outre démontré pour la première fois l'existence d'une absence isolée des BDI dans les cellules respiratoires, indiquant que le mécanisme de leur assemblage et/ou de leur transport présente des différences avec celui des BDE. Enfin, elle a permis de révéler l'existence de mécanismes d'assemblage différents entre cils mobiles et flagelles chez l'Homme.

Ces résultats expliquent la différence observée entre l'atteinte marquée de la fertilité due aux spermatozoïdes totalement immobiles avec absence des deux BDs chez les patients masculins, et l'atteinte modérée sur le plan respiratoire en raison de la persistance d'un battement ciliaire dans les cellules respiratoires dont les cils présentent seulement une absence de BDI.

Par ailleurs, le développement et la validation du modèle de CENH différenciées *in vitro* en cellules ciliées après une invalidation de gène par CRISPR-Cas9, a ouvert de nouvelles perspectives pour l'étude des protéines impliquées dans la ciliogenèse et de la physiopathologie des maladies touchant l'épithélium respiratoire. Plusieurs projets basés sur cette approche physiologique ont débuté au laboratoire.

V.1.2. Article 1

TTC12 Loss-of-Function Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia and Unveil Distinct Dynein Assembly Mechanisms in Motile Cilia Versus Flagella.

Thomas L, Bouhouche K, Whitfield M, Thouvenin G, Coste A, Louis B, Szymanski C, Bequignon E, Papon JF, Castelli M, Lemullois M, Dhalluin X, Drouin-Garraud V, Montantin G, Tissier S, Duquesnoy P, Copin B, Dastot F, Couvet S, Barbotin AL, Faucon C, Honore I, Maitre B, Beydon N, Tamalet A, Rives N, Koll F, Escudier E, Tassin AM, Touré A, Mitchell V, Amselem S, Legendre M.

Publié dans : *Am J Hum Genet.* 2020 Feb 6;106(2):153-169. doi: 10.1016/j.ajhg.2019.12.010.
PMID: 31978331

TTC12 Loss-of-Function Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia and Unveil Distinct Dynein Assembly Mechanisms in Motile Cilia Versus Flagella

Lucie Thomas,¹ Khaled Bouhouche,^{2,19} Marjorie Whitfield,^{3,19} Guillaume Thouvenin,^{4,5} Andre Coste,^{6,7} Bruno Louis,⁷ Claire Szymanski,⁸ Emilie Bequignon,^{6,7} Jean-François Papon,^{7,9} Manon Castelli,² Michel Lemullois,² Xavier Dhalluin,¹⁰ Valérie Drouin-Garraud,¹¹ Guy Montantin,¹² Sylvie Tissier,¹² Philippe Duquesnoy,¹ Bruno Copin,¹² Florence Dastot,¹² Sandrine Couvet,¹ Anne-Laure Barbotin,^{13,14} Catherine Faucon,¹⁵ Isabelle Honore,¹⁶ Bernard Maitre,¹⁷ Nicole Beydon,⁴ Aline Tamalet,⁴ Nathalie Rives,¹⁸ France Koll,² Estelle Escudier,^{1,12} Anne-Marie Tassin,^{2,20} Aminata Touré,^{3,20,*} Valérie Mitchell,^{13,14,20} Serge Amselem,^{1,12,20,*} and Marie Legendre^{1,12,20}

Cilia and flagella are evolutionarily conserved organelles whose motility relies on the outer and inner dynein arm complexes (ODAs and IDAs). Defects in ODAs and IDAs result in primary ciliary dyskinesia (PCD), a disease characterized by recurrent airway infections and male infertility. PCD mutations in assembly factors have been shown to cause a combined ODA-IDA defect, affecting both cilia and flagella. We identified four loss-of-function mutations in *TTC12*, which encodes a cytoplasmic protein, in four independent families in which affected individuals displayed a peculiar PCD phenotype characterized by the absence of ODAs and IDAs in sperm flagella, contrasting with the absence of only IDAs in respiratory cilia. Analyses of both primary cells from individuals carrying *TTC12* mutations and human differentiated airway cells invalidated for *TTC12* by a CRISPR-Cas9 approach revealed an IDA defect restricted to a subset of single-headed IDAs that are different in flagella and cilia, whereas *TTC12* depletion in the ciliate *Paramecium tetraurelia* recapitulated the sperm phenotype. Overall, our study, which identifies *TTC12* as a gene involved in PCD, unveils distinct dynein assembly mechanisms in human motile cilia versus flagella.

Introduction

Primary ciliary dyskinesia (PCD [MIM: 244400]) is a group of clinically and genetically heterogeneous disorders wherein dysfunction of motile cilia leads to impaired mucociliary clearance and early recurrent airway infections. About one person in 10,000 individuals is affected,¹ and given the key role of motile cilia in the establishment of left-right asymmetry during embryogenesis,² nearly 50% of those individuals display *situs inversus* and have Kartagener syndrome. In addition, because the microtubule-based structure of motile cilia, the axoneme, is close to that of

sperm flagella, most affected male individuals are also infertile. The axoneme consists of nine peripheral outer microtubule doublets circularly arranged around two central microtubules surrounded by a central sheath (“9+2” pattern). Attached all along the microtubule length, the outer dynein arms (ODAs), and the inner dynein arms (IDAs) are multiprotein complexes that carry an ATPase activity and provide the sliding force for motility.

In humans, ODAs are composed of two axonemal dynein heavy chains (HCs), namely the β and γ chains, which are attached to a large intermediate chain/light chain complex (IC/LC). Two types of ODAs have been

¹Sorbonne Université, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U933, Hôpital Armand-Trousseau, Paris 75012, France; ²Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Centre à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette 91198, France; ³Institut Cochin, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1016), Centre National de la Recherche Scientifique UMR8104, Université Paris Descartes, Paris 75014, France; ⁴Unité Fonctionnelle d’Exploration Fonctionnelle Respiratoire – Somnologie, Service de Physiologie et Explorations Fonctionnelles, Centre National de Référence des Maladies Respiratoires Rares, Hôpital Armand-Trousseau, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris 75012, France; ⁵Centre de Recherche Saint-Antoine, Sorbonne Universités, Paris 75012, France; ⁶Hôpital Henri Mondor et Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Service d’Oto-Rhino-Laryngologie et de Chirurgie Cervico-Faciale, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Créteil 94010, France; ⁷Faculté de Médecine, Université Paris-Est, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U955), Centre National de la Recherche Scientifique ERL7240, Hôpital Henri Mondor, Créteil 94010, France; ⁸Service d’Oto-Rhino-Laryngologie et de Chirurgie Cervico-Faciale, Hôpital Huriez, Centre Hospitalier Universitaire Lille, Lille 59000, France; ⁹Service d’Oto-Rhino-Laryngologie et de Chirurgie Cervico-Faciale, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Le Kremlin-Bicêtre 94275, France; ¹⁰Services de Pneumologie et Oncologie Thoracique et d’endoscopie respiratoire, Hôpital Calmette, Centre Hospitalier Universitaire Lille, Lille 59000, France; ¹¹Service de Génétique Médicale, Hôpital Charles Nicolle, Centre Hospitalier Universitaire-Hôpitaux de Rouen, Rouen 76000, France; ¹²Département de Génétique Médicale, Hôpital Armand-Trousseau, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris 75012, France; ¹³Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-Cecos, Hôpital Jeanne de Flandre, Centre Hospitalier Universitaire Lille, Lille 59000, France; ¹⁴EA4308: Gametogenesis and Gamete Quality, Université de Lille, Lille 59000, France; ¹⁵Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Laboratoire de Microscopie Électronique, Service d’Anatomopathologie, Créteil 94010, France; ¹⁶Service de Pneumologie et Oncologie Thoracique, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris 75014, France; ¹⁷Service de Pneumologie, Hôpital Henri Mondor et Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Créteil 94010, France; ¹⁸Department of Reproductive Biology-Centre d’Étude et de Conservation du Sperme, Normandie Université, UNIROUEN, EA 4308 “Gametogenesis and Gamete Quality,” Rouen University Hospital, Rouen 76000, France

¹⁹These authors contributed equally to this work

²⁰These authors contributed equally to this work

*Correspondence: aminata.toure@inserm.fr (A.T.), serge.amselem@inserm.fr (S.A.)

<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.12.010>

© 2019 American Society of Human Genetics.



described in cilia: the type 1 ODAs are located at the proximal part of the cilium and contain DNAH5 (γ chain) associated with DNAH11 (β chain), and the type 2 ODAs are located at the distal part of the cilium and contain DNAH5 (γ chain) associated with DNAH9 (β -chain). It is worth noting that recent studies performed in humans revealed that the ODA composition of spermatozoa differs from that found in cilia:³ in spermatozoa, the γ and β chains consist of DNAH8 and DNAH17, respectively, which are both specifically expressed in sperm cells. As for IDAs, their exact structure and composition is virtually unknown in humans. Most of the available knowledge was provided by studies in the flagellated alga *Chlamydomonas reinhardtii*, where seven IDA subspecies have been identified. Six distinct single-headed IDA subspecies (called IDA a, b, c, d, e, and g), each including only one HC, have been characterized, and one dimeric IDA complex (called IDA f or IDA-I1), which contains two HCs, has been identified.^{4–7} There is growing interest in identifying the key players involved in the process of ODA and IDA assembly and transport. In this regard, one of the most frequent ciliary ultrastructural defects found in PCD is the absence of both dynein arms (DAs)⁸ as a result of mutations in genes encoding proteins involved in ODA and IDA assembly, docking, and transport (i.e., such genes include *DNAAF2/KTU*⁹ [MIM: 612517], *DNAAF1/LRRC50*¹⁰ [MIM: 613190], *DNAAF3*¹¹ [MIM: 614566], *CCDC103*¹² [MIM: 614677], *DNAAF5/HEATR2*¹³ [MIM: 614864], *LRRC6*¹⁴ [MIM: 614930], *DNAAF4/DYX1C1*¹⁵ [MIM: 608709], *ZMYND10*¹⁶ [MIM: 607070], *SPAG1*¹⁷ [MIM: 603395], *CFAP298/C21orf59*¹⁸ [MIM: 615494], *PIH1D3*¹⁹ [MIM: 300933], and *CFAP300/C11orf70*²⁰ [MIM: 618058]).

Although several of these genes have been renamed with the acronym DNAAF, which stands for dynein axonemal assembly factor, their precise role in the assembly and/or transport machinery is not known. As shown recently, multiciliated cells contain cytoplasmic liquid-like organelles that concentrate DNAAFs with dynein chains and chaperones.²¹ To date, very few investigations have been performed on spermatozoa from PCD-affected individuals; in all cases, the sperm ultrastructure defects revealed by transmission electron microscopy (TEM) were always found to be identical to those reported in the cilia. In this regard, the recent observation of differences in the protein composition of ODAs between human cilia and sperm flagella³ raises the question as to whether the assembly and transport mechanisms of ODA and IDA components are conserved between human cilia and flagella.

In the present study, we identified independent families in which affected individuals displayed a peculiar PCD phenotype characterized by the absence of IDAs in respiratory cilia; this phenotype was in contrast with the absence of both ODAs and IDAs in sperm. Such an unusual observation prompted us to search for the molecular basis of the PCD phenotype in those individuals and to decipher the consequences of the identified molecular defects on cilia and flagella assembly by developing an *in vivo* model

in the ciliate *Paramecium tetraurelia* and a CRISPR-Cas9-mediated genome-editing approach in human primary airway epithelial cells (AECs).

Material and Methods

Affected Individuals

We obtained written informed consent from all affected individuals and/or their parents according to protocols approved by the Comité de Protection des Personnes (CPP) Ile de France III (CPP02748) and the institutional review board of the French Institute of Health and Medical Research (CEEI-IRB: no. 15-259).

Genetic Analyses

Identification of *TTC12* (GenBank: NM_017868.4) sequence variations was performed from genomic blood DNA, either by whole-exome sequencing (WES) or by parallel sequencing with a custom targeted-capture panel. More precisely, in individual DCP791, WES was performed with the Agilent SureSelect V5 target enrichment system on a HiSeq sequencing machine (Illumina). In individuals DCP153 and DCP1606, WES was performed with the SeqCap EZ MedExome target-enrichment kit on a NextSeq sequencing machine (Illumina). The DNA of individual 18GM00157 was analyzed on a MiSeq sequencer (Illumina) with a custom targeted-capture panel (SeqCap EZ Choice, Roche Diagnostics) that encompasses the 45 genes involved in PCD and 250 candidate genes for PCD. The libraries were prepared according to the manufacturer's instructions. Data were analyzed through an in-house double pipeline based on Bowtie2 and BWA tools. Reads were visualized with the Integrative Genomics Viewer (IGV, Broad Institute). Copy-number variation was analyzed via a depth-ratio comparison between subjects sequenced in the same run, and depth ratios obtained for each of the four individuals were represented on a graph built with GraphPad Prism 5 software.

Sanger sequencing was performed on genomic blood DNA with the BigDye Terminator v3.1 system (Thermo Fisher) after PCR amplification with the Go-Taq Green Master Mix (Promega) at an annealing temperature of 60°C and purification with ExoSAP-IT(USB), according to the manufacturer's instructions. Fragments were analyzed on a 3730XL device (Thermo Fisher) after Sephadex G-50 Superfine purification (GE Healthcare). Amplification and sequencing primers are listed in [Table S1](#). Sequences were analyzed with SeqScape software (Thermo Fisher).

TEM Analysis of Ciliary and Flagella Ultrastructure

AECs obtained from nasal or bronchial biopsies were fixed in 2.5% glutaraldehyde to be processed for TEM as previously described.²² Ciliary ultrastructural results were quantified as a percentage of abnormal cilia among the total number of analyzed cilia. Semen was fixed in 2.0% v/v glutaraldehyde in phosphate buffer, washed for 15 min in fresh buffer containing 4% w/v sucrose, and embedded in 2% agar. Post-fixation lasted 1 h in 1% w/v osmic acid in phosphate buffer. After dehydration in a graded series of ethanol, small pieces of agar containing sperm cells were embedded in Epon resin (Polysciences). Sections were cut on a Reichert OmU2 ultramicrotome (Reichert-Jung AG) with a diamond knife. 70 nm sections were collected on nickel grids and stained with uranyl acetate (2% in 70% ethanol, 20 min) and Reynolds lead citrate (10 min) and examined with a Zeiss transmission

electron microscope 902 (Leo). Images were acquired with a Gatan Orius SC1000 CCD camera (Gatan France).

Immunoblotting

AECs obtained by airway brushing from individuals 18GM00157 and DCP1606 and control individuals, as well as spermatozoa from a control donor, were suspended in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, and Complete Protease Inhibitor Cocktail [Roche Diagnostics]). Lysates were sonicated and cleared by 10 min of centrifugation at 1,000 × g at 4°C.

Cell lysates were loaded on 10% SDS-PAGE; proteins were then transferred for 2 h to a PVDF membrane, and analyzed via immunoblotting with TTC12 antibody (Santa Cruz sc-390229, 1/200), DNAJB13 antibody (HPA052465, 1/300), or DNAI1 antibody (HPA021649, 1/400), all incubated overnight at 4°C in PBS containing 0.1% Tween 20 and 5% milk. The secondary antibody (rabbit-HRP, SIGMA, A0545) was incubated for 1 h at room temperature at a final dilution of 1:5000 in PBS containing 0.1% Tween 20 and 5% milk. Proteins were detected with Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE healthcare) according to the manufacturer's recommendations.

Immunofluorescence Analyses on AECs

All antibodies are listed in Table S2. AECs obtained via nasal brushing from individuals 18GM00157, DCP1606, and control individuals (i.e., individuals in whom the diagnosis of PCD was excluded based on the absence of sinopulmonary symptoms and of normal values of nasal nitric oxide) were suspended in FertiCult IVF medium. Samples were cytocentrifugated onto glass slides, air dried, and directly used for immunostaining. Cells were first fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature, washed three times with PBS++ (i.e., PBS supplemented with 0.49 mM MgCl₂ and 0.9 mM CaCl₂), incubated for 10 min with PBS++ 50 mM NH₄Cl, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min. Then, cells were incubated for 2 h at room temperature with primary antibodies before being revealed by secondary antibodies at room temperature for 1 h. All antibodies were incubated in PBS++ 1% BSA. Finally, cells were washed three times with PBS++ and mounted in ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI (Cell Signaling #8961) so that nuclei would be stained, and images were taken with an ECLIPSE 80i microscope (Nikon) with a Retiga-2000R camera (QImaging).

Immunofluorescence Analyses of Human Spermatozoa

Study participants provided semen samples via masturbation after a period of 2–7 days of sexual abstinence, evaluated according to World Health Organization (WHO) guidelines,²³ and then frozen until further analysis. 10 µL of frozen semen samples were spread onto a Superfrost Plus slide (Menzel Glasbearbeitungswerk) and fixed by incubation with 4% paraformaldehyde for 10 min. The slides were incubated 20 min at 95°C in citrate buffer (H-3300, VectorLabs), treated with 0.2% Triton in PBS for permeabilization, and then blocked by incubation in 1% BSA for 1 h. The slides were then incubated with primary antibodies overnight at 4°C and then with secondary antibodies for 1 h at room temperature. The slides were mounted in Vectashield medium (Vector Laboratories) supplemented with 0.5 mg/mL DAPI and were subsequently analyzed with a Zeiss Axiophot epifluorescence microscope. Digital images were acquired with a cooled charge-coupled device (CCD) camera (Hamamatsu) under identical instrument settings with MetaMorph software (Molecular Devices).

Paramecium Experiments

All experiments were carried out with entirely homozygous mutant strains: 7S strain for feeding experiments and nd7, which carries a recessive monogenic mutation blocking trichocyst discharge,²⁴ for Paramecium transformation.

Paramecium Strain and Cultivation

Cells were grown at 27°C in a wheat grass powder (BHB from GSE Vertrieb GmbH) infusion medium bacterized with *Klebsiella pneumoniae* and supplemented with 0.8 µg/mL β-sitosterol according to standard procedures.²⁵

Paramecium Gene-Knockdown Experiments

We used the feeding procedure previously described to achieve RNAi gene silencing.²⁶ We obtained the plasmids used in RNAi silencing experiments by cloning PCR products, which were amplified from the coding region of each gene (Table S3), in L4440 vector²⁷ via Gibson technology (Gibson DJ 2009). These plasmids were then transformed in an HT115 DE3 *Escherichia coli* strain to produce T7Pol-driven dsRNA as previously described.²⁶

Microinjection of a Transgene Expressing a GFP-Tagged TTC12a Protein

To create a version of *TTC12a* that would be resistant to RNAi silencing, we replaced the sequence from nucleotide 471 to 745 (corresponding to dsRNA sequence) of the *TTC12a* coding region *in vitro* by a modified synthetic DNA sequence coding for the same amino acid sequence (Figure S1). The GFP coding sequence was fused at the 3' end of WT or *TTC12a* RNAi-resistant versions and cloned (via Gibson technology [Gibson DJ 2009]) in the XhoI site of the pPXV-GFP vector under the control of the constitutive regulators of the *Paramecium* calmodulin gene.²⁸ Twelve nucleotides coding for four glycine amino acids were introduced between the *TTC12a*-coding region and the GFP-coding sequence. The plasmid was linearized by SfiI digestion and microinjected along with ND7-complementing plasmid into the macronucleus of nd7-1 mutant cells unable to discharge their trichocysts.²⁴ Transformants were first screened for their ability to discharge trichocysts, and if they had this ability, they were further analyzed. Microinjection was performed under an inverted Nikon phase-contrast microscope via a Narishige micromanipulation device and an Eppendorf air pressure microinjector.

Paramecium TEM Analysis

For ultrastructural observations, paramecia were permeabilized in PHEM buffer (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, and 2 mM MgCl₂, adjusted to pH 6.9 with NaOH) with 1% Triton X-100 for 1 min, rinsed in PHEM buffer, and fixed in 1% (v/v) tannic acid and 1% (v/v) glutaraldehyde in PHEM buffer for 30 min. Cells were then rinsed in PHEM and 0.05 M cacodylate buffers before being postfixed in 1% OsO₄ (v/v) 0.05 M cacodylate buffer at pH 7.4 for 30 min. After being rinsed, cells were embedded into 2% agarose. Agar blocks were then dehydrated in graded series of ethanol and propylene oxide and embedded in Epon. Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The sections were examined with a Jeol transmission electron microscope 1400 (at 120 kV). The number of ODAs and IDAs were counted in about 140 cilia cross-sections obtained from TTC12-knocked-down or control cells.

Paramecium Swimming Speed and Cell Trajectory

We analyzed paramecia swimming behavior of TTC12-depleted and control cells by transferring 8–10 paramecia into a drop of conditioned BHB medium and imaging them for 10 s every 0.3 s to assess the swimming pattern under dark-field microscopy by using MetaVue software. Image analysis and the measurement of

Table 1. Phenotype of PCD-Affected Individuals with Identified <i>TTC12</i> Mutations											
Individuals (Origin)	Known Consanguinity	Gender at Diagnosis	Airway Disease		Fertility	Nasal NO (nL/min)	TEM Defect (%)	Sperm	Allele 1	Allele 2	
			SI	Lower							Upper
DCP791 (Turkey)	yes	male (24 years)	no	minima	sinusitis	infertility	low ^a	NA	IDAs+ ODAs (100%)	c.1614+3A>T (p.?)	c.1614+3A>T (p.?)
18GM00157 (Morocco)	yes	female (50 years)	no	asthma bronchiectasis	rhino-sinusitis	not tested	37.6	IDAs (100%) disorganization (22%)	NR	c.1678C>T (p.Arg560*)	c.1678C>T (p.Arg560*)
DCP1606 (Tunisia)	yes	male (11 years)	no	NNRD, bronchiectasis, pneumopathies	rhino-sinusitis otitis	NR	146	IDAs (100%) disorganization (24%)	NR	c.607del (p.Ile203*)	c.607del (p.Ile203*)
DCP153 (Europe)	no	male (33 years)	no	bronchitis	rhino-sinusitis	Infertility	186	IDAs (100%) disorganization (2%)	IDAs+ODAs (100%)	c.1700T>G (p.Met567Arg)	c.1700T>G (p.Met567Arg)

Abbreviations are as follows: NNRD, neonatal respiratory distress; NR, not relevant; NO, nitric oxide; NA, not available; TEM, transmission electron microscopy; IDAs, inner dynein arms, and ODAs, outer dynein arms. PCD nasal NO < 77 nL/min.⁸

^aExact value not available.

swimming velocity were then performed with the ImageJ software.

Paramecium Fluorescence-Microscopy Analysis

Immunofluorescence (IF) was performed as follows: paramecia were fixed in 2% paraformaldehyde in PHEM buffer for 15 min. Cells were then permeabilized for 15 min in 1% Triton X-100 in PHEM and washed three times in PBS supplemented with 3% BSA. Immunostaining was performed with a polyglutamylated tubulin antibody (kindly provided by Carsten Janke, 1/500) as previously described.²⁹ Cells were observed with a confocal Leica SP8 microscope, and image stacks were processed with the ImageJ and Photoshop softwares.

Paramecium Deciliation, Protein Extraction, and Immunoblot

Cilia were purified³⁰ and recovered by centrifugation at 28,000 × g for 30 min, and protein was directly extracted in SDS-Laemmli buffer. Total protein content from paramecia or paramecia cell bodies (deciliated paramecia) was directly boiled in 10% SDS, followed by dilution in 2XSDS Laemmli buffer. Proteins were then separated on SDS-PAGE, blotted on a nylon membrane, and probed with an anti-GFP antibody (1:1,000, Interchim).

Air-Liquid Interface Culture and Infection

AECs obtained either from surgical material from non PCD-affected individuals suffering from nasal polyps requiring surgery or from nasal brushing of PCD-affected individuals were cultured at the air-liquid interface (ALI) as previously described.³¹ In brief, epithelial cells were seeded in 12-well collagen IV-coated transwell inserts (Costar, coming) and cultured in PneumaCult-Exp Plus medium (#05040, Stem Cell) until confluence was reached. The medium was then removed from the apical surface and replaced in the basal chamber by the PneumaCult-ALI medium (#5001, Stem Cell) so that cells would be exposed to an air-liquid interface that promoted ciliogenesis during the following 21 days. Lentiviral transduction of AECs was performed as previously described.³² In brief, viral particles together with a Rho-associated protein kinase inhibitor were added to the medium during the expansion phase before a cell-selection step with the use of puromycin (2 μg/mL). Resistant cells were then cultured at the ALI as described above. Cells infected with an empty vector were used as a control.

Results

Next-Generation Sequencing-Based Approaches Identify Homozygous Loss-of-Function *TTC12* Mutations in Four Independent PCD-Affected Individuals with Distinct Ciliary and Flagellar DA Defects

To uncover novel genetic causes responsible for PCD, we used a next-generation sequencing (NGS)-based approach in four independent probands with a PCD phenotype that was not explained by mutations in genes known to be involved in PCD. As summarized in Table 1, individuals DCP791, 18GM00157, and DCP1606 originate from North Africa and were born from a consanguineous union, whereas the fourth individual, DCP153, originates from Europe and has parents with no known consanguinity. All four individuals displayed sinopulmonary symptoms with rhino-sinusitis and had normal *situs* position. Individuals 18GM00157 and DCP1606 also displayed

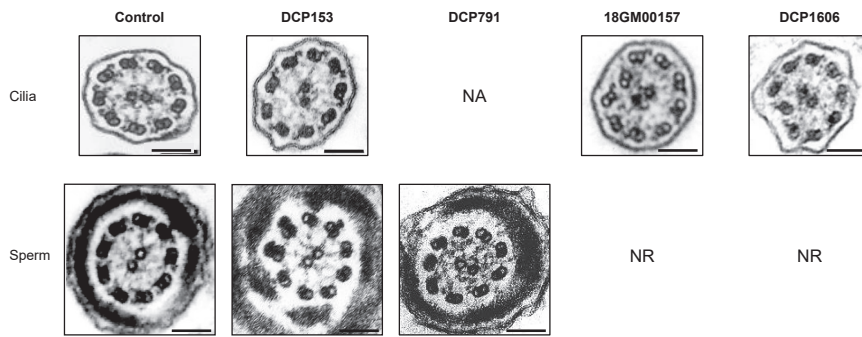


Figure 1. Ciliary and Flagellar Ultrastructural Defects in PCD-Affected Individuals with *TTC12* Mutations

Electron micrographs of cross-sections of ciliary axonemes (upper panel) from a control individual and individuals DCP153, 18GM00157, and DCP1606 are compared to those of cross-sections of sperm flagellar axonemes (lower panel) from a control individual and from the infertile PCD-affected individuals DCP153 and DCP791. In each individual, the ciliary section shows an abnormal configuration with missing IDAs and an associated mild axonemal disorganization in individuals

18GM00157 and DCP1606, but ODAs are clearly present. The flagellar sections show a lack of both IDAs and ODAs. Black scale bars represent 0.1 μm . Abbreviations are as follows: NR, not relevant; NA, not available.

bronchiectasis, and individual DCP1606 suffered from neonatal respiratory distress. Nasal nitric oxide (NO) concentrations were recorded for those four individuals and showed low levels for two of them. High-speed videomicroscopy (HSVM) performed on nasal brushings of three individuals showed variable proportions of immotile cilia (70%, 50%, and 10% in 18GM00157, DCP1606, and DCP153, respectively); a normal beat frequency and moderate beating defects (for the portion of motile cilia) consisting of a reduced beating angle; and a lower distance swept by the cilium tip (Table S1). Representative videos showing immotile and beating cilia are shown in the supplemental data (Videos S1 and S2; S3 and S4; and S5 and S6 for individuals 18GM00157, DCP1606, and DCP153, respectively, and Video S7 for a control individual). TEM analysis of respiratory cilia was performed for individuals DCP153, 18GM00157, and DCP1606 and showed the absence of IDAs associated with some axonemal disorganization (2%, 22%, and 24%, respectively) but also, importantly, the presence of ODAs in all examined cilia (Table 1) (Figure 1).

Among the three male individuals, individual DCP1606 was a child (11 years old), and individuals DCP791 and DCP153 were adults known to be infertile as a result of total asthenozoospermia (Table 2). Surprisingly, TEM analysis of sperm cells from the two infertile individuals revealed the total lack of both IDAs and ODAs, an ultrastructural phenotype clearly different from that observed in cilia from respiratory cells where only IDAs were missing.

NGS analyses led to the identification of homozygous mutations in *TTC12* [MIM: 610732], a gene that has so far not been associated with PCD. *TTC12* is located on chromosome 11 and consists of 22 coding exons (GenBank: NM_017868.4), suggesting a protein of 705 residues (UniProt: Q9H892). Individuals DCP1606 and 18GM00157 were shown to carry the nonsense mutations c.607del (p.Ile203*) and c.1678C>T (p.Arg560*), respectively. Individual DCP791 carried a splice mutation (c.1614+3A>T, p.?) and individual DCP153 was homozygous for the missense mutation c.1700T>G (p.Met567Arg). Two of these mutations, c.1614+3A>T and c.607del, are not reported in gnomAD, and the

c.1678C>T and c.1700T>G mutations are found at very low frequencies: 4×10^{-5} and 6×10^{-5} , respectively (Table S4). The presence of all these *TTC12* mutations was confirmed by Sanger sequencing, as illustrated in Figures S2 and S3. The expected consequences of the identified variants at the protein level are shown in Figure 2.

***TTC12* Is a Cytoplasmic Protein of Ciliated Cells**

TTC12 contains three tetratricopeptide repeat (TPR) domains in its N-terminal part and three armadillo repeat domains (ARM1, ARM2, and ARM3) in its C-terminal part. A TPR domain consists of a motif of ~34 amino acids organized in two antiparallel alpha helices known to mediate protein-protein interactions and the assembly of multiprotein complexes.³⁴ ARM domains, which are approximately 40 amino acids long, have also been implicated in protein-protein interactions through their superhelix structure.³⁵ To date, the biological functions of *TTC12* are unknown. To gain insight into its role, we first checked *TTC12* tissue expression by RT-PCR in AECs and in testis tissue (Figure S4A) with a primer set (located in exons 2 and 22) bracketing the entire coding region (Table S1). Sequencing of the resulting RT-PCR products allowed the identification of the same *TTC12* isoform (GenBank: NM_017868.4) in both samples. As shown by real-time PCR performed with primers located in exons 11 and 12 of *TTC12* (Table S1), a similar expression level of this transcript was found in AEC and testis samples (Figure S4B). The corresponding *TTC12* 75 kDa protein was also easily detectable by immunoblot in both cell types (Figure S4C). We next investigated the subcellular localization of *TTC12* in ciliated cells. Given the absence of available anti-*TTC12* antibodies suitable for IF studies, we performed immunoblot experiments on protein extracts from ciliary or cytoplasmic fractions of cultured AECs. This analysis showed that *TTC12* is virtually exclusively detected in the cytosolic fraction; in contrast, DNAJB13, a component of radial spokes, was mainly detected in the ciliary fraction, as expected (Figure S4D). These results are in line with data from quantitative proteomic analyses, which did not identify *TTC12* in purified preparations of axonemes from human airway cells.³⁶

Table 2. Semen Characteristics of Infertile Individuals with Identified *TTC12* Mutations

Individuals	pH	Volume (ml)	Sperm Count (10 ⁶ /mL)	Total Motility (%)	Progressive Motility (%)	Vitality (%)	Typical Forms (%)	Flagellum Defects				
								Absent	Short	Irregular Caliber	Coiled	Multiple
DCP791	ND	ND	21	0 ^b	0 ^b	75	36	7	0	0	10	0
DCP153	7.9	4.5	81	0 ^b	0 ^b	68	33	2	1	1	6	1
Reference values ^a	7.2	1.5	15	40	32	58	23	5	1	2	17	1

Values are expressed in percent, unless otherwise specified. ND: not determined.

^aAccording to the World Health Organization (WHO) standards²³ and the distribution range of morphologically abnormal spermatozoa observed in fertile individuals.³³

^bAbnormal values.

Overall, the cytoplasmic localization of *TTC12* indicates that this protein is not a structural component of the axoneme but might play a role in the assembly and/or the transport of axonemal components.

Functional Consequences of the Identified *TTC12* Mutations

The nonsense mutations carried by individuals 18GM00157 and DCP1606 might generate truncated proteins lacking the ARM superhelix structure of *TTC12* (Figure 2). Such premature stop codons might also trigger the nonsense-mediated mRNA decay pathway and therefore might lead to the absence of protein. To test these hypotheses, we cultured AECs from individuals 18GM00157 and DCP1606 and from a control individual at the ALI as previously described.³¹ Analysis of total protein extracts by immunoblotting with an antibody raised against the N-terminal part of *TTC12* led to the detection of *TTC12* in the control but not in samples from individuals 18GM00157 and DCP1606 (Figure 3A). These results clearly indicate that the two nonsense mutations identified in individuals 18GM00157 and DCP1606 are associated with *TTC12* loss of function.

As for individual DCP153, he carries a missense variation replacing methionine 567, located in the second ARM domain of *TTC12*, by an arginine residue. Several lines of evidence support the involvement of the p.Met567Arg variation in the PCD phenotype of this individual. First, as mentioned above, this variation is reported in gnomAD at a very low frequency (6×10^{-5}) and only in the heterozygous state (Table S5). Second, it predicts changes in both the polarity and the charge of this amino acid that is highly conserved in mammals. In zebrafish and *Xenopus*, this methionine residue is replaced by a leucine, an amino acid that is also apolar (Figure S5A). In addition, alignments of the well-conserved ARM2 and ARM3 domains of *TTC12* with the ten ARM domains found in ARMC4—also involved in PCD³⁷—unveil (1) that the methionine found in ARM2 at position 567 also corresponds to a methionine in the ARM3 domain (Met610) (Figure S5B) and (2) the high conservation among all those ARM domains of a hydro-

phobic residue at a position corresponding to Met567 in *TTC12* (Figure S5C). Third and most importantly, in immunoblot analyses on protein extracts from AECs and from spermatozoa of individual DCP153, who carries the missense mutation in the homozygous state, the amount of *TTC12* was found to be dramatically reduced (Figures 3A and 4B), thereby attesting to the pathogenicity of the p.Met567Arg mutation.

The last individual, DCP791, carries the c.1614+3A>T transversion involving the splice-donor site of *TTC12* intron 18. As predicted by the MaxEntScan webtool, this nucleotide substitution is expected to have a strong impact on the splicing of *TTC12* transcripts (score decreasing from 9.49 to 2.03). In addition, a recent study described a deep neural network that precisely models mRNA splicing from a genomic sequence and accurately predicts the effects of all possible genomic SNVs on splicing.³⁸ On the basis of this dataset, the probability that the *TTC12* c.1614+3A>T mutation alters the intron 17 canonical splice site is 88%. To further confirm the deleterious effect of this mutation on splicing, we generated minigene constructs containing a genomic DNA region spanning exons 17 to 19 of *TTC12*, with or without the A>T transversion. Analysis of the corresponding transcripts in HEK293 cells transfected with those plasmid constructs showed that the mutation induces a complete skipping of exon 18 (Figures S6A and S6B). This in-frame deletion of exon 18 spares the exons encoding the ARM2 and ARM3 domains but, as shown with the NCBI CDD webtool, the prediction of those domains is lost (Figure S6C).

TTC12 Mutations Affect a Subset of Single-Headed IDAs in Respiratory Cilia

To further investigate the function of *TTC12* in respiratory cilia and in sperm flagella, we first used high-resolution IF to compare the localization of different axonemal components in AECs from three individuals (18GM00157, DCP1606, and DCP153) to their localization in controls. We used DNAH5 and DNAI1 as markers of the ODAs; DNAH2 and DNAH10 for the double-headed IDA-I1 complex; RSPH3 and RSPH4a for radial spokes (RSs); GAS8 for

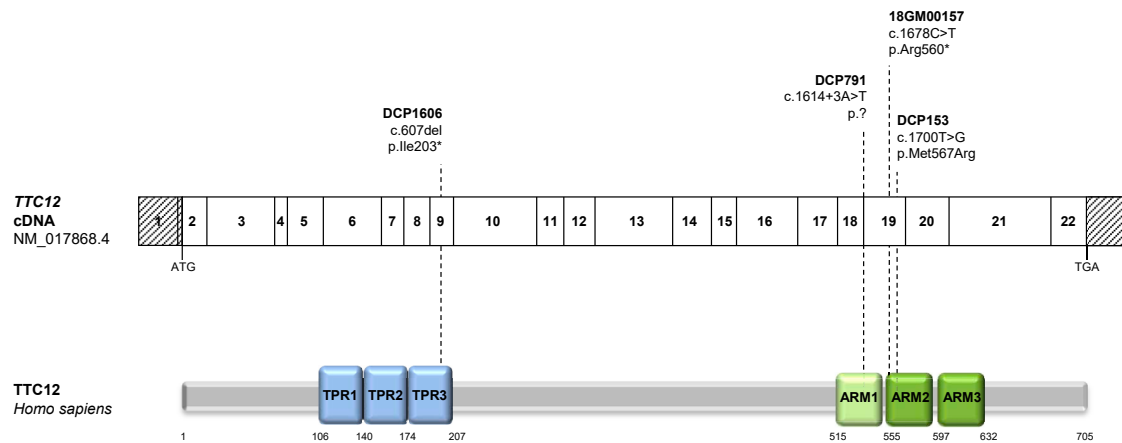


Figure 2. *TTC12* Mutations and Their Putative Impact at the Protein Level in Individuals with PCD

The mutations are shown within the exonic organization of the human *TTC12* cDNA (top) and a domain-organization model of the corresponding protein (bottom) according to the SMART webtool and CDD NCBI database. Abbreviations are as follows: TPR, tetratricopeptide repeat; and ARM, armadillo repeat. The light green box represents a degenerated ARM domain, and the two dark green boxes correspond to typical ARM domains.

the nexin-dynein regulatory complex (N-DRC); and *CCDC40* for the ciliary ruler.³⁹ As proposed by Kollmar,⁴⁰ the single-headed IDA subspecies (a, b, c, d, e, and g) would result from gene duplications followed by the generation of highly divergent N termini and the formation, in *Chlamydomonas* but not in mammals, of chimeric single-headed heavy dynein chains. This model, which relies on thorough phylogenetic analyses, readily explains the fact that the single-headed IDAs a, c, and d bind the light-chain DNALI1 (both in *Chlamydomonas* and in humans), whereas the heavy chains belonging to another subgroup (b, e, and g) bind centrin in *Chlamydomonas*, and in humans, the b and e heavy chains, which are not chimeric, would bind DNALI1. We therefore performed immunostaining with antibodies directed against DNALI1 (corresponding to IDA subspecies a, c, and d and potentially to IDA subspecies b and e), DNAH1 (corresponding to IDA subspecies d), DNAH6 (corresponding to IDA subspecies g), and DNAH12 and DNAH3, both corresponding to other IDA subspecies (a, b, c, or e). We found that, in the respiratory cilia of the three individuals with *TTC12* mutations, the subcellular localization patterns of the markers for ODAs, radial spokes (RSs), the nexin-dynein regulatory complex (N-DRC), and the ciliary ruler were similar to those found in controls (Figure S7). Interestingly with regard to IDAs, although DNAH2 and DNAH10, corresponding to the double-headed IDA-I1, were found to be normal in those same three individuals (Figure S7), all the markers of the single-headed IDA subspecies (i.e., DNALI1, DNAH1, DNAH6, and DNAH12) displayed an abnormal pattern (Figure 3B). DNALI1, DNAH1, and DNAH6 were present at low levels in the very proximal part of the cilia from the three individuals and absent from the rest of the axoneme, whereas DNAH12 was not detectable all along the cilia and was found to accumulate at the subapical part of the cytoplasm of ciliated cells. Overall, in cilia, *TTC12* mutations do not affect ODAs or IDA-I1 but

compromise a single-headed-IDA subset, which comprises DNALI1, DNAH1, DNAH6, and DNAH12. Of note, DNAH3 was not detected in cilia from control individuals (data not shown).

***TTC12* Mutations Affect ODAs and a Distinct Subset of Single-Headed IDAs in Sperm Flagella**

In line with the TEM data, IF analyses in spermatozoa from the infertile PCD-affected individual DCP153 showed that DNAI1 as well as DNAH8 and DNAH17, the two dynein HCs specific to ODAs in sperm flagella,³ were undetectable (Figure 4A), thus clearly confirming that *TTC12* mutations induce a loss of ODAs in sperm cells but not in airway cilia. Because very little information on the IDA subtypes and their HC composition is available in human sperm cells, we analyzed the pattern of all described IDA HCs in humans (except DNAH7 and DNAH14, for which no antibodies are so far suitable for IF). Interestingly, as observed in cilia, markers of the double-headed IDA-I1 complex (i.e., DNAH2 and DNAH10) were found unchanged in individual DCP153. Regarding markers of single-headed IDAs, although the dynein HC DNAH3 (a, b, c, or e) was not detected in control respiratory cilia, it was found along the axoneme of control spermatozoa. Remarkably, this dynein HC was totally absent in sperm from individual DCP153. Additionally, DNAH12 (also corresponding to the single-headed IDA subspecies a, b, c, or e) was detected along the full length of the flagellar axoneme in a control but displayed an expression pattern restricted to the proximal part of the flagella in the affected individual DCP153 (Figure 4A). By contrast, the dynein HCs of the single-headed IDA subspecies d and g (i.e., DNAH1 and DNAH6) displayed a normal expression pattern (Figure S8). As for DNALI1, the light chain associated with the IDA subspecies a, c, and d, it was found to be normally localized along the flagellar axoneme of spermatozoa from the affected individual DCP153; however, the IF

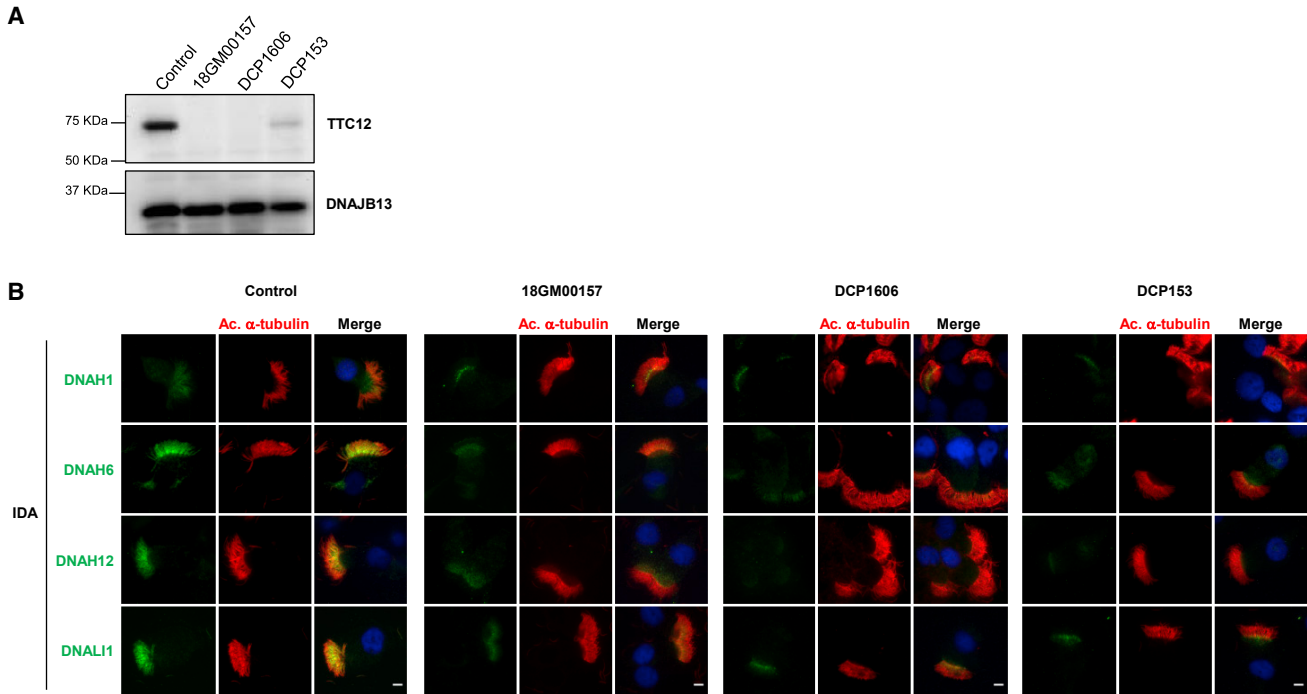


Figure 3. TTC12 Loss-of-Function Mutations Cause Defective Single-Headed IDA Assembly in Respiratory Cilia

(A) Protein lysates extracted from AECs of a control individual and individuals 18GM00157, DCP1606, and DCP153 were resolved by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with an anti-TTC12 antibody. The expression of TTC12 is virtually absent or dramatically reduced in PCD-affected individuals. DNAJB13, a component of radial spokes, was used as a positive control.

(B) IF microscopy analysis of IDA markers in respiratory epithelial cells from a control and from individuals 18GM00157, DCP1606, and DCP153 homozygous for *TTC12* mutations. Cells were double-labeled with an anti-acetylated α -tubulin antibody (red), a marker of ciliary axonemes, and anti-DNAH6, anti-DNAH12, or anti-DNALI1 antibodies as markers of IDAs (green). Nuclear staining was performed with DAPI (blue). In affected individuals, DNAH12 is completely absent in the cilia but seems to accumulate at the subapical part of the cytoplasm. By contrast, DNALI1 and DNAH6 appear to be strongly reduced but are partially present at the proximal part of cilia. (DNAH2 and DNAH10, two markers of the double-headed IDA-II, were shown to be normally expressed in the individuals; see Figure S7). Scale bars represent 5 μ m. IDA: inner dynein arm.

signal intensity appeared to be reduced (Figure 4A), a result confirmed by an immunoblot performed with an anti-DNALI1 antibody on protein extracts from the individual's spermatozoa (Figure 4C). Taken together, these data demonstrate that in sperm cells from individuals with *TTC12* mutations, the assembly and/or the transport of ODAs and an IDA subset comprising DNALI1, DNAH3, and DNAH12 are compromised, whereas IDA-II remains intact.

TTC12-Depleted *Paramecium* Reproduce the Spermatozoa Phenotype Observed in PCD-Affected Individuals

To further investigate the function of TTC12 in cilia motility, we undertook studies in the free-living ciliate *Paramecium tetraurelia*, which is a powerful model organism with which to characterize potential functions of PCD candidate genes^{41,42} because gene functional analysis by RNA interference silencing is rapid, efficient, and easy to perform. Gene homology analyses performed on the *P. tetraurelia* genome²⁸ identified four genes putatively encoding TTC12; these genes are GSPATT00036969001, GSPATT00034215001, GSPATT00035675001, and GSPATT00037155001, hereafter named *TTC12a*, *TTC12b*, *TTC12-like a*, and *TTC12-like b*,

respectively. Interpro software analysis detected both TPR and ARM repeats in *TTC12a* and *TTC12b* only. Therefore, we focused our analysis on these two proteins, which are the closest orthologs of human TTC12 (Figure S9). RNA-seq analysis showed that *TTC12a* is highly expressed in comparison to *TTC12b* and is the only paralog overexpressed during ciliogenesis (Table S6)^{43,44}. By generating a GFP-tagged *TTC12a* protein in *paramecia*, we showed that, as observed in human cells, *TTC12a* is a cytoplasmic protein (Figure S10). We used the dsRNA feeding method to silence *TTC12a*, *TTC12b*, and the combination *TTC12a+TTC12b*. The knockdown (KD) of *TTC12a* alone or in association with *TTC12b* led to a dramatic defect in the swimming velocity (Figures 5A and 5B) and subsequent cell death. By contrast, cells that were knocked down for *TTC12b* showed no obvious abnormal swimming phenotype, indicating that only *TTC12a* is essential for cilia motility (Figures 5A and 5B). The swimming velocity and cell death observed in *TTC12a*-depleted cells were rescued by the expression of an RNAi-resistant version of the gene (Figures 5C 5D, and 5E), confirming that the observed phenotypes are specific to *TTC12* knockdown. Cilia-staining IF and TEM indicated that in *Paramecium TTC12a+b* KD cilia

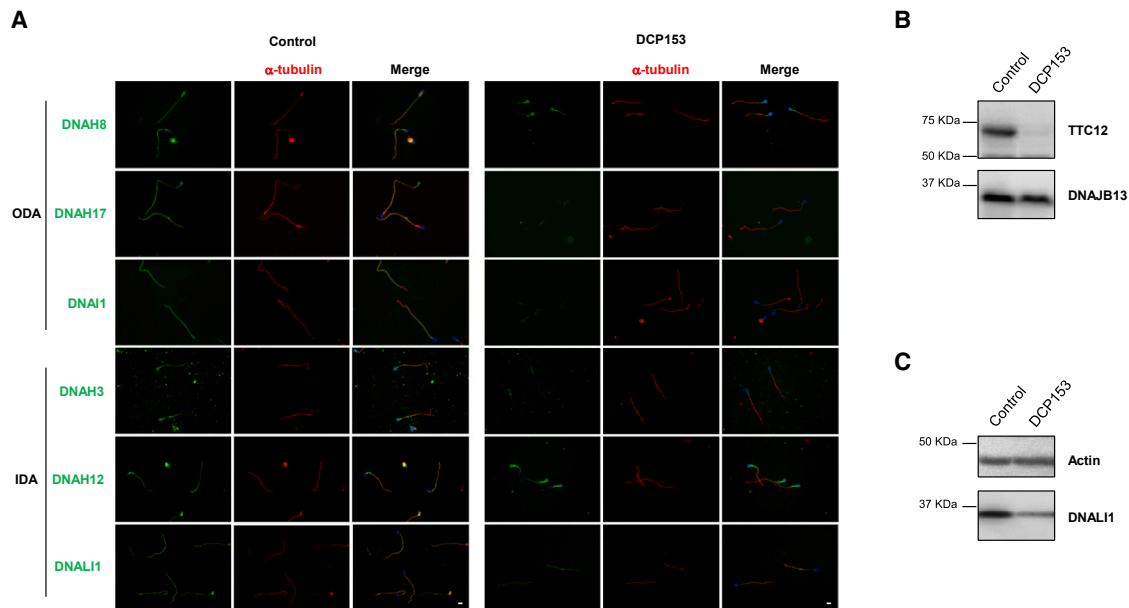


Figure 4. *TTC12* Mutations Impact the Assembly of Both ODAs and IDAs in Spermatozoa

(A) IF microscopy analysis of ODA and IDA markers in spermatozoa from a control and the infertile individual DCP153 carrying bi-allelic *TTC12* mutations. Cells were double-labeled with a marker of ciliary axonemes and anti- α -tubulin antibody (red), together with anti-DNAH8, anti-DNAH17, or anti-DNAI1 antibodies as markers of ODAs (green) and anti-DNAH3, anti-DNAH12, or anti-DNALI1 antibodies as markers of IDAs (green). Nuclear staining was performed with DAPI (blue). In individual DCP153, DNAH8, DNAH17, DNAI1, and DNAH3 are absent along the flagellar axoneme. By contrast, DNAH12 remains exclusively present in the proximal part of flagella, and DNALI1 appears to be present but reduced along the axoneme. Scale bars represent 5 μ m.

(B) Spermatozoa protein lysates of a control individual and individual DCP153 were resolved by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with an anti-TTC12 antibody, showing the absence of TTC12 expression in the individual. Very low amounts of TTC12 were detected in spermatozoa from the infertile individual DCP153. DNAJB13, a component of radial spokes, was used as a positive control.

(C) Spermatozoa protein lysates of a control individual and individual DCP153 were resolved by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with an anti-DNALI1 antibody, showing the reduced amounts of DNALI1 in flagella from the affected individual. Actin was used as a positive loading control. Abbreviations are as follows: ODA, outer dynein arm; and IDA, inner dynein arm.

were globally intact (Figure 6A) but contained a reduced number of ODAs and/or IDAs per cilium (Figure 6B). Similar results were obtained after depletion of the *TTC12a* protein alone (data not shown). Taken together, these data indicate that, similarly to what we found in human spermatozoa, the assembly and/or transport of both ODAs and IDAs was affected by the absence of *TTC12a* in the *Paramecium* model, which suggests that the function of this protein is at least partly conserved throughout evolution.

CRISPR-Cas9-Mediated *TTC12* Inactivation in AECs Leads to Single-Headed IDA Subspecies Defects Mimicking the Phenotype of AECs from Individuals with *TTC12* Mutations

In order to further assess the consequences of *TTC12* loss-of-function mutations in airway ciliated cells, we inactivated *TTC12* in the model of primary AECs cultured at ALI³¹ through a CRISPR-Cas9 approach. Control AECs were transduced with lentiviruses expressing plentiCRISPRv2 carrying Cas9 and RNA guides (gRNA) targeting *TTC12*. Two gRNAs targeting exon 3 were tested, and the most effective one, gRNA 1 (i.e., with the higher level of insertions or deletions as assessed by TIDE webtool), was used for further experiments.

Genomic DNA (gDNA) was then extracted from ALI cultures transduced with gRNA 1. We found that 82% of gDNA carried indels, including 28% of single-nucleotide insertions (Figure S11A and S11B). *TTC12* inactivation in AECs was confirmed by immunoblot (Figure S11C), thereby allowing us to investigate the functional effects of such inactivation on the main axonemal components. IF staining of *TTC12*-inactivated cultured epithelial cells revealed a phenotype similar to that found in primary cells from individuals with *TTC12* mutations; only axonemal components specific to single-headed IDAs (i.e., DNAH1, DNAH6, DNAH12, and DNALI1) were found to be affected (Figures 7A and 7B). More specifically, the analysis of ciliated cells cultured in ALI by high-resolution IF confirmed the inactivation of *TTC12* in clusters with a combination of ciliated cells lacking DNAH6, DNAH12, and DNALI1 along the cilia length and ciliated cells with normal staining (Figure 7A). Moreover, analysis of isolated ciliated cells confirmed the data obtained in AECs from individuals with *TTC12* mutations; the abnormal localization of DNAH1, DNAH6, and DNALI1 was found at very low levels at the base of the cilia, and DNAH12 was completely absent all along the cilia (Figure 7B). All the other tested axonemal components displayed a normal staining (i.e., DNAH5,

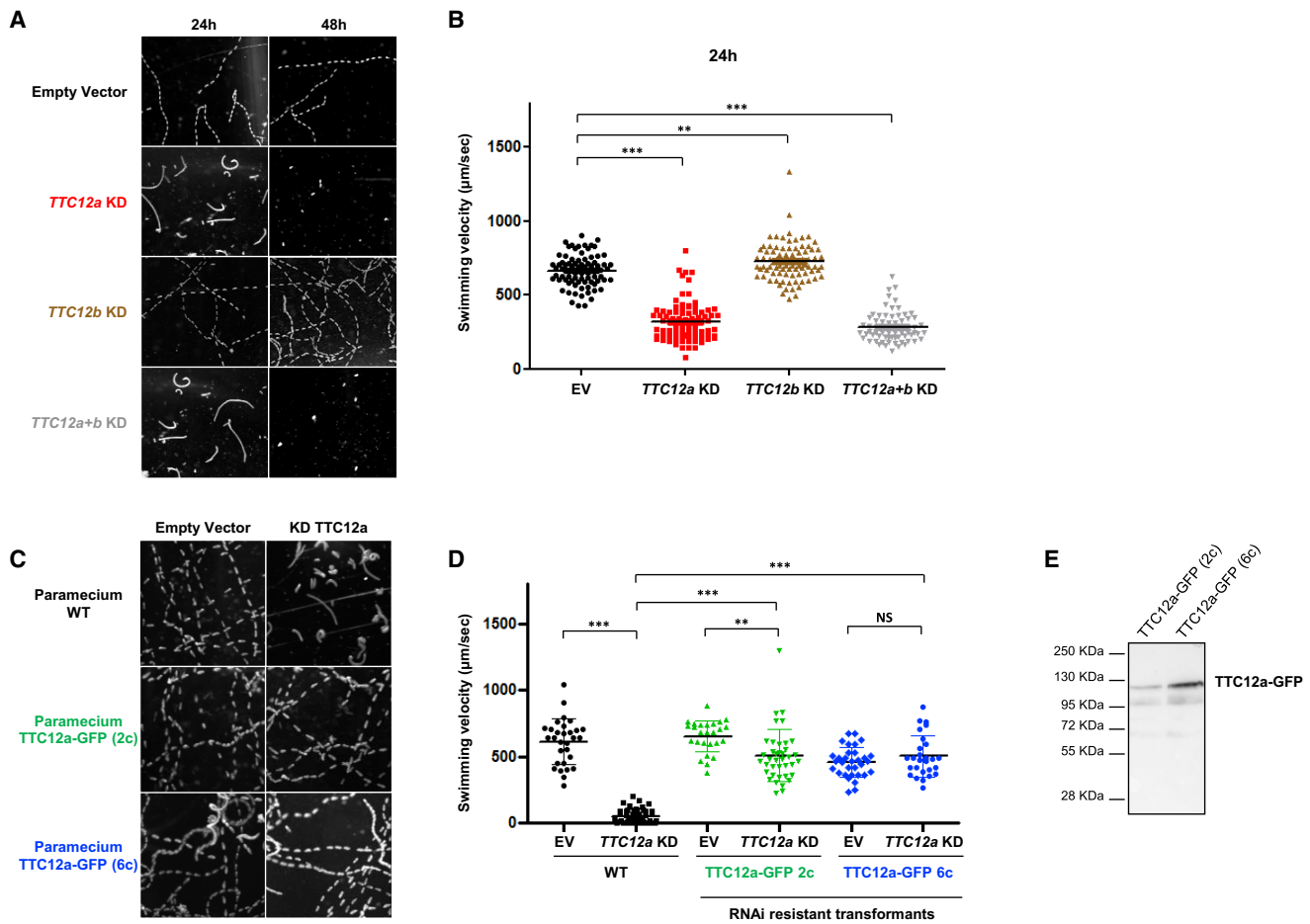


Figure 5. Knockdown of *TTC12a* Affects the Swimming Velocity of Paramecia

(A) Z projection of track recording paramecia swimming under a dark-field microscope with a 10× objective lens after 24 h or 48 h of RNAi treatment. At 24 h of silencing, swimming behavior was affected in *TTC12a*- and *TTC12a+b*-silenced cells, whereas the silencing of *TTC12b* did not show any swimming defect. At 48 h, *TTC12a*- and *TTC12a+b*-silenced cells did not swim anymore, and they died at 72 h.

(B) Analysis of the swimming velocity of *TTC12a*, *TTC12b*, and *TTC12a+b* KD cells as well as control paramecia (i.e., empty vector silenced paramecia). Note that *TTC12b*-depleted cells swam slightly faster (725 mm/s) than control cells (EV, 665 mm/s). The swimming velocity of *TTC12a* (317 mm/s) and *TTC12a+b* (282 mm/s) KD cells was reduced to 50% of that of control cells at 24 h. Data are represented as the mean ± SEM. Statistical analyses were performed with GrahPad Prism v5 software through the use of two-tailed unpaired t tests, ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, (*n* = 69–88 per experiment).

(C) Z projection of track recording paramecia swimming under a dark-field microscope equipped with a 10× objective lens. Clones transformed by an RNAi-resistant version of *TTC12a* (2c and 6c) as well as non-transformed paramecia were grown for 36 h in an empty-vector silencing medium or in a *TTC12a*-silencing medium. *TTC12a*-depleted cells barely swam, as shown previously, whereas cells expressing an RNAi-resistant version of *TTC12a* again swam similarly to control cells. This indicates that *TTC12a*-depleted phenotypes are rescued by the *TTC12a* RNAi-resistant version.

(D) Analysis of the swimming velocity of transformed and non-transformed cells grown in an empty-vector silencing medium or in a *TTC12a*-silencing medium. As expected, *TTC12a* silencing in non-transformed cells dramatically reduced the swimming velocity (52 mm/s). However, the expression of the *TTC12* RNAi-resistant version rescues this phenotype (88% of complementation). Note that the swimming velocity of transformed 2c cells (653 mm/s) was similar to that of non-transformed paramecia (612 mm/s), while transformed 6c cells swam slower (458 mm/s). Data are represented as the mean ± SEM. Statistical analyses were performed with GrahPad Prism v5 software and two-tailed unpaired t tests. ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, NS (non-significant) *p* > 0.1 (*n* = 26–48 per experiment).

(E) Immunoblot analysis on total protein extract of transformed 2c and 6c cells showing that both clones express *TTC12a*-GFP. Abbreviations are as follows: EV, empty vector; and KD, knockdown.

DNAH9, DNAH11, and DNAI1 for ODAs; DNAH2 and DNAH10 for IDA-I1; RSPH1, RSPH3, RSPH4a, RSPH9, and RSPH11 for RSs; GAS8 for the N-DRC; and CCDC39 and CCDC40 for the ciliary ruler) indicating that all other axonemal complexes were normally assembled (Figure S12). To further study the impact of *TTC2* invalidation on ciliary axonemal components, we

analyzed cross-sections of cilia from *TTC12*-invalidated epithelial cells by TEM. As shown in Figure 7C, those cilia displayed an abnormal ultrastructure; 84% of cilia lacked IDAs, whereas a non-infected culture harbored only 3% of abnormal cilia. Again, this ultrastructural phenotype correlates with the one found in individuals with *TTC12* mutations.

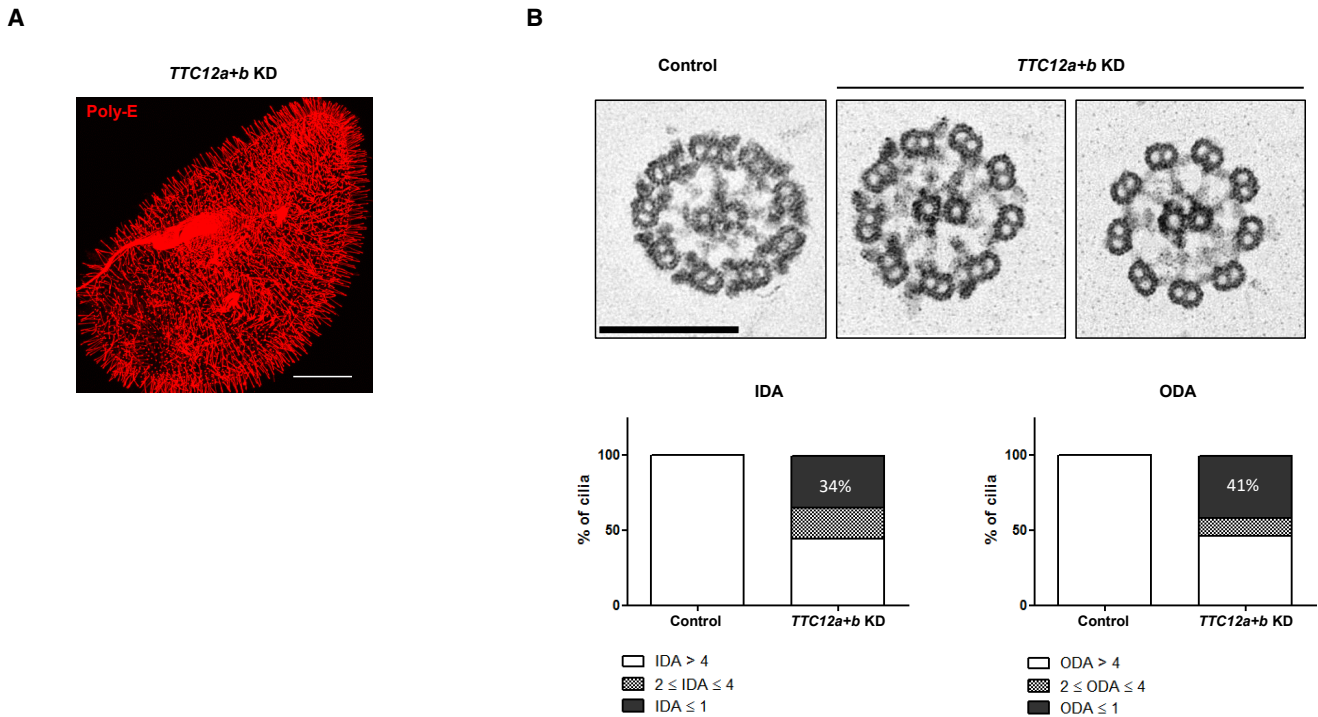


Figure 6. Knockdown of *TTC12a+b* in *Paramecia* Leads to the Loss of Both ODAs and IDAs

(A) Depletion of *TTC12a+b* in *Paramecium* does not affect cilia number or length. *TTC12a+b*-silenced *paramecia* were fixed and immunostained for cilia (anti-polyglutamylated tubulin antibodies) after 48 h of RNAi. The scale bar represents 20 μ m. (B) Upper panel: Electronmicrographs of cross-sections of cilia from *TTC12a+b* KD *paramecia*. Control cilia show the normal distribution of both ODAs and IDAs. By contrast, *TTC12a+b* KD cilia show a partial or total lack of ODAs and IDAs. The scale bar represents 200 nm. Lower panel: quantitative TEM analysis of the number of IDAs and ODAs on 140 cross-sections from a control and *TTC12a+b* co-depleted cells. ODAs and IDAs were normally distributed in 100% of cilia from control cells and in about 50% of the co-depleted *TTC12a+b* cells. One must interpret this result while taking into account that, in *paramecia*, half of cilia are renewed at each cell division. Therefore, after the first division, *paramecia* display half of normal cilia and half of *TTC12a+b*-silenced cilia. The former half (generated before silencing) did not display the phenotype, whereas the new one did (generated after silencing). Abbreviations are as follows: ODA, outer dynein arm; IDA, inner dynein arm; and KD, knockdown.

Discussion

We report mutations in *TTC12*, a gene encoding a protein involved in the cytoplasmic assembly and/or transport of axonemal DAs, in PCD-affected individuals. A thorough analysis of the phenotype of sperm flagella and respiratory cilia from *TTC12*-deficient individuals revealed that the loss of function of *TTC12* affects both ODAs and a subset of single-headed IDAs in sperm flagella, but only a different subset of single-headed IDAs in respiratory cilia. These data, which are further supported by two cellular models of the pathology (i.e., the ciliate *Paramecium tetraurelia* depleted in *TTC12* and human AECs differentiated *in vitro* after a CRISPR-Cas9-mediated invalidation of *TTC12*), reveal the existence of distinct dynein assembly mechanisms in human sperm flagella and respiratory cilia.

The biological function of *TTC12* is still elusive. One study showed an upregulation of *TTC12* transcripts during mouse ciliogenesis *in vitro* and a centrosomal localization of *TTC12* fused to GFP.⁴⁵ In *paramecia*, *TTC12a*, the ortholog of human *TTC12*, was also found to be overexpressed during ciliogenesis (*ParameciumDB*). Although some *TTC* proteins have been involved in the so-called intraflagellar

transport (IFT)^{46–48} the following points support *TTC12*'s possible role as a co-chaperone: (1) *TTC12* contains three TPR domains, three ARM domains, and two structural motifs with alpha helices known to be involved in protein-protein interactions, and TPR-containing proteins are part of several multiprotein complexes that include co-chaperones;³⁴ and (2) notably, in humans, only two other proteins, *UNC45A* and *UNC45B*, are known to contain both TPR and ARM domains, and these have been shown to interact with HSP90 and to act as molecular co-chaperones.^{35,49–51} These data, together with the cytoplasmic localization of *TTC12*, are therefore consistent with a role of *TTC12* as a co-chaperone involved in dynein assembly.

The cytoplasmic assembly of DAs is a complex process involving a wide and still incompletely resolved chaperone-mediated protein network. DA components are first synthesized and pre-assembled into multi-subunit structures in the cytoplasm before being transported by IFT into the axoneme for microtubule attachment.^{52,53} Except for HSP90, all the proteins known to be involved in the axonemal dynein pre-assembly network have been implicated in PCD (i.e., such proteins include CFAP300, CFAP298, CCDC103, DNAAF1, DNAAF2,

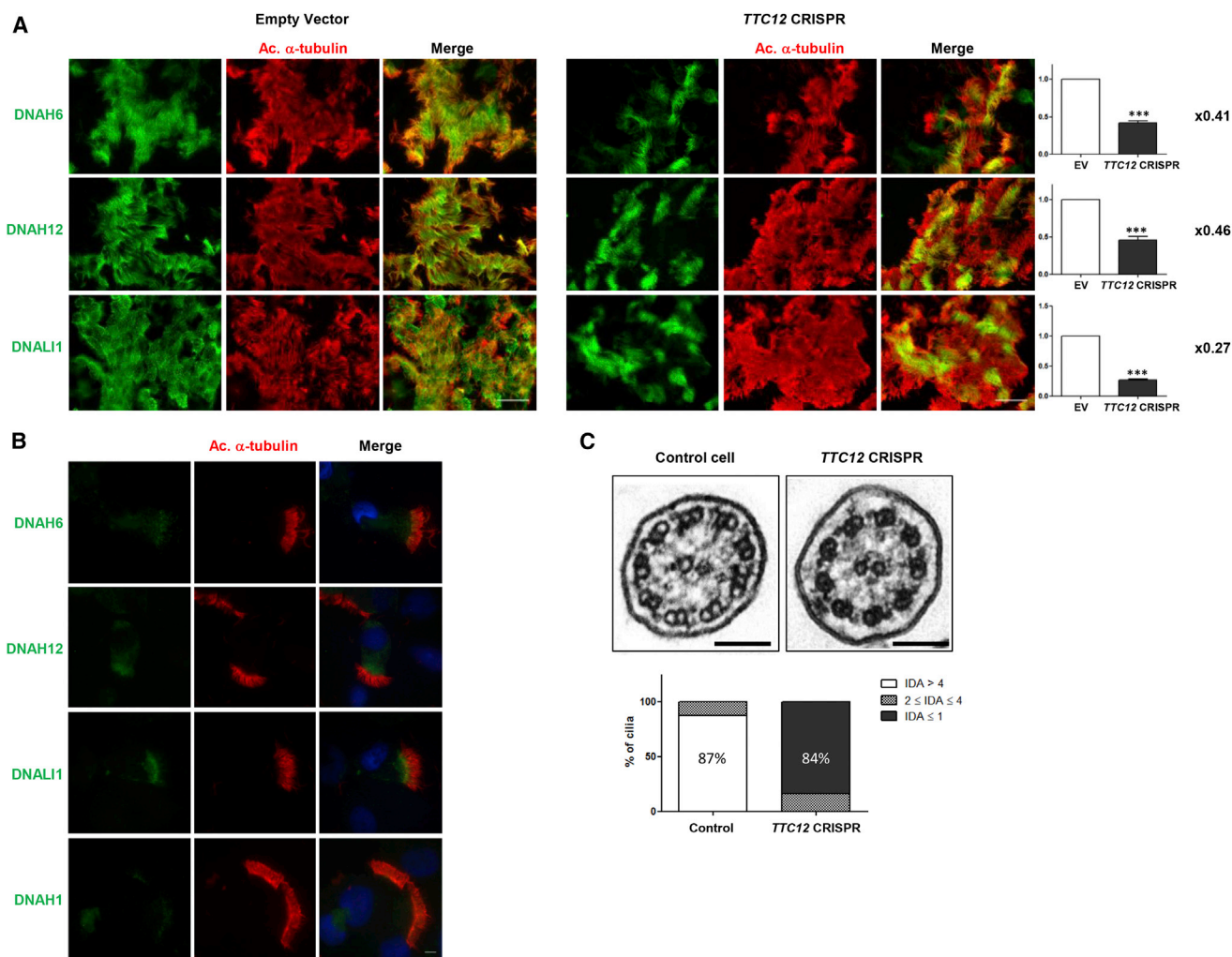


Figure 7. TTC12 Is Required for the Assembly of Single-Headed IDAs

(A) *TTC12* was invalidated in AEC cultures with *TTC12* CRISPR-Cas9 lentiviruses and immunostained with an anti-acetylated α -tubulin antibody (red), a marker of ciliary axonemes, and anti-DNAH6, anti-DNAH12, or anti-DNALI1 antibodies as markers of single-headed IDAs (green). IF analysis in clusters of ciliated cells shows the partial inactivation of *TTC12* in culture with a loss of DNAH6, DNAH12, and DNALI1 in cells lacking *TTC12*. Scale bars represent 25 μ m. DNAH6-, DNAH12-, and DNALI1-labeled areas were measured with ImageJ software and normalized against tubulin-labeled area. The dynein/tubulin ratios obtained in *TTC12*-CRISPR-transduced cells were then normalized to ratios obtained in EV-transduced cells. Values of those final ratios are indicated on the right of the histograms and showed the decrease of dynein-chain-labeling signal compared to tubulin. Data are represented as the mean \pm SEM. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism v5 software and two-tailed unpaired t tests. *** $p < 0.001$ ($n = 3$).

(B) IF images of isolated ciliated cells lacking *TTC12* show the complete loss of DNAH12 along the cilia and its accumulation in the sub-apical region of the cytoplasm, whereas DNAH6 and DNALI1 expression appears to be strongly decreased but still present at the base of cilia. Nuclear staining was performed with DAPI (blue). The scale bar represents 25 μ m.

(C) Electromicrographs of cross-sections of cilia axonemes from a non-infected AEC culture and a *TTC12*-CRISPR-infected cell culture show an abnormal arrangement lacking IDAs in the *TTC12*-invalidated culture. Proportions of cilia harboring more than four IDAs, between two and four IDAs, and up to one IDA, in electromicrograph cross-sections, were reported in a histogram comparing control cells to *TTC12*-invalidated cells. Scale bars represent 5 μ m.

Abbreviations are as follows: ODA, outer dynein arm; IDA, inner dynein arm; and EV, empty vector.

DNAAF3, DNAAF4, DNAAF5, LRRC6, PIH1D3, SPAG1, and ZMYND10). HSP90 is known to interact with TPR domains of various co-chaperones to promote their function.⁵⁴ Two so-called dynein-assembly factors contain TPR domains: DNAAF4 and SPAG1. In recent studies, DNAAF4 was found to interact with both HSP90 and DNAAF2 through its TPR domains to form an R2TP-like complex.^{55,56} PIH1D3, whose corresponding gene has recently been found to be involved in PCD, might also interact with HSP90 through

a TPR-containing protein, which could be DNAAF4.^{55,56} Interestingly, DNAAF4, which seems to play a central role in this network, was found to interact with ZMYND10, a partner of LRRC6 and CFAP298,^{16,57} the latter of which also interacts with DNAAF1.⁵⁸ In this assembly network, it has been reported that DNAAF2 and PIH1D3 interact with DNAI2,^{9,56} a dynein intermediate chain known to assemble early in the human ODA assembly process.⁵⁹ As for DNAAF5, it has been shown to interact with DNAI2

but would not bind HSP90.⁵⁹ The functions of CFAP300, DNAAF3, SPAG1, and CCDC103 remain unclear, and there are currently no reported interactions of these proteins with HSP90 or other chaperones. In this context, TTC12, with its three TPR domains that suggest an interaction with HSP90 and/or other chaperones, emerges as a player in this complex pre-assembly network.

In most studies, the absence of both DAs in PCD-affected individuals has been identified by TEM and high-resolution IF mainly through the use of DNAH5 and DNALI1 antibodies directed, respectively, against the ODA γ -heavy chain and the IDA subspecies a, c, and d. However, these two approaches do not allow determination of which ODA type(s) and which IDA subspecies are affected. For DNAAF4, DNAAF5, and CCDC103 mutations, which are responsible for an absence of both DAs, the proximal staining of DNAH5 and DNAI2 and/or the loss of DNAH9 staining suggests that only type 2 ODAs are affected.^{9,12,15}

In order to accurately decipher the role played by TTC12 in DA assembly, we aimed to identify which single-headed IDA subspecies are affected in the respiratory cilia of individuals with *TTC12* mutations. Besides the presence of ODAs, as attested to by TEM and IF analyses, IDA staining revealed that IDA-I1 remained present, whereas according to the *Chlamydomonas* model, four of the six single-headed IDA subspecies (a, c, d, and g) were affected. No conclusion could be raised on the b and e subspecies because the heavy chain DNAH12 is not yet assigned to a specific subspecies (a, b, c, or e), and no efficient antibodies are available to detect the two remaining IDA heavy chains (i.e., DNAH7 and DNAH14) (Figure 8). Of note, proteomic analyses performed on human airway cilia and spermatozoa showed that DNAH7 is present in both proteomes; in contrast, DNAH14 is undetected in both of them.^{36,60–62} Like in cilia, spermatozoa from individuals with *TTC12* mutations conserve the dimeric IDA-I1. Nonetheless, unlike in cilia, those spermatozoa displayed an absence of ODAs, as revealed by TEM analyses and confirmed by the absence of staining of the ODA HCs (DNAH8 and DNAH17) that are specifically expressed in flagella.³ Interestingly, as for single-headed IDA components, our results showed that the IDA heavy chain DNAH3 (present in the IDA subspecies a, b, c, or e) is detected in flagellar axonemes but is not detectable in cilia; these results are in line with what would be expected from proteomic data.^{36,60} Additionally, spermatozoa from an individual with bi-allelic *TTC12* mutations displayed a loss of DNAH3 as well as a mislocalization of DNAH12 (another monomeric IDA heavy chain that is not specifically assigned to subspecies a, b, c, or e), thereby unveiling the role of TTC12 in the proper expression of DNAH3 and DNAH12 in sperm cells.

Surprisingly, although DNAH1 (d) and DNAH6 (g) are present in both normal cilia and flagella, they were not impacted by *TTC12* mutations in spermatozoa, in contrast with what was observed in cilia.

Moreover, in those spermatozoa, DNALI1 amounts were found to be reduced but present (Figure 8).

Taken together, these results show that, in spermatozoa, *TTC12* defects lead to the complete absence of ODAs and of a set of monomeric IDA subspecies; this set is different from the set of monomeric IDA subspecies impacted in respiratory cilia. Although the absence of ODAs in flagella could be explained by differences in ODA composition between cilia and flagella (DNAH5, DNAH9, and DNAH11 in cilia; DNAH8 and DNAH17 in flagella), the differences affecting single-headed IDAs are not exclusively due to distinct dynein HC composition (e.g., DNAH1 and DNAH6 are both present in cilia and flagella).

In paramecia, *TTC12* knock down led both to the absence of DAs and to a drastic impairment of the swimming velocity. This suggests similarities in the ODA and IDA assembly process at play in this protist and in human sperm flagella. In human cilia, the defects of all known co-chaperones, except for *TTC12*, affect both ODAs and IDAs. The situation is very different in *Chlamydomonas*, where several of the algal homolog genes are important for assembly of one DA type; *DNAAF1* and *HEATR2* homologs (i.e., *ODA7* and *HEATR2*, respectively) govern the assembly of ODAs only, whereas the *DNAAF4* homolog (i.e., *PF23*) contributes only to the assembly of some IDAs.⁶³

Because paramecia mimicked the human flagellar phenotype but not the ciliary one, we looked for an additional cellular model to further strengthen our conclusions on the role of *TTC12* in cilia. We developed a human differentiated cell-culture model based on CRISPR-Cas9 invalidation of *TTC12*. Primary AECs cultured under ALI conditions constitute a strong epithelial barrier that is very difficult to efficiently transfect, especially without inhibiting ciliogenesis. In this study, we showed that transduction of AECs during their expansion phase not only is highly efficient but, most importantly, also preserves ciliogenesis and thus provides large amounts of ciliated cells from which DNA, RNA, and protein expression can be studied. After puromycin selection, 100% of cultured cells were infected, but four populations with different genotypes could have been present: no indel in *TTC12*, indels within one *TTC12* allele, distinct indels within each of the two *TTC12* alleles, or the same indel within the two *TTC12* alleles; these genotypes are equivalent to a wild-type genotype at the *TTC12* locus and to a *TTC12* loss-of-function mutation present in the heterozygous, compound heterozygous, and homozygous state, respectively. Because AECs cannot be dissociated and isolated for selection, contrary to what is done for cell lines, we had to work with a heterogeneous population of cells that were either invalidated or not invalidated for *TTC12*. Nevertheless, our results revealed that *TTC12* CRISPR AECs perfectly mimic the phenotype observed in cilia from individuals carrying *TTC12* mutations, whereas *TTC12*-KD paramecia displayed a ciliary phenotype closer to the flagellar phenotype observed in human spermatozoa. From a general viewpoint, this demonstrates that CRISPR-Cas9-engineered AECs represent a valuable model

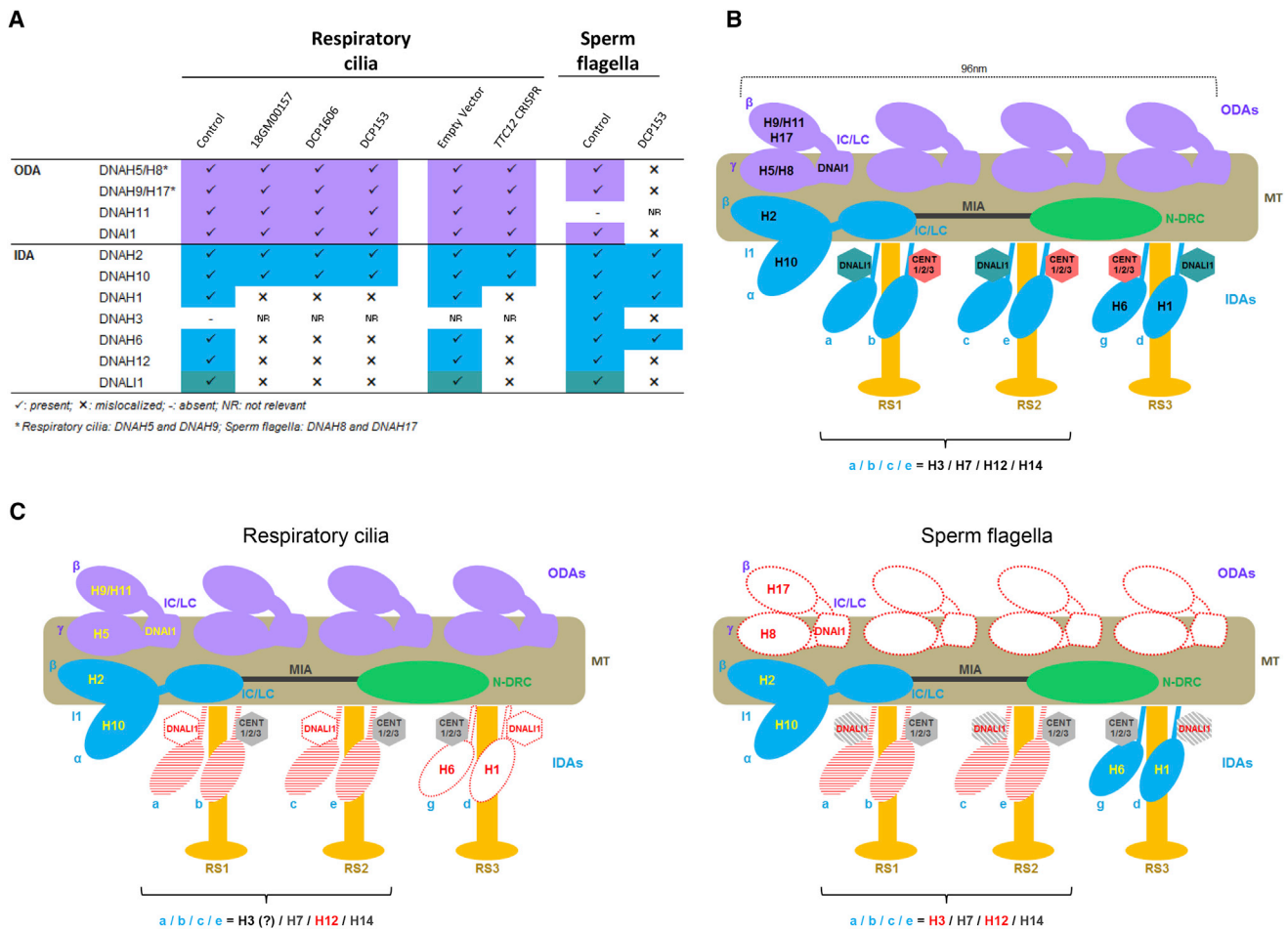


Figure 8. Dynein Chains Affected by the Absence of TTC12 and Diagrammatic Representation of the Axonemal Components Impacted by TTC12 Loss-of-Function Mutations in Respiratory Cilia and Sperm Flagella

(A) Table summarizing the dynein chains studied by IF in AECs of a control and of individuals 18GM00157, DCP1606, DCP153, in AEC cultures invalidated or not for *TTC12* by a CRISPR-Cas9 approach, and in spermatozoa from a control and from individual DCP153. ODA labeling was performed with anti-DNAH5 and anti-DNAH9 antibodies in AECs and anti-DNAH8 and anti-DNAH17 antibodies in spermatozoa. Black check marks represent normal localization, minus signs represent an absence of protein, and black cross signs indicate mislocalization. NR: not relevant.

(B) Schematic structure of a normal 96-nm-long axonemal unit. Each unit, which repeats along the microtubule doublets, consists of four ODAs represented in purple and IDAs shown in blue. Because the exact composition of IDAs is virtually unknown in humans, the IDA representation is based on data from *Chlamydomonas*, in which the seven IDA subspecies include six single-headed DAs (a, b, c, e, g, and d) and one double-headed DA (IDA-I1).

(C) Phenotype of *TTC12*-deficient respiratory cilia versus *TTC12*-deficient sperm flagella. The proteins unaffected by the loss of *TTC12* are represented in full color and written in yellow, and the proteins affected by the loss of *TTC12* are represented in white with a red dotted line and written in red. The proteins found to be affected by *TTC12* mutations, but for which the exact localization is unknown in humans, are represented in a hatched red pattern and are written in red. Proteins with lower but non-null expression are represented in a hatched gray pattern and are written in red. The proteins that could not be tested are represented and written in gray.

Abbreviations are as follows: ODA, outer dynein arm; IDA, inner dynein arm; N-DRC, nexin-dynein regulatory complex; MIA, modifier of inner arms; IC/LC, intermediate chain/light chain; RS, radial spoke; and MT, microtubules.

for studying the impact of PCD mutations on ciliary axonemes.

As for clinical aspects, the diagnosis of PCD is difficult to establish in individuals with mild respiratory symptoms and no laterality defect. In such situations, low concentrations of nasal NO, an abnormal ciliary beat frequency, and/or the presence of ciliary ultrastructural defects is essential if clinicians are to confirm or deny the suspicion of PCD. In the current study, all the individuals were exempt from laterality defects and displayed motile cilia with a normal beat frequency. In two of the individuals,

nasal NO concentrations were normal. Furthermore, the ciliary ultrastructural defect (i.e., the isolated absence of IDAs with an inconstant and mild axonemal disorganization) was also difficult to assert by TEM because of the usual low contrast of IDAs. The diagnosis of PCD was, however, much easier to establish in the two adult male individuals because of their infertility due to a sperm immotility related to the flagellar absence of both DAs, an ultrastructural defect easily identified by TEM. It is therefore tempting to speculate that PCD could be underdiagnosed in female individuals with *TTC12* mutations, in young male individuals,

or in adult males for whom no TEM analyses of their spermatozoa is performed, thereby underscoring the major benefit of molecular analyses in such individuals.

In conclusion, *TTC12* emerges as a cytoplasmic player in DA assembly and/or transport. So far, all the mutations in genes encoding cytoplasmic pre-assembly factors cause a combined ODA and IDA defect. However, *TTC12* mutations lead to distinct ultrastructural defects in cilia (i.e., absence of single-headed IDAs) and in sperm flagella (i.e., absence of both DAs), which unveils its role as a possible co-chaperone in charge of monomeric IDAs in both organelles but not of ODAs in cilia. More precisely, *TTC12* is in charge of different dynein heavy chains in monomeric IDAs from cilia and from flagella. Furthermore, our findings should be of particular help to establish the diagnosis of PCD in individuals with isolated IDA defects in respiratory cilia. The development of a cellular model based on human AECs differentiated *in vitro* into ciliated cells after a CRISPR-cas9-mediated invalidation of genes of interest should open new avenues to decipher both the role of the numerous proteins expressed during ciliogenesis and the pathophysiology of diseases of the airway epithelium.

Supplemental Data

Supplemental Data can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.12.010>.

Acknowledgments

We are grateful to the affected persons and their families, whose cooperation made this study possible. We acknowledge the contributions of the CELPHEDIA Infrastructure, especially the center AniRA in Lyon and Gisèle Froment, Didier Nègre, and Caroline Costa from the lentivectors production facility (UMS3444/US8, SFR Biosciences Gerland-Lyon Sud) and RaDiCo, funded by the French National Research Agency under the specific program “Investments for the Future,” (Cohort grant agreement ANR-10-COHO-0003) and the Chancellerie des Universités de Paris (Legs Poix grant). We thank Lucas Fares-Taie and Araksya Izmiryan at IMAGINE Institute for their advice in setting up the CRISPR-Cas9 technology. We thank Anne Loyens from INSERM U1172 at Lille University for TEM technical assistance and Feng Zhang from the Massachusetts Institute of Technology for the gift of the plentiCRISPRv2 plasmid.

Declaration of Interests

The authors declare no competing interests.

Received: October 11, 2019

Accepted: December 18, 2019

Published: January 23, 2020

Web Resources

CELPHEDIA Infrastructure, <http://www.celphedia.eu/>
Conserved Domain Database (NCBI CDD webtool), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>

Clustal Omega program, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
CRISPOR TEFOR, <http://crispor.tefor.net/>
EMBL EBI Ensembl, <https://www.ensembl.org/index.html>
EMBL EBI Expression Atlas, <https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>
GnomAD, <https://gnomad.broadinstitute.org/>
InterPro, <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>
OMIM, <https://www.omim.org/>
ParameciumDB, <https://paramecium.i2bc.paris-saclay.fr>
SMART, <http://smart.embl-heidelberg.de/>
TIDE, <https://tide.deskgen.com/>
Uniprot, <https://www.uniprot.org/>

References

1. Lucas, J.S., Burgess, A., Mitchison, H.M., Moya, E., Williamson, M., Hogg, C., National, P.C.D.; and National PCD Service, UK (2014). Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Arch. Dis. Child.* **99**, 850–856.
2. Dasgupta, A., and Amack, J.D. (2016). Cilia in vertebrate left-right patterning. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **371**, 20150410.
3. Whitfield, M., Thomas, L., Bequignon, E., Schmitt, A., Stouvenel, L., Montantin, G., Tissier, S., Duquesnoy, P., Copin, B., Chantot, S., et al. (2019). Mutations in DNAH17, encoding a sperm-specific axonemal outer dynein arm heavy chain, cause isolated male infertility due to Asthenozoospermia. *Am. J. Hum. Genet.* **105**, 198–212.
4. Bui, K.H., Yagi, T., Yamamoto, R., Kamiya, R., and Ishikawa, T. (2012). Polarity and asymmetry in the arrangement of dynein and related structures in the *Chlamydomonas* axoneme. *J. Cell Biol.* **198**, 913–925.
5. Lin, J., Yin, W., Smith, M.C., Song, K., Leigh, M.W., Zariwala, M.A., Knowles, M.R., Ostrowski, L.E., and Nicastro, D. (2014). Cryo-electron tomography reveals ciliary defects underlying human RSPH1 primary ciliary dyskinesia. *Nat. Commun.* **5**, 5727.
6. Viswanadha, R., Sale, W.S., and Porter, M.E. (2017). Ciliary motility: Regulation of axonemal dynein motors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, a018325.
7. Hom, E.F.Y., Witman, G.B., Harris, E.H., Dutcher, S.K., Kamiya, R., Mitchell, D.R., Pazour, G.J., Porter, M.E., Sale, W.S., Wirschell, M., et al. (2011). A unified taxonomy for ciliary dyneins. *Cytoskeleton (Hoboken)* **68**, 555–565.
8. Lucas, J.S., Barbato, A., Collins, S.A., Goutaki, M., Behan, L., Caudri, D., Dell, S., Eber, E., Escudier, E., Hirst, R.A., et al. (2017). European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur. Respir. J.* **49**, 1601090.
9. Omran, H., Kobayashi, D., Olbrich, H., Tsukahara, T., Loges, N.T., Hagiwara, H., Zhang, Q., Leblond, G., O’Toole, E., Hara, C., et al. (2008). Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature* **456**, 611–616.
10. Duquesnoy, P., Escudier, E., Vincensini, L., Freshour, J., Bridoux, A.-M., Coste, A., Deschildre, A., de Blic, J., Legendre, M., Montantin, G., et al. (2009). Loss-of-function mutations in the human ortholog of *Chlamydomonas reinhardtii* ODA7 disrupt dynein arm assembly and cause primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* **85**, 890–896.
11. Mitchison, H.M., Schmidts, M., Loges, N.T., Freshour, J., Dritsoula, A., Hirst, R.A., O’Callaghan, C., Blau, H., Al Dabbagh, M., Olbrich, H., et al. (2012). Mutations in axonemal dynein assembly factor DNAAF3 cause primary ciliary dyskinesia. *Nat. Genet.* **44**, 381–389, S1–S2.

12. Panizzi, J.R., Becker-Heck, A., Castleman, V.H., Al-Mutairi, D.A., Liu, Y., Loges, N.T., Pathak, N., Austin-Tse, C., Sheridan, E., Schmidts, M., et al. (2012). CCDC103 mutations cause primary ciliary dyskinesia by disrupting assembly of ciliary dynein arms. *Nat. Genet.* *44*, 714–719.
13. Horani, A., Druley, T.E., Zariwala, M.A., Patel, A.C., Levinson, B.T., Van Arendonk, L.G., Thornton, K.C., Giacalone, J.C., Albee, A.J., Wilson, K.S., et al. (2012). Whole-exome capture and sequencing identifies HEATR2 mutation as a cause of primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* *91*, 685–693.
14. Kott, E., Duquesnoy, P., Copin, B., Legendre, M., Dastot-Le Moal, F., Montantin, G., Jeanson, L., Tamalet, A., Papon, J.-F., Siffroi, J.-P., et al. (2012). Loss-of-function mutations in LRRC6, a gene essential for proper axonemal assembly of inner and outer dynein arms, cause primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* *91*, 958–964.
15. Tarkar, A., Loges, N.T., Slagle, C.E., Francis, R., Dougherty, G.W., Tamayo, J.V., Shook, B., Cantino, M., Schwartz, D., Jahnke, C., et al.; UK10K (2013). DYX1C1 is required for axonemal dynein assembly and ciliary motility. *Nat. Genet.* *45*, 995–1003.
16. Zariwala, M.A., Gee, H.Y., Kurkowiak, M., Al-Mutairi, D.A., Leigh, M.W., Hurd, T.W., Hjeij, R., Dell, S.D., Chaki, M., Dougherty, G.W., et al. (2013). ZMYND10 is mutated in primary ciliary dyskinesia and interacts with LRRC6. *Am. J. Hum. Genet.* *93*, 336–345.
17. Knowles, M.R., Ostrowski, L.E., Loges, N.T., Hurd, T., Leigh, M.W., Huang, L., Wolf, W.E., Carson, J.L., Hazucha, M.J., Yin, W., et al. (2013). Mutations in SPAG1 cause primary ciliary dyskinesia associated with defective outer and inner dynein arms. *Am. J. Hum. Genet.* *93*, 711–720.
18. Austin-Tse, C., Halbritter, J., Zariwala, M.A., Gilberti, R.M., Gee, H.Y., Hellman, N., Pathak, N., Liu, Y., Panizzi, J.R., Patel-King, R.S., et al. (2013). Zebrafish ciliopathy screen plus human mutational analysis identifies C21orf59 and CCDC65 defects as causing primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* *93*, 672–686.
19. Paff, T., Loges, N.T., Aprea, I., Wu, K., Bakey, Z., Haarman, E.G., Daniels, J.M.A., Sistermans, E.A., Bogunovic, N., Dougherty, G.W., et al. (2017). Mutations in PIH1D3 cause X-Linked primary ciliary dyskinesia with outer and inner dynein arm defects. *Am. J. Hum. Genet.* *100*, 160–168.
20. Höben, I.M., Hjeij, R., Olbrich, H., Dougherty, G.W., Nöthe-Menchen, T., Aprea, I., Frank, D., Pennekamp, P., Dworniczak, B., Wallmeier, J., et al. (2018). Mutations in C11orf70 cause primary ciliary dyskinesia with randomization of left/right body asymmetry due to defects of outer and inner dynein arms. *Am. J. Hum. Genet.* *102*, 973–984.
21. Huizar, R.L., Lee, C., Boulgakov, A.A., Horani, A., Tu, F., Marcotte, E.M., Brody, S.L., and Wallingford, J.B. (2018). A liquid-like organelle at the root of motile ciliopathy. *eLife* *7*, e38497.
22. Verra, F., Fleury-Feith, J., Boucherat, M., Pinchon, M.-C., Bignon, J., and Escudier, E. (1993). Do nasal ciliary changes reflect bronchial changes? An ultrastructural study. *Am. Rev. Respir. Dis.* *147*, 908–913.
23. Cooper, T.G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H.W.G., Behre, H.M., Haugen, T.B., Kruger, T., Wang, C., Mbizvo, M.T., and Vogelsohn, K.M. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum. Reprod. Update* *16*, 231–245.
24. Skouri, F., and Cohen, J. (1997). Genetic approach to regulated exocytosis using functional complementation in *Paramecium*: identification of the ND7 gene required for membrane fusion. *Mol. Biol. Cell* *8*, 1063–1071.
25. Sonneborn, T.M. (1970). Chapter 12: Methods in *Paramecium* Research. In *Methods in Cell Biology*, D.M. Prescott, ed. (Academic Press), pp. 241–339.
26. Galvani, A., and Sperling, L. (2002). RNA interference by feeding in *Paramecium*. *Trends Genet.* *18*, 11–12.
27. Timmons, L., and Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* *395*, 854.
28. Hauser, K., Haynes, W.J., Kung, C., Plattner, H., and Kissmehl, R. (2000). Expression of the green fluorescent protein in *Paramecium tetraurelia*. *Eur. J. Cell Biol.* *79*, 144–149.
29. Rüdiger, A.H., Rüdiger, M., Wehland, J., and Weber, K. (1999). Monoclonal antibody ID5: epitope characterization and minimal requirements for the recognition of polyglutamylated alpha- and beta-tubulin. *Eur. J. Cell Biol.* *78*, 15–20.
30. Adoutte, A., Ramanathan, R., Lewis, R.M., Dute, R.R., Ling, K.Y., Kung, C., and Nelson, D.L. (1980). Biochemical studies of the excitable membrane of *Paramecium tetraurelia*. III. Proteins of cilia and ciliary membranes. *J. Cell Biol.* *84*, 717–738.
31. Coste, A., Brugel, L., Maître, B., Boussat, S., Papon, J.F., Wingerstmann, L., Peynègre, R., and Escudier, E. (2000). Inflammatory cells as well as epithelial cells in nasal polyps express vascular endothelial growth factor. *Eur. Respir. J.* *15*, 367–372.
32. Horani, A., Nath, A., Wasserman, M.G., Huang, T., and Brody, S.L. (2013). Rho-associated protein kinase inhibition enhances airway epithelial Basal-cell proliferation and lentivirus transduction. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *49*, 341–347.
33. Auger, J., Jouannet, P., and Eustache, F. (2016). Another look at human sperm morphology. *Hum. Reprod.* *31*, 10–23.
34. Blatch, G.L., and Lässle, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *BioEssays* *21*, 932–939.
35. Tewari, R., Bailes, E., Bunting, K.A., and Coates, J.C. (2010). Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures. *Trends Cell Biol.* *20*, 470–481.
36. Blackburn, K., Bustamante-Marin, X., Yin, W., Goshe, M.B., and Ostrowski, L.E. (2017). Quantitative proteomic analysis of human airway cilia identifies previously uncharacterized proteins of high abundance. *J. Proteome Res.* *16*, 1579–1592.
37. Hjeij, R., Lindstrand, A., Francis, R., Zariwala, M.A., Liu, X., Li, Y., Damerla, R., Dougherty, G.W., Abouhamed, M., Olbrich, H., et al. (2013). ARMC4 mutations cause primary ciliary dyskinesia with randomization of left/right body asymmetry. *Am. J. Hum. Genet.* *93*, 357–367.
38. Jaganathan, K., Kyriazopoulou Panagiotopoulou, S., McRae, J.F., Darbandi, S.F., Knowles, D., Li, Y.I., Kosmicki, J.A., Arbe-laez, J., Cui, W., Schwartz, G.B., et al. (2019). Predicting splicing from primary sequence with deep learning. *Cell* *176*, 535–548.e24.
39. Osinka, A., Poprzeczko, M., Zielinska, M.M., Fabczak, H., Joachimiak, E., and Wloga, D. (2019). Ciliary proteins: Filling the gaps. recent advances in deciphering the protein composition of motile ciliary complexes. *Cells* *8*, 730.
40. Kollmar, M. (2016). Fine-tuning motile cilia and flagella: Evolution of the dynein motor proteins from plants to humans at high resolution. *Mol. Biol. Evol.* *33*, 3249–3267.
41. Fassad, M.R., Shoemark, A., Legendre, M., Hirst, R.A., Koll, F., le Borgne, P., Louis, B., Daudvohra, F., Patel, M.P., Thomas, L., et al. (2018). Mutations in outer dynein arm heavy chain

- DNAH9 cause motile cilia defects and situs inversus. *Am. J. Hum. Genet.* *103*, 984–994.
42. Fassad, M.R., Shoemark, A., le Borgne, P., Koll, F., Patel, M., Dixon, M., Hayward, J., Richardson, C., Frost, E., Jenkins, L., et al. (2018). C11orf70 mutations disrupting the intraflagellar transport-dependent assembly of multiple axonemal dyneins cause primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* *102*, 956–972.
 43. Arnaiz, O., Malinowska, A., Klotz, C., Sperling, L., Dadlez, M., Koll, F., and Cohen, J. (2009). Cildb: a knowledgebase for centrosomes and cilia. *Database (Oxford)* *2009*, bap022.
 44. Arnaiz, O., Cohen, J., Tassin, A.M., and Koll, F. (2014). Remodeling Cildb, a popular database for cilia and links for ciliopathies. *Cilia* *3*, 9.
 45. Hoh, R.A., Stowe, T.R., Turk, E., and Stearns, T. (2012). Transcriptional program of ciliated epithelial cells reveals new cilium and centrosome components and links to human disease. *PLoS ONE* *7*, e52166.
 46. Xu, Y., Cao, J., Huang, S., Feng, D., Zhang, W., Zhu, X., and Yan, X. (2015). Characterization of tetratricopeptide repeat-containing proteins critical for cilia formation and function. *PLoS ONE* *10*, e0124378.
 47. Pazour, G.J., Dickert, B.L., Vucica, Y., Seeley, E.S., Rosenbaum, J.L., Witman, G.B., and Cole, D.G. (2000). *Chlamydomonas* *IFT88* and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene *tg737*, are required for assembly of cilia and flagella. *J. Cell Biol.* *151*, 709–718.
 48. Taschner, M., Bhogaraju, S., and Lorentzen, E. (2012). Architecture and function of IFT complex proteins in ciliogenesis. *Differentiation* *83*, S12–S22.
 49. Eisa, N.H., Jilani, Y., Kainth, K., Redd, P., Lu, S., Bougrine, O., Abdul Sater, H., Patwardhan, C.A., Shull, A., Shi, H., et al. (2019). The co-chaperone UNC45A is essential for the expression of mitotic kinase NEK7 and tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* *294*, 5246–5260.
 50. Mooneyham, A., Iizuka, Y., Yang, Q., Coombes, C., McClellan, M., Shridhar, V., Emmings, E., Shetty, M., Chen, L., Ai, T., et al. (2019). UNC-45A Is a Novel Microtubule-Associated Protein and Regulator of Paclitaxel Sensitivity in Ovarian Cancer Cells. *Mol. Cancer Res.* *17*, 370–383.
 51. Nicholls, P., Bujalowski, P.J., Epstein, H.F., Boehning, D.F., Barral, J.M., and Oberhauser, A.F. (2014). Chaperone-mediated reversible inhibition of the sarcomeric myosin power stroke. *FEBS Lett.* *588*, 3977–3981.
 52. Kobayashi, D., and Takeda, H. (2012). Ciliary motility: the components and cytoplasmic preassembly mechanisms of the axonemal dyneins. *Differentiation* *83*, S23–S29.
 53. Rosenbaum, J.L., and Witman, G.B. (2002). Intraflagellar transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 813–825.
 54. Assimon, V.A., Southworth, D.R., and Gestwicki, J.E. (2015). Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to heat shock protein 70 (Hsp70) and heat shock protein 90 (Hsp90) is regulated by affinity and phosphorylation. *Biochemistry* *54*, 7120–7131.
 55. Pal, M., Morgan, M., Phelps, S.E.L., Roe, S.M., Parry-Morris, S., Downs, J.A., Polier, S., Pearl, L.H., and Prodromou, C. (2014). Structural basis for phosphorylation-dependent recruitment of Tel2 to Hsp90 by Pih1. *Structure* *22*, 805–818.
 56. Olcese, C., Patel, M.P., Shoemark, A., Kiviluoto, S., Legendre, M., Williams, H.J., Vaughan, C.K., Hayward, J., Goldenberg, A., Emes, R.D., et al. (2017). X-linked primary ciliary dyskinesia due to mutations in the cytoplasmic axonemal dynein assembly factor PIH1D3. *Nat. Commun.* *8*, 14279.
 57. Cho, K.J., Noh, S.H., Han, S.M., Choi, W.-I., Kim, H.-Y., Yu, S., Lee, J.S., Rim, J.H., Lee, M.G., Hildebrandt, F., and Gee, H.Y. (2018). ZMYND10 stabilizes intermediate chain proteins in the cytoplasmic pre-assembly of dynein arms. *PLoS Genet.* *14*, e1007316.
 58. Jaffe, K.M., Grimes, D.T., Schottenfeld-Roames, J., Werner, M.E., Ku, T.S., Kim, S.K., Pelliccia, J.L., Morante, N.F.C., Mitchell, B.J., and Burdine, R.D. (2016). c21orf59/kurly controls both cilia motility and polarization. *Cell Rep.* *14*, 1841–1849.
 59. Diggie, C.P., Moore, D.J., Mali, G., zur Lage, P., Ait-Lounis, A., Schmidts, M., Shoemark, A., Garcia Munoz, A., Halachev, M.R., Gautier, P., et al. (2014). HEATR2 plays a conserved role in assembly of the ciliary motile apparatus. *PLoS Genet.* *10*, e1004577.
 60. Wang, G., Guo, Y., Zhou, T., Shi, X., Yu, J., Yang, Y., Wu, Y., Wang, J., Liu, M., Chen, X., et al. (2013). In-depth proteomic analysis of the human sperm reveals complex protein compositions. *J. Proteomics* *79*, 114–122.
 61. Amaral, A., Castillo, J., Estanyol, J.M., Ballescà, J.L., Ramalho-Santos, J., and Oliva, R. (2013). Human sperm tail proteome suggests new endogenous metabolic pathways. *Mol. Cell. Proteomics* *12*, 330–342.
 62. Vandenbrouck, Y., Lane, L., Carapito, C., Duek, P., Rondel, K., Bruley, C., Macron, C., Gonzalez de Peredo, A., Couté, Y., Chaoui, K., et al. (2016). Looking for missing proteins in the proteome of human spermatozoa: An update. *J. Proteome Res.* *15*, 3998–4019.
 63. Desai, P.B., Dean, A.B., and Mitchell, D.R. (2018). Chapter 4: Cytoplasmic preassembly and trafficking of axonemal dyneins. In *Dyneins*, Second Edition, S.M. King, ed. (Academic Press), pp. 140–161.

Supplemental Data

***TTC12* Loss-of-Function Mutations Cause Primary Ciliary**

Dyskinesia and Unveil Distinct Dynein Assembly

Mechanisms in Motile Cilia Versus Flagella

Lucie Thomas, Khaled Bouhouche, Marjorie Whitfield, Guillaume Thouvenin, Andre Coste, Bruno Louis, Claire Szymanski, Emilie Bequignon, Jean-François Papon, Manon Castelli, Michel Lemullois, Xavier Dhalluin, Valérie Drouin-Garraud, Guy Montantin, Sylvie Tissier, Philippe Duquesnoy, Bruno Copin, Florence Dastot, Sandrine Couvet, Anne-Laure Barbotin, Catherine Faucon, Isabelle Honore, Bernard Maitre, Nicole Beydon, Aline Tamalet, Nathalie Rives, France Koll, Estelle Escudier, Anne-Marie Tassin, Aminata Touré, Valérie Mitchell, Serge Amselem, and Marie Legendre

A

```
TTC12a_WT          GAGCACTTTTACGCATAAGAAATGGGAATATTATACAAGTTCAGAAGAAGAAATGAATC 60
TTC12a_RNAi_resistant GAGCACGTTTACTCATAAAAAATGGGAATACTATACATCATCAGAAGAGGAAATCGAATC 60
*****  *****  *****  *****  *****  *****  *****  *****  *****

TTC12a_WT          TGAGCCAATAGTTCCTAAAGATGACCCAAATTTTCAGAGCCTTAGAATTAGATATGGAATA 120
TTC12a_RNAi_resistant AGAGCCTATTGTCCAAAAGACGATCCTAACTTTAGAGCTTTGGAATTGGATATGGAGCA 120
*****  *  *****  *****  *  *  *  *  *****  *  *****  *****  *

TTC12a_WT          AAGAAAGAAAAAGAAAGAGGAAGACATGAAAAAGGCAGAGGAATTGAAAAACAAAGGCAA 180
TTC12a_RNAi_resistant AAGAAAAAGAAAAAGGAAGAGGATATGAAGAAAGCTGAAGAGTTAAAGATAAAGGCAA 180
*****  *  *  *  *  *  *  *  *****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

TTC12a_WT          TGAGTATTATAGTAAGGGTGATTATGATCATGCGGCTTGGAATATTCTTAAGCCCTTGA 240
TTC12a_RNAi_resistant CGAATATTACTCAAAGGAGATTATGATCACGCTGCGTGGAAGTATTCCATAAGCTTTGGA 240
*  *****  *  *  *****  *  *  *****  *****  *****  *  *

TTC12a_WT          ATTAGTAAAGGATAATAAGACTTTGTGGTTAAATC          275
TTC12a_RNAi_resistant ATTGGTTAAAGATAACAAGACATTATGGTTGAACC          275
*  *  *  *  *****  *****  *  *****  *  *
```

212/275 (77.09%)

B

```
TTC12a_WT          STFTHKKWEYYTSSEEEIESEPIVPKDDPNFRALELDMEQRKKKKEEDMKKAEELKNKGN 60
TTC12a_RNAi_resistant STFTHKKWEYYTSSEEEIESEPIVPKDDPNFRALELDMEQRKKKKEEDMKKAEELKNKGN 60
*****

TTC12a_WT          EYYSKGDYDHAAWKYSQALELVKDNKTLWLN 91
TTC12a_RNAi_resistant EYYSKGDYDHAAWKYSQALELVKDNKTLWLN 91
*****
```

91/91 (100%)

Figure S1. *P. tetraurelia* nucleic acid and protein sequences of TTC12a versus TTC12a RNAi-resistant

DNA (A) and protein (B) alignments from ClustalOmega of the target of RNAi (275pb) for WT TTC12a and RNAi-resistant TTC12a. Fully conserved residue (*).

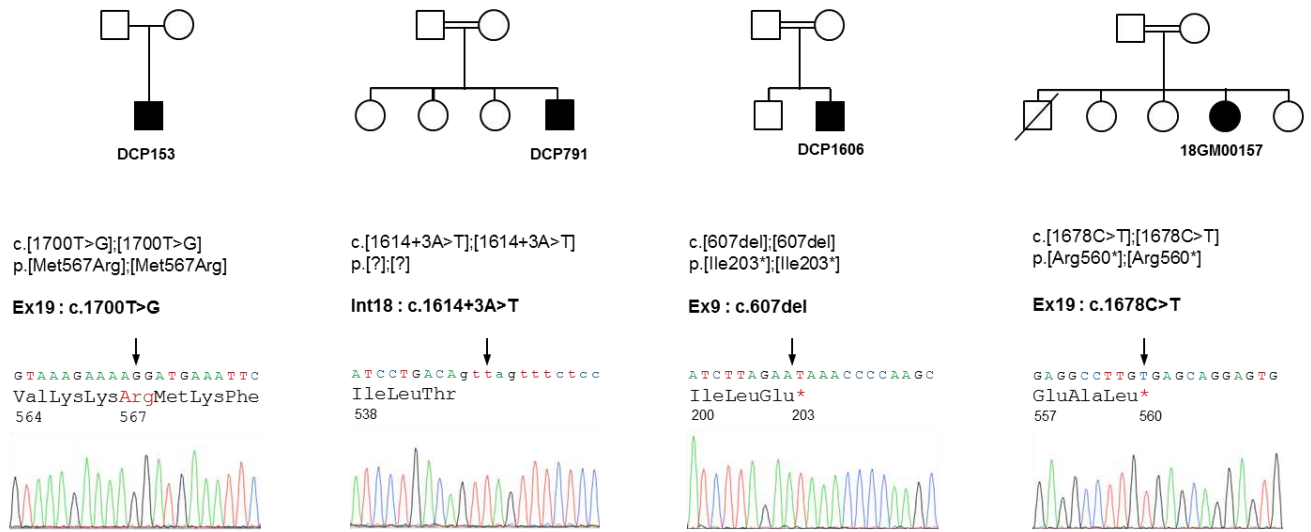


Figure S2. *TTC12* mutations identified in the four independent families

Top: Genealogical trees. Full symbols indicate primary ciliary dyskinesia. All but one individual (DCP153) were born to known consanguineous unions. Bottom: Electrophoregrams showing the *TTC12* mutations identified in the four unrelated PCD probands.

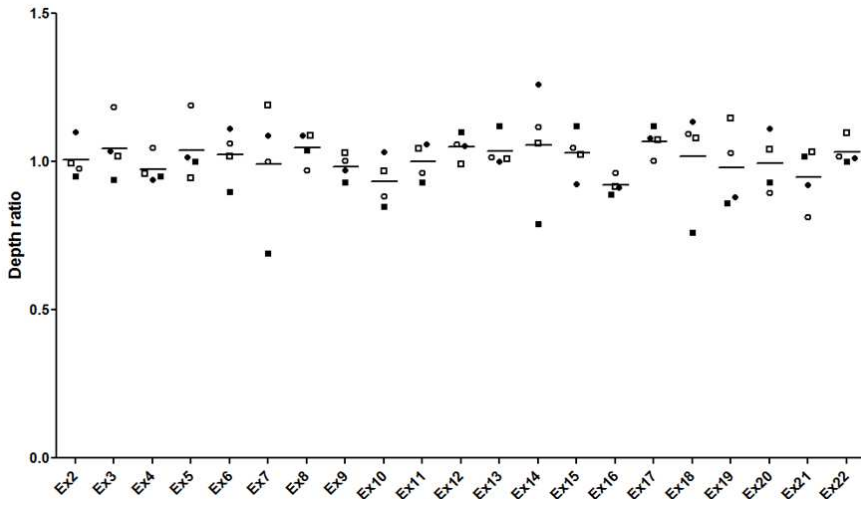


Figure S3. *TTC12* NGS depth ratio analysis

TTC12 copy-number variation analysis in subjects DCP153 (black square), DCP791 (empty square), DCP1606 (black circle), and 18GM00157 (empty circle) by depth ratio analysis of NGS data for each targeted capture probe.

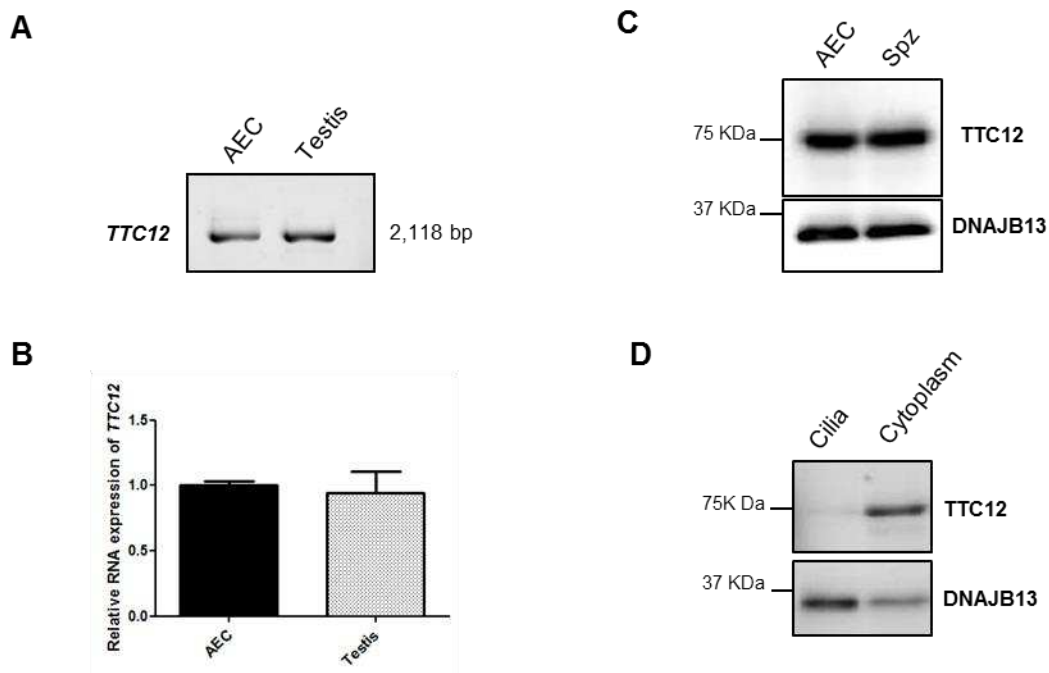


Figure S4. Expression of *TTC12*/*TTC12* in human airway epithelial cells (AECs) and testis/spermatozoa in subcellular fractions of AECs

A) Analysis of *TTC12* transcripts in AECs and testis by RT-PCR followed by Sanger sequencing showing a unique isoform present in both cell types corresponding to the 705-residue protein (2,118 bp PCR-product, NM_017868.4).

B) Similar levels of *TTC12* transcripts in AECs and testis tissue, as determined by RT-qPCR with *ERCC3* as endogenous control. Data are represented as the mean \pm SEM with no significant differences using *t*-test, $p > 0.1$ ($n=8$).

C) Detection of the *TTC12* protein in AECs and spermatozoa by western blot. *DNAJB13*, a component of radial spokes, was used as positive control (the expected mass of the *TTC12* protein is 78kDa).

D) Cytoplasmic expression of *TTC12* in AECs. AECs were fractionated and analyzed by western blot. *TTC12* appears to be mainly cytoplasmic, whereas *DNAJB13*, a component of radial spokes used as control, was found mainly in the cilia fraction.

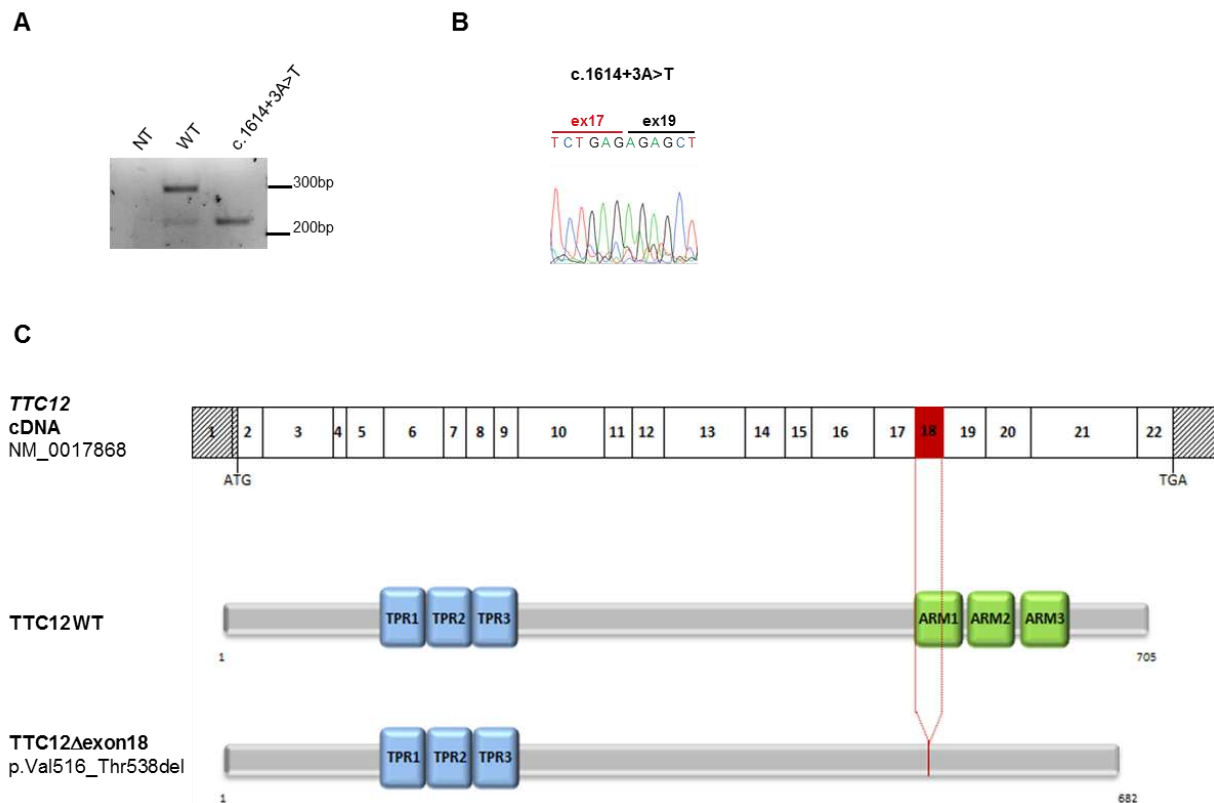


Figure S6. The *TTC12* c.1614+3A>T mutation identified in individual DCP791: Functional consequences on *TTC12* RNA splicing and predicted impact at the protein level

A) RT-PCR amplification of *TTC12* transcripts obtained from HEK293 cells transfected with a minigene containing a genomic DNA region spanning exons 17 to 19 of *TTC12*, with or without the c.1614+3A>T mutation. A representative gel picture shows bands corresponding to fully spliced *TTC12* transcripts (296 bp) and a smaller molecular species (227 bp) corresponding to *TTC12* transcripts lacking exon 18 (*TTC12*-Δexon18). The low amounts of *TTC12*-Δexon18 transcripts also detected with the WT construct may result from the strong overexpression of the minigene in this transient expression study. NT: non-transfected cells

B) Sanger sequencing of RT-PCR products generated from HEK293 cells transfected with the mutated *TTC12* minigene confirming the complete skipping of exon 18 in *TTC12* transcripts.

C) Schematic representation of the predicted impact of exon 18 skipping at the protein level. Exonic organization of the human *TTC12* cDNA (top) and domain-organization model of wild-type *TTC12* and

TTC12 deleted from the domain encoded by exon 18 (bottom) according to CDD NCBI database. No ARM domain is predicted in the TTC12 protein lacking amino acids encoded by exon18. TPR: tetratricopeptide repeat; ARM: armadillo repeat.

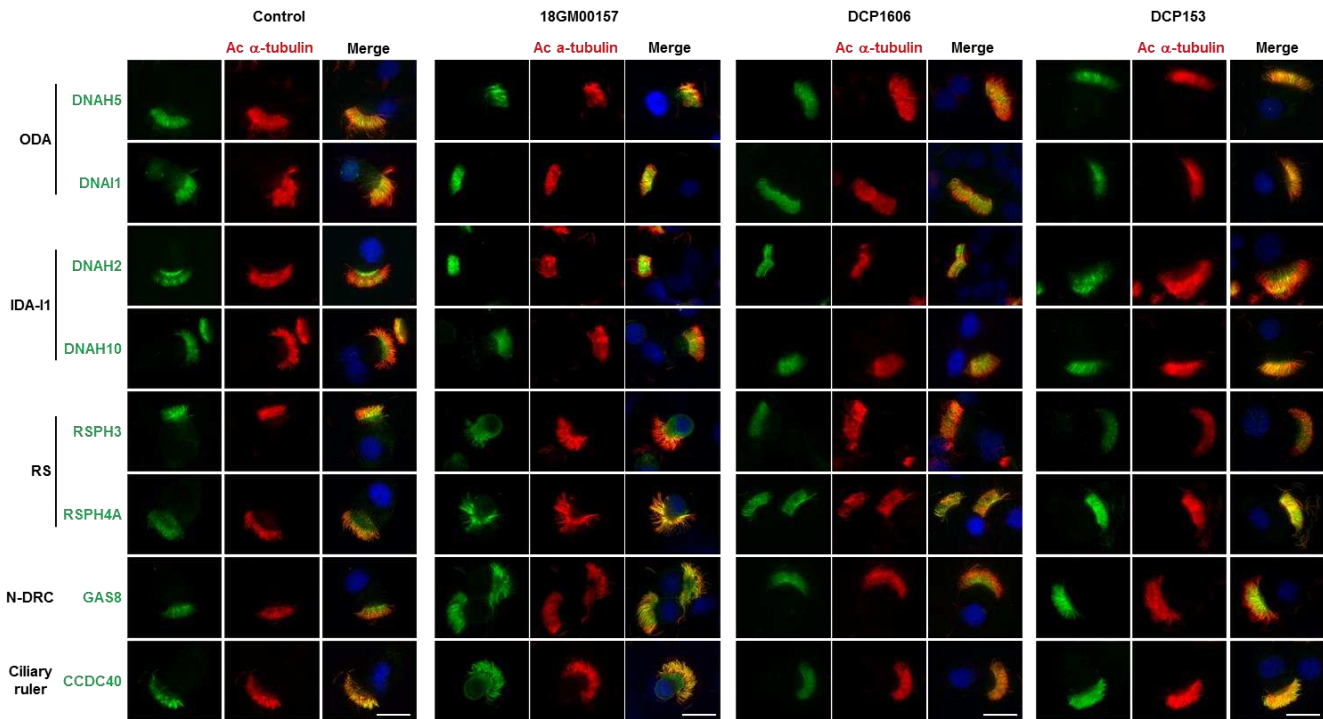


Figure S7. Expression of ODA, IDA, RS, N-DRC and ciliary ruler markers in AECs from individuals with *TTC12* mutations

Immunofluorescence microscopy analyses of airway epithelial cells from PCD individuals 18GM00157, DCP1606 and DCP153 are shown. Immunostaining of the main axonemal component markers (all in green) and of acetylated α -tubulin (in red) shows a normal expression and localization of all the components tested. Nuclear staining was performed with DAPI (blue). Scale bars, 25 μ m. ODA: outer dynein arms; IDA: inner dynein arms; RS: radial spokes; N-DRC: nexin-dynein regulatory complex.

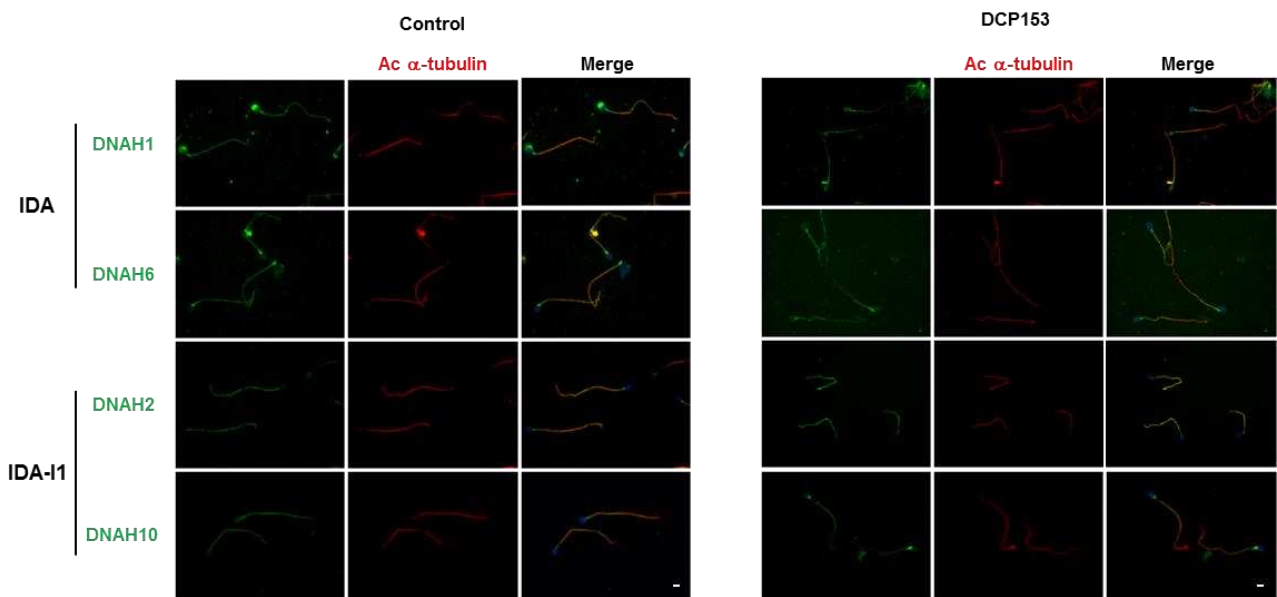


Figure S8. Expression of IDA and IDA-I1 markers in spermatozoa from individual DCP153

Immunofluorescence microscopy analyses in spermatozoa from the infertile PCD individual DCP153. Immunostaining with anti-DNAH1 and anti-DNAH6 antibodies (markers of IDA subspecies d and g, respectively) and anti-DNAH2 and anti-DNAH10 antibodies (markers of IDA-I1), all in green, together with α -tubulin (in red) shows a normal expression and localization of all the components tested. Nuclear staining was performed with DAPI (blue). Scale bars, 5 μ m. IDAs: inner dynein arms.

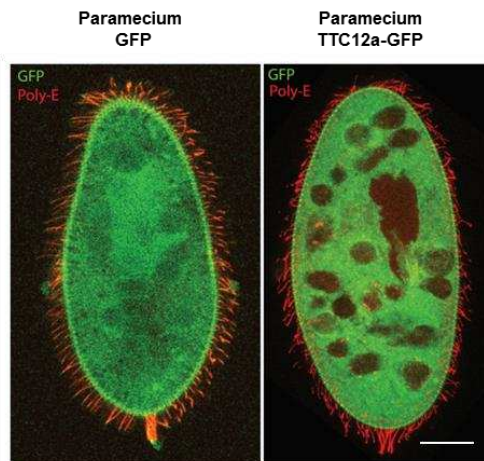
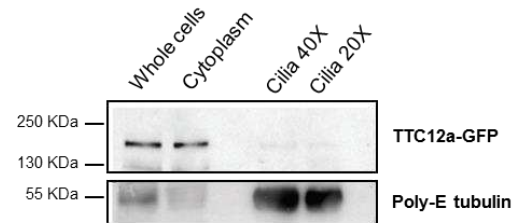
A**B**

Figure S10. Localization of TTC12a in *Paramecium tetraurelia*

A) Paramecia expressing either GFP (left panel) or TTC12a-GFP (right panel) show a very high level of cytoplasmic GFP staining. Scale bar, 20 μm .

B) Cytoplasmic expression of TTC12a in paramecia. Protein extracts from whole cells, cytoplasm (cell body of deciliated cells) or cilia fraction of the same cells loaded with a 40- or 20-fold excess of cilia (40X, 20X), were probed with anti-GFP and anti-Poly-E tubulin antibodies. TTC12a is present in the cytoplasm, whereas the protein is almost not detected in the cilia fraction.

A

	Position	Sequence	Efficiency
gRNA 1	Exon 3	AAAGAGACTACTGCTTATGG	82%
gRNA 2	Exon 3	ACTGCTTATGGAGGAAGACC	60%

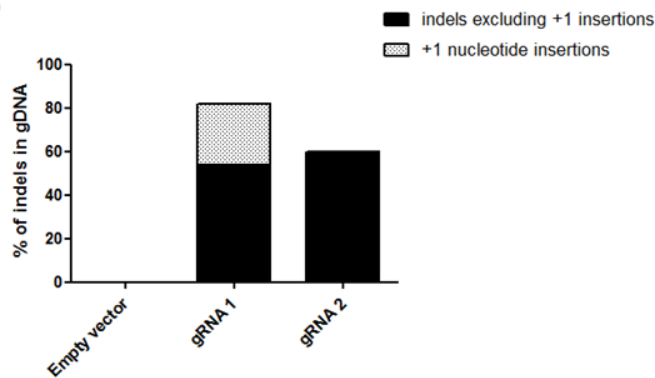
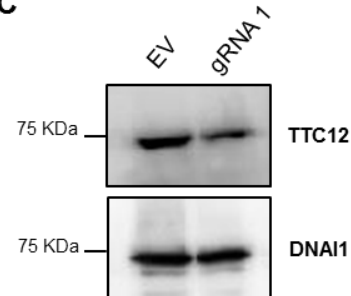
B**C**

Figure S11. Insertions and deletions (indels) in *TTC12*-CRISPR transduced AECs

A) Sequence, position and efficiency of two CRISPR guides targeting *TTC12*.

B) Percentage of insertions and deletions (indels) in the genomic DNA of *TTC12*-CRISPR AECs compared to control AECs (transduced with an empty vector). Sanger sequencing was performed and analyzed with the TIDE webtool. Guide 1 has a better efficiency (82% of indels) than guide 2 (60% of INDELS). Grey = proportion of +1 single nucleotide insertions (28% with guide 1, and 1% with guide 2).

C) Western blot of cells lysates from AECs in which *TTC12* has or not been invalidated by a CRISPR-Cas9 approach, showing a decreased expression of *TTC12* in the invalidated culture.

gDNA: genomic DNA; AECs: airway epithelial cells; EV: empty vector.

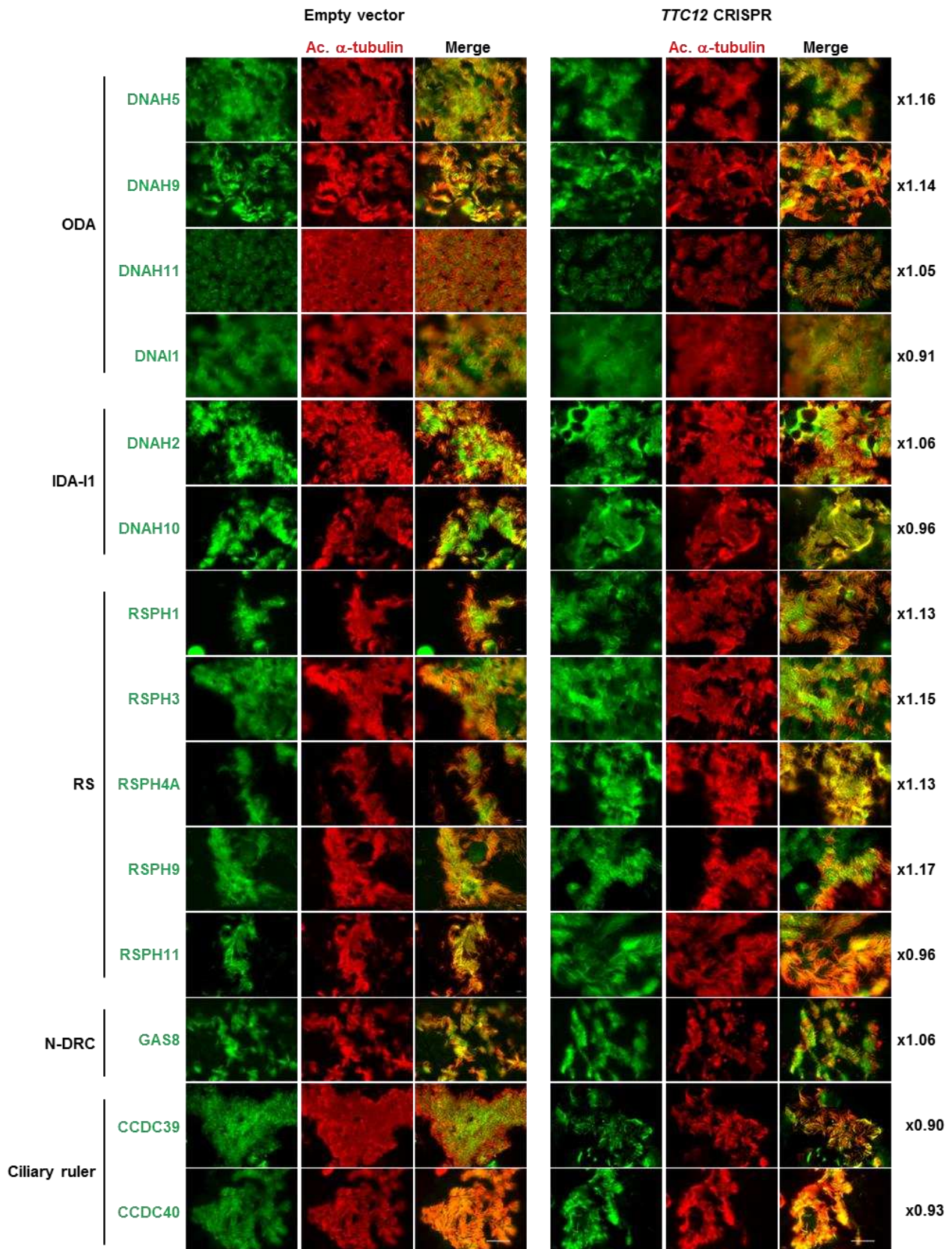


Figure S12. Expression of ODA, IDA, RS, N-DRC and ciliary ruler markers in AEC cultures in which *TTC12* has or not been invalidated by a CRISPR-Cas9 approach

Immunostaining of the main axonemal component markers (all in green) and of the acetylated α -tubulin (in red) in AECs invalidated for *TTC12* shows an expression similar to that found in native AECs. Scale bars, 25 μ m. Green labeled areas were measured with ImageJ software and normalized against the tubulin labeled area (red). The dynein/tubulin ratios obtained in *TTC12*-CRISPR transduced cells were then normalized to ratios obtained in EV-transduced cells before. Values of those final ratios are indicated on the right side of the figure and showed no differences between green and red labels.

ODA: outer dynein arm; IDA: inner dynein arm; RS: radial spoke; N-DRC: nexin-dynein regulatory complex;

EV: empty vector.

Table S1: Primers sequences

PCR and Sanger sequencing		
Name	Sequence	PCR product size (bp)
TTC12_ex9F	ACTGGGAGCAGGAGGAGG	315
TTC12_ex9R	GACCCAACTGTGCAGGAAAG	
TTC12_ex18F	TTAGGGGAGACAGACATGGG	465
TTC12_ex18R	GGACACAGCAAGGAGGTCAC	
TTC12_ex19F	TGGCAAGGGGCTATGATTAC	448
TTC12_ex19R	AAGCAAATCCCTATCCAAGAAG	
Reverse-Transcription PCR and Real Time PCR		
Name	Sequence	PCR product size (bp)
TTC12exon2_ATG	GATTCCGGTTCACAATGGATGC	2118 (NM_017868.4)
TTC12exon22_STOP	TTAGCATAGGAACAACACACGGT	
QPCR_TTC12-Ex11F	TGACAACGAGGTCATAAGAAGG	68
QPCR_TTC12-Ex12R	CAGACCATTCTTCAACTGCAT	
QPCR_ERCC3-Ex9F	ACTGGATGGAGCTGCAGAAT	70
QPCR_ERCC3-Ex10R	GACATAGGGCACCAGACCTC	
Minigene construct		
Name	Sequence	PCR product size (bp)
MinigeneTTC12_17F	ATGTGTCTTCAGGCTCCCTTTGT	3035
MinigeneTTC12_19R	TCACAAGGCCTCCTCAACAATTT	
pCDNA3topo_3'UTR_F	GAGCTCGGATCCACTAGTCC	296
pCDNA3topo_5'UTR_R	GGAGAGGGTTAGGGATAGGC	
Guides RNA and on-target PCR		
Name	Sequence	PCR product size (bp)
TTC12gRNA1_lentiCRISPRv2F	CACCGAAAGAGACTACTGCTTATGG	/
TTC12gRNA1_lentiCRISPRv2R	AAACCCATAAGCAGTAGTCTCTTTC	
TTC12gRNA2_lentiCRISPRv2F	CACCGACTGCTTATGGAGGAAGACC	/
TTC12gRNA2_lentiCRISPRv2R	AAACGGTCTTCTCCATAAGCAGTC	
PCR_Ontarget_F	TGACCCAGTTGTGCAACAGA	364

Table S2: Antibodies used for immunofluorescence microscopy studies

Antibody	Localization	Host	Clonality	Company	Reference	Dilution	
						Cilia	Flagella
α acetylated tubulin	Microtubulin doublets	mouse	monoclonal	Sigma	(6-11-B1) T6793	1/600	/
α tubulin	Microtubulin doublets	mouse	monoclonal	Sigma	T9026	/	1/500
CCDC39	Ciliary ruler (IDA-RS-NDRC linker)	rabbit	polyclonal	Sigma	HPA035364	1/400	/
CCDC40	Ciliary ruler (IDA-RS-NDRC linker)	rabbit	polyclonal	Sigma	HPA022974	1/500	/
DNAH1	IDA heavy chain, subspecies d	rabbit	polyclonal	Sigma	HPA036805	1/50	1/25
DNAH2	IDA-I1 heavy chain	rabbit	polyclonal	Sigma	HPA067103	1/100	1/50
DNAH3	IDA heavy chain, subspecies a? b? c? e?	rabbit	monoclonal	Abcam	ab172632	1/50	1/50
DNAH5	ODA g heavy chain	rabbit	polyclonal	Sigma	HPA037470	1/200	NR
DNAH6	IDA heavy chain, subspecies g	rabbit	polyclonal	Sigma	HPA036391	1/50	1/50
DNAH8	ODA g heavy chain	rabbit	polyclonal	Sigma	HPA028447	NR	1/2000
DNAH9	ODA b heavy chain, distal	rabbit	polyclonal	Sigma	HPA052641	1/150	NR
DNAH10	IDA-I1 heavy chain	rabbit	polyclonal	Sigma	HPA039066	1/150	1/50
DNAH11	ODA b heavy chain, proximal	rabbit	polyclonal	Sigma	HPA045880	1/75	NR
DNAH12	IDA heavy chain, subspecies a? b? c? e?	rabbit	polyclonal	Sigma	HPA058203	1/50	1/50
DNAH17	ODA b heavy chain, distal	rabbit	polyclonal	Sigma	HPA024354	NR	1/200
DNAI1	ODA intermediate chain	rabbit	polyclonal	Sigma	HPA021649	1/300	1/200
DNALI1	IDA associated protein, subspecies a/c/d	rabbit	polyclonal	Sigma	HPA028305	1/150	1/100
GAS8	DRC4	rabbit	polyclonal	Sigma	HPA041311	1/300	/
RSPH1	Radial Spoke Head	rabbit	polyclonal	Sigma	HPA017382	1/100	/
RSPH11	Radial Spoke Stalk	rabbit	polyclonal	Sigma	HPA039193	1/200	/
RSPH3	Radial Spoke Stalk	rabbit	polyclonal	Novus	NBP1-84244	1/100	/
RSPH4A	Radial Spoke Head	rabbit	polyclonal	Sigma	HPA031196	1/200	/
RSPH9	Radial Spoke Head	rabbit	polyclonal	Sigma	HPA031703	1/200	/

NR: Not Relevant

Table S3: Position and length of DNA segments used in paramecia feeding experiments

Gene	Position	Length (bp)
<i>TTC12a</i>	[471-745]	275
<i>TTC12b</i>	[471-588]-[613-745]	251

Table S4: High-speed videomicroscopy parameters

Individuals	Beating cilia (%)	CBF (Hz)	Angle (°)	Distance travelled by the cilium tip (µm/sec)
18GM00157	30	10 ± 3.3	50 ± 24	57.3 ± 42.4
DCP1606	50	11.4 ± 5.4	31 ± 21	36.9 ± 26.2
DCP153	90	6.3 ± 2.0	50 ± 22	39.1 ± 43.2
Controls (mean ± SD) ^a	91 ± 13	8.9 ± 2.0	71.6 ± 6.6	66.7 ± 14.2
P ^b , n=15	0.027	ns	0.002	0.04

CBF: ciliary beat frequency, SD: standard deviation, ns: not significant. Angle and distance travelled were evaluated on beating cilia.

^aAccording to the normal values published in reference¹

^busing the Mann-Whitney U test, with 15 individuals with non PCD bronchiectasis; p<0.05 was considered as significant.

Table S5: Allele frequency of *TTC12* mutations identified in individuals

Individuals	Genomic position (Grch37)	Mutation	Exon	Mutation type	GnomAD allele frequency (mutated/total allele number)	Number of homozygotes
DCP1606	chr11:113209524	c.607del p.Ile203*	9	Nonsense	0	0
DCP791	chr11:113230733	c.1614+3A>T p.?	Intron 18	Splice (exon 18 skipping)	0	0
18GM00157	chr11:113233186	c.1678C>T p.Arg560*	19	Nonsense	4x10 ⁻⁵ (14/282804)	0
DCP153	chr11:113233208	c.1700T>G p.Met567Arg	19	Missense	6x10 ⁻⁵ (17/282758)	0

Table S6: Expression pattern of *Paramecium tetraurelia* *TTC12* genes

Gene	Accession number	Expression pattern ^a		Protein length	Identity (%)
		Life cycle	Deciliation/Reciliation		
<i>TTC12a</i>	PTET.51.1.G1640129	High	Overexpressed	846 residues	83.45
<i>TTC12b</i>	PTET.51.1.G1420106	Basal	Not modified	850 residues	

^aaccording to *ParameciumDB*

SUPPLEMENTAL MATERIAL AND METHODS

High-speed videomicroscopy

Ciliated samples were obtained by nasal brushing with a 2 mm cytology brush (Laboratoires Gyneas). Cells were suspended in B1 BSA medium (CCD Lab) and examined within three hours after sampling. All observations were performed at room temperature with an inverted microscope (Axiovert 200, Carl Zeiss S.A.S.) with an oil immersion x100 objective, and within 20 min. Beating ciliated edges were recorded with a digital camera (PixelINK A741) at a rate of 355 frames per second. Each movie was composed of 1,800 frames with a definition of 256 × 192 pixels. Pixel size was (0.13 × 0.13) μm^2 . Twenty distinct areas containing intact undisrupted ciliated epithelial edges devoid of mucus and beating in the plane of the camera were recorded. Qualitative and quantitative evaluations of ciliary beat patterns were performed as previously described¹. Briefly, 10 beating cilia individualized were followed during a complete beating cycle (one cilium selected per video/edges) in order to measure the following parameters: ciliary beat frequency (CBF), beating angle and distance travelled by the cilium tip per second. These results were compared to a disease control group previously published (i.e., 15 individuals with non-PCD bronchiectasis¹) using the Mann-Whitney U test; $p < 0.05$ was considered as significant.

Quantitative RT-PCR

One microgram of total RNA from airway cells at cultured at air-liquid interface or testis tissue (Takara Bio Europe/Clontech) was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and then subjected to reverse transcription with the Reverse Transcriptase kit (Roche) following the manufacturer's instructions. The real-time PCR assays were performed in the Light Cycler LC480 (Roche) with the mesablue qPCR mastermix Plus for Sybr Assay (Eurogentec). *ERCC3*, an ubiquitously expressed gene, was used as an endogenous control to normalize the data and determine the relative expression between AECs and testis by calculating the primer efficiency^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} . The primers used are listed in **Table S1**.

Cilia isolation from ALI cultures

After more than 21 days of culture of AECs in ALI conditions (as indicated above), cilia isolation was performed as described². Briefly, the apical surface of AEC cultures was washed two times with PBS before being gently swirled with a deciliation buffer (10mM Tris-HCL pH7.5, 50mM NaCl, 10mM CaCl₂, 1mM EDTA, 0.1% Triton X100, 7mM Bmercaptoethanol, 1% Protease inhibitor). The cilia fraction was collected and first centrifugated 1 min at 1000 g at 4°C, then 5 min at 12000g at 4°C to gather all cilia that were then resuspended in resuspension buffer (30mM HEPES pH7.3, 25mM NaCl, 5mM MgSO₄, 1mM EGTA, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 1% protease inhibitor). The fraction remaining on the insert was considered as the cytoplasmic part. Both fractions were suspended in ice-cold lysis buffer to perform immunoblotting as described in the Material and Methods section of the main text.

Minigene constructs and *in vitro* expression

Genomic DNA was extracted from blood obtained from a healthy control and from DCP791 individual carrying the c.1614+3A>T splice site mutation. A region spanning exons 17 to 19 containing or not the c.1614+3A>T transversion was amplified by PCR from those genomic DNAs and cloned into pcDNA3.1/V5-His-TOPO using the TOPO TA cloning kit (Thermofischer Sc.) according to the manufacturer's recommendations.

Constructs were checked by Sanger sequencing before being transfected in HEK293 cells with FuGENE[®] HD Transfection Reagent (Promega). Total RNA was extracted with RNeasy Mini Kit (Qiagen) before being treated with Dpn1 to eliminate the bacterial plasmid. Reverse transcription was then performed with the Reverse Transcriptor kit (Roche) following the manufacturer's instructions. To avoid the amplification of HEK293 endogenous *TTC12* transcripts, PCR was performed with primers located in the plasmidic 5' and 3' untranslated regions flanking the *TTC12* gene fragment. All primers used are listed in **Table S1**.

CRISPR-cas9 guides design and lentiviral vector construct

Oligonucleotides coding for guide RNAs that target the third exon of *TTC12* were designed with the crispor.tefor.net webtool. We selected two guides, consisting of 20-bp sequences followed by NGG PAM of the CRISPR/SpCas9, that combined the higher specificity score associated with the lower out-of-frame score. We previously checked the absence of off-targets in introns or exons of genes known to be implicated in PCD, and that all off-targets contained more than three single-nucleotide mismatches. Guides were cloned into plentiCRISPRv2, a gift from Feng Zhang³ (Addgene plasmid # 52961; <http://n2t.net/addgene:52961>; RRID:Addgene_52961) according to the original online protocol of the Zhang lab (https://www.addgene.org/static/data/plasmids/52/52961/52961-attachment_B3xTwa0bkYD.pdf). The production of lentiviruses was performed by AniRA Vectorologie (SFR Biosciences Gerland – Lyon Sud). Guides and primers used are listed in **Table S1**.

1. Papon, J.-F., Bassinet, L., Cariou-Patron, G., Zerah-Lancner, F., Vojtek, A.-M., Blanchon, S., Crestani, B., Amselem, S., Coste, A., Housset, B., et al. (2012). Quantitative analysis of ciliary beating in primary ciliary dyskinesia: a pilot study. *Orphanet J Rare Dis* 7, 78.
2. Ostrowski, L.E. (2006). Chapter 14 - Preparation of Cilia from Human Airway Epithelial Cells. In *Cell Biology (Third Edition)*, J.E. Celis, ed. (Burlington: Academic Press), pp. 99–102.
3. Sanjana, N.E., Shalem, O., and Zhang, F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* 11, 783–784.

V.2. Identification de manifestations pulmonaires variables chez des femmes porteuses à l'état hétérozygote de mutations de *PIH1D3*

V.2.1. Introduction

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au gène *PIH1D3*, localisé sur le chromosome X, qui est responsable de la seule forme de DCP non-syndromique récessive liée à l'X (UK10K Rare Group et al., 2017). Un défaut de ce gène, qui code une protéine cytoplasmique d'assemblage des deux BDs, mène à l'immobilité des cils respiratoires et des flagelles dans lesquels les BDE et les BDI sont absents.

En raison de leur unique chromosome X, les hommes porteurs d'un défaut moléculaire de *PIH1D3* sont tous atteints, tandis que leurs mères, possédant deux chromosomes X, sont des porteuses hétérozygotes censées être asymptomatiques. Cependant, l'enquête familiale des patients DCP avec mutations dans *PIH1D3* avait mis en évidence l'existence de symptômes respiratoires de sévérité variable chez certaines mères. À la suite de ces observations, nous avons émis l'hypothèse que l'inactivation d'un des chromosomes X chez ces femmes pourrait expliquer la survenue ou non de symptômes respiratoires d'intensités variables.

L'inactivation de l'X (*XCI*, *X-chromosome inactivation*), aussi appelé Lyonisation (Lyon, 1989), est un processus conduisant à l'inactivation d'un des deux chromosomes X au cours des phases précoces du développement des embryons de sexe féminin. En effet, afin de maintenir le dosage génique entre les deux sexes, un des chromosomes X est inactivé de façon aléatoire dans les cellules somatiques de chaque femme (Morey et al., 2011). Ce phénomène, très bien étudié chez la souris, est moins bien connu chez l'Homme en raison des possibilités très limitées de travailler sur les embryons humains. Des études menées sur des embryons dérivés de fécondation *in vitro* ou de cellules souches humaines ont permis toutefois d'avancer dans les connaissances de ce processus chez l'Homme. Ce phénomène est déclenché par l'accumulation d'un ARN long non codant (lncRNA) codé par le gène *XIST* localisé dans un locus formant le centre d'inactivation de l'X (*Xic*). L'ARN long non codant est surexprimé de façon monoallélique et recouvre en *cis* le futur chromosome X inactif (Brown et al., 1992; Penny et al., 1996). Ce processus est immédiatement suivi d'une série de modifications de la chromatine, de l'ADN et une réorganisation spatiale (Galupa and Heard, 2015). Ainsi, le chromosome inactif porte des marques spécifiques tels que la tri-méthylation des lysines 9 et 27 de l'histone H3 (H3K9me3 et H3K27me3), l'ubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A (H2AK119ub), mais aussi l'hyperméthylation d'îlots CpG (Nora and Heard, 2010; Patrat et al., 2020) (**Figure 33**).

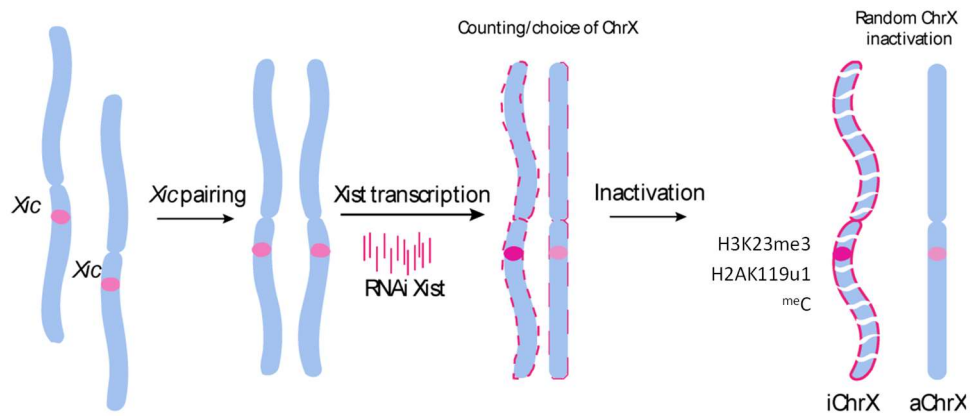


Figure 33. Inactivation aléatoire d'un des chromosomes X. (modifié de Katopodis et al., 2020). Un des chromosomes est recouvert par le long ARN non codant codé par *Xist*. Le chromosome inactivé présente diverses marques spécifiques telles que la triméthylation et la monoubiquitination d'histones et la méthylation des cytosines. *Xic* : *X inactivation center*, *RNA Xist* : *long non coding RNA*, *iChrX* : *Chr X inactif*, *aChrX*: *Chr X actif*, H3K23me3 : triméthylation de l'histone 3, H2AK119u1 : monoubiquitination de l'histone 2, ^{me}C = cytosine méthylée.

Dans notre travail, nous avons entrepris de préciser le phénotype respiratoire chez 6 mères porteuses à l'état hétérozygote d'un défaut moléculaire de *PIH1D3*. Nous avons mis en évidence que le spectre des symptômes des 6 mères s'étendait de l'absence totale de manifestations respiratoires jusqu'à des manifestations respiratoires plus sévères.

Le phénotype ciliaire a pu être étudié chez trois mères symptomatiques par des analyses de leurs CENH *ex vivo* et/ou *in vitro* en ME, HSVM et IF. Nous avons mis en évidence la présence au niveau de l'épithélium respiratoire d'une population hétérogène de cellules comprenant des cellules normales battantes et des cellules anormales immobiles. Enfin, nous avons constaté que les proportions variables de cellules ciliées normales corrélaient avec la sévérité des symptômes respiratoires : plus la proportion de cellules avec cils normaux était élevée, moins le phénotype était sévère.

Nous avons ensuite étudié les profils d'inactivation du chromosome X porteur de la mutation chez les 6 mères par étude de la méthylation de l'ADN. La méthylation de l'ADN est couramment étudiée en diagnostic par une technique basée sur la capacité de deux enzymes de restriction, *MspI* et *HpaII*, à digérer ou non des fragments d'ADN en fonction de leur statut de méthylation. Ces analyses sont réalisées au niveau d'îlots CpG de divers locus du chromosome X dont le plus connu est le locus HUMARA (*human androgen receptor*). Ces locus contiennent des régions polymorphes (répétition de CAG) qui permettent de distinguer les deux allèles pour le calcul du taux de méthylation de chacun. La méthylation déterminée au niveau de ces locus est connue pour refléter correctement l'inactivation de l'X de tout le chromosome (Bertelsen et al., 2011).

Au cours de ce travail, nous avons utilisé cette technique sur l'ADN sanguin des 6 mères et, de façon originale, nous sommes parvenus à déterminer chez elles la phase entre le taux de méthylation et l'allèle *PIH1D3* muté. Ce résultat a été obtenu en repérant chez elles l'allèle muté transmis à leur fils atteints de DCP grâce aux régions polymorphes. Pour l'une des 6 mères, nous avons également pu étudier l'ADN extrait de CENH.

Par ailleurs, pour les 4 mères porteuses de grandes délétions (de 4 à 46 gènes délétés), nous avons également pu utiliser une seconde approche d'étude de la méthylation basée sur la conversion au bisulfite des cytosines non-méthylées en uraciles. Cette méthode, que nous avons appliquée sur les ADN maternels directement au niveau du locus délété (une seule copie de *PIH1D3*), a permis de déterminer directement le taux de méthylation de l'allèle normal non délété, et d'en déduire donc le taux d'inactivation du X muté. Cette technique est plus fiable que la technique de digestion sensible à la méthylation puisqu'elle s'affranchit du risque potentiel de recombinaison homologue entre le locus *HUMARA* et *PIH1D3*. Cependant, elle n'a pas pu être appliquée aux deux mères portant des mutations ponctuelles en raison de l'impossibilité de différencier l'allèle muté et l'allèle normal de *PIH1D3*.

Nous avons alors confronté les profils de méthylation de l'ADN aux phénotypes cliniques des six mères, ce qui nous a permis de démontrer que la variabilité des symptômes respiratoires était étroitement liée à la proportion de cellules dans lesquelles le chromosome X muté était inactivé. En effet, lorsque le chromosome X normal est inactivé dans une cellule ciliée, seul l'allèle muté de *PIH1D3* est exprimé ; ceci induit l'absence des deux BDs et l'immobilité des ciliaire. Chez les femmes, l'inactivation aléatoire d'un chromosome X dans chaque cellule mène à une population de cellules en mosaïque. Ainsi, nous avons montré que la proportion variable de cellules ciliées normales battantes/mutées immobiles, au niveau de l'épithélium respiratoire de chacune de ces femmes porteuses de mutations *PIH1D3* à l'état hétérozygote, est à l'origine de la variabilité de leurs symptômes.

Plusieurs maladies récessives liées à l'X ont fait l'objet d'études montrant un lien entre inactivation de l'X et sévérité du phénotype de femmes hétérozygotes. Il est intéressant de noter que ces études de méthylation sont réalisées sur de l'ADN issu du sang total, souvent en raison de l'inaccessibilité du tissu d'intérêt. Dans certaines maladies liées à l'X, le profil d'inactivation déterminé dans le sang n'est pas corrélé avec le phénotype clinique (comme l'hémophilie A/B, la maladie de Fabry) (Maier et al., 2006; Orstavik et al., 2000). En revanche pour d'autres maladies liées à l'X (comme le syndrome de l'X-fragile (de Vries et al., 1996), la myopathie de Duchenne (Pegoraro et al., 1995) ou le diabète insipide néphrogénique (Sato et al., 2008)), le profil d'inactivation de l'X observé dans les cellules sanguines reflète vraisemblablement le profil d'inactivation du tissu d'intérêt inaccessible, puisque le phénotype clinique est totalement corrélé aux résultats obtenus sur le sang. Dans notre étude, nous avons déterminé le taux d'inactivation du X muté dans le sang des 6 mères étudiées, ainsi que dans les CENH

de l'une d'entre elle. Le taux obtenu dans les CENH de cette femme s'est avéré similaire à celui obtenu à partir de ses cellules sanguines, et tout à fait cohérent avec la proportion de CENH anormales observée par trois techniques différentes (ME, IF et HSVM). Par ailleurs, nous avons pu montrer chez deux autres mères que la proportion de CENH anormales observée par ME, IF et HSVM était cohérente avec le taux de méthylation du X muté obtenu dans le sang. Enfin, pour les 6 mères étudiées, le phénotype clinique était tout à fait cohérent avec les taux de méthylation des X mutés obtenus dans le sang.

De façon intéressante, dans notre étude, les mères les plus symptomatiques sont les mères porteuses de mutations ponctuelles, alors que les femmes asymptomatiques ou légèrement atteintes portent de très larges délétions emportant plusieurs gènes (4, 22, 30, et 46 gènes selon les mères). Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature démontrant l'inactivation préférentielle des chromosomes portant des larges délétions multigéniques comme mécanisme de protection (Zhao et al., 2021, Santos-Rebouças et al., 2020; Leppig et al., 2001).

Les résultats de ce travail démontrent (i) d'une part, qu'il est essentiel d'explorer les origines génétiques de symptômes respiratoires, même légers, chez les femmes apparentées aux hommes atteints de DCP liée à un défaut moléculaire de *PIH1D3* en vue d'un conseil génétique et (ii) d'autre part, qu'il est important de rechercher chez des femmes consultant pour une atteinte respiratoire chronique modérée, l'éventualité d'un défaut moléculaire de *PIH1D3* à l'état hétérozygote.

Nos résultats suggèrent également que la présence d'environ 30% de cellules ciliées normales dans le tractus respiratoire permettrait d'assurer une épuration mucociliaire suffisante pour éviter l'apparition des symptômes classiques de DCP. Ce résultat apporte des données encourageantes dans la perspective d'une potentielle thérapie génique des DCP.

V.2.2. Article 2

Variable X-chromosome inactivation underlies primary ciliary dyskinesia expressivity in female carriers of a *PIH1D3* mutation

Lucie Thomas, Laurence Cuisset, Jean-François Papon, Aline Tamalet, Isabelle Pin, Rola Abou Taam, Catherine Faucon, Guy Montantin, Sylvie Tissier, Philippe Dusquenoy, Florence Dastot-Le Moal, Bruno Copin, Nathalie Carion, Bruno Louis, Sandra Chantot, Jean-Pierre Siffroi, Rana Mitri, André Coste, Estelle Escudier, Guillaume Thouvenin, Serge Amselem and Marie Legendre

En cours de révision dans l'*European Respiratory Journal*

Variable X-chromosome inactivation underlies primary ciliary dyskinesia expressivity in female carriers of a *PIH1D3* mutation

Lucie Thomas¹, Laurence Cuisset², Jean-François Papon^{3,4}, Aline Tamalet⁵, Isabelle Pin⁶, Rola Abou Taam⁷, Catherine Faucon⁸, Guy Montantin⁹, Sylvie Tissier⁹, Philippe Dusquenoy¹, Florence Dastot-Le Moal⁹, Bruno Copin⁹, Nathalie Carion², Bruno Louis³, Sandra Chantot^{1,10}, Jean-Pierre Siffroi^{1,10}, Rana Mitri⁸, André Coste^{3,11}, Estelle Escudier^{1,9}, Guillaume Thouvenin⁵, Serge Amselem^{1,9} and Marie Legendre^{1,9}

¹ Sorbonne Université, INSERM, Childhood Genetic Diseases, Hôpital Armand-Trousseau, Paris, France

² Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (AP-HP) Centre, Université de Paris, Hôpital Cochin, Paris, France

³ Université Paris-Est, Faculté de Médecine, INSERM U955, CNRS ERL7240, Hôpital Henri-Mondor, Créteil, France

⁴ AP-HP, Service d’Oto-Rhino-Laryngologie et de Chirurgie Cervico-Faciale, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin–Bicêtre, France

⁵ AP-HP, Unité Fonctionnelle d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire–Somnologie, Service de Physiologie et Explorations Fonctionnelles, Centre National de Référence des Maladies, Hôpital Armand-Trousseau, Paris, France

⁶ Pédiatrie, CHU de Grenoble Alpes, Grenoble, France

⁷ AP-HP, Service de Pneumologie et Allergologie Pédiatriques, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

⁸ Service d'Anatomopathologie, Laboratoire de Microscopie Electronique, Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Créteil, France

⁹ Sorbonne Université, AP-HP, UF de Génétique Moléculaire, Hôpital Armand-Trousseau, Paris, France

¹⁰ Sorbonne Université, AP-HP, UF de Génétique Chromosomique, Hôpital Armand-Trousseau, Paris, France

¹¹ AP-HP, Service d’Oto-Rhino-Laryngologie et de Chirurgie Cervico-Faciale, Hôpital Henri-Mondor et Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Créteil, France

Corresponding author: Marie Legendre, UF de Génétique Moléculaire, Hôpital Armand-Trousseau, 26, avenue du Dr-Arnold-Netter, 75012 Paris, France. E-mail: marie.legendre@aphp.fr

Abstract

Background Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a rare genetic disorder caused by defective motile cilia underlying chronic respiratory symptoms. In the case of X-linked recessive PCD resulting from mutations in PIH1 Domain-Containing-3 (*PIH1D3*), all males are affected, whereas their mothers are supposedly healthy carriers of a heterozygous *PIH1D3* mutation. However, the random X-chromosome inactivation (XCI) in each cell of females prompted us to investigate whether these mothers might have respiratory symptoms caused by preferential inactivation of their normal *PIH1D3* allele.

Methods XCI patterns of 6 mothers of 8 male PCD patients were determined by DNA-methylation studies and compared to clinical (6/6 mothers) and cilia (4/6 mothers) phenotypes. Within these XCI analyses, the mutated X-chromosome could be tracked in all mothers to assess the percentage of cells in which the normal *PIH1D3* allele is inactivated.

Results The mothers' phenotypes ranged from total absence of airway symptoms (n=2) to mild/moderate phenotypes (n=3) or severe respiratory signs (n=1), closely reflecting their respective XCI patterns. Analyses of the four symptomatic mothers' airway cilia revealed cellular heterogeneity with normal cells and cells with immotile cilia lacking both dynein arms.

Conclusions The results of this study highlight the importance of searching for heterozygous carriers of a *PIH1D3* mutation in all female relatives of male PCD patients with a *PIH1D3* defect, and in females consulting for mild chronic respiratory symptoms. Those results also demonstrated that ~30% normal ciliated airway cells sufficed to avoid severe PCD, a result paving the way for gene therapy.

Take Home Message

Allele specificity of X-chromosome inactivation in females with a *PIH1D3*-gene mutation underlies a wide range of primary ciliary dyskinesia severities, suggesting ~30% ciliated airway cells should be targeted for future molecular and cell therapies.

Introduction

Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a rare genetic disorder [(MIM: 244400)] in which dysfunction of motile cilia from respiratory epithelial cells leads to impaired mucociliary clearance resulting in chronic airway infections; half the patients have associated situs inversus caused by dysfunctional nodal cilia, which defines Kartagener syndrome [1, 2]. In addition, most affected males are infertile because of similar sperm-flagellum and/or efferent duct ciliated-epithelium defects [3].

PCD is a clinically and genetically heterogeneous disorder with, to date, about implicated 50 genes [4]. It is usually transmitted as an autosomal-recessive trait, meaning both parents of a patient are healthy carriers of a heterozygous mutation in one of those genes. However, mutations in three of those genes (retinitis pigmentosa GTPase regulator (*RPGR*) [5], oral-facial-digital syndrome type-1 (*OFD1*) [6] and *PIH1D3*/dynein axonemal assembly factor-6 (*DNAAF6*) [7]) are responsible for X-linked PCD. *RPGR* and *OFD1* mutations are mainly responsible for syndromic PCD, while *PIH1D3* mutations are involved in non-syndromic X-linked recessive PCD. Affected males carrying *PIH1D3* mutations have typical PCD features including, neonatal respiratory distress, recurrent upper and lower respiratory tract infections and bronchiectasis; half also have situs inversus totalis, and asthenozoospermia renders adults infertile [7]. Because *PIH1D3* encodes a player in the cytoplasmic pre-assembly of dynein arms (DAs) [7], its mutations lead to the loss of both outer and inner DAs (ODAs and IDAs, respectively), the molecular motors attached all along the axoneme, which provide the sliding force for cilia motility.

Human and therian mammal male cells carry one X and one Y chromosomes, while female cells carry two X-chromosomes. To preserve the same gene dosage in males and females, one X-chromosome copy is silenced in females [8], except for the 15% of genes that escape inactivation, mostly included in the two pseudo-autosomal regions [9, 10]. X-chromosome inactivation (XCI) occurs during the early stages of development and is passed on to daughter cells through mitosis. It involves epigenetic modifications, *e.g.*, methylation of CpG sites, leading, within each female's cells, to the random mosaic expression of either the maternal or paternal X-chromosome [11]. Most importantly, in most women, the fraction of cells with maternal XCI is roughly the same as that of cells in which the paternal X-chromosome is inactivated. However, in the general population, a deviation from the 50:50 ratio, with preferential inactivation of either the maternal or paternal X-chromosome, has been described [12] and a ratio higher than ~80:20 is referred to as inactivation skewing [8]. Because of this functional mosaicism, disease phenotypes of female carriers of X-linked recessive mutations may vary widely [13].

Overall, these observations raise the question as to whether the mothers of patients whose PCD results from a *PIH1D3* mutation are asymptomatic or may have respiratory symptoms of variable

severity. This study was designed to look for respiratory symptoms and cilia abnormalities in several mothers of male patients with *PIH1D3* mutations, and we determined the mothers' clinical and cilia phenotypes according to the methylation status of their mutated *PIH1D3* allele.

Patients and methods

Subjects and study design

In our PCD cohort, we identified eight male patients from six independent families with a molecular defect in *PIH1D3*: two point mutations and four large deletions. This study concerns their six mothers (M1 to M6). They were questioned about their phenotype during the evaluation of their sons' medical histories. M3 to M6 underwent cilia investigations for respiratory symptoms (see below). In addition, blood DNA samples from the six mothers were obtained for genetic analyses and the methylation states of X-chromosomes with/without the *PIH1D3* defect were determined by methylation-sensitive digestion and/or sequencing of bisulfite-converted DNA (**table S1**). Written informed consent was obtained from the six mothers investigated, following protocols approved by the Comité de Protection des Personnes (CPP) Île-de-France III and the INSERM Institutional Review Board.

Molecular genetics

The pathogenic *PIH1D3* mutations identified in the boys were sought in their mothers by Sanger sequencing for the two point mutations and by copy-number variation analyses for the four deletions (supplementary material).

PCD-related investigations

Nasal nitric oxide (NO) measurements, high-speed videomicroscopy analysis (HSVA)-assessed beating cilia on nasal brushings, and/or structural analyses of cilia using transmission electron microscopy (TEM) are described in supplementary material.

Impact of heterozygous PIH1D3 mutations on DAs as assessed by immunofluorescence (IF) and Western-blotting

Various DA components were studied by IF and Western-blotting analyses of airway epithelial cells (AECs) obtained from nasal brushing (M3, M4, M5 and M6) and/or following air-liquid interface (ALI) culture (control individuals, M5 and M6) (supplementary material).

XCI studies

Methylation levels of the X-chromosomes carrying the mutated *PIH1D3* allele *versus* those carrying the normal *PIH1D3* allele were evaluated with two different techniques.

Methylation-sensitive digestion. This method is based on the properties of two restriction enzymes, *MspI* and *HpaII*, to digest, or not, DNA fragments according to their methylation status. It was applied to M1-to-M6 blood samples or ALI-cultured M5 AECs. The methylation level was calculated at the commonly studied human androgen receptor (*HUMARA*) locus, which contains a polymorphic region where CAG repeats allow distinction between the two alleles, and two cleavage sites for *MspI/HpaII* that enable evaluation of each allele's methylation percentage, after digestion followed by polymerase chain reaction (PCR) amplification. *MspI/HpaII*-site methylation at this locus represents the whole XCI [14]. Importantly, we then analysed CAG repeats in the affected son(s)' allele to track the *PIH1D3*-mutated allele, and assign the corresponding methylation rate to the mother's allele. When the *HUMARA*-specific CAG region was not informative (homozygous in the mother), three other loci, containing trinucleotide-repeats, located on X-chromosomes can be studied: *PCSK1N*, *ZDHHC15* or *SLITRK4* [15]. Herein, only M4's *PCSK1N* locus was analysed (supplementary material).

Bisulfite conversion. This approach, which relies on the capacity of bisulfite to convert non-methylated cytosines into uracils, was applied to blood DNA from M1–M4, who harboured large deletions, to specifically determine the remaining normal allele's methylation at several loci. We used the Premium Bisulfite Kit (Diagenode) according to the manufacturer's recommendations (supplementary material), and performed PCR and Sanger sequencing with primers outside methylation sites (*i.e.*, CG dimers).

Results

Genotypes of mothers of sons with a PIH1D3-related PCD phenotype

Sanger-sequencing and copy-number-variation analyses confirmed that the six mothers carry, in the heterozygous state, the same pathogenic mutation as their respective son(s). Five of those defects had previously been described [7]: two point mutations (c.511C>T p.(Gln171*) in M5, and c.397G>T p.(Asp133Tyr) in M6) and three large deletions including the whole *PIH1D3* gene (3.27-Mb del, 3.73-Mb del or 1.93-Mb del, in M1, M3 or M4, respectively). In addition, we identified a new deletion involving 6/7 *PIH1D3*-gene exons (118-kb del) in M2 and her son (19GM00662) (supplementary figure S1).

Phenotypes of mothers carrying heterozygous pathogenic PIH1D3 mutations

As summarised in **table 1**, the six mothers' clinical phenotypes differed, ranging from no respiratory symptoms (M1 and M2) to variable disease severities for the four others, involving the upper and/or lower airways, with symptoms appearing from childhood to adulthood. M3 and M4 had mild clinical signs, respectively: intermittent nasal obstruction with episodic bronchitis in adulthood, and sinusitis and cough only during childhood. Lastly, M5's manifestations were moderate, and M6 had very severe upper and lower respiratory symptoms since childhood, associated with bronchiectasis. M6's greater symptom severity closely resembles typical PCD. Interestingly, none of the six mothers had situs inversus. Their risk factors for respiratory symptoms are reported in (supplementary **table S2**). Clinical features of their sons, hemizygous for *PIH1D3* mutations, are described in supplementary **table S3** (updated from previous published data [7]).

Cilia investigations of symptomatic M3, M4, M5 and M6 differed for the percentages of HSVA-identified immotile cilia (17% for M3, 23% for M4 and 50% for M5), and TEM-assessed percentages of cilia lacking both DAs (3% for M4, 80% for M5 and 45% for M6). Notably, these symptomatic mothers' NO levels and ciliary-beating frequencies were normal (**table 2**).

Impact of heterozygous PIH1D3 mutations—at the single-AEC and AEC-population levels—on DA-specific cell proteins

Ex-vivo high-resolution IF studies on freshly collected AECs from the four symptomatic mothers (M3 to M6) exhibited cell mosaicism. Given the absence of specific anti-*PIH1D3* antibodies suitable for IF studies, we used classical ODA (DNAH5 and DNAI2) and IDA (DNALI1) markers to discriminate AECs whose active X-chromosome carries normal *PIH1D3*, from those whose active X-chromosome carries mutated *PIH1D3* (**figure 1a**). Two AEC populations coexist in these four mothers: normal, expressing DNAH5, DNAI2 and DNALI1 all along the axoneme, corresponding to the X-chromosome carrying normal *PIH1D3*; and another, expressing the X-chromosome carrying mutated *PIH1D3* that completely lacks ODA and IDA markers. Furthermore, quantitatively, all cells in male PCD patients with hemizygous *PIH1D3* mutations are abnormal (supplementary **figure S2**), 100% of controls' AECs were normal, while M3's and M4's (with mild clinical symptoms), M5's (moderate symptoms) and M6's (severe symptoms) normal AECs represented ~68%, ~70%, ~28% and ~20%, respectively (**figure 1b**).

AECs from moderately and severely-affected M5 and M6 respectively, could be ALI-cultured, enabling confirmation of cell mosaicism using several approaches. First, *in-vitro* immunolabelling of DNAH5, DNAI2 and DNALI1 at the cell-population level yielded patches of AECs expressing normal *PIH1D3* intermingled with patches expressing mutated *PIH1D3* (**figure 2a**). In agreement with fresh

nasal-brushing findings, only ~38% (M5) and ~20% (M6) of AECs retained both DAs. TEM analysis of those AECs confirmed the mixed population: 25% normal and 75% totally lacking both DAs for M5, and 9% normal and 91% totally lacking both DAs for M6 (**figure 2c**), while the majority of cilia in male PCD patients with hemizygous *PIH1D3* mutations lacked both DAs (supplementary **figure S3**). Finally, HSVA cilia analyses revealed ~37% (M5) and ~13% (M6) motile ciliated AECs, with normal ciliary-beating frequencies, and 63% (M5) and 87% (M6) totally immotile (**figure 2d**, and **movies S1 and S2** in supplementary material).

In addition, total protein extracts from those ALI-cultured AECs were immunoblotted with anti-DNAI2 antibody (directed against ODAs). M5's and M6's cell lysate contained less DNAI2 than those of two independent controls (**figure 2b**). That analysis also revealed for M5, two *PIH1D3* proteins: one generated by the normal allele, and the other truncated from M5's nonsense mutated allele (p.Gln171*). That truncated-protein expression reflects the absence of activation of the nonsense-mediated mRNA-decay pathway, an observation consistent with the premature stop codon located in the last *PIH1D3* exon.

X-chromosome inactivation skewing among mothers heterozygous for mutated PIH1D3

Exploring XCI with methylation-sensitive digestion of the six mothers' DNA from peripheral blood enabled determination of their inactivation patterns and quantification of the percentages of inferred methylated mutated-*PIH1D3* alleles (*i.e.*, inactivated). Moreover, similar percentages of methylated mutated-*PIH1D3* alleles were found in M5's blood and AECs (89% and 72%) (**figure 3a**).

As shown in **figure 3a**, M5 and M6 (moderate and severe clinical phenotypes, respectively) had XCI skewing favouring their mutated alleles. Conversely, asymptomatic M2 and M4 (mild clinical respiratory symptoms) had XCI skewing favouring their normal allele expression. The comparative trinucleotide-repeats analysis of M3 and her son (data not shown) revealed at least one homologous recombination event between the *ZDHHC15* and *SLITRK4* loci which flank the *PIH1D3* gene. M3's recombination breakpoint(s) could not be accurately located, preventing her XCI ratio of 14/86 from being linked to the X-chromosome carrying the mutated allele. According to methylation-sensitive digestion at the *HUMARA* locus, asymptomatic M1 had an extremely skewed XCI ratio: 100% of the active X-chromosome carried the mutated *PIH1D3* allele; that unexpected observation raised the question as to whether homologous recombination events could have misled us.

The methylation-sensitive-digestion-estimated XCI ratio in blood DNA was calculated at the *HUMARA* or *PCSK1N* locus, located, respectively, 40 and 57-Mb upstream from *PIH1D3* (**figure 3c**). To overcome potential recombination events, the bisulfite-conversion method was applied at the *PIH1D3* locus for M1, M2, M3 and M4, who have large deletions, to directly evaluate methylation of the normal allele by targeting loci included in those deletions (*PIH1D3*, *NUP62CL* and *TBC1D8B*); XCI

skewing favouring the normal allele was found for all four. Indeed, M1 and M2 (asymptomatic) and M3 and M4 (mild disease phenotype) had, respectively: 95%, 80%, 89% and 91% active/non-methylated chromosomes carrying the non-deleted *PIH1D3* allele (**figure 3b**). Thus, this technique resolved two data previously obtained with the digestion method: the uninterpretable 14/86 ratio for M3 and the inconsistent result obtained for M1. For collated cilia-investigation and methylation-analysis information available for each mother see **figure 4**.

Discussion

PCD almost always follows autosomal-recessive transmission. However, a few patients carry mutations in *PIH1D3*, one of the three PCD genes located on the X-chromosome. In that setting, males carrying a *PIH1D3* mutation are affected, whereas their mothers are supposedly healthy *PIH1D3*-mutation carriers. Diametrically opposed to that expectation, our results demonstrated broad disease-expression phenotype differences among six mothers heterozygous for a pathogenic *PIH1D3* mutation. Thorough analysis of their phenotypes, considering their XCI patterns, revealed that their respiratory phenotypes reflected the percentages of AECs harbouring the inactivated mutated allele. Because XCI occurs early during development and randomly in each female cell, when a mutation occurs in an X-chromosome gene, it is expected that half the cells in each tissue would express the normal X-chromosome, while the other half would express the mutated X-chromosome. The ratio between those two cell populations may deviate from 50:50, thereby favouring expression of the mutated or normal chromosome. And the disease-severity phenotype is expected to reflect that ratio. Although that ratio has been the subject of numerous studies [12, 16, 17], none of them concerned PCD to the best of our knowledge. Those studies predominantly used the methylation ratio at the *HUMARA* locus in blood DNA determined with the digestion method, without tracking the mutation-carrying allele.

The novelty of our study is the combination of two methods to assess DNA methylation in an allele-specific way. First, *HUMARA*-locus digestion for all mother–son pairs phased the mutated-*PIH1D3* allele and methylation ratio. Second, bisulfite conversion for the four mothers heterozygous for entire *PIH1D3* deletion, directly provided normal allele's methylation percentage. Those experimental results enabled determination of the percentages of active/non-methylated X-chromosomes carrying a normal *PIH1D3* copy. Despite the small number of individuals investigated for this rare disease (*i.e.*, six independent families herein), information concerning the six mothers' clinical respiratory phenotypes substantiated the percentages of AECs in which the mutated X-chromosome is inactivated (**figure 4**). Furthermore, all six mothers had skewed XCIs, with extreme

skewing previously deemed explanatory for X-linked disorders in heterozygous-mutation-carrying females, who were usually asymptomatic (ratio>95:5%) [18–21]. In the general population, 10% of women have skewed XCIs (>80:20%), with 1–5% being extremely skewed (ratio>95:5%) [12, 22]. Those extremely skewed ratios might reach 20% for women >60 years [12]. Our six mothers' ages ranged from 36 to 48 years.

The relationship between clinical X-linked-disease phenotypes and the XCI patterns has mainly been studied in blood cells because of inaccessibility of tissues of interest. It may be either inconsistent (*e.g.*, hemophilia A/B, Fabry disease [23, 24]) or significantly linked (*e.g.*, fragile-X mental retardation, nephrogenic diabetes insipidus [25, 26]). Herein, we were able to obtain large amounts of AECs from M5 enabling demonstration that their methylation pattern was similar to that of her blood cells. Moreover, TEM, IF and/or HSVA cilia phenotypes were consistent with the blood-DNA-methylation ratio obtained for four mothers (**figure 4**). Taken together, those results strongly support—for the six mothers investigated—the relationship between clinical phenotype and XCI pattern.

Although the bisulfite-conversion method is only feasible for deletions including the gene of interest and CpG sites, our results highlight its better reliability, as it targets the region of interest in the non-deleted normal allele, compared to the methylation-sensitive digestion technique. Bisulfite-conversion provided clear conclusions for M1 and M3, that had been left unresolved by methylation-sensitive digestion because of homologous-recombination.

Notably, point-mutation-carrying M5 and M6, respectively, had moderately and severely symptomatic phenotypes, while asymptomatic and mild phenotypes corresponded to large deletions including multiple genes (4, 22, 30 and 46 genes in M2, M4, M1 and M3, respectively, *cf.* **table S4**). Those results are consistent with previous studies demonstrating the preferential inactivation of X-chromosomes harbouring large multigenic deletions as a protective event [27–30].

Among the 13 male PCD patients previously reported with a *PIH1D3* mutation [7], six had situs inversus, an observation in keeping with the expected ~50% of PCD patients having Kartagener syndrome. By contrast, it is striking to note that none of the six mothers studied herein had laterality defects, thereby suggesting that the nodal flow, taken as a whole, might suffice to brake symmetry in the embryo; however, investigation of additional female *PIH1D3*-defect carriers is needed to confirm that hypothesis.

Our findings highlight the importance of proposing genetic testing for all female relatives of male PCD patients with a *PIH1D3* defect to: 1) search for a heterozygous *PIH1D3* mutation, and 2) analyse the methylation to determine the XCI pattern for those with respiratory symptoms, thereby improving their disease management. From a more general viewpoint, our findings should also

prompt investigation into the cause of chronic respiratory symptoms, *e.g.*, mild rhinosinusitis or bronchitis, in all women, to allow them to benefit from a genetic counselling and appropriate medical follow-up. That management is all the more important since the six mothers investigated herein do not have two major phenotypic features highly suggestive of PCD in the context of chronic airway symptoms (*i.e.*, situs inversus and low nasal NO level).

Our results also revealed that ~30% of normal ciliated AECs (in M5) were sufficient to achieve mucociliary clearance to prevent severe PCD. That relatively low number of AECs necessary to correct respiratory tract dysfunction and prevent typical PCD provide promising insights for future gene therapy of PCD.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data include 4 figures, 5 tables and 2 movies.

Acknowledgements: We are grateful to the mothers and their families, whose cooperation made this study possible. We also thank Janet Jacobson for editing the manuscript.

Author contributions: L. Thomas: study design, acquisition and analysis of data, and writing the manuscript. L. Cuisset: acquisition of methylation-sensitive-digestion data and manuscript review. J.F. Papon: clinical data, follow-up of the investigated mothers, and nasal-brushing samples. A. Tamalet, I. Pin, G. Thouvenin, and A. Coste: clinical data and follow-up of the investigated mothers. R. Abou Taam: clinical phenotyping of mothers. C. Faucon: all TEM experiments. G. Montantin, S. Tissier, P. Dusquenoy, F. Dastot-Le Moal, and B. Copin: genetic analyses. N. Carion: methylation-sensitive-digestion experiments. B. Louis: developed and provided the HSVA software. S. Chantot: acquisition and analysis of copy-number-variation data. R. Mitri: TEM analyses and data interpretation. E. Escudier: study conception and design, interpretation of data, writing and review of the manuscript. S. Amselem: study conception, analysis of the data, writing and final approval of the manuscript. M. Legendre: conceived the study, contributed to study design, analysis of the data, writing and final approval of the manuscript. All authors revised the manuscript and gave their final approval.

Conflict of interest: The authors declare no competing interests.

Support statement: This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Fondation pour la Recherche Médicale, the Legs Poix from the Chancellerie des Universités, BEAT-PCD and by RaDiCo (funded by the French National Research Agency under the specific programme “Investments for the Future”, Cohort grant agreement ANR-10-COHO-0003).

References

- 1 Bisgrove BW, Yost HJ. The roles of cilia in developmental disorders and disease. *Development* 2006; 133: 4131-4143.
- 2 Lucas JS, Barbato A, Collins SA, Goutaki M, Behan L, Caudri D, *et al.* European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 2017; 49: 1601090.
- 3 Sironen A, Shoemark A, Patel M, Loebinger MR, Mitchison HM. Sperm defects in primary ciliary dyskinesia and related causes of male infertility. *Cell Mol Life Sci* 2020; 77: 2029–2048.
- 4 Legendre M, Zaragosi LE, Mitchison HM. Motile cilia and airway disease. *Semin Cell Dev Biol* 2021; 110: 19–33.
- 5 Moore A, Escudier E, Roger G, Tamalet A, Pelosse B, Marlin S, *et al.* *RPGR* is mutated in patients with a complex X-linked phenotype combining primary ciliary dyskinesia and retinitis pigmentosa. *J Med Genet* 2006; 43: 326–333.
- 6 Bukowy-Bieryllo Z, Rabiasz A, Dabrowski M, Pogorzelski A, Wojda A, Dmenska H, *et al.* Truncating mutations in exons 20 and 21 of *OFD1* can cause primary ciliary dyskinesia without associated syndromic symptoms. *J Med Genet* 2019; 56: 769–777.
- 7 Olcese C, Patel MP, Shoemark A, Kiviluoto S, Legendre M, Williams HJ, *et al.* X-linked primary ciliary dyskinesia due to mutations in the cytoplasmic axonemal dynein assembly factor *PIH1D3*. *Nat Commun.* 2017; 8:14279.
- 8 Lyon MF. X-chromosome inactivation as a system of gene dosage compensation to regulate gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1989; 36: 119–130.
- 9 Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 2005; 434: 400–404.
- 10 GTEx Consortium, Tukiainen T, Villani AC, Yen A, Rivas MA, Marshall JL, *et al.* Landscape of X chromosome inactivation across human tissues. *Nature* 2017; 550: 244–248.
- 11 Nora EP, Heard E. Chromatin structure and nuclear organization dynamics during X-chromosome inactivation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2010; 75: 333–344.
- 12 Ørstavik KH. X chromosome inactivation in clinical practice. *Hum Genet* 2009; 126: 363–373.
- 13 Migeon BR. Why females are mosaics, X-chromosome inactivation, and sex differences in disease. *Gend Med* 2007; 4: 97–105.
- 14 Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of *HpaII* and *HhaI* sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 1229–1239.
- 15 Bertelsen B, Tümer Z, Ravn K. Three new loci for determining X chromosome inactivation patterns. *J Mol Diagn* 2011; 13: 537–540.
- 16 Migeon BR. X-linked diseases: susceptible females. *Genet Med* 2020; 22: 1156–1574.

- 17 Fahim AT, Sullivan LS, Bowne SJ, Jones KD, Wheaton DKH, Khan NW, *et al.* X-chromosome inactivation is a biomarker of clinical severity in female carriers of *RPGR*-associated X-linked retinitis pigmentosa. *Ophthalmol Retina* 2020; 4: 510–520.
- 18 Ferraris AM, Forni GL, Mangerini R, Gaetani GF. Nonrandom X-chromosome inactivation in hemopoietic cells from carriers of dyskeratosis congenita. *Am J Hum Genet.* 1997; 61: 458–461.
- 19 Gibbons RJ, Suthers GK, Wilkie AO, Buckle VJ, Higgs DR. X-linked alpha-thalassemia/mental retardation (ATR-X) syndrome: localization to Xq12-q21.31 by X inactivation and linkage analysis. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 1136–1149.
- 20 Fearon ER, Kohn DB, Winkelstein JA, Vogelstein B, Blaese RM. Carrier detection in the Wiskott Aldrich syndrome. *Blood* 1988; 72: 1735–1739.
- 21 Li SL, Ting SS, Lindeman R, French R, Ziegler JB. Carrier identification in X-linked immunodeficiency diseases. *J Paediatr Child Health.* 1998 Jun; 34(3): 273–279.
- 22 Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Preisinger AC, Willard HF, Michelson AM, *et al.* Clonal analysis using recombinant DNA probes from the X-chromosome. *Cancer Res* 1987; 47: 4806–4813.
- 23 Orstavik KH, Scheibel E, Ingerslev J, Schwartz M. Absence of correlation between X chromosome inactivation pattern and plasma concentration of factor VIII and factor IX in carriers of haemophilia A and B. *Thromb Haemost* 2000; 83: 433–437.
- 24 Maier EM, Osterrieder S, Whybra C, Ries M, Gal A, Beck M, *et al.* Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl* 2006; 95: 30–38.
- 25 Satoh M, Ogikubo S, Yoshizawa-Ogasawara A. Correlation between clinical phenotypes and X-inactivation patterns in six female carriers with heterozygote vasopressin type 2 receptor gene mutations. *Endocr J* 2008; 55: 277–284.
- 26 de Vries BB, Wiegers AM, Smits AP, Mohkamsing S, Duivenvoorden HJ, Fryns JP, Curfs LM, Halley DJ, Oostra BA, van den Ouweland AM, Niermeijer MF. Mental status of females with an FMR1 gene full mutation. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 1025-32.
- 27 Santos-Rebouças CB, Boy R, Vianna EQ, Gonçalves AP, Piergiorgio RM, Abdala BB, *et al.* Skewed X-chromosome inactivation and compensatory upregulation of escape genes precludes major clinical symptoms in a female with a large Xq deletion. *Front Genet* 2020; 11: 101.
- 28 Zhao Y, Li J, Dai L, Ma Y, Bai Y, Guo H. X. X Chromosome Inactivation Pattern and Pregnancy Outcome of Female Carriers of Pathogenic Heterozygous X-Linked Deletions. *Front Genet* 2021; 12: 782629.
- 29 McMahon A, Monk M. X-chromosome activity in female mouse embryos heterozygous for *Pgk-1* and Searle's translocation, T(X; 16) 16H. *Genet Res* 1983; 41: 69–83.
- 30 Leppig KA, Distèche CM. Ring X and other structural X chromosome abnormalities: X inactivation

and phenotype. *Semin Reprod Med* 2001; 19: 147-57.

Figure captions

FIGURE 1 Impact of heterozygous *PIH1D3* mutations on dynein arm (DA)-specific proteins in airway epithelial cells (AECs). a) Immunofluorescence microscopy analysis of DA markers, in AECs from a control and mothers (M3, M4, M5 and M6) carrying a *PIH1D3* molecular defect. Cells were double-labelled with an anti-acetylated α -tubulin antibody targeting the ciliary axoneme (red), and anti-DNAH5 or anti-DNAI2 antibodies as markers of ODAs, or an anti-DNALI1 antibody, as marker of IDAs (green). DAPI stained nuclei in blue. M3, M4, M5 and M6 display mixed cell populations: those lacking ODAs and IDAs, and normal cells with both DAs. Scale bars, 5 μ m. b) Histograms show the percentages of ciliary-tuft cells expressing normal pattern of DNAH5, DNAI2 or DNALI1, based on 100 counted cells, for each mother and the control individual. For each mother, we determined the mean of percentages obtained for the three markers.

FIGURE 2 Deep phenotyping of air-liquid interface (ALI)-cultured airway epithelial cells (AECs) from mothers M5 and M6 carrying, respectively, the heterozygous *PIH1D3* nonsense mutation c.(511C>T), p.(Gln171*) and the heterozygous *PIH1D3* missense mutation c.(397G>T), p.(Asp133Tyr). AECs obtained by nasal brushing of a control individual, M5 and M6 were cultured at ALI for 28 days before being processed. a) AECs were immunolabelled with an anti-acetylated (Ac.) α -tubulin antibody targeting the ciliary axoneme (red) and anti-DNAH5 or anti-DNAI2 antibodies as markers of outer DAs (ODAs), or anti-DNALI1 antibody, as marker of inner DAs (IDAs) (green). These immunofluorescence findings reveal M5's and M6's cellular mosaicism, with a mixture of two populations: multiciliated cells with both DAs as a result of the expression of the normal *PIH1D3* allele (the inactivated X chromosome carrying the mutated *PIH1D3* allele), and a population of cells lacking their DAs (the inactivated X chromosome carrying the normal *PIH1D3* allele). Scale bar, 5 μ m. Right panel, DNAH5-, DNAI2-, DNALI1- and tubulin-labelled areas were measured with ImageJ software (three to seven areas, each containing ~40 cells, *i.e.* ~120-280 cells in total). Histograms show the percentages of ciliated AECs with normal DA patterns (DA/tubulin ratios, mean \pm SEM). All values are plotted against a control whose immunolabellings are presented in Figure S4. For each mother, we determined the mean of percentages obtained for the three markers. b) AEC-protein lysates from 2 controls, M5 and M6 were separated by sodium dodecyl-sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and analysed by immunoblotting with anti-DNAI2, anti-PIH1D3 and anti-GAPDH antibodies. For M5, two PIH1D3 molecular species were identified: the full-length normal PIH1D3 protein and a smaller PIH1D3 one compatible with truncation resulting from the expression of the nonsense mutated *PIH1D3* allele (p.Gln171*). Both mothers have much

smaller amounts of DNAI. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) served as the positive control. c) Electron micrographs of cross-sections of cilia axonemes of ALI-cultured AECs from a control, M5 and M6 confirmed M5's and M6's mixed population of cells: 25% normal cilia and 75% cilia lacking both ODAs and IDAs for M5, and 9% normal cilia and 91% cilia lacking both ODAs and IDAs for M6. Scale bars, 5 μ m. d) Histograms represent high-speed videomicroscopy analysis (HSVA)-determined percentages of beating ciliated cells in M5's and M6's ALI-cultured AECs (37% and 13%, respectively) and immotile ciliated cells (63% and 87%, respectively) (at least 10 distinct areas were observed, each containing 10-20 cells). See supplementary data movies S1 and S2.

FIGURE 3 X-chromosome inactivation (XCI) pattern, at distinct loci, in mothers (M) heterozygous for a *PIH1D3* molecular defect. DNA-methylation analysis with a) methylation-sensitive digestion or b) bisulfite conversion in blood or airway epithelial cells (AECs) from M1 to M6 carrying a *PIH1D3* molecular defect. Histograms represent the percentages of cells, as deduced from methylation analyses, expressing either the normal allele (methylation of the mutated allele; in black), or the mutated allele (methylation of the normal allele; in red). The white histogram (for M3) corresponds to a situation in which the X-chromosome methylation status could not be phased with the *PIH1D3* mutation due to a homologous recombination event. WT, wild-type. NR: not relevant (as *PIH1D3* WT-allele methylation ratio can only be assessed when hemizygous). c) Human X-chromosome representation. The loci studied with the methylation-sensitive method are shown in blue, while those assessed with the bisulfite conversion method are in green. In yellow: delimitation of the larger deletion (3.73 Mb). Scale bar: 11.5 Mb.

FIGURE 4 X-chromosome inactivation (XCI) patterns in light of the clinical and cellular phenotypes of mothers (M) carrying a *PIH1D3* mutation. Left Y-axes represent the percentages of cells, as deduced from methylation analyses, expressing either the normal allele (methylation of the mutated allele; in black), or the mutated allele (methylation of the normal allele; in red). Right Y-axes represent the percentages of airway epithelial cells (AECs) with an abnormal or normal cellular phenotype. For each mother, methylation analyses (black/red/white bars) and/or cellular analyses (grey/orange bars) correspond to the clinical phenotype. White histograms correspond to M3's situation, *i.e.*, the X-chromosome-methylation status could not be phased with the *PIH1D3* mutation by the digestion technique, due to a homologous recombination event. Symbol ¥ for M1 indicates discordant results probably attributable to a homologous recombination event. WT: wild type; IF: immunofluorescence; HSVA: high-speed videomicroscopy analysis.

TABLE 1 Airway phenotype of the six mothers (M1–M6) harbouring a pathogenic heterozygous *PIH1D3* mutation

Mother (ID number)	Respiratory- symptom onset (age)	LD	Upper respiratory tract			Lower respiratory tract		
			Symptoms	Endoscopy	Sinus CT scan	Neonatal distress	Symptoms	Bronchiectasis
M1 (DCP1339)	–		None	NR	NR	No	None	No
M2 (8822GM0145)	–	No	None	NR	NR	No	None	No
M3 (16GM00624)	Adult (38 yr)	No	Intermittent nasal obstruction	Normal	Normal	No	Bronchitis from 38 years old	No
M4 (DCP1748)	Childhood (10 yr)	No	Sinusitis during childhood	Normal	Normal	No	Wet cough during childhood; none during adulthood	No
M5 (DCP1848)	Childhood (5 yr)	No	Chronic rhinosinusitis; otitis only during childhood	Normal	Partial sinus opacities	No	Some bronchitis; one pneumopathy (at 39 yr)	No
M6 (DCP1994)	Childhood (6 yr)	No	Serous otitis; chronic rhinosinusitis with surgery (at 6 & 20 yr); nasal polyposis	Purulent secretions	Total sinus opacities	No	Pneumopathies; chronic bronchitis; exacerbations with intermittent <i>P. aeruginosa</i> FEV ₁ =2.47 L (92%)	Yes; left inferior lobe

LD: laterality defect; CT: computed tomography; NR: not relevant; FEV₁: forced expiratory volume in 1 second.

No symptoms
 Mild phenotype
 Moderate phenotype
 Severe phenotype

TABLE 2 The six mothers' genotypes and cilia investigations

Mother (ID number)	Age (yr) at the time of study	Genotype	Primary ciliary dyskinesia-related investigations		
			nNO [§] (nL/min)	HSVA (% motile/immotile ciliated cells) (CBF)	TEM Abnormal cilia (%)
M1 (DCP1339)	48	c.[3.27-Mb del];[=] p.[0];[=]	ND	ND	ND
M2 (8822GM0145)	36	c.[118-kb del];[=] p.[0];[=]	ND	ND	ND
M3 (16GM00624)	48	c.[3.73-Mb del];[=] p.[0];[=]	Not evaluated	Motile: 83% (8.1 Hz) Immotile: 17%	Not assessable (no ciliated cells)
M4 (DCP1748)	39	c.[1.93-Mb del];[=] p.[0];[=]	159	Motile: 77% (4.5 Hz) Immotile: 23%	Absence of both dynein arms (3%)
M5 (DCP1848)	40	c.[511C>T];[=] p.[(Gln171*)];[=]	248	Motile: 50% (15.5 Hz) Immotile: 50%	Absence of both dynein arms (80%)
M6 (DCP1994)	46	c.[397G>T];[=] p.[(Asp133Tyr)];[=]	Normal	Motile* (9.5 Hz) Immotile*	Absence of both dynein arms (45%)

nNO: nasal nitric oxide; HSVA: high-speed videomicroscopy analysis; CBF: ciliary-beat frequency; TEM: transmission electron microscopy; NA: Not Available; ND: not done; DA: dynein arms. [=] normal allele.

[§]nNO in PCD patients <77 nL/min [2].

* Examined visually but % of immotile ciliated cells not evaluated.

Figure 1

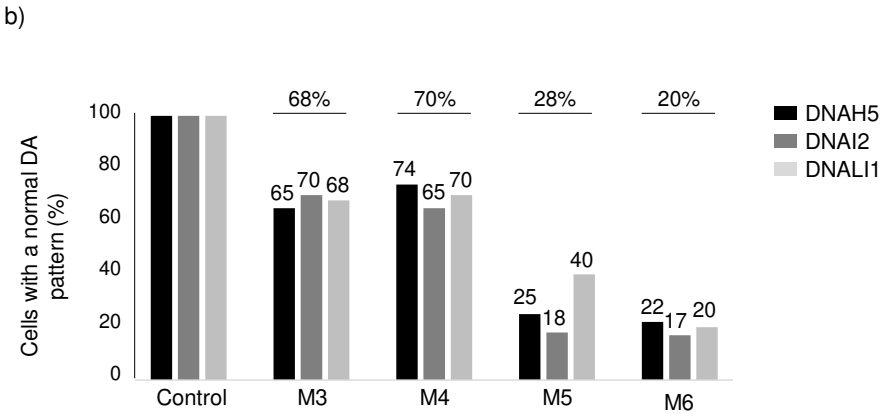
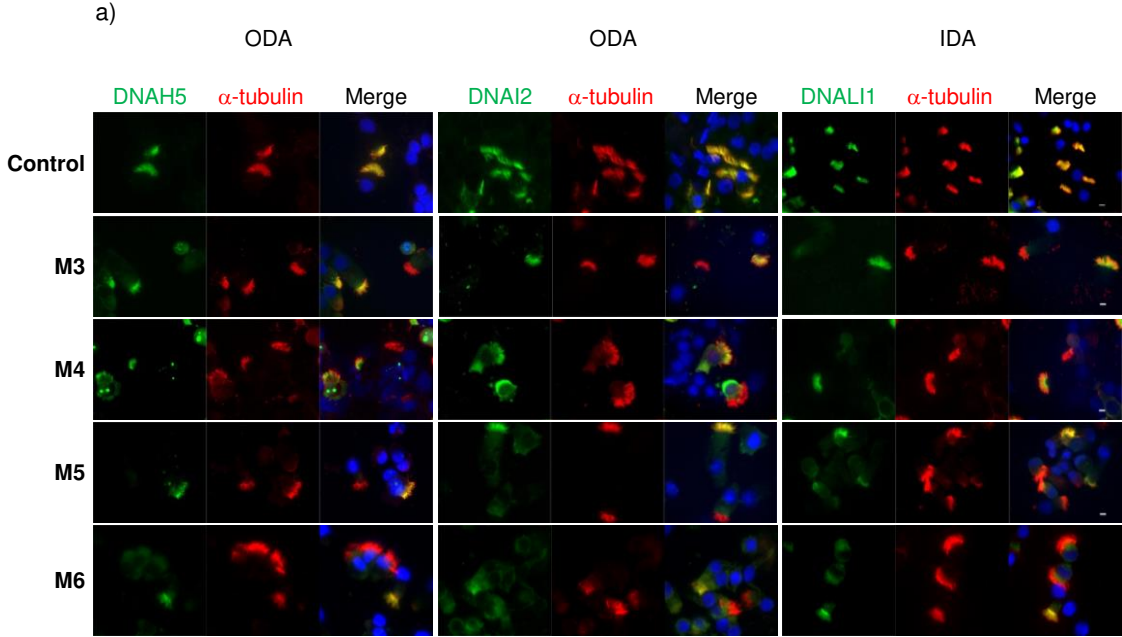


Figure 2

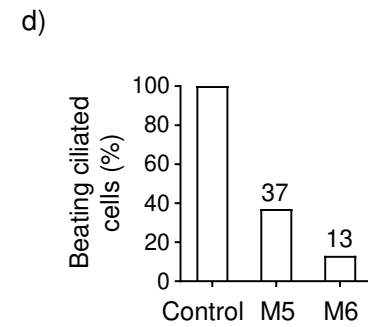
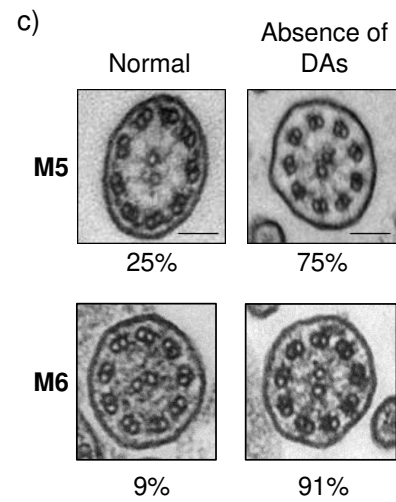
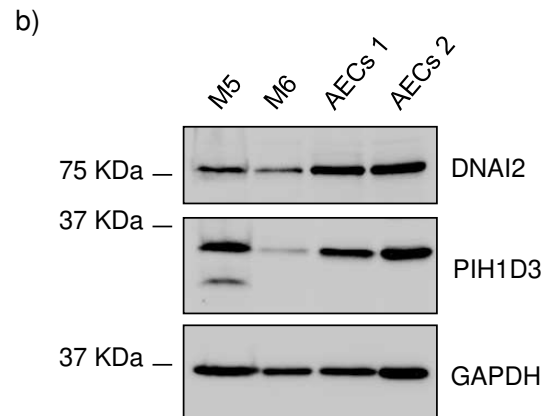
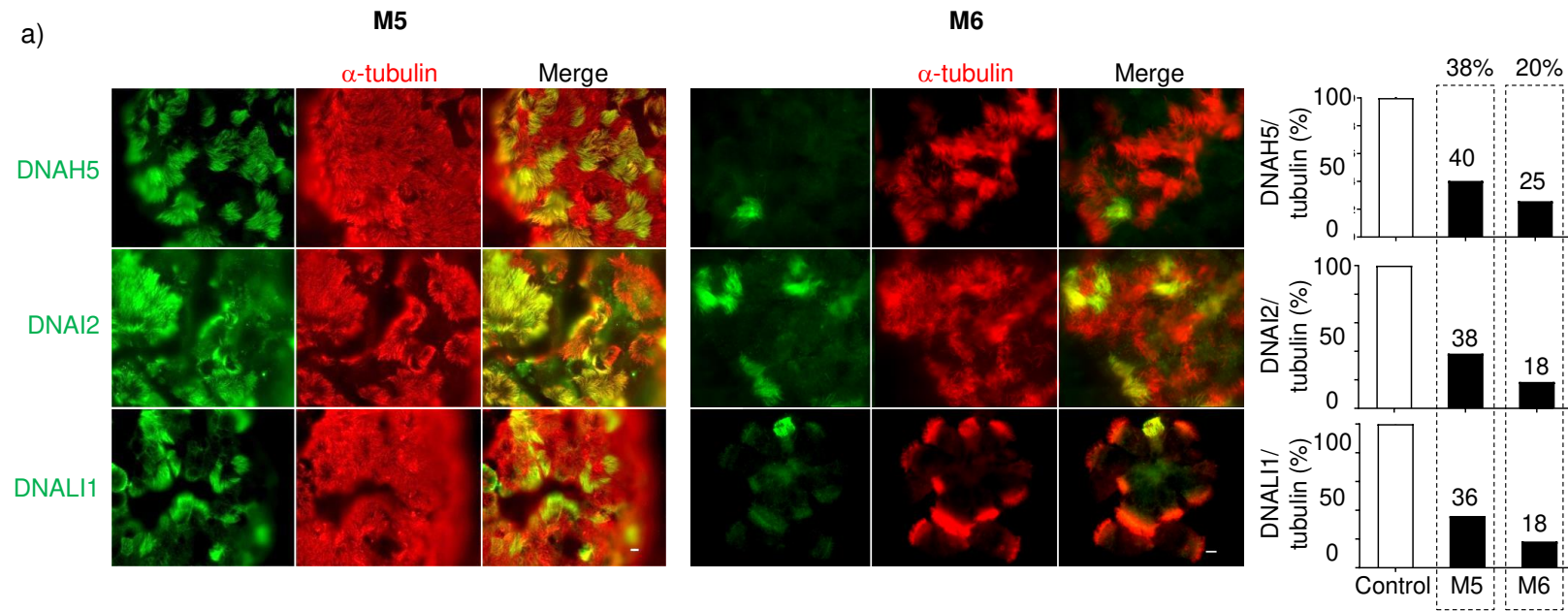


Figure 3

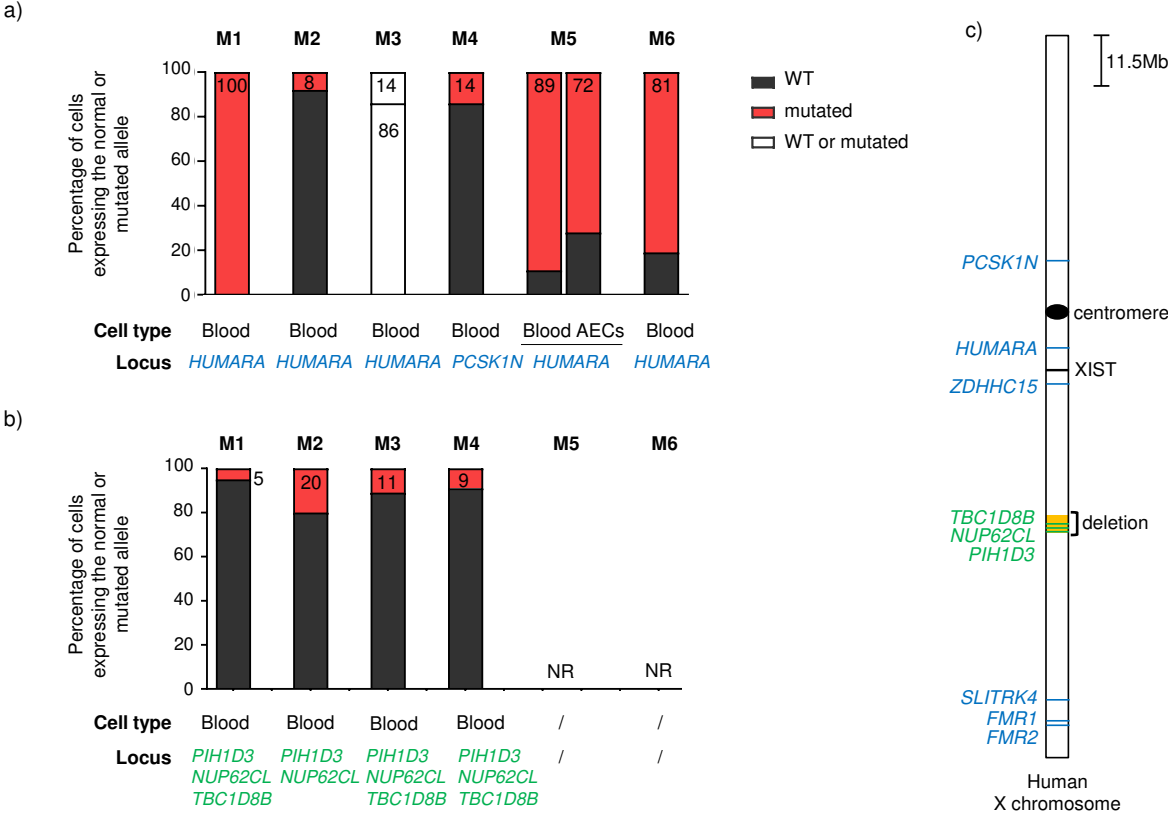
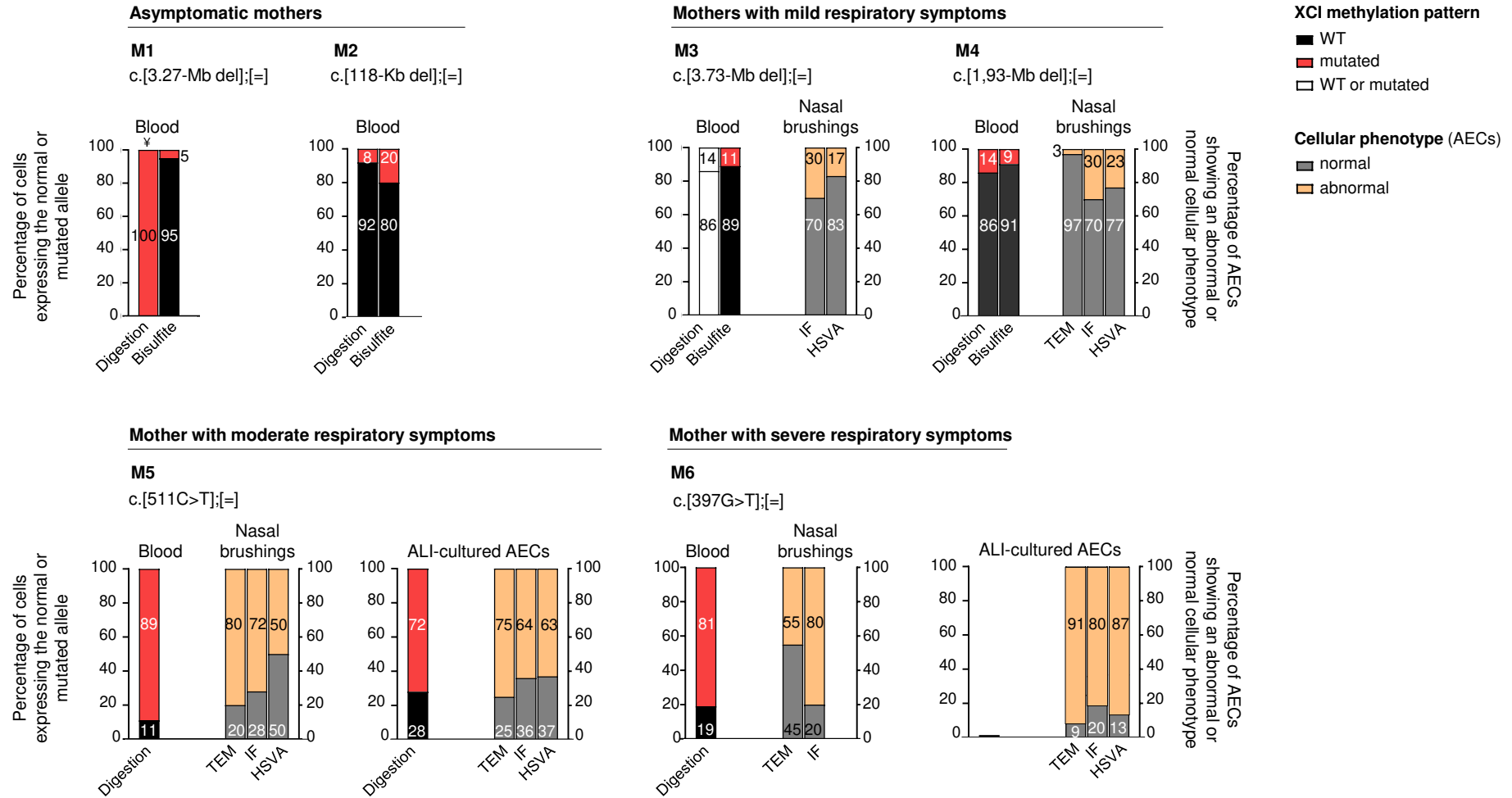


Figure 4



SUPPLEMENTAL

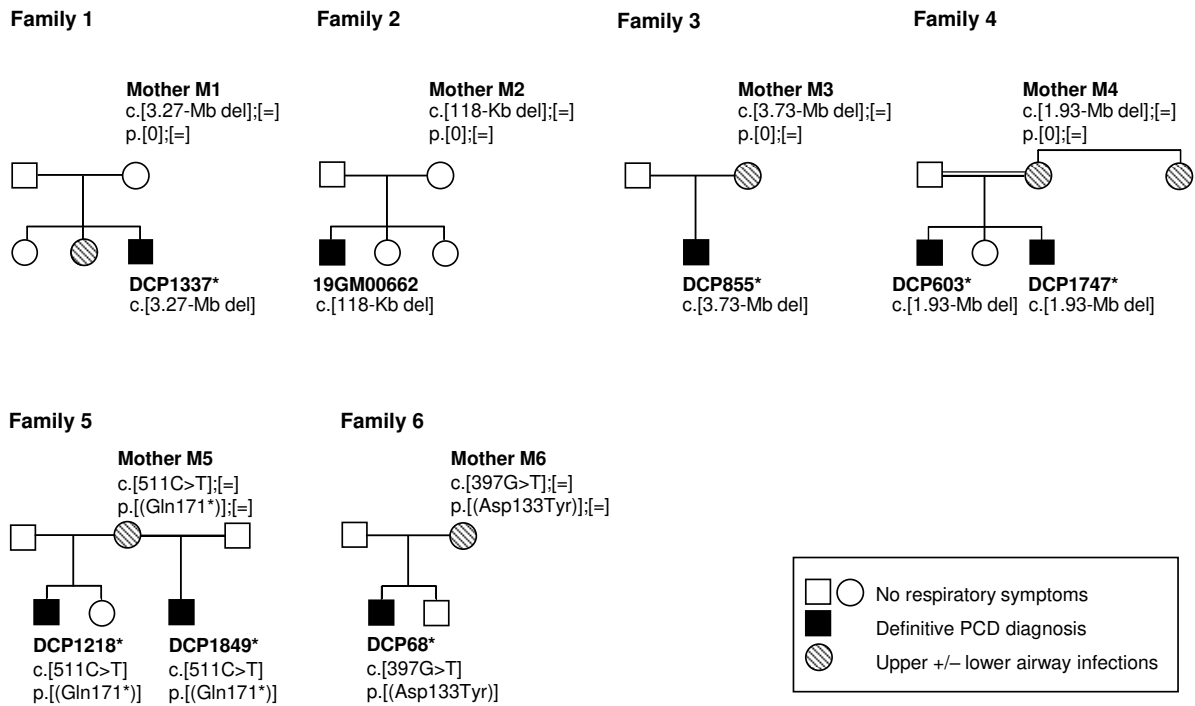


FIGURE S1 Genotypes and phenotypes in the six families in which mothers (M1–M6) are heterozygous for a *PIH1D3* mutation. Black squares indicate the eight male primary ciliary dyskinesia (PCD) patients. Cross-hatched circles represent mothers with respiratory symptoms. White circles and squares represent respiratory symptom-free females and males, respectively. [=] normal allele. **PIH1D3* genotype previously published by [1]

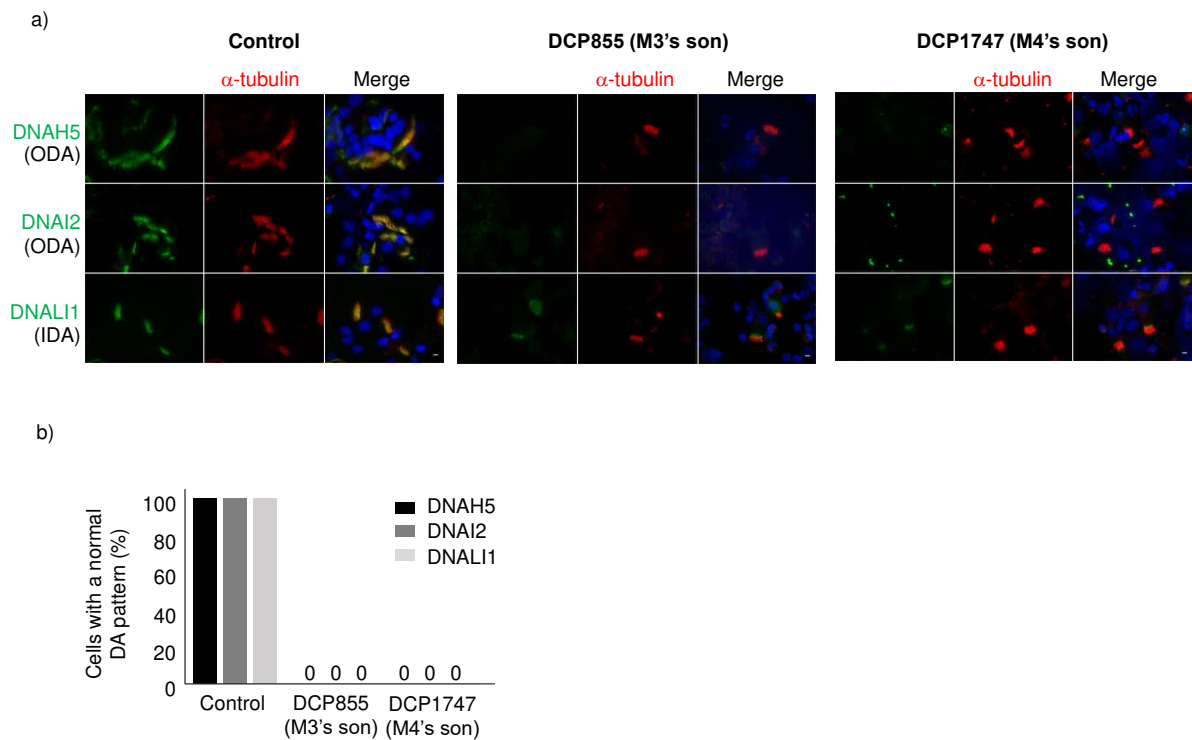


FIGURE S2 Impact of hemizygous *PIH1D3* mutations on dynein arm (DA)-specific proteins in airway epithelial cells (AECs) in two male primary ciliary dyskinesia (PCD) patients. a) Immunofluorescence microscopy analysis of DA markers in AECs from a control and two male PCD patients, DCP855 (mother (M) 3's son) and DCP1747 (M4's son), each carrying a hemizygous *PIH1D3* mutation. Cells were double-labelled with an anti-acetylated (Ac.) α -tubulin antibody targeting the ciliary axoneme (red) and anti-DNAH5 or anti-DNAI2 antibodies as markers of outer DAs (ODAs), or an anti-DNALI1 antibody, as marker of inner DAs (IDAs) (green). DAPI stained nuclei blue. All ciliated cells from two male patients were lacking ODAs and IDAs. Scale bars, 5 μ m. b) The numbers of ciliary-tuft cells expressing DNAH5, DNAI2 or DNALI1 were counted in 100 cells. Histogram bars show each individual's percentages of cells with a normal DA pattern.

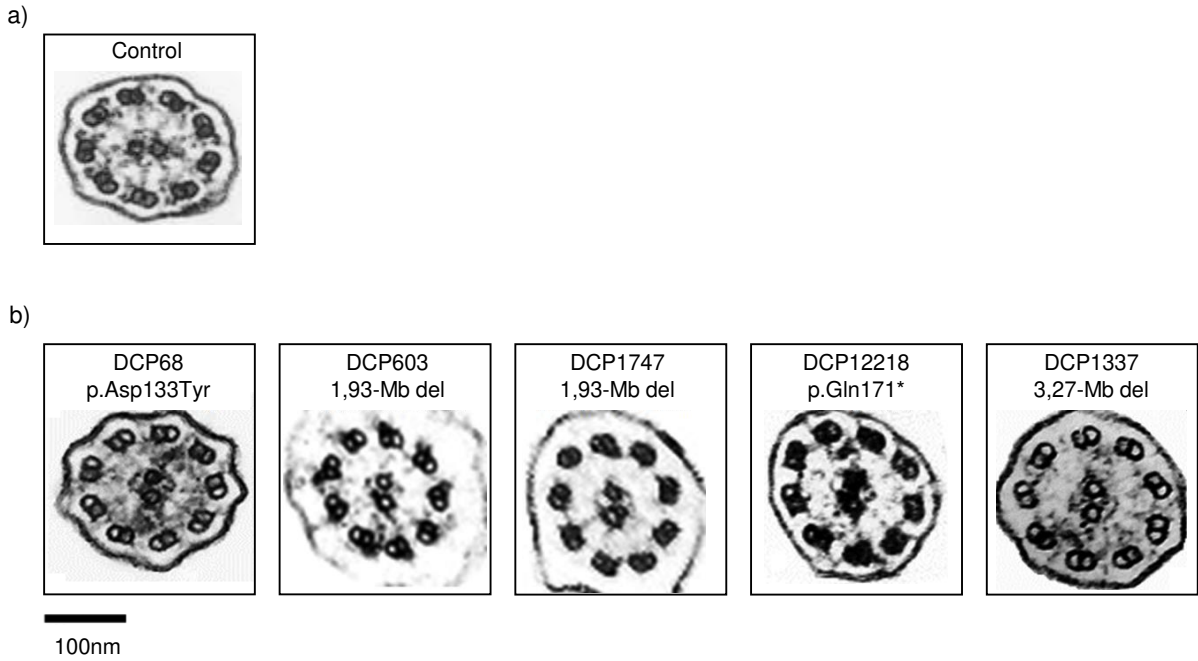


FIGURE S3 Ultrastructural defects in airway cilia of male primary ciliary dyskinesia (PCD) patients with hemizygous *PIH1D3* mutations. a) Transmission electron microscopy (TEM) showing the cross-section arrangement of cilia from a healthy control. b) TEM of *PIH1D3*-mutant cilia from nasal AECs of the five sons born to mothers M1, M4, M5 and M6. *PIH1D3* mutations result in fewer or loss of both outer DAs (ODAs) and inner DAs (IDAs). Modified from [1].

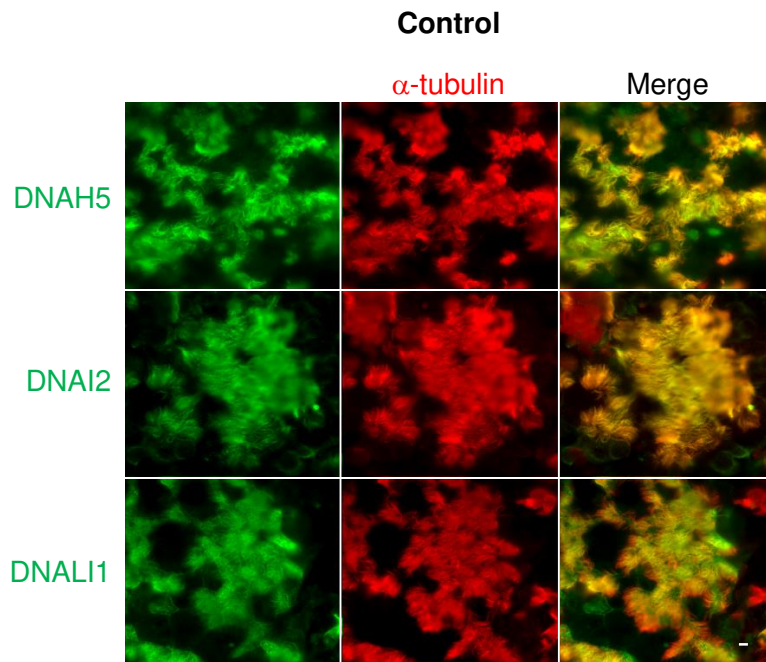


FIGURE S4 ALI-cultured AECs from a control individual were immunolabelled with an anti-acetylated (Ac.) α -tubulin antibody targeting the ciliary axoneme (red) and anti-DNAH5 or anti-DNAI2 antibodies as markers of outer DAs (ODAs), or anti-DNALI1 antibody, as marker of inner DAs (IDAs) (green). Scale bar, 5 μ m.

Movie S1 Representative high-speed videomicroscopy analysis (HSVA) movie showing the mixed populations of beating ciliated cells and immotile ciliated cells in air-liquid interface (ALI)-cultured airway epithelial cells (AECs) from mother M5.

Movie S2 Representative high-speed videomicroscopy analysis (HSVA) movie showing the mixed populations of beating ciliated cells and immotile ciliated cells in air-liquid interface (ALI)-cultured airway epithelial cells (AECs) from mother M6, with a very weak proportion of motile ciliated cells.

TABLE S1 Study design for each mother (M)

Characteristic	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Symptoms	No	No	Mild	Mild	Moderate	Severe
Molecular diagnostics	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Methylation studies						
Methylation-sensitive digestion	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Bisulfite conversion	✓	✓	✓	✓	NR	NR
Diagnostic investigations						
Nitric oxide	NR	NR	ND	✓	✓	✓
Beating cilia (HSVA)	NR	NR	✓	✓	✓	ND
Axonemal ultrastructure (TEM)	NR	NR	ND	✓	✓	✓
Additional investigations						
<i>Ex vivo</i> IF	NR	NR	✓	✓	✓	✓
ALI culture (IF, WB, HSVA, TEM)	NR	NR	ND	ND	✓	ND

NR: not relevant, ND: not done or insufficient tissue available, HSVA: high-speed videomicroscopy analysis; TEM: transmission electron microscopy; IF: Immunofluorescence, ALI: air-liquid-interface; WB: Western blot

TABLE S2 Risk factors for respiratory symptoms

Mother	Tobacco	Allergy	Exposure to volatile toxins	Exposure to air conditioning	Asthma
M3	Yes	No	No	No	No
M4	No	Pollen	No	No	No
M5	Passive exposure	Desensitization to respiratory allergens (at 21 years)	No	No	No
M6	Yes, until 34 years old (15 pack-years)	No	No	No	No

TABLE S3 Clinical features of males carrying *PIH1D3* mutations

Male PCD patient	Patient's mother	Genotype (hemizygous)	Age at diagnosis	SI	Bronchiectasis	Respiratory symptoms	Other symptoms	FEV ₁ (year & age at testing)	OM & hearing	Nasal NO	HSVA	TEM ultra-structural defect
DCP1337	M1	c.[3.27-Mb del] p.[0]	9 yr	No	Bronchiectasis (middle lobe), lobectomy	NRD; recurrent upper & lower respiratory tract infections	Transient mild cerebellar syndrome, delayed milestones	FEV ₁ 72% predicted (2015 at 12 yr)	OM	ND	2012, Static	IDA+ODA (97% total absence; 3% retained ODA)
19GM00662	M2	c.[118-Kb del] p.[0]	6 yr	Yes	No bronchiectasis	Recurrent upper & lower respiratory tract infections	Delayed milestones	Unknown	OM	37 ppb (normal value: 211 ppb)	2019, Static	IDA+ODA (100% total absence)
DCP855	M3	c.[3.73-Mb del] p.[0]	6 yr	No	Bronchiectasis	NRD; recurrent upper & lower respiratory tract infections	Intellectual disability	Unknown	OM	ND	2011, Static	IDA+ODA (4 biopsies: very few cilia, no quantification)
DCP603	M4	c.[1.93-Mb del] p.[0]	Birth	Yes	Bronchiectasis (left & right lower lobes, & middle lobe)	NRD; recurrent upper & lower respiratory tract infections		Obstruction & hypoxemia	OM	7 nL/min (PCD nasal NO <77 nL/min)	2001, Static; 2008, Static	IDA+ODA (100% total absence)
DCP1747			3 yr	No	No bronchiectasis	NRD; recurrent upper & lower respiratory tract infections		FEV ₁ 96% predicted (2014 at 5 yr)	OM severe bilateral hearing loss	ND	2012, Static	IDA+ODA (93.5% total absence; 1.5% retained IDA; 5% retained ODA)
DCP1218	M5	c.[511C>T] p.[(Gln171*)]	Birth	Yes	Mild bronchiectasis (middle lobe)	NRD		FEV ₁ 48% predicted (2016 at 13 yr)	OM	ND	2011, Static	IDA+ODA (90% total absence; 3% retained IDA; 7% retained ODA)
DCP1849			Birth	No	No bronchiectasis	NRD; cough & rhinitis		NA	OM	ND	ND	ND
DCP68	M6	c.[397G>T] p.[(Asp133Tyr)]	4 yr	No	Mild bronchiectasis	Recurrent upper & lower respiratory tract infections		FEV ₁ 89% predicted (2016 at 17 yr)	OM	ND	2000, Static 2003, Static	

PCD: primary ciliary dyskinesia; SI: situs inversus, NRD: neonatal respiratory distress, OM: otitis media, ND: not done; HSVA: high-speed video microscopy, IDA: inner dynein arms, ODA: outer dynein arms; FEV₁: forced expiration volume in 1 second. Fertility assessment was not relevant for these boys. Table modified from [1].

TABLE S4 Coding and non-coding elements within chromosome deletions including *PIH1D3* for mothers (M)

	M3 (3.73-Mb del)	M1 (3.27-Mb del)	M4 (1.93-Mb del)	M2 (118-Kb del)
Boundaries of the deletion (Grch37)	103,077,143– 106,814,443	103,580,266– 106,853,641	104,582,944– 106,510,764	106,357,788– 106,475,646
Deleted genes	RAB9B RNA5SP511 ELF2P1 LOC644261 DPPA3P1 TMSB15B H2BFXP H2BFWT H2BFM LOC100101478 LOC101060236 SLC25A53 ZCCHC18 LOC286437 FAM199X ESX1 PHBP10 RPL18AP14 TEX13A IL1RAPL2 KCTD9P2 RNU6-207P NRK SERPINA7 LOC100131448 MUM1L1 LOC107178920 NAP1L4P2 SERPINA7P1 CXorf57 MIR548AN RNF128 TBC1D8B RIPPLY1 CLDN2 MORC4 EEF1A1P40 RBM41 NUP62CL LOC644563 PIH1D3 MYCLP1 DNAJA1P3 KRT18P49 FRMPD3-AS1 FRMPD3	PHBP10 RPL18AP14 TEX13A IL1RAPL2 KCTD9P2 RNU6-207P NRK SERPINA7 LOC100131448 MUM1L1 LOC107178920 NAP1L4P2 SERPINA7P1 CXorf57 MIR548AN RNF128 TBC1D8B RIPPLY1 CLDN2 MORC4 EEF1A1P40 RBM41 NUP62CL LOC644563 PIH1D3 MYCLP1 DNAJA1P3 KRT18P49 FRMPD3-AS1 FRMPD3	IL1RAPL2# KCTD9P2 RNU6-207P NRK SERPINA7 LOC100131448 MUM1L1 LOC107178920 NAP1L4P2 SERPINA7P1 CXorf57 MIR548AN RNF128 TBC1D8B RIPPLY1 CLDN2 MORC4 EEF1A1P40 RBM41 NUP62CL LOC644563 PIH1D3	RBM41* NUP62CL LOC644563 PIH1D3 §

Indicates that only the last 6 coding exons of *IL1RAPL2* are deleted.

* Indicates that only the last 9 coding exons of *RBM41* are deleted.

§ Indicates that only the 6 first exons of *PIH1D3* are deleted (6 out of the 7 exons).

In red, genes analysed with the bisulfite-conversion.

Table modified from [1].

TABLE S5 Primer sequences

Name	Sequence	PCR product size (bp)
PCR amplification and Sanger sequencing		
PIH1D3_ Exon3_ F	TCCAGGTCTGTGAGTTAGCAAAA	480
PIH1D3_ Exon3_ R	TCATGCATAATCAGCCTTGTAGC	
PIH1D3_ Exon4_ F	TCACTGAGCTGGAAC TAGGGT	850
PIH1D3_ Exon4_ R	ACCACACGTGACTTTCTTGCTC	
PIH1D3_ Exon5_ F2	TGCATGGAAAAGATATCAAAGCGT	823
PIH1D3_ Exon5_ R2	AACTGAAAGGAAGGTGTTATGCTTT	
PIH1D3_ Exon6_ F	TATATGCCTGAAGACCTGCAAGC	561
PIH1D3_ Exon6_ R	GGACGGAAC TAGGATGGAAGAAA	
PIH1D3_ Exon7_ F	TTTGGAGCCAGAAACCTTAGTCA	454
PIH1D3_ Exon7_ R	CCACTTTTCTCAGACTTTAGGGG	
PIH1D3_ Exon8_ F	GCCTGTAAACATAGCCTGAGACT	1207
PIH1D3_ Exon8_ R	AAAGCACAACTGAAGAAGCCAAA	
Sanger sequencing		
PIH1D3_ Ex5_ Seq_ R3	ATAATCAATTACACATGCCTTCC	
PIH1D3_ Ex6_ Seq_ F2	TTTGTTTAGTCCTTTTATTTTACC	
PIH1D3_ Ex6_ Seq_ R2	TGTGTATTGTGCATATGATTCC	
PIH1D3_ Ex8_ Seq_ F2	GTTTTCTAACACTCTAGTGGCA	
PIH1D3_ Ex8_ Seq_ R2	AACAGAGTAATAGAAATTA CTG	
PCR amplification of bisulfite converted DNA and Sanger sequencing		
TBC1D8B_bisulf_F2	AAGTGTGGAAAATTTGAATTTGAG	443
TBC1D8B_bisulf_R2	AACATTCTCAAACCTTAAAAATAATAA	
NUP62CL_bisulf_F1	GGGGAGTATTTGGTTAATTG	391
NUP62CL_bisulf_R1	AAAAAACAATTTAATTCATTCATAA	
PIH1D3_bisulf_F1	TTTGTTTATAGAGGAGAATAAAAAG	157
PIH1D3_bisulf_R1	AAAAAATTTACTACAATCCTCCA	
Methylation-sensitive digestion		
HUMARA F	FAM-TGCGCGAAGTGATCCAGAAC	180-220
HUMARA R	CTTGGGGAGAACCATCCTCA	
PSCK1N F	HEX-ATGCGAAGACCATTCCCTCT	310-350
PSCK1N R	GTGCGTGTGATGTGAGGAGA	
SLITRK4 F	FAM-GCACACAAGCAGTCCTTCCT	370-420
SLITRK4 R	GGCTTCTTGTTGCTCTCT	
ZDHC15 F	FAM-TCTTTGGCTCGAAGATCGAC	510-560
ZDHC15 R	TATGGCTCGCATCTTTACA	

PCR: polymerase chain reaction

MATERIALS AND METHODS

Molecular genetics

Genomic DNA extracted from blood was subjected to Sanger sequencing with the BigDye Terminator v3.1 system (ThermoFisher) following polymerase chain reaction (PCR)-amplification with the Go-Taq Green Master Mix (Promega) at an annealing temperature of 60°C and purification with ExoSAP-IT (Applied Biosystems), following the manufacturers' instructions. Fragments were analysed on a 3730XL device (ThermoFisher) after Sephadex G-50 Superfine purification (GE Healthcare). Amplification and sequencing primers are listed in **table S5**. Sequences were analysed with SeqScape software (ThermoFisher).

The four large multigenic deletions were characterised with the HumanOmniExpress 24 BeadChip from Illumina and the data were analysed with the Genome Studio and copy-number-variation partition 3.1.6 software (Illumina).

Nasal Nitric Oxide (nNO) measurement

For mothers M4, M5 and M6, transnasal NO was measured through an olive inserted into one nostril drawing air from the other nostril. The mean NO value of five consecutive peaks during regular breathing was recorded. The sampling flow of the device was checked before each measurement, and the machines were calibrated for NO according to the manufacturer's instructions. Depending on the individual, three different methods could be used, two with the velum closed (VC): expiration against a resistance (ER) or breath-hold (BH) methods; and one without the velum being open: tidal-breathing (TB) method. For ER and BH methods, respectively, subjects were constantly exhaling against an ER of 8–10 cm H₂O or breath-holding at total lung capacity (Valsalva manoeuvre), until a NO plateau was reached. The recorded NO value was the mean of a 3-s plateau (maximum – minimum NO values within 10% of the mean). During the TB measurement, subjects were breathing regularly with mouth closed in most cases, which measured successive NO-concentration decreases and increases on the tracing. The mean NO value of five consecutive peaks during regular breathing was recorded.

Beating cilia analyses by high-speed videomicroscopy analysis (HSVA)

Samples of ciliated cells obtained by nasal brushing (mothers M3, M4 and M5) were suspended in B1 BSA medium (CCD Lab) and examined within 3 h after sampling. Ciliary beat frequency (CBF) of motile cilia was calculated as previously described [2], and the percentage of immotile ciliated cells were evaluated in 10 distinct areas containing intact ciliated epithelial edges. All observations were

made at room temperature with an inverted microscope (Axiovert 200, Carl Zeiss S.A.S.) with an oil immersion $\times 100$ objective, and within 20 min.

Cilia-ultrastructure analyses by transmission electron microscopy (TEM)

Ciliated samples obtained by nasal biopsies (mothers M4, M5 and M6) or after air-liquid interface (ALI) cell culture (mother M5; see below), were fixed in 2.5% glutaraldehyde to be processed for TEM as previously described [3]. Sections were cut on a Reichert OmU2 ultramicrotome (Reichert-Jung AG, Wien, Austria) using a diamond knife. Sections (70-nm thick) were collected on nickel grids and stained with uranyl acetate (2% in 70% ethanol, 20 min) and Reynolds' lead citrate (10 min), and examined using a Zeiss TEM 902 (Leo, Rueil-Malmaison, France). Images were acquired using a Gatan Orius SC1000 CCD camera (Gatan France, Grandchamp, France). Cilia-ultrastructure findings were quantified as a percentage of abnormal cilia among the total number of cilia analysed.

ALI cell cultures

Airway epithelial cells (AECs) obtained either from surgical material from non-PCD-affected individuals with nasal polyps requiring surgery, or from nasal brushings from mothers M5 and M6, were cultured at ALI as previously described [4]. Briefly, AECs were seeded in 12-well collagen IV-coated transwell inserts (Costar, Corning) and cultured in PneumaCult-Exp Plus medium (#05040, Stem Cell) until reaching confluence. The medium was then removed from the apical surface and replaced in the basal chamber by the PneumaCult-ALI medium (#5001, Stem Cell) to expose cells to an ALI that promotes ciliogenesis during the following 21 days.

Immunofluorescence assays

AECs, obtained from either nasal brushing *ex-vivo* or ALI-cultured cells, were cytocentrifugated onto glass slides, air-dried and directly used for immunolabelling. Cells were first fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature, washed three times with phosphated-buffered saline (PBS) supplemented with 0.49 mM $MgCl_2$ and 0.9 mM $CaCl_2$ (PBS++) incubated for 10 min with PBS++ NH_4Cl 50 mM, and permeabilised with 0.1% Triton X-100 for 10 min. Then, cells were incubated for 2 h at room temperature with antibodies directed against DNAH5 (Sigma HPA037470, 1/300), DNAI2 (Abnova H00064446-B01, 1/150), DNALI1 (Sigma HPA028305, 1/300) or α -acetylated tubulin (Sigma (6-11-B1) T6793, 1/600) before being revealed by secondary antibodies (AlexaFluor LifeTechnologies) at room temperature for 1 h. All antibodies were incubated in PBS++ 1% BSA. Cells were finally washed three times with PBS++, mounted in ProLong[®] Gold Antifade Reagent with DAPI (Cell Signaling #8961) to stain nuclei. Images were taken using an ECLIPSE 80i microscope (Nikon) with a Retiga-2000R camera (QImaging), Images were analysed with ImageJ software (National

Institute of Mental Health) to determine either the number of ciliated cells (IF ex-vivo) or ciliated areas (IF in-vitro).

Western blot (WB)

AECs obtained from ALI cultures were suspended in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, and Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics)). Lysates were sonicated and cleared by 10 min of centrifugation at 1000 *g*, 4°C.

Cell lysates were loaded onto 10% sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel (SDS–PAGE), transferred for 2 h on a PVDF membrane and subjected to Western blotting with PIH1D3 antibody (Sigma HPA051099, 1/200), DNAI2 antibody (Abnova H00064446-B01, 1/100) or GAPDH antibody (Cell Signaling 3683S, 1/2500), all incubated overnight at 4°C in PBS–0.1% Tween 20–5% skim milk. The secondary antibodies (rabbit-horseradish peroxidase (HRP), Sigma A0545 or mouse-HRP, Sigma A9044) was incubated for 1 h at room temperature at a final dilution of 1:5000 in PBS–0.1% Tween 20–5% skim milk. Proteins were detected using Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) according to the manufacturer’s recommendations.

X-chromosome-inactivation studies

Methylation-sensitive digestion. Genomic DNA was digested with *RsaI* to improve all PCR reactions. Samples were subjected to PCR amplification at 4 loci (*HUMARA*, *PCSK1N*, *ZDHHC15*, *SLITRK4*). The same PCR amplifications were run after digestion with either *MspI*, a methylation non-sensitive enzyme, or *HpaII*, a methylation-sensitive enzyme; both enzymes target the same restriction site (CCGG). While *MspI* digestion completely prevents the amplifications (internal negative control), *HpaII*, which only digests non-methylated DNA, allows amplifications of methylated alleles. Fragments were analysed on a 3500 XL device (Applied Biosystems) followed by GeneMapper software analysis (ThermoFisher). The X-inactivation ratios were calculated as previously described [5]. Primers are listed in **Table S5**.

Bisulfite conversion. All non-methylated cytosines were converted into uracils in genomic DNA from the four mothers using the Premium Bisulfite Kit (Diagenode), according to the manufacturer’s recommendations. Converted DNA was then amplified with the KAPA HiFi HotStart Uracil + ReadyMix Kit (KapaBiosystems) at an annealing temperature of 55°C and purified with ExoSAP-IT (Applied Biosystems) following the manufacturer’s instructions. Sanger sequencing was done as previously described (under “Molecular genetics” methods in the main text). Specific primers for bisulfite-converted-DNA were designed using the MethPrimer webtool (<http://www.urogene.org/methprimer>). Primers are listed in **Table S5**. PCR amplification and sequencing of converted DNA enables detection of methylated cytosine as cytosine and non-

methylated cytosine as thymine. Sequences were analysed with Chromas software to determine peak height values. Methylation ratios (i.e., X-chromosome inactivation (XCI) ratios) are the means those peak height values at each CG position within the amplicons.

1. Olcese C, Patel MP, Shoemark A, Kiviluoto S, Legendre M, Williams HJ, et al. X-linked primary ciliary dyskinesia due to mutations in the cytoplasmic axonemal dynein assembly factor PIH1D3. *Nat Commun.* 2017 Feb 8;8:14279.
2. Papon JF, Bassinet L, Cariou-Patron G, Zerah-Lancner F, Vojtek AM, Blanchon S, et al. Quantitative analysis of ciliary beating in primary ciliary dyskinesia: a pilot study. *Orphanet J Rare Dis.* 2012 Oct 11;7:78.
3. Verra F, Fleury-Feith J, Boucherat M, Pinchon MC, Bignon J, Escudier E. Do Nasal Ciliary Changes Reflect Bronchial Changes?: An Ultrastructural Study. *Am Rev Respir Dis.* 1993 Apr 1;147(4):908–13.
4. Coste A, Brugel L, Maitre B, Boussat S, Papon JF, Wingerstmann L, et al. Inflammatory cells as well as epithelial cells in nasal polyps express vascular endothelial growth factor. *European Respiratory Journal.* 2000 Feb 1;15(2):367–72.
5. Lau AW, Brown CJ, Peñaherrera M, Langlois S, Kalousek DK, Robinson WP. Skewed X-chromosome inactivation is common in fetuses or newborns associated with confined placental mosaicism. *Am J Hum Genet.* 1997 Dec;61(6):1353–61.

VI- Discussion

Dans cette partie, je discuterai tout d'abord des points forts des résultats obtenus au cours de cette thèse pour *TTC12* et *PIH1D3*, puis j'évoquerai la place de ces deux protéines dans l'assemblage des BDs à l'état physiologique chez l'Homme. Enfin, je discuterai l'implication en pathologie de ces deux protéines au sein du réseau des autres protéines impliquées dans les DCP avec absence des deux BDs.

Les résultats obtenus dans ce travail de thèse ont apporté de nouvelles données sur la physiopathologie des DCP avec absence de deux BDs dues à des défauts moléculaires de deux gènes, *TTC12* et *PIH1D3*, qui codent des protéines d'assemblage cytoplasmique des BDs.

Dans notre étude sur *TTC12*, la différence de phénotype ultrastructural observé chez les patients entre les cils mobiles des voies aériennes et les flagelles des spermatozoïdes révèle pour la première fois l'existence de mécanismes d'assemblage des bras de dynéine différents entre cils mobiles et flagelles chez l'Homme. Jusqu'à présent, les différences connues entre cils respiratoires et flagelles portaient sur la composition protéique de l'axonème de ces deux organelles. Ainsi, certains gènes de structure axonémale spécifiquement exprimés dans le flagelle des spermatozoïdes et non dans les cils respiratoires, comme *DNAH17*, sont impliqués dans les infertilités masculines isolées sans atteinte respiratoire (Whitfield et al., 2019). Dans le cas de *TTC12*, l'expression de la protéine ne diffère pas entre les cils et les flagelles ; cependant c'est sa fonction, et plus précisément la nature des sous-types de bras de dynéine que *TTC12* prend en charge, qui varie entre les deux organelles. De façon intéressante on constate également que le sous-type dimérique de BDI (I1) n'est assemblé par *TTC12* ni dans le cil respiratoire ni dans le spermatozoïde, ce qui suggère que ce bras est pris en charge par une autre chaperonne non encore identifiée. Ceci indique que les chaperonnes sont différentes selon les sous-types de BDI. Jusqu'à nos travaux sur *TTC12*, la caractérisation précise des différents sous-types de BDI affectés par le défaut d'un gène d'assemblage n'avait jamais été étudiée, notamment en raison de l'indisponibilité d'anticorps permettant de différencier chacun d'eux.

Dans notre travail, nous avons d'une part montré que la déplétion de *TTC12* dans *Paramecium tetraurelia* reproduisait le phénotype du flagelle des spermatozoïdes (absence des BDE et BDI), et d'autre part confirmé l'absence isolée de BDI des cils respiratoires dans un modèle de culture primaire de cellules nasales humaines en interface air-liquide invalidées pour *TTC12* par la technique de CRISPR-Cas9. Ces résultats mettent en évidence l'intérêt de chaque modèle d'étude des DCP visant à préciser la physiopathologie de la maladie. Les protistes unicellulaires, qui semblent se rapprocher davantage des flagelles des spermatozoïdes, seraient de bons modèles pour approfondir les mécanismes d'assemblage du flagelle, mais seraient moins adaptés pour analyser ces mêmes mécanismes dans les cils respiratoires. De ce fait, le développement du modèle de CENH invalidées par

CRISPR-Cas9 ouvre des perspectives très intéressantes pour l'étude de la physiopathologie des maladies touchant l'épithélium respiratoire.

Le second gène codant une protéine d'assemblage cytoplasmique des bras de dynéines auquel nous nous sommes intéressés pendant mon travail de thèse est *PIH1D3*. Localisé sur le chromosome X, ce gène est responsable de DCP chez des patients masculins, tandis que leurs mères, porteuses de la même mutation à l'état hétérozygote, peuvent présenter des symptômes respiratoires de sévérité très variable en étroite relation avec leur profil d'inactivation de l'X. De façon intéressante, une corrélation phénotype clinique/inactivation de l'X a été récemment mise en évidence pour le gène *RPGR* (Fahim et al., 2020), responsable de rétinite pigmentaire parfois associée à une DCP. Cependant, cette étude s'est concentrée uniquement sur les atteintes oculaires sans considérer l'existence ou non de signes respiratoires. Il est important de noter que dans cette étude, comme dans de nombreux travaux concernant d'autres maladies liées à l'X, le profil d'inactivation est déterminé par l'approche de digestion sensible à la méthylation au locus *HUMARA*, parfois situé très loin du gène d'intérêt (e.g. >80cM pour *TFAZZIN* dans le syndrome de Barth (Orstavik et al., 1998), ou *DKC1* dans la dyskératose congénitale (Ferraris et al., 1997)) rendant le risque de survenue de recombinaison homologue élevé. La phase entre le locus *HUMARA* et le gène muté n'est habituellement pas démontrée à l'échelle moléculaire, et le lien entre méthylation et phénotype clinique, bien que basé sur un grand nombre de patients, reste alors supposé. Ainsi, le résultat repose surtout sur la probabilité qu'a un patient d'être asymptomatique ou peu atteint en fonction de son ratio d'inactivation. Dans notre étude, nous avons dans un premier temps utilisé cette technique classique de digestion au locus *HUMARA* que nous avons associée à l'étude des régions polymorphes chez le fils atteint afin de tenter de mettre en phase le taux de méthylation avec le défaut de *PIH1D3* (gène distant de 40 cM du locus *HUMARA*). Nous sommes ensuite parvenus à mettre au point une seconde approche basée sur la conversion au bisulfite des cytosines méthylées en uraciles au niveau d'îlots CpG localisés dans la région promotrice du gène *PIH1D3* et dans quelques gènes flanquants, nous permettant de nous affranchir du risque de recombinaison homologue due à la distance génétique élevée entre *PIH1D3* et *HUMARA*. Bien que réalisable seulement en cas de délétion, cette approche innovante d'étude de la méthylation dans le cadre de maladie liée à l'X est particulièrement fiable du fait de l'analyse directe des sites de méthylation de l'allèle normal non délété.

Dans notre travail, 5 femmes sur 6 présentent un biais d'inactivation (>80:20%) tandis que la dernière présente un biais extrême (ratio>95:5%). Dans beaucoup de maladies liées à l'X, un fort pourcentage de femmes porteuses hétérozygotes sont asymptomatiques et présentent un ratio d'inactivation de l'X extrêmement déséquilibré (ratio>95:5%). C'est le cas par exemple du syndrome ATR-X (*Alpha-thalassemia/mental retardation syndrome*) (Gibbons et al., 1992), du syndrome WAS (*Wiskott–Aldrich*

syndrome) (Fearon et al., 1988), de la dyskératose congénitale (Ferraris et al., 1997), de l'agammaglobulinémie liée à l'X (Italian XLA Collaborative Group et al., 2000), ou encore du X-SCID (*X-linked severe combined immunodeficiency*) (Li et al., 1998). Les mécanismes de sélection à l'origine de ces biais de méthylation sont mal connus. Ils pourraient être dus à une sélection préférentielle des cellules exprimant l'allèle normal en raison d'un effet de la mutation sur la multiplication cellulaire et/ou sur le taux de survie des cellules dans lesquelles l'X muté est actif (Lacout et al., 2003; Muers et al., 2007; Ørstavik, 2009). Cependant, il arrive que le X préférentiellement actif soit le X muté comme chez les femmes porteuses à l'état hétérozygote de mutation dans le gène *ABCD1* responsable d'adenoleucodystrophie (Maier et al., 2002; Migeon et al., 1981).

Dans la population générale, en dehors de toute pathologie liée à l'X connue, environ 10% des femmes présentent un biais d'inactivation (>80:20%), mais seulement 1-5% présentent un biais extrême (ratio>95:5%) (Vogelstein et al., 1987). En revanche, cette proportion de femme avec des ratios extrêmement biaisés atteint 20% chez les femmes de plus de 60 ans (Ørstavik, 2009). Pour certaines maladies liées à l'X, comme le déficit en G6PD (*Glucose-6-Phosphate Deshydrogenase*), l'inactivation de l'X reste aléatoire et les femmes porteuses hétérozygotes ne présentent, par conséquent, pas plus de biais extrême que la population générale. La mesure de l'activité enzymatique de la G6PD chez ses femmes montre un taux très variable allant de normal à clairement abaissé (Errigo et al., 2023) représentant la diversité des phénotypes cliniques. Par ailleurs de nombreux cas de déficit en G6PD débute à un âge avancé chez ces femmes probablement en raison de l'augmentation du biais d'inactivation dans la population âgée (Au et al., 2006, 2004). Ayant toutes environ 40 ans, les femmes porteuses hétérozygotes étudiées dans notre travail sur *PIH1D3* ne sont pas concernées par cette augmentation du biais avec l'âge.

Les études de l'expressivité des maladies récessives liées à l'X chez les femmes hétérozygotes en fonction des ratios de méthylation des chromosomes X sont majoritairement réalisées sur des cellules issues du sang périphérique. La méthylation de l'X pouvant varier selon les tissus, il est important, si cela est possible, d'analyser aussi le tissu cible de la maladie. Dans ce travail, l'accès au CENH des patients pour étudier les proportions des cellules normales/anormales, nous a permis de confirmer les résultats de méthylation obtenus sur le sang.

Enfin, nous avons pu établir un lien entre la proportion de cellules ciliées normales dans l'épithélium respiratoire et le phénotype clinique observée chez les femmes. Cette corrélation nous permet de déduire qu'environ 30% de cellules battantes suffisent à éviter un phénotype respiratoire sévère. Cette information nouvelle est très prometteuse puisqu'elle donne une indication précieuse sur le nombre de cellules qu'il faudrait corriger par thérapie génique pour atténuer les manifestations respiratoires de la DCP.

Dans le paragraphe qui suit, je discuterai d'abord de la localisation subcellulaire où prendrait place l'assemblage des BDs puis j'aborderai le complexe R2TP-like qui en serait un acteur principal, tout en précisant la place respective tenue par TTC12 et PIH1D3.

Les facteurs d'assemblage des BDs ont plusieurs fois été visualisés dans des « foci » situés dans le cytoplasme des cellules ciliées. Récemment, des études plus poussées chez le xénope ont mis en évidence un regroupement de DNAAFs et de BDs dans des régions du cytoplasme, appelées DynAPs, qui pourraient constituer le lieu d'assemblage des BDs (Huizar et al., 2018). Par ailleurs, les BDI et les BDE ont été observés dans des compartiments distincts au sein même de ces DynAPs. Ces résultats sont en faveur de l'existence de mécanismes différents et de chaperonnes spécifiques selon le type de bras de dynéine. La protéine PIH1D3 fait partie des facteurs d'assemblage qui ont été observés dans ces DynAPs (tout comme DAAAF2, DAAAF3, DAAAF4, DAAAF5, DAAAF11/LRRC6, DAAAF7/ZMYND10, DAAAF13/SPAG1, et CFAP298). Une colocalisation de PIH1D3 avec DAAAF2 a d'ailleurs été mise en évidence dans ces structures (Lee et al., 2020). En revanche, la présence de TTC12 dans ces structures n'a pas été recherchée à ce jour.

Il faut noter que jusqu'à présent, les DynAPs et la colocalisation des facteurs d'assemblage avec les BDs ont uniquement été étudiés par surexpression de protéines de fusion (DAAAF+tag fluorescent) chez le xénope. Des études complémentaires respectant mieux l'état physiologique sont nécessaires pour confirmer et préciser ces résultats chez l'Homme.

D'après leur similarité de séquence avec les protéines du complexe R2TP bien caractérisé chez la levure (cf I.3.1.2. HSP90 et les complexes R2TP-like), les protéines TTC12 et PIH1D3, qui possèdent des domaines TRP (*tetratricopeptide repeat*) et PIH1 (*Protein Interactig with Hsp90*) respectivement, feraient partie de complexes cytoplasmiques « R2TP-like » chargés de l'assemblage des bras de dynéines. Ce processus d'assemblage des BDs par ce complexe « R2TP-like » reste très mal connu dans les cils respiratoires et les flagelles des spermatozoïdes chez l'Homme. En effet, nos connaissances reposent principalement sur (i) la découverte de gènes de DCP et/ou d'infertilité conduisant à une absence des BDs ; et sur (ii) des recherches dans des modèles unicellulaires tels que *Chlamydomonas*. Dans ce contexte, et jusqu'aux résultats de notre travail sur TTC12, aucune différence de mécanismes d'assemblage et/ou de transport des BDs n'avait été décrite entre cils et flagelles chez l'Homme.

Une fois les BDs assemblés dans le cytoplasme, ils doivent être transportés vers le cil puis le long de l'axonème. Plusieurs analyses protéomiques de ciliome réalisées à partir de cils mobiles respiratoires isolés démontrent que les facteurs d'assemblage (DAAAFs) ne sont pas présents dans l'axonème ciliaire, à l'inverse des protéines de l'IFT qui, elles, sont bien détectés dans les cils respiratoires (Blackburn et al., 2017). Enfin, les molécules impliquées dans le transfert des BDs depuis le complexe d'assemblage cytoplasmique vers l'IFT ciliaire ne sont pas connues.

Dans cette dernière partie de discussion, je détaillerai le rôle en pathologie de TTC12 et PIH1D3 par comparaison avec les autres protéines impliquées dans les DCP avec absence des deux BDs.

Les protéines TTC12 et PIH1D3 font parties des 13 gènes responsables de DCP non syndromique avec absence de deux BDs dans le cil et/ou dans le flagelle (**Tableau 7**). Les analyses de ciliomes démontrent que parmi ces 13 gènes, un seul code une protéine localisée dans l'axonème, *CCDC103*, tandis que les douze autres codent des protéines cytoplasmiques (Blackburn et al., 2017). Ces données sont cohérentes avec le rôle supposé de *CCDC103*, non pas en tant que chaperonne, mais comme protéine d'ancrage des BDE et des BDI (cf I.3.3.1.3. *CCDC103* et I.3.3.2.2. *CCDC39/40* et *CCDC103*).

Gènes d'assemblage/transport			
Absence de deux BDs	Fonction	Ciliome	Infertilité masculine
<i>CCDC103</i>	Ancrage des BDs	Présent	Oui
<i>CFAP298 (C21orf59)</i>	?	Absent	NE
<i>CFAP300 (C11orf70)</i>	?	Absent	Oui
<i>DNAAF1 (LRRC50)</i>	?	Absent	Oui
<i>DNAAF2 (KTU)</i>	R2TP-like complexe (assemblage)	Absent	Oui
<i>DNAAF3 (C19orf51)</i>	?	Absent	Oui
<i>DNAAF4 (DYX1C1)</i>	R2TP-like complexe (assemblage)	Absent	Oui
<i>DNAAF5 (HEATR2)</i>	?	Absent	Oui
<i>DNAAF6 (PIH1D3)</i>	R2TP-like complexe (assemblage)	Absent	Oui
<i>DNAAF11 (LRRC6)</i>	Lié à HSP90 (assemblage)	Absent	Oui
<i>DNAAF13 (SPAG1)</i>	R2TP-like complexe (assemblage)	Absent	Oui
<i>DNAAF7 (ZMYND10)</i>	Lié à HSP90 (assemblage)	Absent	Oui
Absence de BDI			
<i>TTC12*</i>	R2TP-like complexe (assemblage)	Absent	Oui

NE : non étudié

*Absence des 2 BDs dans les flagelles des spermatozoïdes (à l'exception du bras interne dimérique I1/f)

Tableau 7. Caractéristiques des 13 protéines impliquées dans les DCP non syndromiques avec absence des deux BDs.

De façon intéressante, à l'exception de *CFAP298*, 12 de ces 13 gènes sont également responsables d'une infertilité masculine parmi lesquels 7 codent des protéines en lien avec HSP90 ou le complexe R2TP. Ceci suggère l'existence du même type de complexe d'assemblage des BDs dans les cils mobiles et le flagelle des spermatozoïdes (Newman et al., 2023). Aucun facteur d'assemblage n'a été décrit jusqu'à présent comme spécifique de l'assemblage des deux BDs des cils respiratoires. Il est important de noter que, de la même façon, il n'existe à ce jour aucun facteur d'assemblage des deux BDs uniquement présent dans les flagelles des spermatozoïdes. A ce jour, 32 gènes sont impliqués dans l'infertilité masculine isolée sans atteinte respiratoire, et aucun d'entre eux ne conduit à l'absence des deux BDs dans le flagelle. La grande majorité (27 gènes sur 32) code des protéines axonémales et non pas cytoplasmiques, et la localisation des 5 dernières protéines reste indéterminée. Ainsi, jusqu'à présent, un défaut menant à l'absence des deux BDs dans les flagelles des spermatozoïdes est toujours associé à un défaut des cils respiratoires conduisant à une DCP.

En dehors des protéines dont nous venons de discuter, le complexe R2TP chez *Chlamydomonas* comporte de nombreuses autres protéines dont les orthologues humains n'ont jamais été impliqués dans les DCP à ce jour (e.g. PIH1D1, PIH1D2). Ceci pourrait être expliqué par la rareté des défauts moléculaires dans les gènes codant ces protéines de petite taille (environ 300 acides aminés), ou par leur fonction qui pourrait être différente chez l'Homme, ou encore par un effet compensatoire d'autres protéines possédant la même fonction chez l'Homme (redondance fonctionnelle).

Chez les patients DCP qui présentent une absence des deux BDs, le défaut de la structure axonémale est identifié via les résultats de la ME et/ou des immunomarquages des cils avec quelques marqueurs de BDE et de BDI (**Tableau 8**). En raison de la disponibilité d'un anticorps spécifique de DNALI1, cette protéine a toujours été utilisée comme marqueur préférentiel des BDI. Cependant, DNALI1 serait absent des sous-types g et I1/f chez l'Homme (cf I.2.2. Bras de dynéine internes), ce qui pourrait expliquer que dans les CENH de patients mutés dans *CCDC103*, DNALI1 n'est pas altéré en IF alors qu'en ME les deux BDs paraissent absents (puisque le sous-type dimérique I1/f contribue de façon majeure à la densité électronique des BDI) (**Tableau 8**). Chez ces patients, les sous-types g et I1/f pourraient être les uniques sous-types affectés. De la même façon, pour tous les gènes impliqués dans les DCP où le marquage de DNALI1 a été le seul marqueur des BDI utilisé chez les patients, comme c'est le cas pour *PIH1D3* (UK10K Rare Group et al., 2017), il n'est pas possible de conclure quant à la présence ou l'absence de la sous-unité dimérique I1/f ni de la sous-unité monomérique g, qui ne possèdent pas DNALI1. Dans le cas des mutations du gène *CFAP300* (Fassad et al., 2018a; Höben et al., 2018), dernier facteur d'assemblage identifié après *TTC12*, les marquages de DNALI1 (a, b, c, e et d) et DNAH6 (g) en IF permettent de conclure que tous les BDI monomériques sont touchés, mais ne donne pas d'information concernant le sous-type dimérique I1/f (**Tableau 8**). Chez les patients porteurs de mutations de *TTC12*, nous avons pu analyser de nombreux marqueurs en IF qui ont montré que les 6 BDI monomériques sont absents et que le sous-type dimérique I1/f et les BDE sont présents.

Phénotype ciliaire des patients DCP							
Gène (année)	Défaut en ME	Détection en IF					
		BDE	Marqueurs	BDI mono.	Marqueurs	BDI dim.	Marqueurs
<i>DNAAF2</i> (2008)	BDE+BDI	Absent	DNAH5	Absent	(DNALI1)		
<i>DNAAF1</i> (2009)	BDE+BDI	Absent	DNAH5, DNAI2	Absent	(DNALI1)		
<i>DNAAF3</i> (2012)	BDE+BDI	Absent	DNAH5	Absent	(DNALI1)		
<i>LRRC6</i> (2012)	BDE+BDI	Absent	DNAI2	Absent	(DNALI1)		
<i>DNAAF5</i> (2012)	BDE+BDI	Absent	DNAI1	Absent	(DNALI1, DNAH7)		
<i>DNAAF4</i> (2013)	BDE+BDI	Absent	DNAH5, DNAH9	Absent	(DNALI1)		
<i>ZMYND10</i> (2013)	BDE+BDI	Absent	DNAH5	Absent	(DNALI1)		
<i>SPAG1</i> (2013)	BDE+BDI	Absent	DNAH5	Absent	(DNALI1)		
<i>CFAP298</i> (2013)	BDE+BDI	Absent	DNAH5	Absent	(DNALI1)		
<i>PIH1D3</i> (2017)	BDE+BDI	Absent	DNAH5, DNAH9, DNAI1, DNAI2	Absent	(DNALI1)		
<i>CCDC103</i> (2016)	BDE+BDI	Absent	DNAH5, DNAH9, DNAI2	Présent	(DNALI1)		
<i>CFAP300</i> (2018)	BDE+BDI	Absent	DNAH5, DNAH9, DNAI1, DNAI2	Absent	(DNALI1, DNAH6)		
		Présent	DNAH11				
<i>TTC12</i> (2020)	BDI	Présent	DNAH5, DNAH9, DNAH11, DNAI1)	Absent	(DNALI1, DNAH1, DNAH6, DNAH12)	Présent	(DNAH2, DNAH10)

Tableau 8. Phénotype ciliaire observé en ME et en IF chez les patients DCP avec absence de deux BDs.

BDE: bras de dynéine externe, BDI: bras de dynéine interne, DC: complexe d'ancrage des BDE. Dans le cas de *TTC12* : absence de deux BDs dans les flagelles et des BDI monomériques dans les cils respiratoires

Enfin, en cas de DCP avec atteinte des deux BDs, les cils respiratoires sont presque toujours immobiles et le phénotype clinique correspond à un phénotype classique de DCP (atteinte respiratoire récurrente des voies aériennes supérieures et inférieures, pouvant être associée à un *situs inversus* et une infertilité masculine) (Blanchon et al., 2020). Cependant, il est important de noter que le défaut de *TTC12* est quant à lui responsable de DCP avec une atteinte respiratoire modérée, et que l'absence isolée des BDI dans les cils respiratoires est difficile à affirmer en ME en raison du faible contraste des BDI. De plus, chez les 4 patients de notre étude portant sur *TTC12*, l'absence de défaut de latéralité et la fréquence normale de battement ciliaire rend le diagnostic de DCP particulièrement difficile. Le diagnostic de DCP est d'autant plus difficile à porter lorsque le NO nasal est normal (2 sur 4 patients de notre étude), et que l'infertilité masculine ne peut être diagnostiquée (comme c'est le cas dans notre étude lorsqu'il s'agit de sujet de sexe féminin ou de jeunes garçons). Pour ces raisons, nous pouvons imaginer que les DCP liées à *TTC12* pourraient être sous-estimées chez les femmes, les jeunes enfants ou les hommes n'ayant pas testé leur fertilité.

De manière similaire, chez les femmes porteuses de mutations *PIH1D3* à l'état hétérozygote, pour lesquelles l'allèle muté est majoritairement exprimé et dont les manifestations respiratoires se

rapprochent de celles d'une DCP (tout en restant plus modérées comme c'est le cas pour une des mères étudiées dans le cadre de cette thèse), l'identification de la cause moléculaire est particulièrement difficile s'il n'existe aucun individu masculin atteint de DCP dans la famille. Pourtant, la connaissance de l'étiologie moléculaire de leurs symptômes respiratoires permettrait à ces patientes de bénéficier non seulement d'une meilleure prise en charge thérapeutique mais aussi d'un conseil génétique adapté en cas de grossesse. De manière plus générale, les résultats obtenus dans ce travail de thèse laissent penser que, face à des infections respiratoires récidivantes hautes et/ou basses, il est important de rechercher dans le bilan étiologique, des anomalies ciliaires parfois discrètes en rapport avec l'existence de mutations des gènes *TTC12* ou *PIH1D3*.

VII- Conclusion et perspectives

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse ont permis de progresser dans la compréhension des mécanismes d'assemblage des bras de dynéine des cils mobiles en précisant le rôle de TTC12 et PIH1D3, deux protéines cytoplasmiques dont les anomalies moléculaires sont responsables de DCP avec absence des bras de dynéines. Ils ont aussi permis d'apporter de nouvelles connaissances sur la physiopathologie des DCP, en particulier en identifiant certaines formes frustes de DCP pour lesquelles l'atteinte respiratoire est au second plan ou modérée.

Sur un plan fondamental, nos travaux sur TTC12 ont permis de montrer pour la première fois l'existence de mécanismes d'assemblage différents dans les cils respiratoires et les flagelles des spermatozoïdes. Ils démontrent également pour la première fois qu'une absence isolée des BDI monomériques peut entraîner une atteinte respiratoire, même si celle-ci est modérée. Ces travaux ont aussi permis le développement de l'inactivation de gènes d'intérêt par CRISPR-Cas9 dans des CENH différenciées en culture ALI, ce qui ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude de la physiopathologie des maladies touchant l'épithélium respiratoire. Dans le cadre des DCP, il est désormais possible grâce à ce nouveau modèle d'envisager de caractériser pour chaque gène impliqué dans l'assemblage des BDs, la fonction précise de ces différentes cochaperones ainsi que les sous-types de BDI affectés par le défaut de chacune d'entre elles.

En ce qui concerne les anomalies de *PIH1D3*, responsables de la seule DCP non syndromique récessive liée à l'X, nous sommes parvenus à corrélérer, au cas par cas, le profil d'inactivation de l'X avec l'expressivité variable des symptômes respiratoires chez les mères porteuses de mutations *PIH1D3* à l'état hétérozygote. Pour cela nous avons utilisé deux techniques courantes d'étude de la méthylation de l'ADN que nous avons adaptées de façon originale pour obtenir (i) la phase entre l'allèle muté de *PIH1D3* avec le pourcentage de méthylation obtenu par digestion enzymatique au site HUMARA, (ii) le taux de méthylation de l'allèle normal par conversion au bisulfite au niveau de délétions emportant le gène *PIH1D3*. L'utilisation innovante de ces techniques pour déterminer précisément la méthylation d'un allèle muté (et non pas un ratio global de méthylation) pourrait être élargie à d'autres maladies liées à l'X (sous réserve, pour la technique de conversion au bisulfite, que le défaut moléculaire soit une grande délétion emportant le gène d'intérêt et des sites de méthylation). Il serait ainsi possible de préciser, à l'échelle individuelle, la relation directe entre l'inactivation de l'X porteur d'un allèle muté et la survenue d'une maladie liée à l'X. La future utilisation du séquençage de type long read comportant une analyse de la méthylation chez les sujets féminins porteurs de mutations de *PIH1D3* (ou d'autres gènes du chromosome X) pourrait permettre de prédire la sévérité du phénotype dans un contexte anténatal.

Sur un plan plus clinique, dans la continuité de nos travaux sur *TTC12*, il semble nécessaire de mieux caractériser le phénotype flagellaire chez les patients masculins adultes atteints de DCP avec absence des deux BDs. En effet, comme pour *TTC12*, ceci pourrait permettre de révéler d'éventuelles différences dans l'assemblage des cils et flagelles. Même si une infertilité masculine a été décrite en cas d'anomalie de 12/13 gènes de DCP avec défaut d'assemblage des BDs, l'impact sur l'ultrastructure de l'axonème ou sur la composition en BDs a très rarement été évalué sur ces flagelles.

Nos résultats sur *PIH1D3* suggèrent quant à eux que toutes les femmes avec des manifestations respiratoires même minimales, et qui sont apparentées à un patient masculin atteint de DCP liée à *PIH1D3*, devraient bénéficier d'une étude moléculaire éventuellement associée à l'étude du profil d'inactivation de l'X. De façon plus générale, il devrait être envisagé pour toutes les femmes présentant des symptômes respiratoires chroniques, la possibilité d'une atteinte liée à une mutation de *PIH1D3* qui, une fois diagnostiquée, permettrait un meilleur suivi des patientes et un conseil génétique adapté en cas de grossesse.

Enfin, les patients porteurs de mutations de *TTC12*, tout comme les femmes porteuses d'une mutation hétérozygote de *PIH1D3*, présentent des atteintes respiratoires modérées difficiles à rapporter à une DCP tout particulièrement en raison de l'absence d'autres symptômes évocateurs de DCP tels que l'abaissement du NO nasal ou le défaut de latéralisation des organes. Plusieurs gènes de DCP sont déjà connus pour conduire à des manifestations respiratoires plutôt modérées : *GAS2L2*, *LRRRC56*, *DNAH9*, *RSPH1* et *CFAP74*. Les mutations du gène *DNAH9* mènent, par exemple, à une atteinte respiratoire souvent limitée aux voies supérieures et à un NO nasal subnormal. Elles conduisent cependant à un défaut de latéralisation des organes chez tous les patients identifiés, ce qui peut laisser penser que le diagnostic de DCP n'aurait pas été porté en l'absence de *situs inversus*. Ainsi, ces formes de DCP aux manifestations respiratoires modérées seraient très vraisemblablement sous diagnostiquées. Il est d'ailleurs intéressant de noter que la majeure partie des gènes de DCP responsables de ces atteintes respiratoires modérées a été identifiée au cours des 5 dernières années (*LRRRC56*, *DNAH9*, *GAS2L2*, *CFAP74*, *TTC12* ainsi que *PIH1D3* à l'état hétérozygote chez les femmes). Les futurs gènes impliqués en DCP pourraient ainsi faire partie de ce groupe de DCP à manifestations respiratoires discrètes. Ces données posent en outre la question de la réalisation d'études génétiques chez les sujets présentant une atteinte respiratoire limitée mais chronique depuis la naissance ou la petite enfance.

Références

- Ahmed, N.T., Gao, C., Lucker, B.F., Cole, D.G., Mitchell, D.R., 2008. ODA16 aids axonemal outer row dynein assembly through an interaction with the intraflagellar transport machinery. *J Cell Biol* 183, 313–322. <https://doi.org/10.1083/jcb.200802025>
- Au, W.-Y., Lam, V., Pang, A., Lee, W.-M., Chan, J.L.C., Song, Y.-Q., Ma, E.S., Kwong, Y.-L., 2006. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in female octogenarians, nanogenarians, and centenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61, 1086–1089. <https://doi.org/10.1093/gerona/61.10.1086>
- Au, W.-Y., Ma, E.S.K., Lam, V.M.S., Chan, J.L.C., Pang, A., Kwong, Y.-L., 2004. Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in elderly Chinese women heterozygous for G6PD variants. *Am J Med Genet A* 129A, 208–211. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30213>
- Austin-Tse, C., Halbritter, J., Zariwala, M.A., Gilberti, R.M., Gee, H.Y., Hellman, N., Pathak, N., Liu, Y., Panizzi, J.R., Patel-King, R.S., Tritschler, D., Bower, R., O'Toole, E., Porath, J.D., Hurd, T.W., Chaki, M., Diaz, K.A., Kohl, S., Lovric, S., Hwang, D.-Y., Braun, D.A., Schueler, M., Airik, R., Otto, E.A., Leigh, M.W., Noone, P.G., Carson, J.L., Davis, S.D., Pittman, J.E., Ferkol, T.W., Atkinson, J.J., Olivier, K.N., Sagel, S.D., Dell, S.D., Rosenfeld, M., Milla, C.E., Loges, N.T., Omran, H., Porter, M.E., King, S.M., Knowles, M.R., Drummond, I.A., Hildebrandt, F., 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, 672–686. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.08.015>
- Awatade, N.T., Wong, S.L., Capraro, A., Pandzic, E., Slapetova, I., Zhong, L., Turgutoglu, N., Fawcett, L.K., Whan, R.M., Jaffe, A., Waters, S.A., 2021. Significant functional differences in differentiated Conditionally Reprogrammed (CRC)- and Feeder-free Dual SMAD inhibited-expanded human nasal epithelial cells. *J Cyst Fibros* 20, 364–371. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2020.12.019>
- Berical, A., Lee, R.E., Lu, J., Beermann, M.L., Le Suer, J.A., Mithal, A., Thomas, D., Ranallo, N., Peasley, M., Stuffer, A., Bukis, K., Seymour, R., Harrington, J., Coote, K., Valley, H., Hurley, K., McNally, P., Mostoslavsky, G., Mahoney, J., Randell, S.H., Hawkins, F.J., 2022. A multimodal iPSC platform for cystic fibrosis drug testing. *Nat Commun* 13, 4270. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31854-8>
- Bertelsen, B., Tümer, Z., Ravn, K., 2011. Three New Loci for Determining X Chromosome Inactivation Patterns. *The Journal of Molecular Diagnostics* 13, 537–540. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.05.003>
- Blackburn, K., Bustamante-Marin, X., Yin, W., Goshe, M.B., Ostrowski, L.E., 2017. Quantitative Proteomic Analysis of Human Airway Cilia Identifies Previously Uncharacterized Proteins of High Abundance. *Journal of Proteome Research* 16, 1579–1592. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00972>
- Blanchon, Sylvain, Legendre, M., Bottier, M., Tamalet, A., Montantin, G., Collot, N., Faucon, C., Dastot, F., Copin, B., Clement, A., Filoche, M., Coste, A., Amselem, S., Escudier, E., Papon, J.-F., Louis, B., 2020. Deep phenotyping, including quantitative ciliary beating parameters, and extensive genotyping in primary ciliary dyskinesia. *J Med Genet* 57, 237–244. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106424>
- Blanchon, S., Papon, J.F., Beydon, N., Tamalet, A., Escudier, E., Legendre, M., Thouvenin, G., 2020. Dyskinésies ciliaires primitives de l'enfant. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture* 33, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.jpp.2019.12.009>
- Bloodgood, R.A., 2009. From central to rudimentary to primary: the history of an underappreciated organelle whose time has come. The primary cilium. *Methods Cell Biol* 94, 3–52. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)94001-2](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)94001-2)
- Bluhmki, T., Traub, S., Müller, A.-K., Bitzer, S., Schruf, E., Bammert, M.-T., Leist, M., Gantner, F., Garnett, J.P., Heilker, R., 2021. Functional human iPSC-derived alveolar-like cells cultured in a

- miniaturized 96-Transwell air-liquid interface model. *Sci Rep* 11, 17028. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96565-4>
- Bonnefoy, S., Watson, C.M., Kernohan, K.D., Lemos, M., Hutchinson, S., Poulter, J.A., Crinnion, L.A., Berry, I., Simmonds, J., Vasudevan, P., O'Callaghan, C., Hirst, R.A., Rutman, A., Huang, L., Hartley, T., Grynspan, D., Moya, E., Li, C., Carr, I.M., Bonthron, D.T., Leroux, M., Boycott, K.M., Bastin, P., Sheridan, E.G., 2018. Biallelic Mutations in LRRC56, Encoding a Protein Associated with Intraflagellar Transport, Cause Mucociliary Clearance and Laterality Defects. *The American Journal of Human Genetics* 103, 727–739. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.10.003>
- Bower, R., Tritschler, D., Vanderwaal, K., Perrone, C.A., Mueller, J., Fox, L., Sale, W.S., Porter, M.E., 2013. The N-DRC forms a conserved biochemical complex that maintains outer doublet alignment and limits microtubule sliding in motile axonemes. *Mol Biol Cell* 24, 1134–1152. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-11-0801>
- Braschi, B., Omran, H., Witman, G.B., Pazour, G.J., Pfister, K.K., Bruford, E.A., King, S.M., 2022. Consensus nomenclature for dyneins and associated assembly factors. *Journal of Cell Biology* 221, e202109014. <https://doi.org/10.1083/jcb.202109014>
- Brennan, S.K., Ferkol, T.W., Davis, S.D., 2021. Emerging Genotype-Phenotype Relationships in Primary Ciliary Dyskinesia. *IJMS* 22, 8272. <https://doi.org/10.3390/ijms22158272>
- Brown, C.J., Hendrich, B.D., Rupert, J.L., Lafrenière, R.G., Xing, Y., Lawrence, J., Willard, H.F., 1992. The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell* 71, 527–542. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90520-m](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90520-m)
- Bukowy-Bieryłło, Z., 2021. Long-term differentiating primary human airway epithelial cell cultures: how far are we? *Cell Commun Signal* 19, 63. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00740-z>
- Carter, A.P., 2013. Crystal clear insights into how the dynein motor moves. *J Cell Sci* 126, 705–713. <https://doi.org/10.1242/jcs.120725>
- Carter, A.P., Cho, C., Jin, L., Vale, R.D., 2011. Crystal structure of the dynein motor domain. *Science* 331, 1159–1165. <https://doi.org/10.1126/science.1202393>
- Chen, S., Schoen, J., 2019. Air-liquid interface cell culture: From airway epithelium to the female reproductive tract. *Reprod Domest Anim* 54 Suppl 3, 38–45. <https://doi.org/10.1111/rda.13481>
- Chen, Y., Zhao, M., Wang, S., Chen, J., Wang, Y., Cao, Q., Zhou, W., Liu, J., Xu, Z., Tong, G., Li, J., 2009. A novel role for DYX1C1, a chaperone protein for both Hsp70 and Hsp90, in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 135, 1265–1276. <https://doi.org/10.1007/s00432-009-0568-6>
- Coste, A., Brugel, L., Maître, B., Boussat, S., Papon, J.F., Wingerstmann, L., Peynègre, R., Escudier, E., 2000. Inflammatory cells as well as epithelial cells in nasal polyps express vascular endothelial growth factor. *Eur Respir J* 15, 367–372. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.2000.15b24.x>
- Davis, S.D., Rosenfeld, M., Lee, H.-S., Ferkol, T.W., Sagel, S.D., Dell, S.D., Milla, C., Pittman, J.E., Shapiro, A.J., Sullivan, K.M., Nykamp, K.R., Krischer, J.P., Zariwala, M.A., Knowles, M.R., Leigh, M.W., 2019. Primary Ciliary Dyskinesia: Longitudinal Study of Lung Disease by Ultrastructure Defect and Genotype. *Am J Respir Crit Care Med* 199, 190–198. <https://doi.org/10.1164/rccm.201803-0548OC>
- de Vries, B.B., Wiegers, A.M., Smits, A.P., Mohkamsing, S., Duivenvoorden, H.J., Fryns, J.P., Curfs, L.M., Halley, D.J., Oostra, B.A., van den Ouweland, A.M., Niermeijer, M.F., 1996. Mental status of females with an FMR1 gene full mutation. *Am J Hum Genet* 58, 1025–1032.
- Desai, P.B., Dean, A.B., Mitchell, D.R., 2018. 4 - Cytoplasmic preassembly and trafficking of axonemal dyneins, in: King, S.M. (Ed.), *Dyneins (Second Edition)*. Academic Press, pp. 140–161. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809471-6.00004-8>
- Desai, P.B., Freshour, J.R., Mitchell, D.R., 2015. *Chlamydomonas* axonemal dynein assembly locus *ODA8* encodes a conserved flagellar protein needed for cytoplasmic maturation of outer dynein arm complexes. *Cytoskeleton* 72, 16–28. <https://doi.org/10.1002/cm.21206>

- Diggle, C.P., Moore, D.J., Mali, G., zur Lage, P., Ait-Lounis, A., Schmidts, M., Shoemark, A., Garcia Munoz, A., Halachev, M.R., Gautier, P., Yeyati, P.L., Bonthron, D.T., Carr, I.M., Hayward, B., Markham, A.F., Hope, J.E., von Kriegsheim, A., Mitchison, H.M., Jackson, I.J., Durand, B., Reith, W., Sheridan, E., Jarman, A.P., Mill, P., 2014. HEATR2 Plays a Conserved Role in Assembly of the Ciliary Motile Apparatus. *PLoS Genet* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004577>
- Dougherty, G.W., Loges, N.T., Klinkenbusch, J.A., Olbrich, H., Pennekamp, P., Menchen, T., Raidt, J., Wallmeier, J., Werner, C., Westermann, C., Ruckert, C., Mirra, V., Hjej, R., Memari, Y., Durbin, R., Kolb-Kokocinski, A., Praveen, K., Kashef, M.A., Kashef, S., Eghtedari, F., Häffner, K., Valmari, P., Baktai, G., Aviram, M., Bentur, L., Amirav, I., Davis, E.E., Katsanis, N., Brueckner, M., Shaposhnykov, A., Pigino, G., Dworniczak, B., Omran, H., 2016. DNAH11 Localization in the Proximal Region of Respiratory Cilia Defines Distinct Outer Dynein Arm Complexes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 55, 213–224. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0353OC>
- Dubaissi, E., Rousseau, K., Lea, R., Soto, X., Nardeosingh, S., Schweickert, A., Amaya, E., Thornton, D.J., Papalopulu, N., 2014. A secretory cell type develops alongside multiciliated cells, ionocytes and goblet cells, and provides a protective, anti-infective function in the frog embryonic mucociliary epidermis. *Development* 141, 1514–1525. <https://doi.org/10.1242/dev.102426>
- Errigo, A., Bitti, A., Galistu, F., Salis, R., Pes, G.M., Dore, M.P., 2023. Relationship between Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency, X-Chromosome Inactivation and Inflammatory Markers. *Antioxidants (Basel)* 12, 334. <https://doi.org/10.3390/antiox12020334>
- Fahim, A.T., Sullivan, L.S., Bowne, S.J., Jones, K.D., Wheaton, D.K.H., Khan, N.W., Heckenlively, J.R., Jayasundera, K.T., Branham, K.H., Andrews, C.A., Othman, M.I., Karoukis, A.J., Birch, D.G., Daiger, S.P., 2020. X-Chromosome Inactivation Is a Biomarker of Clinical Severity in Female Carriers of RPGR-Associated X-Linked Retinitis Pigmentosa. *Ophthalmology Retina* 4, 510–520. <https://doi.org/10.1016/j.oret.2019.11.010>
- Fassad, M.R., Shoemark, A., le Borgne, P., Koll, F., Patel, M., Dixon, M., Hayward, J., Richardson, C., Frost, E., Jenkins, L., Cullup, T., Chung, E.M.K., Lemullois, M., Aubusson-Fleury, A., Hogg, C., Mitchell, D.R., Tassin, A.-M., Mitchison, H.M., 2018a. C11orf70 Mutations Disrupting the Intraflagellar Transport-Dependent Assembly of Multiple Axonemal Dyneins Cause Primary Ciliary Dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* 102, 956–972. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.03.024>
- Fassad, M.R., Shoemark, A., Legendre, M., Hirst, R.A., Koll, F., le Borgne, P., Louis, B., Daudvohra, F., Patel, M.P., Thomas, L., Dixon, M., Burgoyne, T., Hayes, J., Nicholson, A.G., Cullup, T., Jenkins, L., Carr, S.B., Aurora, P., Lemullois, M., Aubusson-Fleury, A., Papon, J.-F., O’Callaghan, C., Amselem, S., Hogg, C., Escudier, E., Tassin, A.-M., Mitchison, H.M., 2018b. Mutations in Outer Dynein Arm Heavy Chain DNAH9 Cause Motile Cilia Defects and Situs Inversus. *Am. J. Hum. Genet.* 103, 984–994. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.10.016>
- Fearon, E.R., Kohn, D.B., Winkelstein, J.A., Vogelstein, B., Blaese, R.M., 1988. Carrier detection in the Wiskott Aldrich syndrome. *Blood* 72, 1735–1739.
- Ferraris, A.M., Forni, G.L., Mangerini, R., Gaetani, G.F., 1997. Nonrandom X-chromosome inactivation in hemopoietic cells from carriers of dyskeratosis congenita. *Am J Hum Genet* 61, 458–461. [https://doi.org/10.1016/S0002-9297\(07\)64075-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9297(07)64075-0)
- Fulcher, M.L., Gabriel, S., Burns, K.A., Yankaskas, J.R., Randell, S.H., 2005. Well-differentiated human airway epithelial cell cultures. *Methods Mol Med* 107, 183–206. <https://doi.org/10.1385/1-59259-861-7:183>
- Galupa, R., Heard, E., 2015. X-chromosome inactivation: new insights into cis and trans regulation. *Current Opinion in Genetics & Development* 31, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.04.002>
- Gibbons, R.J., Suthers, G.K., Wilkie, A.O., Buckle, V.J., Higgs, D.R., 1992. X-linked alpha-thalassemia/mental retardation (ATR-X) syndrome: localization to Xq12-q21.31 by X inactivation and linkage analysis. *Am J Hum Genet* 51, 1136–1149.

- Gray, T.E., Guzman, K., Davis, C.W., Abdullah, L.H., Nettesheim, P., 1996. Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14, 104–112. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.14.1.8534481>
- Grossman-Haham, I., 2023. Towards an atomic model of a beating ciliary axoneme. *Curr Opin Struct Biol* 78, 102516. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102516>
- Gruenert, D.C., Finkbeiner, W.E., Widdicombe, J.H., 1995. Culture and transformation of human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 268, L347–360. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1995.268.3.L347>
- Gui, M., Farley, H., Anujan, P., Anderson, J.R., Maxwell, D.W., Whitchurch, J.B., Botsch, J.J., Qiu, T., Meleppattu, S., Singh, S.K., Zhang, Q., Thompson, J., Lucas, J.S., Bingle, C.D., Norris, D.P., Roy, S., Brown, A., 2021a. De novo identification of mammalian ciliary motility proteins using cryo-EM. *Cell* 184, 5791–5806.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.10.007>
- Gui, M., Ma, M., Sze-Tu, E., Wang, X., Koh, F., Zhong, E.D., Berger, B., Davis, J.H., Dutcher, S.K., Zhang, R., Brown, A., 2021b. Structures of radial spokes and associated complexes important for ciliary motility. *Nat Struct Mol Biol* 28, 29–37. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00530-0>
- Hawkins, F.J., Suzuki, S., Beermann, M.L., Barillà, C., Wang, R., Villacorta-Martin, C., Beral, A., Jean, J.C., Le Suer, J., Matte, T., Simone-Roach, C., Tang, Y., Schlaeger, T.M., Crane, A.M., Matthias, N., Huang, S.X.L., Randell, S.H., Wu, J., Spence, J.R., Carraro, G., Stripp, B.R., Rab, A., Sorsher, E.J., Horani, A., Brody, S.L., Davis, B.R., Kotton, D.N., 2021. Derivation of Airway Basal Stem Cells from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 28, 79–95.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.017>
- Hild, M., Jaffe, A.B., 2016. Production of 3-D Airway Organoids From Primary Human Airway Basal Cells and Their Use in High-Throughput Screening. *Current Protocols in Stem Cell Biology* 37. <https://doi.org/10.1002/cpsc.1>
- Höben, I.M., Hjejij, R., Olbrich, H., Dougherty, G.W., Nöthe-Menchen, T., Aprea, I., Frank, D., Pennekamp, P., Dworniczak, B., Wallmeier, J., Raidt, J., Nielsen, K.G., Philipsen, M.C., Santamaria, F., Venditto, L., Amirav, I., Mussaffi, H., Prenzel, F., Wu, K., Bakey, Z., Schmidts, M., Loges, N.T., Omran, H., 2018. Mutations in C11orf70 Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Randomization of Left/Right Body Asymmetry Due to Defects of Outer and Inner Dynein Arms. *The American Journal of Human Genetics* 102, 973–984. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.03.025>
- Horani, A., Druley, T.E., Zariwala, M.A., Patel, A.C., Levinson, B.T., Van Arendonk, L.G., Thornton, K.C., Giacalone, J.C., Albee, A.J., Wilson, K.S., Turner, E.H., Nickerson, D.A., Shendure, J., Bayly, P.V., Leigh, M.W., Knowles, M.R., Brody, S.L., Dutcher, S.K., Ferkol, T.W., 2012a. Whole-exome capture and sequencing identifies HEATR2 mutation as a cause of primary ciliary dyskinesia. *Am J Hum Genet* 91, 685–693. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.08.022>
- Horani, A., Druley, T.E., Zariwala, M.A., Patel, A.C., Levinson, B.T., Van Arendonk, L.G., Thornton, K.C., Giacalone, J.C., Albee, A.J., Wilson, K.S., Turner, E.H., Nickerson, D.A., Shendure, J., Bayly, P.V., Leigh, M.W., Knowles, M.R., Brody, S.L., Dutcher, S.K., Ferkol, T.W., 2012b. Whole-Exome Capture and Sequencing Identifies HEATR2 Mutation as a Cause of Primary Ciliary Dyskinesia. *The American Journal of Human Genetics* 91, 685–693. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.08.022>
- Horani, A., Ferkol, T.W., Shoseyov, D., Wasserman, M.G., Oren, Y.S., Kerem, B., Amirav, I., Cohen-Cymbarknoh, M., Dutcher, S.K., Brody, S.L., Elpeleg, O., Kerem, E., 2013. LRRC6 mutation causes primary ciliary dyskinesia with dynein arm defects. *PLoS One* 8, e59436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059436>
- Horani, A., Ustione, A., Huang, T., Firth, A.L., Pan, J., Gunsten, S.P., Haspel, J.A., Piston, D.W., Brody, S.L., 2018. Establishment of the early cilia preassembly protein complex during motile ciliogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, E1221–E1228. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715915115>
- Hou, Y., Qin, H., Follit, J.A., Pazour, G.J., Rosenbaum, J.L., Witman, G.B., 2007. Functional analysis of an individual IFT protein: IFT46 is required for transport of outer dynein arms into flagella. *J Cell Biol* 176, 653–665. <https://doi.org/10.1083/jcb.200608041>

- Hou, Y., Witman, G.B., 2017. The N-terminus of IFT46 mediates intraflagellar transport of outer arm dynein and its cargo-adaptor ODA16. *Mol Biol Cell* 28, 2420–2433. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-03-0172>
- Huizar, R.L., Lee, C., Boulgakov, A.A., Horani, A., Tu, F., Marcotte, E.M., Brody, S.L., Wallingford, J.B., 2018. A liquid-like organelle at the root of motile ciliopathy. *eLife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.38497>
- Hunter, E.L., Lechtreck, K., Fu, G., Hwang, J., Lin, H., Gokhale, A., Alford, L.M., Lewis, B., Yamamoto, R., Kamiya, R., Yang, F., Nicastro, D., Dutcher, S.K., Wirschell, M., Sale, W.S., 2018. The IDA3 adapter, required for intraflagellar transport of I1 dynein, is regulated by ciliary length. *MBoC* 29, 886–896. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-12-0729>
- Hynds, R.E., Bonfanti, P., Janes, S.M., 2018. Regenerating human epithelia with cultured stem cells: feeder cells, organoids and beyond. *EMBO Mol Med* 10, 139–150. <https://doi.org/10.15252/emmm.201708213>
- Ibañez-Tallon, I., Pagenstecher, A., Fliegauf, M., Olbrich, H., Kispert, A., Ketelsen, U.-P., North, A., Heintz, N., Omran, H., 2004. Dysfunction of axonemal dynein heavy chain Mdnah5 inhibits ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation. *Human Molecular Genetics* 13, 2133–2141. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh219>
- Ide, T., Twan, W.K., Lu, H., Ikawa, Y., Lim, L.-X., Henninger, N., Nishimura, H., Takaoka, K., Narasimhan, V., Yan, X., Shiratori, H., Roy, S., Hamada, H., 2020. CFAP53 regulates mammalian cilia-type motility patterns through differential localization and recruitment of axonemal dynein components. *PLoS Genet* 16, e1009232. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009232>
- Ishikawa, T., 2015. Cryo-electron tomography of motile cilia and flagella. *Cilia* 4, 3. <https://doi.org/10.1186/s13630-014-0012-7>
- Italian XLA Collaborative Group, Moschese, V., Orlandi, P., Plebani, A., Arvanitidis, K., Fiorini, M., Speletas, M., Mella, P., Ritis, K., Sideras, P., Finocchi, A., Livadiotti, S., Rossi, P., 2000. X-Chromosome Inactivation and Mutation Pattern in the Bruton's Tyrosine Kinase Gene in Patients with X-linked Agammaglobulinemia. *Mol Med* 6, 104–113. <https://doi.org/10.1007/BF03401778>
- Jorissen, M., Bessems, A., 1995. Normal ciliary beat frequency after ciliogenesis in nasal epithelial cells cultured sequentially as monolayer and in suspension. *Acta Otolaryngol* 115, 66–70. <https://doi.org/10.3109/00016489509133349>
- Kakihara, Y., Houry, W.A., 2012. The R2TP complex: discovery and functions. *Biochim Biophys Acta* 1823, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.08.016>
- Kartagener, M., Horlacher, A., 1935. Zur Pathogenese der Bronchiektasien: V. Mitteilung. Situs viscerum inversus und Polyposis nasi in einem Falle familiärer Bronchiektasien. *Beiträge zur Klinik der Tuberkulose* 87, 331–333. <https://doi.org/10.1007/BF02163110>
- King, S.M., 2021. Cytoplasmic factories for axonemal dynein assembly. *J Cell Sci* 134, jcs258626. <https://doi.org/10.1242/jcs.258626>
- King, S.M., 2016. Axonemal Dynein Arms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8, a028100. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028100>
- King, S.M., Patel-King, R.S., 2015. The Oligomeric Outer Dynein Arm Assembly Factor CCDC103 Is Tightly Integrated within the Ciliary Axoneme and Exhibits Periodic Binding to Microtubules. *Journal of Biological Chemistry* 290, 7388–7401. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.616425>
- Kollmar, M., 2016. Fine-Tuning Motile Cilia and Flagella: Evolution of the Dynein Motor Proteins from Plants to Humans at High Resolution. *Molecular Biology and Evolution* 33, 3249–3267. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw213>
- Kon, T., Oyama, T., Shimo-Kon, R., Imamula, K., Shima, T., Sutoh, K., Kurisu, G., 2012. The 2.8 Å crystal structure of the dynein motor domain. *Nature* 484, 345–350. <https://doi.org/10.1038/nature10955>
- Kott, E., Duquesnoy, P., Copin, B., Legendre, M., Dastot-Le Moal, F., Montantin, G., Jeanson, L., Tamalet, A., Papon, J.-F., Siffroi, J.-P., Rives, N., Mitchell, V., de Blic, J., Coste, A., Clement, A., Escalier, D., Touré, A., Escudier, E., Amselem, S., 2012. Loss-of-Function Mutations in LRRC6, a

- Gene Essential for Proper Axonemal Assembly of Inner and Outer Dynein Arms, Cause Primary Ciliary Dyskinesia. *Am J Hum Genet* 91, 958–964. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.10.003>
- Kozminski, K.G., Beech, P.L., Rosenbaum, J.L., 1995. The Chlamydomonas kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane. *J Cell Biol* 131, 1517–1527. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.6.1517>
- Kozminski, K.G., Johnson, K.A., Forscher, P., Rosenbaum, J.L., 1993. A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5519–5523. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.12.5519>
- Kubo, S., Yang, S.K., Black, C.S., Dai, D., Valente-Paterno, M., Gaertig, J., Ichikawa, M., Bui, K.H., 2021. Remodeling and activation mechanisms of outer arm dyneins revealed by cryo-EM. *EMBO Rep* 22, e52911. <https://doi.org/10.15252/embr.202152911>
- Kumar, P.A., Hu, Y., Yamamoto, Y., Hoe, N.B., Wei, T.S., Mu, D., Sun, Y., Joo, L.S., Dagher, R., Zielonka, E.M., Wang, D.Y., Lim, B., Chow, V.T., Crum, C.P., Xian, W., McKeon, F., 2011. Distal airway stem cells yield alveoli in vitro and during lung regeneration following H1N1 influenza infection. *Cell* 147, 525–538. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.001>
- Lacout, C., Haddad, E., Sabri, S., Svinarchouk, F., Garçon, L., Capron, C., Foudi, A., Mzali, R., Snapper, S.B., Louache, F., Vainchenker, W., Duménil, D., 2003. A defect in hematopoietic stem cell migration explains the nonrandom X-chromosome inactivation in carriers of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 102, 1282–1289. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2099>
- Lacroix, G., Koch, W., Ritter, D., Gutleb, A.C., Larsen, S.T., Loret, T., Zanetti, F., Constant, S., Chortarea, S., Rothen-Rutishauser, B., Hiemstra, P.S., Frejafon, E., Hubert, P., Gribaldo, L., Kearns, P., Aublant, J.-M., Diabaté, S., Weiss, C., de Groot, A., Kooter, I., 2018. Air-Liquid Interface In Vitro Models for Respiratory Toxicology Research: Consensus Workshop and Recommendations. *Appl In Vitro Toxicol* 4, 91–106. <https://doi.org/10.1089/aivt.2017.0034>
- Laselva, O., Conese, M., 2021. Three-Dimensional Airway Spheroids and Organoids for Cystic Fibrosis Research. *JoR* 1, 229–247. <https://doi.org/10.3390/jor1040022>
- Lee, C., Cox, R.M., Papoulas, O., Horani, A., Drew, K., Devitt, C.C., Brody, S.L., Marcotte, E.M., Wallingford, J.B., 2020. Functional partitioning of a liquid-like organelle during assembly of axonemal dyneins. *eLife* 9, e58662. <https://doi.org/10.7554/eLife.58662>
- Lee, C.F., 2020. Formation of liquid-like cellular organelles depends on their composition. *Nature* 581, 144–145. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-01280-1>
- Lee, L., Ostrowski, L.E., 2021. Motile cilia genetics and cell biology: big results from little mice. *Cell. Mol. Life Sci.* 78, 769–797. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03633-5>
- Legendre, M., Thouvenin, G., Taytard, J., Baron, M., Le Bourgeois, M., Tamalet, A., Mani, R., Jouvion, G., Amselem, S., Escudier, E., Beydon, N., 2022. High Nasal Nitric Oxide, Cilia Analyses, and Genotypes in a Retrospective Cohort of Children with Primary Ciliary Dyskinesia. *Ann Am Thorac Soc* 19, 1704–1712. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.202110-1175OC>
- Legendre, M., Zaragosi, L.-E., Mitchison, H.M., 2021. Motile cilia and airway disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 110, 19–33. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2020.11.007>
- Leppig KA, Disteche CM. Ring X and other structural X chromosome abnormalities: X inactivation and phenotype. *Semin Reprod Med.* 2001 Jun;19(2):147-57. doi: 10.1055/s-2001-15395. PMID: 11480912.
- Li, S.L., Ting, S.S., Lindeman, R., Ffrench, R., Ziegler, J.B., 1998. Carrier identification in X-linked immunodeficiency diseases. *J Paediatr Child Health* 34, 273–279. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1754.1998.00216.x>
- Li, Y., Zhao, L., Yuan, S., Zhang, J., Sun, Z., 2017. Axonemal dynein assembly requires the R2TP complex component Pontin. *Development* 144, 4684–4693. <https://doi.org/10.1242/dev.152314>
- Lin, J., Le, T.V., Augspurger, K., Tritschler, D., Bower, R., Fu, G., Perrone, C., O’Toole, E.T., Mills, K.V., Dymek, E., Smith, E., Nicastro, D., Porter, M.E., 2019. FAP57/WDR65 targets assembly of a subset of inner arm dyneins and connects to regulatory hubs in cilia. *MBoC* 30, 2659–2680. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-07-0367>

- Lin, J., Nicastro, D., 2018. Asymmetric distribution and spatial switching of dynein activity generates ciliary motility. *Science* 360, eaar1968. <https://doi.org/10.1126/science.aar1968>
- Liu, C., Miyata, H., Gao, Y., Sha, Y., Tang, S., Xu, Z., Whitfield, M., Patrat, C., Wu, H., Dulioust, E., Tian, S., Shimada, K., Cong, J., Noda, T., Li, H., Morohoshi, A., Cazin, C., Kherraf, Z.-E., Arnoult, C., Jin, L., He, X., Ray, P.F., Cao, Y., Touré, A., Zhang, F., Ikawa, M., 2020. Bi-allelic DNAH8 Variants Lead to Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella and Primary Male Infertility. *Am J Hum Genet* 107, 330–341. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.06.004>
- Liu, G., Wang, L., Pan, J., 2019. Chlamydomonas WDR92 in association with R2TP-like complex and multiple DNAAFs to regulate ciliary dynein preassembly. *J Mol Cell Biol* 11, 770–780. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy067>
- Liu, Z., Nguyen, Q.P.H., Guan, Q., Albulescu, A., Erdman, L., Mahdaviyeh, Y., Kang, J., Ouyang, H., Hegele, R.G., Moraes, T., Goldenberg, A., Dell, S.D., Mennella, V., 2020. A quantitative super-resolution imaging toolbox for diagnosis of motile ciliopathies. *Sci Transl Med* 12, eaay0071. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay0071>
- Lucas, J.S., Barbato, A., Collins, S.A., Goutaki, M., Behan, L., Caudri, D., Dell, S., Eber, E., Escudier, E., Hirst, R.A., Hogg, C., Jorissen, M., Latzin, P., Legendre, M., Leigh, M.W., Midulla, F., Nielsen, K.G., Omran, H., Papon, J.-F., Pohunek, P., Redfern, B., Rigau, D., Rindlisbacher, B., Santamaria, F., Shoemark, A., Snijders, D., Tonia, T., Titieni, A., Walker, W.T., Werner, C., Bush, A., Kuehni, C.E., 2017. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *European Respiratory Journal* 49, 1601090. <https://doi.org/10.1183/13993003.01090-2016>
- Lynham, J., Houry, W.A., 2022. The Role of Hsp90-R2TP in Macromolecular Complex Assembly and Stabilization. *Biomolecules* 12, 1045. <https://doi.org/10.3390/biom12081045>
- Lyon, M.F., 1989. X-chromosome inactivation as a system of gene dosage compensation to regulate gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 36, 119–130. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(08\)60166-x](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(08)60166-x)
- Ma, M., Stoyanova, M., Rademacher, G., Dutcher, S.K., Brown, A., Zhang, R., 2019. Structure of the Decorated Ciliary Doublet Microtubule. *Cell* 179, 909-922.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.030>
- Maier, E.M., Kammerer, S., Muntau, A.C., Wichers, M., Braun, A., Roscher, A.A., 2002. Symptoms in carriers of adrenoleukodystrophy relate to skewed X inactivation. *Ann Neurol* 52, 683–688. <https://doi.org/10.1002/ana.10376>
- Maier, E.M., Osterrieder, S., Whybra, C., Ries, M., Gal, A., Beck, M., Roscher, A.A., Muntau, A.C., 2006. Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl* 95, 30–38. <https://doi.org/10.1080/08035320600618809>
- Mali, G.R., Yeyati, P., Mizuno, S., Keighren, M.A., Lage, P. zur, Garcia-Munoz, A., Shimada, A., Takeda, H., Edlich, F., Takahashi, S., Kriegsheim, A. von, Jarman, A., Mill, P., 2017. ZMYND10 functions in a chaperone relay during axonemal dynein assembly. *bioRxiv* 233718. <https://doi.org/10.1101/233718>
- Maurizy, C., Quinternet, M., Abel, Y., Verheggen, C., Santo, P.E., Bourguet, M., C F Paiva, A., Bragantini, B., Chagot, M.-E., Robert, M.-C., Abeza, C., Fabre, P., Fort, P., Vandermoere, F., M F Sousa, P., Rain, J.-C., Charpentier, B., Cianférani, S., Bandejas, T.M., Pradet-Balade, B., Manival, X., Bertrand, E., 2018. The RPAP3-Cterminal domain identifies R2TP-like quaternary chaperones. *Nat Commun* 9, 2093. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04431-1>
- Migeon, B.R., Moser, H.W., Moser, A.B., Axelman, J., Sillence, D., Norum, R.A., 1981. Adrenoleukodystrophy: evidence for X linkage, inactivation, and selection favoring the mutant allele in heterozygous cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 5066–5070. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.8.5066>
- Morey C, Avner P. Genetics and epigenetics of the X chromosome. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Dec;1214:E18-33. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05943.x. PMID: 21382199.

- Mou, H., Brazauskas, K., Rajagopal, J., 2015. Personalized medicine for cystic fibrosis: Establishing human model systems: Personalized Medicine for Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 50, S14–S23. <https://doi.org/10.1002/ppul.23233>
- Muers, M.R., Sharpe, J.A., Garrick, D., Sloane-Stanley, J., Nolan, P.M., Hacker, T., Wood, W.G., Higgs, D.R., Gibbons, R.J., 2007. Defining the cause of skewed X-chromosome inactivation in X-linked mental retardation by use of a mouse model. *Am J Hum Genet* 80, 1138–1149. <https://doi.org/10.1086/518369>
- Narasimhan, V., Hjeij, R., Vij, S., Loges, N.T., Wallmeier, J., Koerner-Rettberg, C., Werner, C., Thamilselvam, S.K., Boey, A., Choksi, S.P., Pennekamp, P., Roy, S., Omran, H., 2015. Mutations in *CCDC11*, which encodes a coiled-coil containing ciliary protein, causes situs inversus due to dysmotility of monocilia in the left-right organizer. *Hum Mutat* 36, 307–318. <https://doi.org/10.1002/humu.22738>
- Neugebauer, P., Endepols, H., Mickenhagen, A., Walger, M., 2003. Ciliogenesis in submersion and suspension cultures of human nasal epithelial cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 260, 325–330. <https://doi.org/10.1007/s00405-002-0562-y>
- Newman, L., Chopra, J., Dossett, C., Shepherd, E., Bercusson, A., Carroll, M., Walker, W., Lucas, J.S., Cheong, Y., 2023. The impact of primary ciliary dyskinesia on female and male fertility: a narrative review. *Hum Reprod Update* dmad003. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmad003>
- Nikolić, M.Z., Rawlins, E.L., 2017. Lung Organoids and Their Use To Study Cell-Cell Interaction. *Curr Pathobiol Rep* 5, 223–231. <https://doi.org/10.1007/s40139-017-0137-7>
- Niziolek, M., Bicka, M., Osinka, A., Samsel, Z., Sekretarska, J., Poprzeczko, M., Bazan, R., Fabczak, H., Joachimiak, E., Wloga, D., 2022. PCD Genes—From Patients to Model Organisms and Back to Humans. *IJMS* 23, 1749. <https://doi.org/10.3390/ijms23031749>
- Nora, E.P., Heard, E., 2010. Chromatin Structure and Nuclear Organization Dynamics during X-Chromosome Inactivation. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 75, 333–344. <https://doi.org/10.1101/sqb.2010.75.032>
- Nussbaumer, M., Kieninger, E., Tschanz, S.A., Savas, S.T., Casaulta, C., Goutaki, M., Blanchon, S., Jung, A., Regamey, N., Kuehni, C.E., Latzin, P., Müller, L., 2021. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: discrepancy according to different algorithms. *ERJ Open Res* 7, 00353–02021. <https://doi.org/10.1183/23120541.00353-2021>
- Oda, T., Yanagisawa, H., Kamiya, R., Kikkawa, M., 2014. A molecular ruler determines the repeat length in eukaryotic cilia and flagella. *Science* 346, 857–860. <https://doi.org/10.1126/science.1260214>
- Olbrich, H., Cremers, C., Loges, N.T., Werner, C., Nielsen, K.G., Marthin, J.K., Philipsen, M., Wallmeier, J., Pennekamp, P., Menchen, T., Edelbusch, C., Dougherty, G.W., Schwartz, O., Thiele, H., Altmüller, J., Rommelmann, F., Omran, H., 2015. Loss-of-Function *GAS8* Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia and Disrupt the Nexin-Dynein Regulatory Complex. *Am J Hum Genet* 97, 546–554. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.08.012>
- Olcese, C., Patel, M.P., Shoemark, A., Kiviluoto, S., Legendre, M., Williams, H.J., Vaughan, C.K., Hayward, J., Goldenberg, A., Emes, R.D., Munye, M.M., Dyer, L., Cahill, T., Bevilard, J., Gehrig, C., Guipponi, M., Chantot, S., Duquesnoy, P., Thomas, L., Jeanson, L., Copin, B., Tamalet, A., Thauvin-Robinet, C., Papon, J.-F., Garin, A., Pin, I., Vera, G., Aurora, P., Fassad, M.R., Jenkins, L., Boustred, C., Cullup, T., Dixon, M., Onoufriadis, A., Bush, A., Chung, E.M.K., Antonarakis, S.E., Loebinger, M.R., Wilson, R., Armengot, M., Escudier, E., Hogg, C., UK10K Rare Group, Amselem, S., Sun, Z., Bartoloni, L., Blouin, J.-L., Mitchison, H.M., 2017. X-linked primary ciliary dyskinesia due to mutations in the cytoplasmic axonemal dynein assembly factor *PIH1D3*. *Nat Commun* 8, 14279. <https://doi.org/10.1038/ncomms14279>
- Ørstavik, K.H., 2009. X chromosome inactivation in clinical practice. *Hum Genet* 126, 363–373. <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0670-5>
- Orstavik, K.H., Orstavik, R.E., Naumova, A.K., D’Adamo, P., Gedeon, A., Bolhuis, P.A., Barth, P.G., Toniolo, D., 1998. X chromosome inactivation in carriers of Barth syndrome. *Am J Hum Genet* 63, 1457–1463. <https://doi.org/10.1086/302095>

- Orstavik, K.H., Scheibel, E., Ingerslev, J., Schwartz, M., 2000. Absence of correlation between X chromosome inactivation pattern and plasma concentration of factor VIII and factor IX in carriers of haemophilia A and B. *Thromb Haemost* 83, 433–437.
- Osinka, A., Poprzeczko, M., Zielinska, M.M., Fabczak, H., Joachimiak, E., Wloga, D., 2019. Ciliary Proteins: Filling the Gaps. *Recent Advances in Deciphering the Protein Composition of Motile Ciliary Complexes. Cells* 8, 730. <https://doi.org/10.3390/cells8070730>
- Owa, M., Uchihashi, T., Yanagisawa, H., Yamano, T., Iguchi, H., Fukuzawa, H., Wakabayashi, K., Ando, T., Kikkawa, M., 2019. Inner lumen proteins stabilize doublet microtubules in cilia and flagella. *Nat Commun* 10, 1143. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09051-x>
- Paff, T., Loges, N.T., Aprea, I., Wu, K., Bakey, Z., Haarman, E.G., Daniels, J.M.A., Siermans, E.A., Bogunovic, N., Dougherty, G.W., Höben, I.M., Große-Onnebrink, J., Matter, A., Olbrich, H., Werner, C., Pals, G., Schmidts, M., Omran, H., Micha, D., 2017. Mutations in PIH1D3 Cause X-Linked Primary Ciliary Dyskinesia with Outer and Inner Dynein Arm Defects. *The American Journal of Human Genetics* 100, 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.11.019>
- Panizzi, J.R., Becker-Heck, A., Castleman, V.H., Al-Mutairi, D., Liu, Y., Loges, N.T., Pathak, N., Austin-Tse, C., Sheridan, E., Schmidts, M., Olbrich, H., Werner, C., Häffner, K., Hellman, N., Chodhari, R., Gupta, A., Kramer-Zucker, A., Olale, F., Burdine, R.D., Schier, A.F., O'Callaghan, C., Chung, E.M., Reinhardt, R., Mitchison, H.M., King, S.M., Omran, H., Drummond, I.A., 2012. CCDC103 mutations cause primary ciliary dyskinesia by disrupting assembly of ciliary dynein arms. *Nat Genet* 44, 714–719. <https://doi.org/10.1038/ng.2277>
- Papazian, D., Würtzen, P.A., Hansen, S.W.K., 2016. Polarized Airway Epithelial Models for Immunological Co-Culture Studies. *Int Arch Allergy Immunol* 170, 1–21. <https://doi.org/10.1159/000445833>
- Patel-King, R.S., King, S.M., 2016. A prefoldin-associated WD-repeat protein (WDR92) is required for the correct architectural assembly of motile cilia. *Mol Biol Cell* 27, 1204–1209. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-01-0040>
- Patel-King, R.S., Sakato-Antoku, M., Yankova, M., King, S.M., 2019. WDR92 is required for axonemal dynein heavy chain stability in cytoplasm. *Mol Biol Cell* 30, 1834–1845. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-03-0139>
- Patrat, C., Ouimette, J.-F., Rougeulle, C., 2020. X chromosome inactivation in human development. *Development* 147, dev183095. <https://doi.org/10.1242/dev.183095>
- Pegoraro, E., Schimke, R.N., Garcia, C., Stern, H., Cadaldini, M., Angelini, C., Barbosa, E., Carroll, J., Marks, W.A., Neville, H.E., Marks, H., Appleton, S., Toriello, H., Wessel, H.B., Donnelly, J., Bernes, S.M., Taber, J.W., Weiss, L., Hoffman, E.P., 1995. Genetic and biochemical normalization in female carriers of Duchenne muscular dystrophy: evidence for failure of dystrophin production in dystrophin-competent myonuclei. *Neurology* 45, 677–690. <https://doi.org/10.1212/wnl.45.4.677>
- Pennarun, G., Escudier, E., Chapelin, C., Bridoux, A.-M., Cacheux, V., Roger, G., Clément, A., Goossens, M., Amselem, S., Duriez, B., 1999. Loss-of-Function Mutations in a Human Gene Related to *Chlamydomonas reinhardtii* Dynein IC78 Result in Primary Ciliary Dyskinesia. *The American Journal of Human Genetics* 65, 1508–1519. <https://doi.org/10.1086/302683>
- Penny, G.D., Kay, G.F., Sheardown, S.A., Rastan, S., Brockdorff, N., 1996. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* 379, 131–137. <https://doi.org/10.1038/379131a0>
- Piperno, G., Mead, K., Henderson, S., 1996. Inner dynein arms but not outer dynein arms require the activity of kinesin homologue protein KHP1(FLA10) to reach the distal part of flagella in *Chlamydomonas*. *J Cell Biol* 133, 371–379. <https://doi.org/10.1083/jcb.133.2.371>
- Poprzeczko, M., Bicka, M., Farahat, H., Bazan, R., Osinka, A., Fabczak, H., Joachimiak, E., Wloga, D., 2019. Rare Human Diseases: Model Organisms in Deciphering the Molecular Basis of Primary Ciliary Dyskinesia. *Cells* 8, 1614. <https://doi.org/10.3390/cells8121614>
- Qiu, T., Roy, S., 2022. Ciliary dynein arms: Cytoplasmic preassembly, intraflagellar transport, and axonemal docking. *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.30689>

- Rao, Q., Han, L., Wang, Y., Chai, P., Kuo, Y.-W., Yang, R., Hu, F., Yang, Y., Howard, J., Zhang, K., 2021. Structures of outer-arm dynein array on microtubule doublet reveal a motor coordination mechanism. *Nat Struct Mol Biol* 28, 799–810. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00656-9>
- Redwine, W.B., Hernandez-Lopez, R., Zou, S., Huang, J., Reck-Peterson, S.L., Leschziner, A.E., 2012. Structural basis for microtubule binding and release by dynein. *Science* 337, 1532–1536. <https://doi.org/10.1126/science.1224151>
- Roberts, A.J., Numata, N., Walker, M.L., Kato, Y.S., Malkova, B., Kon, T., Ohkura, R., Arisaka, F., Knight, P.J., Sutoh, K., Burgess, S.A., 2009. AAA+ Ring and linker swing mechanism in the dynein motor. *Cell* 136, 485–495. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.049>
- Rosenbaum, J.L., Witman, G.B., 2002. Intraflagellar transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 813–825. <https://doi.org/10.1038/nrm952>
- Sachs, N., Papaspyropoulos, A., Zomer-van Ommen, D.D., Heo, I., Böttinger, L., Klay, D., Weeber, F., Huelsz-Prince, G., Iakobachvili, N., Amatngalim, G.D., Ligt, J., Hoeck, A., Proost, N., Viveen, M.C., Lyubimova, A., Teeven, L., Derakhshan, S., Korving, J., Begthel, H., Dekkers, J.F., Kumawat, K., Ramos, E., Oosterhout, M.F., Offerhaus, G.J., Wiener, D.J., Olimpio, E.P., Dijkstra, K.K., Smit, E.F., Linden, M., Jaksani, S., Ven, M., Jonkers, J., Rios, A.C., Voest, E.E., Moorsel, C.H., Ent, C.K., Cuppen, E., Oudenaarden, A., Coenjaerts, F.E., Meyaard, L., Bont, L.J., Peters, P.J., Tans, S.J., Zon, J.S., Boj, S.F., Vries, R.G., Beekman, J.M., Clevers, H., 2019. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO J* 38. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100300>
- Sanderson, M.J., Sleigh, M.A., 1981. Ciliary activity of cultured rabbit tracheal epithelium: beat pattern and metachrony. *J Cell Sci* 47, 331–347. <https://doi.org/10.1242/jcs.47.1.331>
- Santos-Rebouças, C.B., Boy, R., Vianna, E.Q., Gonçalves, A.P., Piergiorgio, R.M., Abdala, B.B., dos Santos, J.M., Calassara, V., Machado, F.B., Medina-Acosta, E., Pimentel, M.M.G., 2020. Skewed X-Chromosome Inactivation and Compensatory Upregulation of Escape Genes Precludes Major Clinical Symptoms in a Female With a Large Xq Deletion. *Front. Genet.* 11, 101. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00101>
- Satir, P., 1995. Landmarks in cilia research from Leeuwenhoek to us. *Cell Motil Cytoskeleton* 32, 90–94. <https://doi.org/10.1002/cm.970320203>
- Satir, P., Christensen, S.T., 2007. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol* 69, 377–400. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236>
- Satoh, M., Ogikubo, S., Yoshizawa-Ogasawara, A., 2008. Correlation between clinical phenotypes and X-inactivation patterns in six female carriers with heterozygote vasopressin type 2 receptor gene mutations. *Endocr J* 55, 277–284. <https://doi.org/10.1507/endocrj.k07-083>
- Schmidt, H., Zalyte, R., Urnavicius, L., Carter, A.P., 2015. Structure of human cytoplasmic dynein-2 primed for its power stroke. *Nature* 518, 435–438. <https://doi.org/10.1038/nature14023>
- Serluca, F.C., Xu, B., Okabe, N., Baker, K., Lin, S.-Y., Sullivan-Brown, J., Konieczkowski, D.J., Jaffe, K.M., Bradner, J.M., Fishman, M.C., Burdine, R.D., 2009. Mutations in zebrafish leucine-rich repeat-containing six-like affect cilia motility and result in pronephric cysts, but have variable effects on left-right patterning. *Development* 136, 1621–1631. <https://doi.org/10.1242/dev.020735>
- Shoemark, A., Dell, S., Shapiro, A., Lucas, J.S., 2019. ERS and ATS diagnostic guidelines for primary ciliary dyskinesia: similarities and differences in approach to diagnosis. *Eur Respir J* 54, 1901066. <https://doi.org/10.1183/13993003.01066-2019>
- Suprynowicz, F.A., Upadhyay, G., Krawczyk, E., Kramer, S.C., Hebert, J.D., Liu, X., Yuan, H., Cheluvraju, C., Clapp, P.W., Boucher, R.C., Kamonjoh, C.M., Randell, S.H., Schlegel, R., 2012. Conditionally reprogrammed cells represent a stem-like state of adult epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 20035–20040. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213241109>
- Tan, S.Y., Rosenthal, J., Zhao, X.-Q., Francis, R.J., Chatterjee, B., Sabol, S.L., Linask, K.L., Bracero, L., Connelly, P.S., Daniels, M.P., Yu, Q., Omran, H., Leatherbury, L., Lo, C.W., 2007. Heterotaxy and complex structural heart defects in a mutant mouse model of primary ciliary dyskinesia. *J Clin Invest* 117, 3742–3752. <https://doi.org/10.1172/JCI33284>

- Tarkar, A., Slagle, C.E., Francis, R., Dougherty, G.W., Tamayo, J.V., Shook, B., Cantino, M., Schwartz, D., Jahnke, C., Olbrich, H., Werner, C., Raidt, J., Pennekamp, P., Abouhamed, M., Hjeij, R., Köhler, G., Griese, M., Li, Y., Lemke, K., Klena, N., Liu, X., Gabriel, G., Tobita, K., Jaspers, M., Morgan, L.C., Shapiro, A.J., Letteboer, S.J.F., Mans, D.A., Carson, J.L., Leigh, M.W., Wolf, W.E., Chen, S., Lucas, J.S., Onoufriadis, A., Plagnol, V., Schmidts, M., Boldt, K., Roepman, R., Zariwala, M.A., Lo, C.W., Mitchison, H.M., Knowles, M.R., Burdine, R.D., LoTurco, J.J., Omran, H., 2013. DYX1C1 is required for axonemal dynein assembly and ciliary motility. *Nature Genetics* 45, 995–1003. <https://doi.org/10.1038/ng.2707>
- Taschner, M., Mourão, A., Awasthi, M., Basquin, J., Lorentzen, E., 2017. Structural basis of outer dynein arm intraflagellar transport by the transport adaptor protein ODA16 and the intraflagellar transport protein IFT46. *Journal of Biological Chemistry* 292, 7462–7473. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.780155>
- Ta-Shma, A., Hjeij, R., Perles, Z., Dougherty, G.W., Abu Zahira, I., Letteboer, S.J.F., Antony, D., Darwish, A., Mans, D.A., Spittler, S., Edelbusch, C., Cindrić, S., Nöthe-Menzen, T., Olbrich, H., Stuhlmann, F., Aprea, I., Pennekamp, P., Loges, N.T., Breuer, O., Shaag, A., Rein, A.J.J.T., Gulec, E.Y., Gezdirici, A., Abitbul, R., Elias, N., Amirav, I., Schmidts, M., Roepman, R., Elpeleg, O., Omran, H., 2018. Homozygous loss-of-function mutations in MNS1 cause laterality defects and likely male infertility. *PLoS Genet* 14, e1007602. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007602>
- UK10K Rare Group, Olcese, C., Patel, M.P., Shoemark, A., Kiviluoto, S., Legendre, M., Williams, H.J., Vaughan, C.K., Hayward, J., Goldenberg, A., Emes, R.D., Munye, M.M., Dyer, L., Cahill, T., Bevilard, J., Gehrig, C., Guipponi, M., Chantot, S., Duquesnoy, P., Thomas, L., Jeanson, L., Copin, B., Tamalet, A., Thauvin-Robinet, C., Papon, J.-F., Garin, A., Pin, I., Vera, G., Aurora, P., Fassad, M.R., Jenkins, L., Boustred, C., Cullup, T., Dixon, M., Onoufriadis, A., Bush, A., Chung, E.M.K., Antonarakis, S.E., Loebinger, M.R., Wilson, R., Armengot, M., Escudier, E., Hogg, C., Amselem, S., Sun, Z., Bartoloni, L., Blouin, J.-L., Mitchison, H.M., 2017. X-linked primary ciliary dyskinesia due to mutations in the cytoplasmic axonemal dynein assembly factor PIH1D3. *Nature Communications* 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14279>
- Vanaken, G.J., Bassinet, L., Boon, M., Mani, R., Honoré, I., Papon, J.-F., Cuppens, H., Jaspers, M., Lorent, N., Coste, A., Escudier, E., Amselem, S., Maitre, B., Legendre, M., Christin-Maitre, S., 2017. Infertility in an adult cohort with primary ciliary dyskinesia: phenotype-gene association. *Eur Respir J* 50, 1700314. <https://doi.org/10.1183/13993003.00314-2017>
- Viswanadha, R., Hunter, E.L., Yamamoto, R., Wirschell, M., Alford, L.M., Dutcher, S.K., Sale, W.S., 2014. The ciliary inner dynein arm, I1 dynein, is assembled in the cytoplasm and transported by IFT before axonemal docking. *Cytoskeleton (Hoboken)* 71, 573–586. <https://doi.org/10.1002/cm.21192>
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Willard, H.F., Michelson, A.M., Riggs, A.D., Orkin, S.H., 1987. Clonal analysis using recombinant DNA probes from the X-chromosome. *Cancer Res* 47, 4806–4813.
- Wallmeier, J., Nielsen, K.G., Kuehni, C.E., Lucas, J.S., Leigh, M.W., Zariwala, M.A., Omran, H., 2020. Motile ciliopathies. *Nat Rev Dis Primers* 6, 77. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0209-6>
- Walton, T., Wu, H., Brown, A., 2021. Structure of a microtubule-bound axonemal dynein. *Nat Commun* 12, 477. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20735-7>
- Wang, J., Taschner, M., Petriman, N.A., Andersen, M.B., Basquin, J., Bhogaraju, S., Vetter, M., Wachter, S., Lorentzen, A., Lorentzen, E., 2020. Purification and crystal structure of human ODA16: Implications for ciliary import of outer dynein arms by the intraflagellar transport machinery. *Protein Science* 29, 1502–1510. <https://doi.org/10.1002/pro.3864>
- Wang, L., Li, X., Liu, G., Pan, J., 2022. FBB18 participates in preassembly of almost all axonemal dyneins independent of R2TP complex. *PLoS Genet* 18, e1010374. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010374>
- Whitfield, M., Thomas, L., Bequignon, E., Schmitt, A., Stouvenel, L., Montantin, G., Tissier, S., Duquesnoy, P., Copin, B., Chantot, S., Dastot, F., Faucon, C., Barbotin, A.L., Loyens, A., Siffroi,

- J.-P., Papon, J.-F., Escudier, E., Amselem, S., Mitchell, V., Touré, A., Legendre, M., 2019. Mutations in DNAH17, Encoding a Sperm-Specific Axonemal Outer Dynein Arm Heavy Chain, Cause Isolated Male Infertility Due to Asthenozoospermia. *The American Journal of Human Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.04.015>
- Wirschell, M., Olbrich, H., Werner, C., Tritschler, D., Bower, R., Sale, W.S., Loges, N.T., Pennekamp, P., Lindberg, S., Stenram, U., Carlén, B., Horak, E., Köhler, G., Nürnberg, P., Nürnberg, G., Porter, M.E., Omran, H., 2013. The nexin-dynein regulatory complex subunit DRC1 is essential for motile cilia function in algae and humans. *Nat Genet* 45, 262–268. <https://doi.org/10.1038/ng.2533>
- Yamaguchi, H., Oda, T., Kikkawa, M., Takeda, H., 2018. Systematic studies of all PIH proteins in zebrafish reveal their distinct roles in axonemal dynein assembly. *Elife* 7, e36979. <https://doi.org/10.7554/eLife.36979>
- Yamamoto, R., Hwang, J., Ishikawa, T., Kon, T., Sale, W.S., 2021. Composition and function of ciliary inner-dynein-arm subunits studied in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cytoskeleton (Hoboken)* 78, 77–96. <https://doi.org/10.1002/cm.21662>
- Zhao Y, Li J, Dai L, Ma Y, Bai Y, Guo H. X Chromosome Inactivation Pattern and Pregnancy Outcome of Female Carriers of Pathogenic Heterozygous X-Linked Deletions. *Front Genet*. 2021 Dec 17;12:782629. doi: 10.3389/fgene.2021.782629. PMID: 34976017; PMCID: PMC8719196.
- Zhu, X., Wang, J., Li, S., Lehtreck, K., Pan, J., 2021. IFT54 directly interacts with kinesin-II and IFT dynein to regulate anterograde intraflagellar transport. *The EMBO Journal* 40. <https://doi.org/10.15252/embj.2020105781>
- Zur Lage, P., Newton, F.G., Jarman, A.P., 2019. Survey of the Ciliary Motility Machinery of *Drosophila* Sperm and Ciliated Mechanosensory Neurons Reveals Unexpected Cell-Type Specific Variations: A Model for Motile Ciliopathies. *Front. Genet.* 10, 24. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00024>

Résumé français

Les bras de dynéine (BDs), moteurs du mouvement ciliaire et flagellaire, sont ancrés à intervalles réguliers le long de l'axonème des cils mobiles et des flagelles. Les dyskinésies ciliaires primitives (DCP) sont des maladies respiratoires rares, de transmission essentiellement autosomique récessive, liées à un défaut des cils mobiles, souvent associées à une infertilité masculine. Environ 25% des patients DCP présentent une absence des BDs externes et internes. Ces patients portent des mutations dans un des 13 gènes impliqués qui codent, pour la plupart, des constituants des complexes cytoplasmiques d'assemblage des BDs.

L'objectif de cette thèse était de préciser le rôle de deux co-chaperonnes appartenant au(x) complexe(s) d'assemblage cytoplasmique des BDs, codées par des gènes nouvellement (*TTC12*) ou récemment (*PIH1D3*) impliqués dans les DCP.

Nos travaux sur *TTC12* ont révélé pour la première fois l'existence de mécanismes d'assemblage des BDs différents entre les cils mobiles et les flagelles chez l'Homme, expliquant le phénotype particulier de ces patients : infertilité masculine prédominante et atteinte respiratoire modérée. Nos données démontrent également l'existence de mécanismes d'assemblage distincts entre les différents sous-types de BDs internes. Ces travaux nous ont conduits à développer un modèle de cellules épithéliales nasales humaines (CENH) différenciées *in vitro* en interface air-liquide avec invalidation de gène par CRISPR-Cas9. Cet outil ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude de la physiopathologie de maladies respiratoires.

Notre étude sur *PIH1D3*, responsable de la seule DCP non syndromique récessive liée à l'X, a montré que les femmes porteuses hétérozygotes d'un défaut de *PIH1D3* présentaient des symptômes respiratoires variables (absents à sévères) en relation avec le taux d'inactivation du chromosome X qui porte l'allèle muté. Ce taux d'inactivation a été déterminé par l'évaluation de la méthylation des dimères CG selon deux approches : digestion enzymatique au locus *HUMARA* et conversion au bisulfite au locus *PIH1D3*. Ces résultats incitent donc à rechercher une mutation hétérozygote de *PIH1D3*, en vue d'un conseil génétique, chez (i) des femmes apparentées aux patients masculins avec DCP liée à *PIH1D3*, et (ii) des femmes avec infections respiratoires chroniques sans étiologie identifiée. Dans les deux cas, le diagnostic de DCP est difficile à porter chez ces femmes : absence de l'infertilité masculine, du situs inversus, signes respiratoires modérés, NO nasal normal. Ce travail indique que dans la perspective d'une thérapie génique ou ARN, une compensation d'environ 30% du niveau de l'expression de *PIH1D3* pourrait améliorer significativement le phénotype respiratoire des patients.

Mots clés : dyskinésie ciliaire primitive, axonème, cil, bras de dynéine, assemblage, inactivation de l'X