N°d'ordre NNT : 2017LYSE1108

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Biologie

Soutenue publiquement le 29/06/2017, par :

Jean-André Lapart

Identification et caractérisation de nouvelles protéines de la zone de transition des cils et des flagelles

---

Devant le jury composé de :

Mme Christine Vesque	Chargé de recherche	INSERM	Rapporteur
Mr Maximilian Fürthauer	Chargé de recherche	INSERM	Rapporteur
Mr Alexandre Benmerah	Directeur de recherche	INSERM	Examinateur
Mr Samir Merabet	Directeur de recherche	CNRS	Examinateur
Mme Joëlle Thomas	Maître de conférences	UCBL	Directrice de thèse
Mme Bénédicte Durand	Professeur	UCBL	Co-directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
	Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Ainsi s'achèvent mes trois années de thèse via l'écriture de ce manuscrit. J'aimerais naturellement, avant de rentrer dans le vif du sujet, adresser quelques remerciements aux personnes qui m'ont accompagnées au cours de mon doctorat.

Je remercie tout d'abord les membres de mon jury de thèse, Madame Christine Vesque, Monsieur Alexandre Benmerah, Maximilian Furthauer et Samir Merabet, pour le temps accordé à l'étude et l'évaluation de mes travaux de thèse.

Je remercie mes directrices de thèse, Joëlle Thomas et Bénédicte Durand. Merci à Bénédicte de m'avoir accordé sa confiance afin de réaliser ma thèse dans son équipe et d'avoir supervisé mes travaux durant ces trois années. Merci à Joëlle pour l'encadrement de mes travaux de recherche, pour sa bonne humeur et son enthousiasme qu'elle m'a transmit. Nos séances de grattage de cellules de 3 heures sous la hotte resteront longtemps dans ma mémoire.

Par la suite, mes remerciements sont adressés aux différents membres de l'équipe. Je remercie grandement Céline Augière pour tous les bons moments et délires que l'on a partagés, autant en pièce à mouche que durant nos mémorables soirées jeux. Le fameux ''Small world'' à minuit, ou le ''Zombie'' jusqu'à 2 heures du matin. Nos ''before lab'' autour d'une balle de tennis furent également agréables et défoulants ! Tu devras t'améliorer au nouveau Mario kart au lieu de pester sur la carapace en fin de course. Merci pour tous ces moments passés qui ont égaillé ces trois années et pour ceux à venir ! En effet, ''la petite'', Amélie B., qui va débuter sa thèse, nous a déjà agrémenté de bonnes rigolades et un bon trio s'est formé.

Je remercie bien sur les autres membres de l'équipe, Elizabeth, pour sa bonne humeur permanente, sa disponibilité rendue possible par son don d'ubiquité et toute l'aide qu'elle a pu m'apporter durant ma thèse. Je remercie Marie, notre Athéna, qui n'hésite pas à partir au front avec son sceptre… euh sa pipette… Merci pour ta bonne humeur (quoique) et pour tout ce que tu m'as apporté. Merci à Jean-Luc, ''The electronic man'', notre expert en microscopie électronique, le second garçon de l'équipe, qui m'a permis de me sentir moins seul, isolé dans cet environnement féminin. Merci pour ta bonne humeur permanente, et pour ton aide souvent précieuse.. Enfin, merci à Dominique, notre petite souris du laboratoire qui évite (jusqu'à maintenant), d'ouvrir la porte de la moucherie quotidiennement. Je regrette de n'avoir appris à te découvrir que sur le tard.

Je remercie également les anciens membres de l'équipe et tout particulièrement Charline, qui a décidé d'aller s'exiler au pays du chocolat, des vaches et des hommes à barbe. Nos discussions sans sens, nos soirées geek et mes spoils des séries que tu regardes ont été de magnifiques moments. Tu as été importante dans la réussite de ces trois années et espère qu'un jour on réitèrera nos soirées d'une façon ou d'une autre. Merci à Ikuko et Shuhei pour m'avoir donné encore plus envie d'aller visiter le pays du soleil levant. Je tiens à souligner leur extrême gentillesse. Merci enfin à Matthieu, qui a décidé de retourner dans le brouillard franco-allemand strasbourgeois. Ce fut un réel plaisir de te rencontrer, de partager cinéma et de chanter ''The Lumberjack !!'' avec toi. Et oui, j'ai réussi à citer les Monty Python dans un mansucrit de thèse !

Je n'oublie pas mon Jéjé, associé à son acolyte Elisabeth pour leur très bonne humeur et la détente qu'ils nous procurent. Nos débriefing du Lundi sur les matchs de foot du week-end ont été un régal. Dommage que tu supportes un club qui ne gagnera jamais la Champion's League.

Je remercie également tous les autres membres de l'institut et ceux que je n'ai pas cités (la liste est longue). Merci pour l'aide que vous m'avez apporté d'une façon ou d'une autre. Un merci spécial pour Carole et Pascale. Merci de m'avoir transmis ton amour de la pipette et ton dynamisme, pour ton amitié et ton soutien.

Pour terminer, je souhaiterais remercier dans un premier temps mes amis du Sud: Jerem, Tom, Nico et Guillaume. Merci à Aurélien que j'ai découvert sur le tard durant mon doctorat et avec qui nous avons partagé de grands moments épiques de tennis (proches du niveau de Federer, si si) et de grands jeux de mots, tous les plus nazes mais recherchés les uns que les autres. La suite s'annonce tout aussi bien.

Dans un second temps, je remercie très chaleureusement ma famille, qui m'a soutenue et aidée depuis tant d'années et qui continue de le faire au quotidien. Merci à mes parents, ma petite Mamet, ma sœur qui vient de mettre un monde un petit saucisson. Une pensée toute particulière à mon grand père, Papet. Enfin, merci à toi Amélie A., de partager ma vie au quotidien, de ton soutien indéfectible et de tout ce que tu m'apportes. Nos regards se tournent maintenant vers le petit bonhomme, Erwan, qui vient de pointer son petit museau et ses petites oreilles et qui nous permet de faire des journées sans sommeil.

Liste des abbréviations ---- 1
Résumé ---- 3
Summary ---- 4

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION ---- 6

A - Le cil, une antenne à la surface de la cellule ---- 6
I- Présentation générale du cil ---- 6
II- Fonctions du cil ---- 6
III- Ciliopathies ---- 9
IV-Constituants et structure des cils et des flagelles. ---- 10
IV-1) Centrioles et pieds basaux ---- 10
IV-2) La zone de transition ---- 16
IV-3) L'axonème ---- 16
IV-4) La membrane ciliaire et la poche ciliaire ---- 18

B - La ciliogenèse, suite d'évènements conduisant à la formation des cils ----19
I-Conversion du centriole père en corps basal ---- 20
I-1) Formation des appendices subdistaux/pieds basaux ---- 21
I-2) Formation des appendices distaux/fibres de transition ---- 23
I-3) La racine ciliaire ---- 25
I-4) Association du corps basal avec la vésicule ciliaire ---- 25
I-5) Suppression d'OFD1 par processus autophagique ---- 29
II- Formation et organisation de la zone de transition ---- 29
II-1) Structure de la zone de transition ---- 30
II-2) Constituants de la zone de transition ---- 31
II-3) Conservation des protéines de la zone de transition ---- 37
II-4) Fonctions relatives des protéines de la zone de transition ---- 39
III-La barrière de diffusion des cils ---- 41
III-1) Le rôle des fibres de transition dans la barrière de diffusion ---- 42
III-2) Le rôle de la zone de transition dans la barrière de diffusion ---- 43
III-3) Le rôle de l'anneau de septines dans la barrière de diffusion ---- 44
IV-Extension de l'axonème et de la membrane ciliaire ---- 44
IV-1) Le transport intraflagellaire ---- 45
IV-2) Le BBSome ---- 48
IV-3) Acheminement des protéines vers le cil ---- 49
V-Maintien de la stabilité des cils et flagelles – Les modifications post-traductionnelles des tubulines ---- 52
V-1) Acétylation des tubulines ---- 53
V-2) Détyrosination des tubulines ---- 54
V-3) Glutamylation des tubulines ---- 54
V-4) Glycylation des tubulines ---- 55
VI-La ciliogenèse cytosolique ---- 56
VI-1) Assemblage du flagelle de spermatozoïde humain ---- 56
VI-2) Assemblage du flagelle de Giardia intestinalis ---- 58
VI-3) Assemblage du flagelle de spermatozoïde chez la drosophile ---- 59
VI-4) Assemblage du flagelle de spermatozoïde chez Plasmodium ---- 59

C - La drosophile, un modèle efficace pour étudier l'assemblage des cils et flagelles----60
I-Les cils des neurones sensoriels ---- 61

1-1) Les organes sensoriels externes ---- *62*
I-2) Les organes chordotonaux ---- *65*
I-3) Assemblage des cils des neurones sensoriels ---- *68*
II-Le flagelle de spermatozoïde ---- 69
II-1) La spermatogenèse ---- *69*
II-2) Structure et assemblage du flagelle au cours de la spermatogenèse. ---- *74*
II-3) Processus impliqués dans l'élongation des spermatides ---- *79*

D - Objectifs de la thèse ---- 81

Chapitre II : RESULTATS ---- 82

A - Partie I : crible protéomique : Article ---- 82
Résumé : ---- 82

B - Partie II : Analyse du crible double hybride ---- 126
I-Analyse du gène *CG32655* ---- 128
II-Analyse du gène *CG33140* ---- 128
III-Analyse du gène *CG13164/salto* ---- 131
IV-Analyse du gène *CG3213* ---- 131
V-Analyse du gène *CG5987* ---- 132
VI-Analyse du gène *CG12184* ---- 132
VII-Bilan des informations obtenues par le crible double hybride ---- 136

CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES ---- 138

CONCLUSION ---- 145

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ---- 146

CHAPITRE 4 : ANNEXE ---- 164

Liste des abbréviations

LECA : Dernier ancêtre commun eucaryote
ADN : Acide désoxyribonucléique
GDP : Guanosine diphosphate
GTP : Guanosine triphosphate
hTERT-RPE1 : Cellules épithéliales pigmentaires de la rétine immortalisées par hTERT
IFT : Transport intraflagellaire
PTM : Modification post-traductionnelle
TTL : Tubuline Tyrosine Ligase
TTLL : Tubuline Tyrosine Ligase Like
SHH/Hh : Sonic HedgeHog
SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor
PCV : Vésicule cilaire primaire
DAV : Vésicule des appendices distaux
APEX : Engineered ascorbate peroxidase
BioID : Marquage de proximité par la biotine
BAR : Bin/amphiphysin/Rvs
TGN : Réseau trans du Golgi
CTS : Séquence de ciblage au cil
RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
NLS : Signal de localisation nucléaire
CLEM : Correlated light and electron microscopy
ODA : Bras de dynéine externe
IDA : Bras de dynéine interne
MYCBP : Myc Binding Protein
PCM : Matrice péricentriolaire
MKS : Syndrome de Meckel
JBTS : Syndrome de Joubert
NPHP : Néphronopthise
BBS : Syndrome de Bardet Biedl
CEP : Protéine centriolaire
SNC : Système nerveux central
OFD : Oro-facial-digital
TMEM : Transmembranaire
IMCD3 : Cellules du canal collecteur médullaire interne des reins
MEF : Fibroblaste embryonnaire de souris
BBS : syndrome de Bardet Biedl
CH : Organe chordotonaux
ES : Organe externe sensoriel

Identification et caractérisation de nouvelles protéines de la zone de transition des cils et des flagelles

Résumé

Les cils et les flagelles sont des organites conservés chez les eucaryotes où ils jouent des rôles essentiels et variés comme la motilité et la signalisation cellulaire. La zone de transition est une structure complexe, localisée à la base des cils, indispensable à leur assemblage et pour la sélection des constituants ciliaires. Chez l'Homme, de nombreuses pathologies appelées ciliopathies sont associées à des défauts d'assemblage ou de fonctionnement des cils. Les plus sévères sont liées à des défauts de protéines de la zone de transition. Cette dernière est composée principalement de trois complexes protéiques nommés MKS, NPHP et CEP290 interagissant étroitement entre eux. D'autres protéines, dont CBY conservée des mammifères à la drosophile, s'ajoutent à ces modules mais leur interconnections ne sont pas connues.

Deux modes d'assemblage ciliaire ont été décrits : la ciliogenèse compartimentée et cytosolique. La fonction de la zone de transition au cours de la ciliogenèse compartimentée a fait l'objet de nombreuses études mais son rôle dans la ciliogenèse cytosolique reste peu connu. Au cours de ma thèse, j'ai analysé la fonction de nouvelles protéines de la zone de transition en utilisant le modèle de la drosophile qui présente les 2 types de ciliogenèse.

J'ai réalisé un crible protéomique en cellules murine IMCD3 et caractérisé le module protéique CBY, composé de CBY1, FAM92A et DZIP1L. Ce module est conservé chez la drosophile à la zone de transition. Il est nécessaire à la ciliogenèse, notamment pour l'assemblage de la zone de transition et pour l'ancrage du corps basal à la membrane plasmique. L'absence de ces protéines entraine des défauts ciliaires importants dans l'assemblage des flagelles de spermatozoïde et des cils des neurones sensoriels chez la drosophile.

En conclusion, ce travail apporte de nouvelles connaissances sur l'assemblage de la zone de transition et sur le rôle de CBY dans les mécanismes qui contrôlent la ciliogenèse.

Identification and characterization of novel ciliary transition zone proteins

Summary

Cilia and flagella are highly conserved organelles among eukaryotes species. They are composed of a microtubular cytoskeleton and play essential functions during development and in numerous physiological processes. As a result, in humans, cilia dysfunction leads to a wide range of pathologies, called ciliopathies.
At the ciliary base, the transition zone, a complex structure, is required for proper cilia assembly and regulates the traffic of ciliary components in and out cilia. Defects in transition zone proteins lead to severe ciliopathies. The transition zone is composed of 3 protein complexes, MKS, NPHP and CEP290 that closely interact. Additional proteins, like CBY, conserved between mammals and *Drosophila*, have been described at the transition zone but their precise role and relationships with the other transition zone complexes are unknown.

Two modes of cilia assembly have been described : compartmentalized and cytosolic ciliogenesis. Whereas the function of the transition zone in compartmentalized ciliogenesis is well documented, its role in cytosolic ciliogenesis remains poorly characterized. During my PhD, I characterized new transition zone proteins conserved in mammals and *Drosophila* and analyzed their function during cilia assembly in *Drosophila*.

First, I performed a proteomic screen in murine IMCD3 cells and characterized the CBY module composed of CBY1, FAM92A1 and DZIP1L. This complex is conserved in *Drosophila* and locates at the transition zone. Moreover, I showed that this module is necessary for transition zone assembly and centriolar docking to the plasma membrane and hence required for cilia and flagella assembly. In absence of these proteins, *Drosophila* show severe ciliogenesis defects both in sperm cells and in sensory neurons.

In conclusion, this work brings new insights into the understanding of transition zone assembly and of the mechanisms that control ciliogenesis.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

A - Le cil, une antenne à la surface de la cellule

I- Présentation générale du cil

Les cils et les flagelles sont des organelles présentes à la surface des cellules. Leurs structures, formées autour d'un assemblage de microtubules, sont hautement conservées parmi les espèces eucaryotes. Un tel degré de conservation entre les espèces unicellulaires et multicellulaires souligne l'importance des cils et flagelles apportés à ces organismes. Ils furent initialement identifiés en 1675 par Antoni van Leeuwenhoek, naturaliste, qui observa pour la première fois le mouvement de protozoaires ciliés dans l'eau de pluie. Peu de temps après, il observa également le mouvement de spermatozoïdes flagellés humains. Les cils sont généralement plus petits que les flagelles : entre 1-10 μm de long contre 12 μm pour le flagelle de *Chlamydomonas reinhardtii et* 5 cm pour le flagelle de *Drosophila bifurca.* On ne trouve en général qu'un ou 2 flagelles par cellules. Les cils peuvent être présents en un seul exemplaire. Ils sont généralement immobiles et on parle alors de cils primaires. Leur principale fonction est la transduction de signaux. Ils peuvent également être présents par centaines dans le cas de cellules multiciliées. Ils sont alors généralement motiles et impliqués dans la motilité cellulaire et le mouvement de fluide. Enfin, le type de battement des cils et flagelles est également différent. En effet, tandis que les flagelles émettent des vagues d'ondulation, similaire au mouvement d'un fouet, les cils nodaux motiles par exemples, ont un mouvement plutôt rotationnel, permettant l'établissement de l'asymétrie gauche-droite. Néanmoins, d'autres mouvements sont observés en fonction du type cellulaire comme les cils des voies aériennes qui battent dans un seul plan et permettent l'évacuation du mucus.

La phylogénie des eucaryotes révèle chez le dernier ancêtre commun (LECA : Last Eukaryotic Common Ancestor), la présence d'un cil motile probablement très proche de celui des eucaryotes actuels mais possédant également des fonctions sensorielles. Les cils et les flagelles auraient ensuite été perdus chez certaines espèces de plantes, incluant les angiospermes, et de champignons comme les levures ou microsporidies (Azimzadeh and Marshall, 2010; Jékely and Arendt, 2006; Carvalho-Santos et al., 2011). L'architecture ainsi que la composition des cils et des flagelles étant relativement similaire, j'utiliserai ces deux termes de façon interchangeable dans ce manuscrit.

II- Fonctions du cil

Les cils exercent des fonctions essentielles chez un grand nombre d'organismes et font aujourd'hui l'objet de nombreuses études qui ont permis de montrer leur rôle majeur dans le développement des vertébrés et l'homéostasie tissulaire (Singla and Reiter, 2006).

Chez les organismes unicellulaires comme l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, les deux flagelles sont requis à la fois pour son déplacement et dans la

reconnaissance et l'adhésion des gamètes de types sexuels complémentaires au cours de la formation du zygote **(Figure 1A).** Chez d'autres unicellulaires, comme le trypanosome ou la paramécie, les cils sont mobiles et permettent le déplacement et l'alimentation **(Figure 1B, C).**

Chez les vertébrés et les mammifères, les cils sont présents à la surface de pratiquement toutes les cellules et sont indispensables au développement ainsi qu'à la régulation de divers processus physiologiques. Par exemple, chez le poisson zèbre, les cils de la placode nasale et de la crête de l'oreille interne sont respectivement impliqués dans l'olfaction et l'audition **(Figure 1D, E).** Il existe chez les mammifères une très grande diversité de cils. Par exemple, les cellules épendymaires sont des cellules multiciliées et leur battement permet la circulation du liquide cérébrospinal. Les multicils de l'épithélium respiratoire sont nécessaires à l'évacuation du mucus produit par les bronches dans les voies aériennes **(Figure 1F)**. Par ailleurs, pratiquement toutes les cellules assemblent au cours de leur développement, un cil primaire ayant un rôle de senseur et impliqué dans la transduction de voies de signalisation. C'est notamment le cas des cils primaires localisés au niveau des reins. D'autres cellules assemblent des cils modifiés, comme c'est le cas du cil connecteur des photorécepteurs de la rétine **(Figure 1G)**. Le cil connecteur est essentiel à la compartimentation du photorécepteur puisqu'il permet de séparer le segment externe, qui contient les différentes opsines indispensables à la perception des photons, du segment interne. Enfin, les spermatozoïdes possèdent un flagelle mobile qui leur permet de se propulser **(Figure 1H)**.

Cette liste non exhaustive d'exemples de cellules ciliées ne représente qu'une petite partie des fonctions assurées par les cils parmi toutes les espèces eucaryotes ciliées. Je ne traiterai pas de leurs autres rôles dans ce manuscrit.

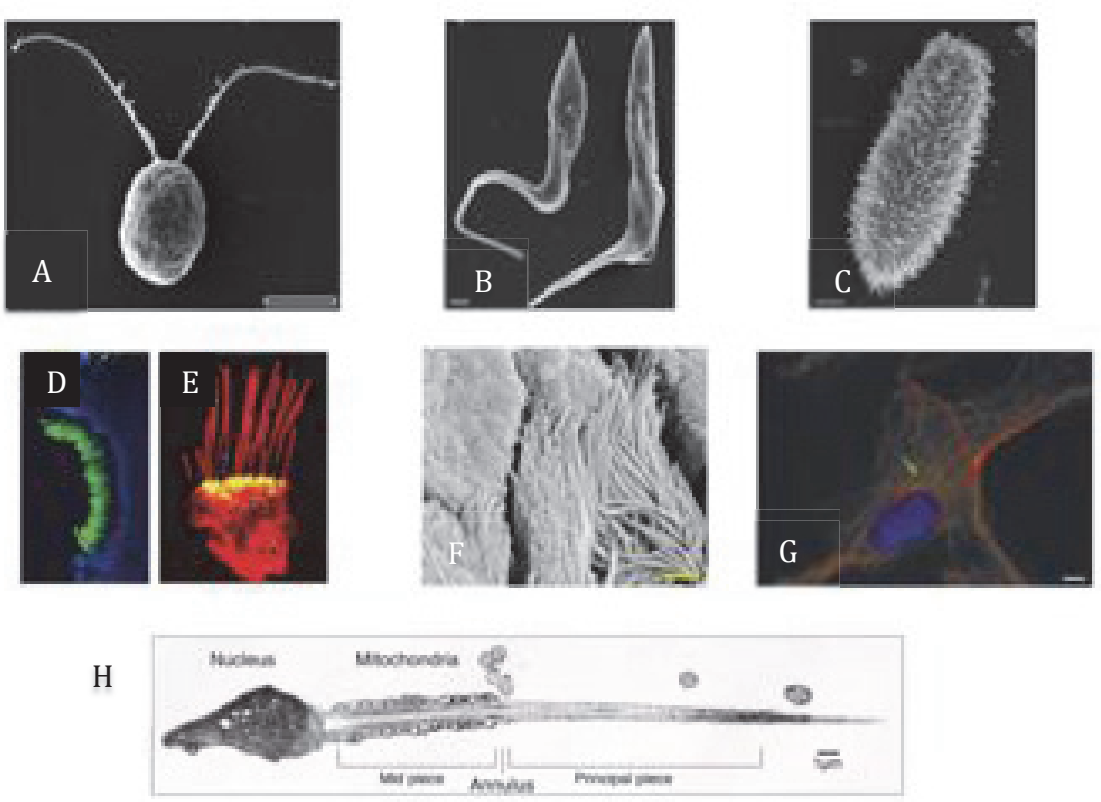


Figure 1 : *Exemples d'organismes ciliés et de la diversité des cils.*
A. *L'algue verte biflagellée Chlamydomonas reinhardtii (image extraite de Morga and Bastin, 2013).*
B. *Trypanosoma thermophila, un protozoaire monoflagellé (image extraite de Vincensini et al., 2012).*
C. *Paramecium tetraurelia, un protozoaire multicilié (image extraite de Vincensini, 2012).*
D. *Immunofluorescence de cils présents à la placode nasale impliqué dans l'olfaction chez le poisson zèbre (image extraite de Malicki and Johnson, 2016).*
E. *Immunofluorescence de cils présents à la crête de l'oreille interne impliqué dans l'audition chez le poisson zèbre (image extraite de Malicki and Johnson, 2016).*
F. *Microscopie électronique à balayage de cils motiles présents dans les voies aériennes de bronches de souris permettant l'évacuation du mucus (image extraite de Siller et al., 2015).*
G. *Immunofluorescence d'un cil primaire en surface de cellule épithéliale pigmentée de la rétine (RPE1). En vert : cil (tubuline acétylée), en rouge : filaments d'actine (image extraite de Pazour et al., 2003).*
H. *Microscopie électronique à transmission d'un spermatozoïde humain (image extraite de Barratt et al., 2009).*

III- Ciliopathies

Le rôle essentiel des cils et des flagelles a été révélé chez l'Homme par la manifestation de désordres liés à des défauts d'assemblages ou de fonctions de cils. Ces pathologies ont été regroupées sous le terme ciliopathie. La création de mutants de différents modèles, qu'ils soient unicellulaires comme *Chlamydomonas* ou *Trypanosoma,* ou multicellulaires comme la souris, la drosophile ou *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), ont contribué à la compréhension des défauts moléculaires observés dans ces ciliopathies (Baker and Beales, 2009).

Les cils étant localisés à la surface de pratiquement toutes les cellules et donc présents dans tous les organes, la nature des symptômes associés à ces ciliopathies sont très variables **(Figure 2).** Ces pathologies peuvent se manifester sous la forme de kystes rénaux, de polydactylie, de dégénérescence de la rétine, ou encore sous la forme de retards mentaux liés à des défauts de développement du système nerveux central (SNC) (Hildebrandt et al., 2011).

Par ailleurs, on trouve également des ciliopathies associées à des défauts de motilité de cils et flagelles se manifestant entre autres par des problèmes respiratoires, c'est le cas des dyskinésies ciliaires primitives (Horani et al., 2016). Les patients peuvent également être atteints d'inversion gauche droite des organes (*Situs inversus*). Enfin, des défauts fonctionnels des spermatozoïdes peuvent conduire à une stérilité chez l'Homme.

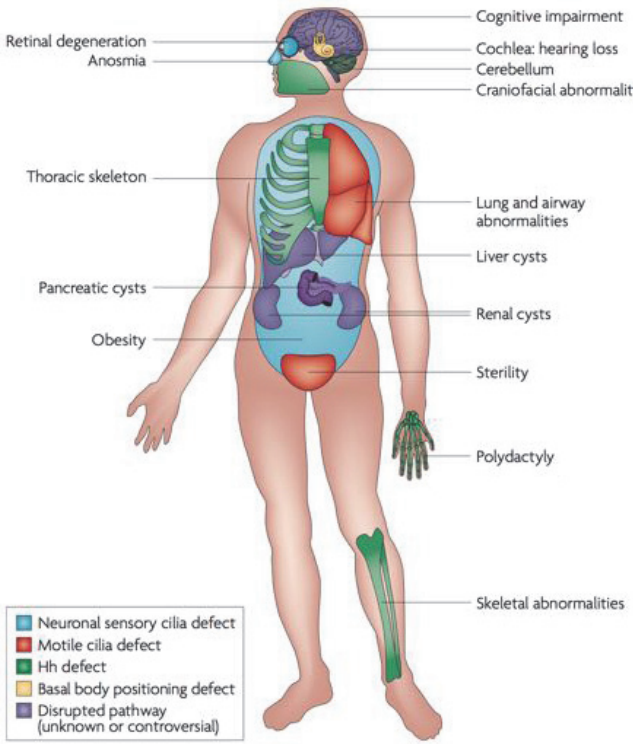


Figure 2 : *Schéma représentant la diversité des organes atteints par un dysfonctionnement du cil primaire ou motile conduisant à une ciliopathie.*
Les ciliopathies les plus sévères conduisent à la dérégulation de la voie HedgeHog (Hh) au niveau des cils primaires. Elles peuvent provoquer des symptômes divers comme une polydactylie (Bardet-Biedl et Meckel), une anomalie squelettique des membres (Ellis-van Creveld) ou encore à un défaut de structure cranio faciales (encéphalocèle) observé dans le syndrome de Meckel. D'autres ciliopathies conduisent à une hydrocéphalie ou à la formation de kystes rénaux, hépatique ou encore pancréatique. Image extraite de Goetz and Anderson, 2010.

Les ciliopathies sont caractérisées par une très grande diversité génétique. On dénombre des dizaines de gènes dont leurs mutations peuvent aboutir à des syndromes ciliaires. Pour chaque ciliopathies de nombreux gènes différents ont été impliqués. De plus, deux mutations distinctes dans un même gène peuvent aboutir à des ciliopathies différentes. Ainsi, le gène *MKS1* est retrouvé muté chez des patients présentant, soit le syndrome de Joubert, soit le syndrome de Meckel.

IV-Constituants et structure des cils et des flagelles.

Malgré la présence d'une grande diversité de propriétés, de taille, ou du nombre de cils, ceux-ci partagent tous une structure similaire. En effet, les cils et les flagelles sont tous composés de trois grands compartiments : le corps basal, qui est un dérivé du centriole père et sert de centre nucléateur de l'axonème, la zone de transition, qui va avoir notamment un rôle de barrière sélective, contrôlant le contenu protéique ciliaire, et enfin l'axonème, qui est une structure microtubulaire composée habituellement de neuf doublets de microtubules. La zone de transition et l'axonème sont entourés d'une membrane ciliaire continue avec la membrane plasmique, mais dont la composition diffère. Enfin, les cils sont très souvent partiellement internalisés, et l'on observe dans ces cas une poche ciliaire formée par une invagination membranaire à proximité du corps basal **(Figure 3)**.

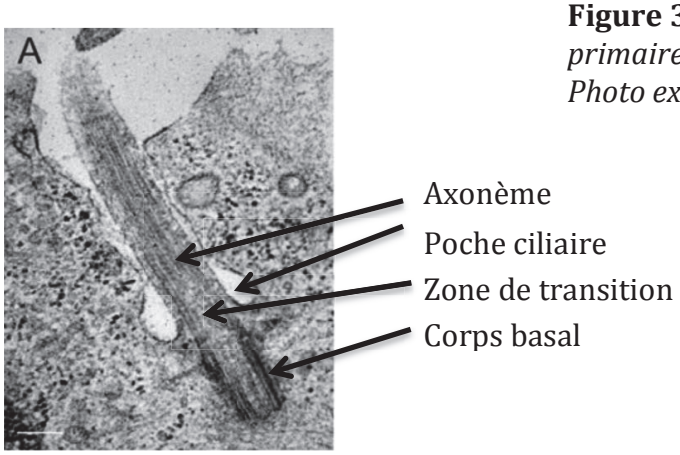


Figure 3 : *Microscopie électronique du cil primaire dans les cellules hTERT- RPE1. Photo extraite de Vincensini et al., 2012.*

IV-1) Centrioles et pieds basaux

a) Description générale

La formation du cil est réalisée à partir du centriole. Ce dernier, entouré du matériel péricentriolaire sont les composants principaux du centrosome : le centre organisateur des microtubules de la cellule **(Figure 4A)**. En interphase ou dans les cellules post-mitotiques, le centrosome permet la mise en place du cytosquelette microtubulaire et joue un rôle dans la polarité, la motilité et la forme de la cellule.

Le centriole est une structure cylindrique d'une longueur d'environ 500 nm de long et 250 nm de diamètre (Winey and O'Toole, 2014). Il est constitué de neuf triplets de microtubules appelés microtubules A, B et C, eux-mêmes constitués de 13 proto-filaments de dimères de tubuline α et β assemblés en continus. Au sein d'un triplet, les microtubules A, B et C sont enchâssés les uns aux autres étant donné que le microtubule B possède en commun des protofilaments du microtubule A mais aussi du microtubule C. De plus, le microtubule A d'un triplet est connecté au microtubule C du triplet suivant, formant le lien A – C **(Figure 4B, C)**.

Cette architecture centriolaire basée sur neuf triplets de microtubules est fortement conservée mais il existe quelques exceptions. En effet, c'est le cas chez *Drosophila melanogaster* où les centrioles des cellules somatiques sont composés de neuf doublets de microtubules, ou encore chez *C. elegans* dont les centrioles sont caractérisés par neuf singlets de microtubules (Callaini, 1997; Wolf et al., 1978). Par ailleurs, cette architecture, basée sur une symétrie d'ordre neuf n'est pas universelle. Par exemple, les centrioles des spermatogonies de l'hexapode *Acerentomonon microrhinus* présentent une symétrie d'ordre quatorze (Riparbelli et al., 2009).

Le corps basal est un dérivé du centriole père. Il est localisé à la base du cil et sert de plateforme pour la nucléation des microtubules de l'axonème. La conversion du centriole père en corps basal a lieu durant la phase G0 ou G1 du cycle cellulaire. Les appendices distaux et subdistaux présents au niveau du centriole père vont permettre au corps basal de migrer à la membrane plasmique, de s'y ancrer et de débuter la formation du cil. Au cours de ce processus, les appendices distaux et subdistaux vont ainsi se convertir respectivement en fibres de transition et en pied basal que l'on retrouvera à la base du cil. Les mécanismes impliqués dans cette conversion sont très étudiés, et des travaux ont permis d'identifier certains acteurs de ce mécanisme et seront discutés dans les paragraphes suivants.

Il est intéressant de noter qu'au cours de l'évolution, la présence du centriole/corps basal est étroitement corrélée à l'apparition des cils, suggérant une pression sélective associée à la fonction du corps basal. Ainsi, le centrosome aurait acquis de nouvelles fonctions, notamment dans la division cellulaire.

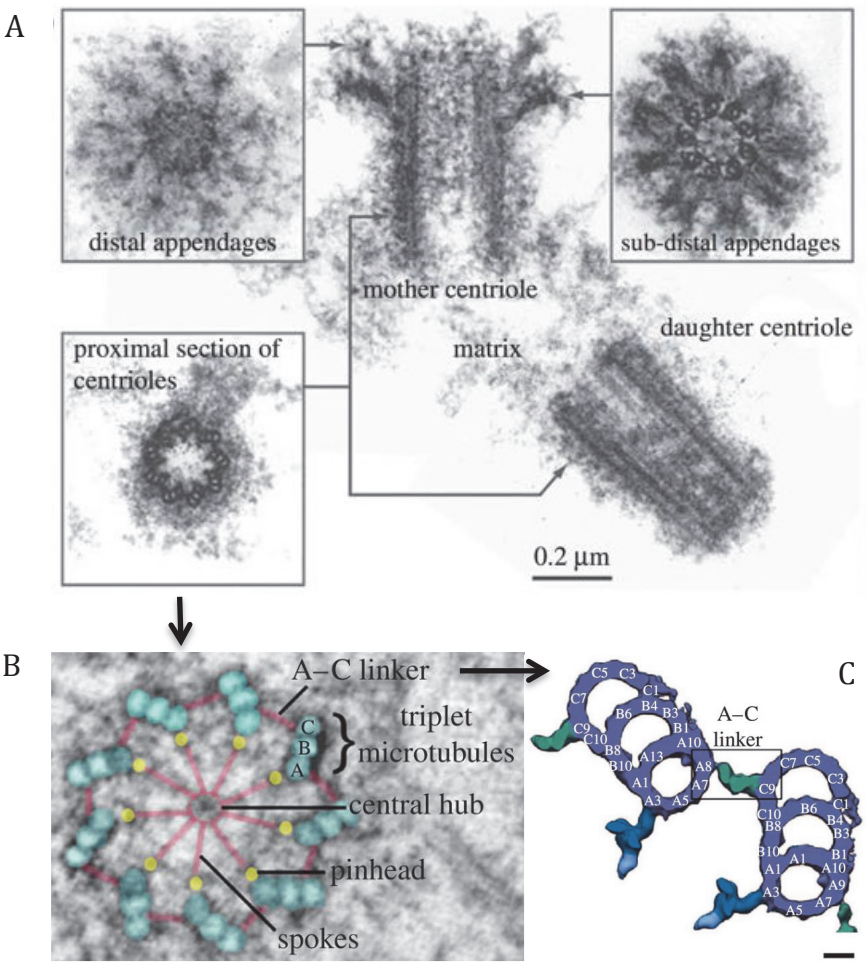


Figure 4 : *Structure générale d'un centrosome.*
***A**. Centrosome humain provenant de lymphoblastes humains (microscopie électronique à transmission). Il contient une paire de centrioles asymétriques d'un point de vue structurel et fonctionnel. La partie proximale des centrioles est constituée de 9 triplets de microtubules appelés A, B et C, enchâssés les uns aux autres, alors que la partie distale ne comporte plus que 9 doublets de microtubules. Le centriole père se distingue par la présence des appendices distaux et subdistaux, absents chez le centriole fils. **B**. Schéma général du «cartwheel» de la partie proximale du centriole où l'on peut voir que des rayons connectent l'anneau central au microtubule A de chaque triplets. Au niveau des microtubules, le rayon se termine selon une forme de tête d'épingle. **C.** Les triplets de microtubules sont reliés les uns aux autres par le lien A-C qui relie le microtubule A d'un triplet au microtubule C du triplet adjacent. Images extraites de Winey and O'Toole, 2012.*

b) Réplication des centrioles

La ciliogenèse et l'avancement dans le cycle cellulaire sont des évènements étroitement liés. En effet, le cil primaire ne se forme que dans les cellules post-mitotiques en phase G0/G1. Ce cil est une structure temporaire puisqu'il est ensuite désassemblé au moment de l'entrée des cellules en mitose. Le corps basal est alors libéré et se détache de la membrane cellulaire afin d'organiser le fuseau mitotique.

Le centriole fils, immature, est associé physiquement au centriole père depuis la mitose précédente. Lors de la transition G1/S et donc de la réplication de l'ADN, les centrioles père et fils vont tous les deux se dupliquer pour former chacun un nouveau centriole fils appelé procentriole **(Figure 5)**. Juste avant la mitose, les deux paires de centrioles nouvellement formées constituent chacune un centrosome qui vont se positionner de part et d'autre du fuseau mitotique organisant le fuseau dit polaire. A l'issue de la mitose, les deux paires de centrioles, séparées par le fuseau mitotique, sont réparties entre les deux cellules filles constituant alors le centrosome de chaque cellule. Le cycle cellulaire se poursuit et un cil pourra être nucléé à partir du centriole père lors de l'entrée des cellules filles en phase G0/G1.

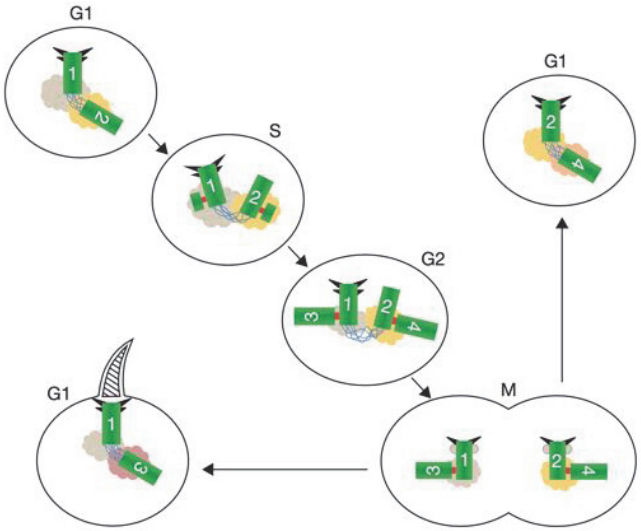


Figure 5 : *Schéma illustrant le processus de réplication des centrioles.*
La réplication des centrioles débute en phase S du cycle cellulaire où des nouveaux procentrioles (3 et 4) sont nucléés perpendiculairement à partir des deux centrioles parentaux préexistant (1 et 2). Ces procentrioles croissent jusqu'à leur taille définitive en phase G2 et sont reliés à leur centriole père (1 et 2). Le centriole 2, devenant le centriole père de la paire nouvellement formée, acquiert des appendices de maturation centriolaire durant la transition G2/M et les 2 paires de centrosomes nouvellement formées ségrègent durant la mitose, une cellule fille récupérant la paire 1-3 et l'autre la paire 2-4. Bien que les centrioles 1 et 2 possèdent tous les deux des protéines des appendices et sont donc équivalents d'un point de vue morphologique, le centriole le plus ancien, le centriole 1, est capable de former un cil primaire en phase G1 plus précocement que le centriole 2. Image extraite de Nigg and Stearns, 2011.

Le centriole fils ou procentriole, au cours de la phase S, se forme au niveau de la région proximale du centriole père et croît orthogonalement à celui-ci. Un noyau de protéines cœur va permettre la formation du « cartwheel », structure qui sert d'échafaudage pour la polymérisation des microtubules centriolaires **(Figure 6)**. Ce noyau de protéines a été mis en évidence en premier chez *Caenorhabditis elegans* et est composé de 4 protéines.

La protéine CEP192, orthologue mammifère de SPD-2 (spindle defective 2), chez *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster*, va permettre le recrutement de la protéine kinase PLK4/ZYG-1 au centriole. A son tour, PLK4 va permettre le recrutement de SAS-6 et SAS-5/Ana2/STIL au niveau du procentriole. SAS-6 est la protéine retrouvée la plus à l'intérieur du « cartwheel » et donc du centriole (Sonnen et al., 2012; Dzhindzhev et al., 2014). Des études sur la perte de fonction de SAS-6 chez *Chlamydomonas* et la drosophile dans lesquelles des anomalies de structure du « cartwheel » ont été observées, ont montré son importance dans l'établissement de la symétrie d'ordre neuf (Nakazawa et al., 2007 ; Rodrigues-Martins et al., 2007). La symétrie d'ordre neuf peut être expliquée par un noyau central en forme d'anneau, provenant d'homodimères de SAS-6 interagissant via leur extrémité N-terminale, et de dimères provenant de l'interaction de leur région C-terminale pointant comme neuf rayons vers l'extérieur **(Figure 4B -** spokes**)** (Kitagawa et al., 2011).

L'assemblage du « cartwheel » nécessite l'implication d'autres protéines pour le recrutement des 4 protéines cœur, comme la protéine CEP152/Asterless (Asl) et CEP135/BLD10. En effet, CEP152 coopère avec CEP192 pour permettre le recrutement de PLK4 au centriole. (Sonnen et al., 2013). La protéine CEP135/BLD10 est localisée à l'extrémité des rayons du « cartwheel » au niveau d'une structure en tête d'épingle **(Figure 4B -** Pinhead**)**. Les premières études chez *Chlamydomonas* et la paramécie ont montré que l'orthologue de *CEP135*, *BLD10*, est impliqué pour la formation du « cartwheel » (Hiraki et al., 2007; Jerka-Dziadosz et al., 2010). Chez la drosophile, son absence ne conduit qu'à un raccourcissement des centrioles qui restent tout de même fonctionnels (Mottier-Pavie and Megraw, 2009). Parallèlement, des études *in vitro* en cellules humaines et de poulet révèlent que l'absence de CEP135 entraîne une légère diminution du nombre de centrioles, sans défaut particulier au niveau de leur structure et de leur composition (Lin et al., 2013a; Inanç et al., 2013).

CEP135 semble donc jouer un rôle important mais non essentiel dans la structure du centriole. Elle est impliquée à la fois dans le bon assemblage du « cartwheel » et dans le contrôle du nombre de centriole, mais la perte de fonction de CEP135 n'a pas d'effets dévastateurs.

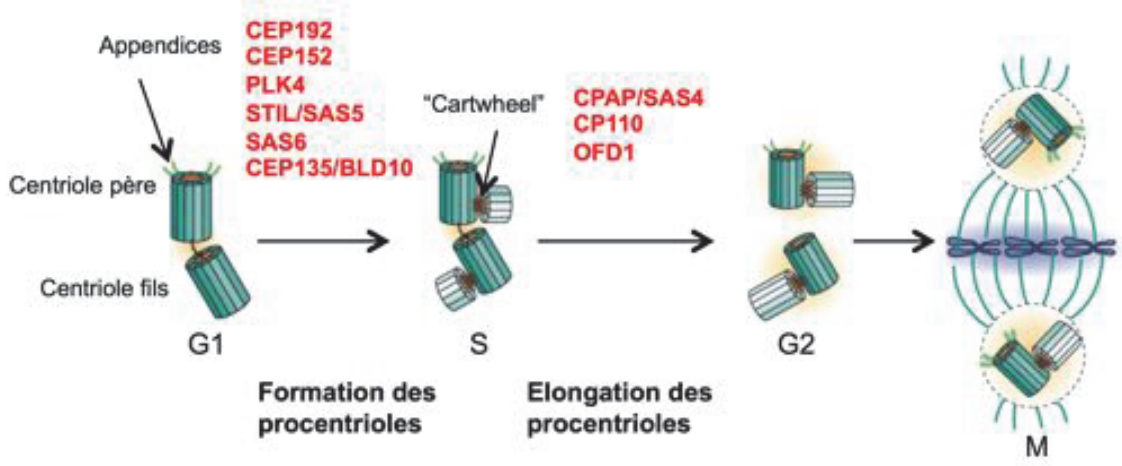


Figure 6 : *Schéma illustrant les protéines nécessaires à la formation et à l'élongation des procentrioles.*
Les procentrioles sont assemblés durant la phase S du cycle cellulaire, à la région proximale des centrioles parentaux (centriole père et fils). Les procentrioles s'allongent par la suite en phase G2. L'assemblage et l'élongation des procentrioles sont contrôlés par un mécanisme très régulé faisant intervenir différentes protéines. Durant la mitose, l'assemblage des procentrioles est terminé et chaque paire de centrioles nouvellement formée se positionne à un pôle de la cellule où elle participe à la division cellulaire. Adapté de Bettencourt-Dias and Glover, 2007.

Une fois le « cartwheel » du procentriole établi, les microtubules centriolaires A, B et C sont ajoutés et commencent leur croissance (Guichard et al., 2010). Ceci implique notamment la protéine SAS-4/CPAP, qui permet la polymérisation des microtubules centriolaires via la coopération de CEP120, localisée préférentiellement au centriole (Lin et al., 2013b). La surexpression de CPAP ou CEP120 engendre un allongement excessif des centrioles. La taille de la partie distale du centriole serait également régulée par la protéine POC5. En effet, des cellules HeLa déplétées de POC5 accumulent des procentrioles courts. POC5 est donc essentiel pour la construction de la partie distale des centrioles mais pas pour l'initiation de l'assemblage du procentriole (Azimzadeh et al., 2009).

D'autres protéines sont nécessaires à la régulation de la région distale des centrioles. C'est le cas notamment de la protéine OFD1 localisée à la partie distale du centriole. La déplétion de OFD1 dans des cellules souches murines provoque, entre-autre, un allongement de la région distale des centrioles, accompagné d'un défaut de modifications post-traductionnelles des tubulines (Singla et al., 2010). OFD1 jouerait donc un rôle dans la stabilisation des microtubules en cours de polymérisation lors de l'allongement centriolaire.

La protéine CP110 régule également la croissance et la taille du centriole puisque sa déplétion dans des cellules HeLa et U2OS conduit à des centrioles anormalement longs (Schmidt et al., 2009). Le recrutement de CP110 au centriole requiert CEP97 et la surexpression de ces deux protéines empêche la formation de cils primaires dans les cellules RPE1 (Spektor et al., 2007). CP110, coiffant l'extrémité distale des centrioles pères chez l'Homme, pourrait ainsi agir en tant que barrière physique pour l'élongation.

IV-2) La zone de transition

La zone de transition est une structure localisée à l'extrémité distale des centrioles et à la base de l'axonème. Elle se caractérise en microscopie électronique par des projections qui relient l'axonème à la membrane et de forme caractéristique qui leur confère leur nom : les liens Y. Elle est impliquée dans la sélection des constituants protéiques ciliaire et permet également de renforcer physiquement la base de l'axonème à la cellule. Elle constitue, avec les fibres de transition, la barrière ciliaire qui contrôle la composition des cils. La composition, l'assemblage et la fonction de la zone de transition seront discutés plus amplement dans un chapitre suivant.

IV-3) L'axonème

L'axonème est la structure principale du cil et des flagelles, et est nucléé à partir du corps basal **(Figure 7A)**. On distingue deux grands types de cils en se basant sur l'ultrastructure et la composition de leur axonème. En effet, la grande majorité des cils mobiles et les flagelles, présentent une conformation appelée 9+2 **(Figure 7B1)**. Ils sont constitués de 9 doublets de microtubules externes périphériques et d'une paire centrale de singlet de microtubules. La paire centrale est alors connectée au microtubule A des doublets périphériques par les fibres radiaires. Sur ces microtubules A sont également retrouvés des bras de dynéine interne et externe, nécessaires pour assurer la motilité du cil. De plus, le microtubule B au sein d'un doublet est connecté au microtubule A du doublet adjacent par un lien de néxine, protéine impliquée dans la régulation de l'activité motrice de dynéine.

Le second type de cil comprend les cils primaires ou immotiles et possèdent uniquement 9 doublets de microtubules périphériques et ont donc une conformation en 9+0 **(Figure 7B2).**

Néanmoins, il existe des exceptions dans l'acquisition du caractère motile/immotile et de la conformation 9+0 et 9+2. En effet, les cils des neurones chordotonaux chez la drosophile sont des cils motiles, mais ne possèdent pas de paire centrale. Ils possèdent en revanche des bras de dynéines internes et externes. Il en est de même pour les cils du nœud embryonnaire chez la souris. (Bellomo et al., 1996; Kavlie et al., 2010). A l'inverse, certains cils immotiles sont pourvus d'une paire centrale de microtubules. C'est par exemple le cas des cils olfactifs présents chez les mammifères (Menco and Morrison, 2003).

Généralement, les cils motiles sont nécessaires au déplacement ou à la génération de flux, et les cils primaires sont requis pour la transduction de signaux. Chez *Chlamydomonas*, son flagelle, qui lui permet de se propulser, transduit également des signaux d'accouplement qui induisent la fusion cellulaire. (Pan and Snell, 2002). De même, les cils motiles qui tapissent les épithéliums des voies aériennes humaines portent des chemiorécepteurs pour les substances amères (Shah et al., 2009). Ceci témoigne donc de l'hétérogénéité existante dans la structure et la fonction des cils.

Plusieurs compartiments peuvent être distingués dans certains cils. Par exemple, la partie distale des cils de *C. elegans* est composée de singlet de microtubules. De même, chez plusieurs organismes dont les mammifères, on peut distinguer un

compartiment spécifique dans la partie proximale du cil qui se caractérise par la présence de la protéine Inversine. Il est également composé des protéines ANKS6, NPHP3 et NEK8. A ce jour, sa fonction n'a pas encore été précisément établie (Hoff et al., 2013).

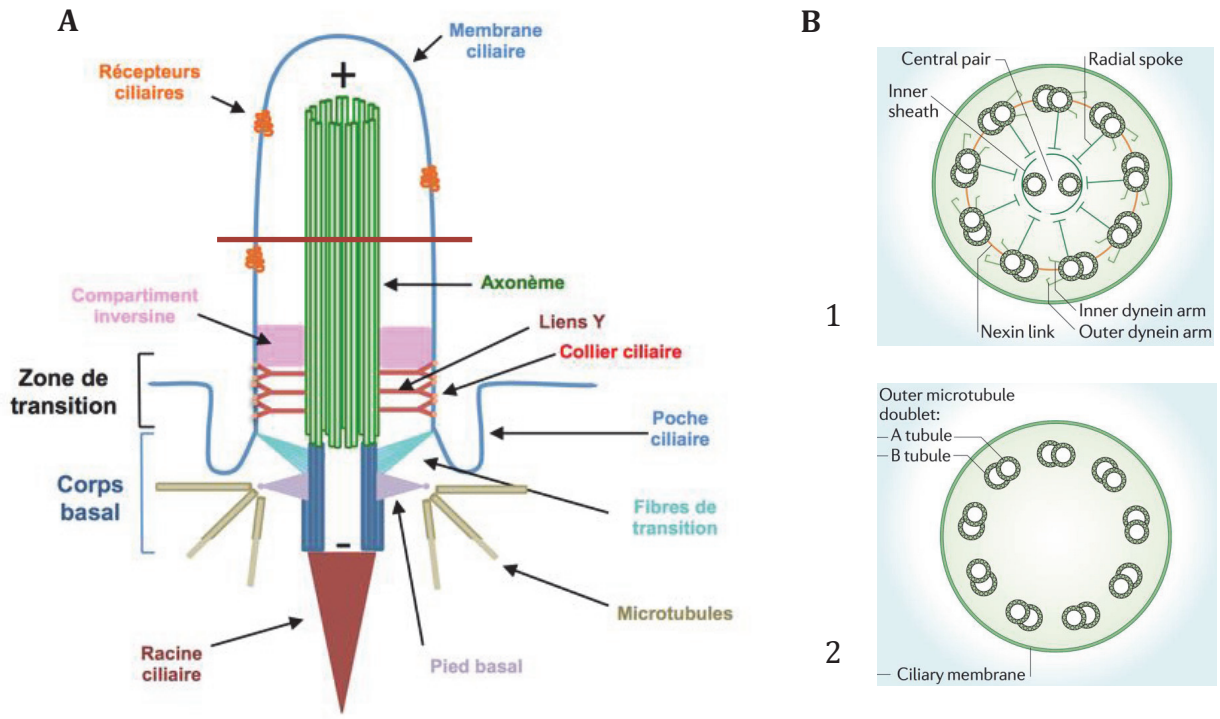


Figure 7 : *Structure d'un cil primaire.*
***A**. Le corps basal est ancré à la membrane plasmique via les fibres de transition. Les pieds basaux permettent l'ancrage de microtubules cytoplasmiques permettant l'acheminement de vésicules vers le cil. La racine ciliaire du corps basal ancre le cil dans le cytoplasme. Localisée distalement vis à vis du corps basal, la zone de transition, est constituée de liens Y qui relient les doublets de microtubules à la membrane ciliaire au niveau d'une structure appelée le collier ciliaire. L'axonème est constitué de doublets de microtubules et le cil est séparé du reste de la cellule par une membrane ciliaire dans laquelle sont localisés des récepteurs membranaires spécifiques. A la base du cil, la membrane ciliaire forme une invagination appelée la poche ciliaire (D'après Vieillard et al., 2014).*
***B**. Schéma représentant une section transversale d'un cil motile (B1) et d'un cil non motile (B2). L'axonème est constitué de 9 doublets périphériques de microtubules (axonème dit en 9+0). Les cils motiles possèdent des structures et protéines accessoires supplémentaires essentielles à la mobilité. Des bras de dynéines internes et externes sont ancrés au tubule A et des fibres radiaires connectent le tubule A à une paire centrale de singlets de microtubules (axonème dit en 9+2). De plus, le tubule A complet d'un doublet est lié au tubule B incomplet du doublet suivant par un lien de néxine. Image extraite de Ishikawa and Marshall, 2011.*

IV-4) La membrane ciliaire et la poche ciliaire

L'axonème est entouré d'une membrane ciliaire dont la composition est différente de celle de la membrane plasmique. En effet, certains récepteurs de voies de signalisation, comme le récepteur Smoothened (SMO) de la voie Sonic Hedgehog (SHH), sont spécifiquement recrutés à la membrane ciliaire suite à une stimulation. On retrouve également les récepteurs Somatostatin Receptor 3 (SSTR3), 5-Hydroxytryptamine Receptor 6 (HTR6), qui appartiennent à la famille des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR), ainsi que le récepteur PKD2 (Polycystin 2), un canal calcique impliqué dans l'asymétrie gauche droite. Enfin, le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes est également retrouvé localisé à la membrane ciliaire après stimulation (Brailov et al., 2000; Berbari et al., 2007; Rohatgi and Snell, 2010).

La différence de composition de la membrane ciliaire n'est pas que protéique mais est aussi lipidique. En effet, la membrane des cils dans des cellules souches neuronales murines ainsi que dans des MEFs, est riche en PIP4, alors que la membrane péri-ciliaire est riche en PI(4,5)P2. Ce phosphoinositide est déphosphorylé par l'enzyme INPP5E, localisée le long de la membrane ciliaire. La déplétion de cette enzyme altère cette différence de composition lipidique puisque l'on retrouve du PI(4,5)P2 à la membrane ciliaire (Garcia-Gonzalo et al., 2015). Certains patients atteints du syndrome de Joubert, ont des mutations détectées dans le gène *INPP5E*, témoignant de l'importance particulière de la composition lipidique de la membrane ciliaire (Bielas et al., 2009).

Ainsi, la différence qualitative de la composition de la membrane ciliaire, comparée à celle de la membrane plasmique, génère un compartiment à part entière de la cellule avec à sa base une barrière de diffusion. Ceci permet alors de définir le cil comme un organite à part entière.

A la base d'un grand nombre de cils se trouve un domaine membranaire particulier appelé poche ciliaire, lié à l'invagination de la base du cil au sein de la cellule **(Figure 3).** Son rôle n'est pas encore clairement déterminé mais certaines études s'entendent sur le fait qu'elle servirait de plateforme associée au cil, facilitant le trafic de protéines membranaires en direction ou venant du cil. Cette idée est renforcée par le site d'ancrage pour des filaments d'actines créé à la poche ciliaire (Benmerah, 2013). Une des particularités de la poche ciliaire est la présence de puits recouverts de clathrine, suggérant fortement une fonction dans les processus endocytaires comme l'internalisation de composants ciliaires destinés à être dégradés ou recyclés en cas d'excès ou de ciblage incorrect. La poche ciliaire pourrait également servir de plateforme de sécrétion avec les vésicules la traversant et libérant leurs contenus dans le milieu extérieur (Molla-Herman et al., 2010). Enfin le rôle de plateforme de la poche ciliaire est mis en lumière par le lien qu'elle crée entre le cil primaire et le cytosquelette d'actine. Ceci permettrait de contrôler, d'une part la morphologie de la poche ciliaire et son environnement local, et d'autres part d'apporter des constituants du cil.

B - La ciliogenèse, suite d'évènements conduisant à la formation des cils

Dès les années 60, Sergei Sorokin révéla, grâce à la microscopie électronique, que la ciliogenèse consiste en une succession d'étapes cytoplasmiques et coordonnées dans le temps et l'espace (Sorokin, 1962). Elle comprend plusieurs étapes indispensables et communes à tous les modèles cellulaires. Ainsi, elle débute par la conversion du centriole père en corps basal, matérialisée par la différenciation des appendices distaux en fibres de transition et des appendices subdistaux en pieds basaux. Simultanément, le corps basal migre et s'ancre à la membrane plasmique. Néanmoins, Sorokin observa que selon les types cellulaires, il existe des différences dans le déroulement de ces étapes et met en lumière deux voie distinctes : la voie extracellulaire et la voie intracellulaire **(Figure 8)**.

La voie intracellulaire est notamment retrouvée dans les neurones, les fibroblastes et les cellules des muscles lisses. Dans ce cas, le corps basal s'associe dans un premier temps à une vésicule ciliaire à l'intérieur de la cellule. L'élongation de l'axonème s'initie sous cette vésicule et celle-ci va s'allonger grâce à l'arrimage d'autres vésicules cytoplasmiques. Enfin, la vésicule ciliaire fusionnera avec la membrane plasmique et le cil en formation sera externalisé. L'élongation du cil primaire et la croissance de l'axonème seront parachevées grâce au transport intraflagellaire (IFT) (Sorokin, 1962; Sorokin, 1968; Benmerah, 2013).

La voie extracellulaire serait privilégiée dans les cellules épithéliales polarisées. Celle-ci implique la migration du corps basal et son ancrage direct au cortex apical, grâce aux fibres de transition. Ceci permet alors la nucléation des microtubules, aboutissant à la formation de l'axonème, qui entouré de sa membrane est en contact direct avec l'environnement extérieur. Cependant, de nouvelles études suggèrent que certains épithéliums assemblent des multicils via une étape d'ancrage des corps basaux à une vésicule ciliaire. C'est par exemple le cas chez le xénope, dans les cellules épithéliales de l'épiderme, où les corps basaux s'associent à une vésicule ciliaire avant leur fusion avec la membrane plasmique (Park et al., 2008). Similairement, une étude dans les cellules de l'épithélium de la trachée de souris déficientes en *CBY1*, a montré que les corps basaux ne s'ancrent pas à la membrane et que des vésicules sont observées à proximité des appendices distaux (Burke et al., 2014). Cela indique donc que les corps basaux des cellules épithéliales peuvent également s'ancrer à une vésicule ciliaire avant d'être localisés à la membrane plasmique.

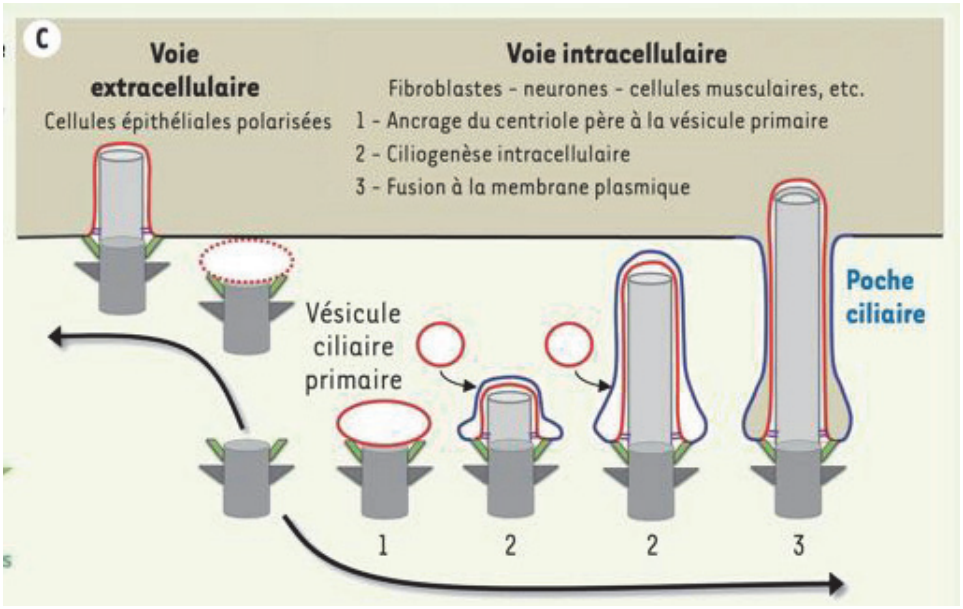


Figure 8 : *Schéma illustrant les deux principales voies : voie extracellulaire et intracellulaire, composées d'étapes cytoplasmiques menant à la formation du cil primaire. Figure extraite de Benmerah, 2014.*

Dans ce manuscrit, je traiterai dans un premier temps principalement de la voie la plus fréquente, la voie intracellulaire, et j'ai choisi de la décrire selon la chronologie des différentes étapes aboutissant à la formation complète du cil, même si la ciliogenèse n'est pas une succession linéaire d'événements. Tous les mécanismes ne sont pas tous décrits et de nombreuses zones d'ombres restent encore à éclaircir. La seconde partie de mon manuscrit traitera de la ciliogenèse chez la drosophile, modèle que j'ai utilisé durant ma thèse afin de caractériser la fonction de protéines de la zone de transition. La zone de transition fera l'objet d'un chapitre spécifique plus tard dans ce manuscrit.

I-Conversion du centriole père en corps basal

Les deux centrioles d'un centrosome étant différents au niveau de leur âge, ils se distinguent également par le matériel protéique qui s'y trouve. En effet, à l'extrémité distale du centriole père se trouve des appendices appelés appendices distaux et subdistaux que l'on ne retrouve pas au niveau du centriole fils. Ces appendices se forment au bout d'un cycle et demi après l'initiation des procentrioles. Lors de l'étape de maturation du centriole père en corps basal, les appendices subdistaux et distaux évoluent respectivement en pieds basaux et fibres de transition. Ces dernières marquent le début de la zone de transition composée de doublets de microtubules.

I-1) Formation des appendices subdistaux/pieds basaux

a) Assemblage des appendices subdistaux/pieds basaux

Un ensemble de protéines a été identifié et décrit pour être localisé au niveau des appendices subdistaux. Parmi ces protéines, on trouve notamment les protéines ODF2 (Outer dense fiber 2), CC2D2A et KIF3A, une sous unité de la protéine motrice kinésine 2 (Kodani et al., 2013; Veleri et al., 2014; Wei et al., 2015). La ε-Tubuline, la Ninéine, CEP170, CEP110/Centrioline, la Galectin-3 et $p150^{Glued}$ viennent compléter la liste des protéines composant les appendices subdistaux (Azimzadeh and Bornens, 2007).

La protéine ODF2 est localisée au niveau des appendices subdistaux et son absence dans des cellules murines abolit intégralement leur formation. Ceci lui confère donc une fonction essentielle dans l'assemblage de ces appendices (Ishikawa et al., 2005).

La protéine CC2D2A est localisée sur le centriole père au niveau des appendices subdistaux et son absence conduit à un défaut de recrutement des protéines ODF2 et Ninéine aux appendices subdistaux, bloquant ainsi leurs assemblages. Des mutations dans le gène *CC2D2A* ont été associées aux syndromes de Meckel et Joubert.

KIF3A interagit avec $p150^{Glued}$ (sous unité de la dynactine, protéine motrice des microtubules permettant l'activité des dynéines), ce qui permet son recrutement aux appendices subdistaux. $p150^{Glued}$ va à son tour recruter la Ninéine et permettra le bon ancrage des microtubules aux appendices subdistaux **(Figure 9)**. La protéine KIF3A participe au transport antérograde de cargos/protéines le long de l'axonème. La déplétion de cette protéine engendre donc des défauts de ciliogenèse, principalement dues à un dysfonctionnement du transport intraflagellaire, mais aussi à un défaut d'ancrage de microtubules aux appendices subdistaux.

Par ailleurs, d'autres protéines comme DZIP1, participent à la formation des appendices subdistaux. En effet, DZIP1 est localisée au corps basal et son absence en cellules humaines RPE1, conduit à une diminution du nombre de cellules ciliées. Ceci est corrélé à la perturbation de la localisation de la Ninéine aux appendices subdistaux et à la perte de la localisation de CEP164 aux appendices distaux (Wang et al., 2013a). DZIP1 est donc impliquée dans la formation des appendices subdistaux mais aussi distaux.

b) Fonctions des appendices subdistaux/pieds basaux

La fonction principale des appendices subdistaux consiste à ancrer et stabiliser les microtubules cytoplasmiques au centriole père notamment par l'intermédiaire des protéines Centrioline et Ninéine qui possèdent des domaines d'interaction avec les microtubules (Tateishi et al., 2013).

Les pieds basaux, au nombre de 1 à 4, dérivent des appendices subdistaux (dont ils sont ultrastructurellement identiques) lors de la conversion du centriole père en

corps basal. On les trouve aussi bien aux cils motiles que primaires mais leur présence à tous les corps basaux des cils primaires n'est pas certaine (Hagiwara et al., 2008). La fonction des pieds basaux a été particulièrement étudiée dans les cellules muticiliées des épithéliums. Dans ces cellules, les pieds basaux participent à l'arrangement d'un réseau de microtubules apical organisé et à l'établissement de la polarité planaire de ces cellules. Les microtubules émanant du pied basal sont orientés dans la direction du fluide et alignent le battement ciliaire avec la direction de la force. De plus, l'absence de la protéine ODF2 dans les cellules épithéliales conduit à la perte du pied basal, affectant la coordination des battements ciliaires. Ceci est associé à une mauvaise orientation du corps basal à la membrane apicale (Kunimoto et al., 2012). Ces défauts ont également été retrouvés dans une autre étude (Clare et al., 2014) sur la Galectin-3, un autre composant du pied basal. Ceci confirme que les microtubules polymérisés au niveau du pied basal sont essentiels à l'alignement des corps basaux et à l'orientation des cils.

Par ailleurs, les pieds basaux participent également à la ciliogenèse via le réseau de microtubules cytoplasmiques qu'ils génèrent et qui permet le trafic de vésicules et de protéines nécessaires pour la ciliogenèse (Veleri et al., 2014).

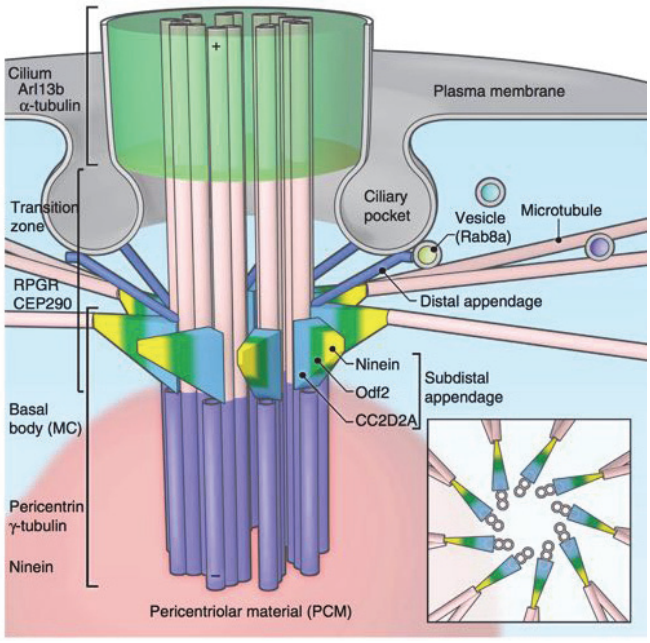


Figure 9 *: Schéma illustrant le rôle des appendices sub-distaux.*
Les appendices subdistaux sont caractérisés par la présence successive de 3 protéines: CC2D2A, ODF2 et la Ninéine.
Les appendices subdistaux ancrent des microtubules cytoplasmiques et facilitent l'ancrage et le transport de vésicules, vers la base du cil à la zone de transition. CC2D2A et ODF2 permettraient ce trafic vésiculaire. Le corps basal est représenté en violet et la zone de transition en rose. Figure extraite de Veleri et al., 2014.

La présence de structures se rapprochant du pied basal n'a pas encore été révélée par microscopie électronique chez certaines espèces telles que *C. elegans* et la drosophile, malgré la conservation de certaines protéines comme ODF2. Aucune étude n'a été publiée à ce jour, permettant de déterminer si la fonction de ces protéines au centriole est conservée.

I-2) Formation des appendices distaux/fibres de transition

Le centriole père se distingue également du centriole fils par des appendices distaux. Ceux-ci évoluent en fibre de transition au moment de la maturation du centriole père en corps basal, capable de s'attacher aux vésicules ciliaires lors de l'initiation de la ciliogenèse.

Les appendices distaux/fibres de transition sont au nombre de 9, chacun émergeant de la portion distale du tubule C à l'extrémité du corps basal et se terminant à la partie proximale de la membrane ciliaire (gibbons and grimstone, 1960). Des analyses plus fines ont suggéré que les fibres sont espacées d'environ 60 nm, ce qui est suffisant pour qu'un ribosome les traverse, mais pas une vésicule (Nachury et al., 2010). La principale voie d'accès au cil des différentes macromolécules participant à la composition des cils serait ces 60 nm entre les fibres de transition, puisque la lumière du corps basal est obstruée par des structures denses aux électrons contenant la Centrine 2 (Fisch and Dupuis-Williams, 2012).

A ce jour, au moins 5 protéines ont été identifiées comme composants des fibres de transition **(Figure 10)** (Graser et al., 2007; Sillibourne et al., 2013; Joo et al., 2013; Tanos et al., 2013).

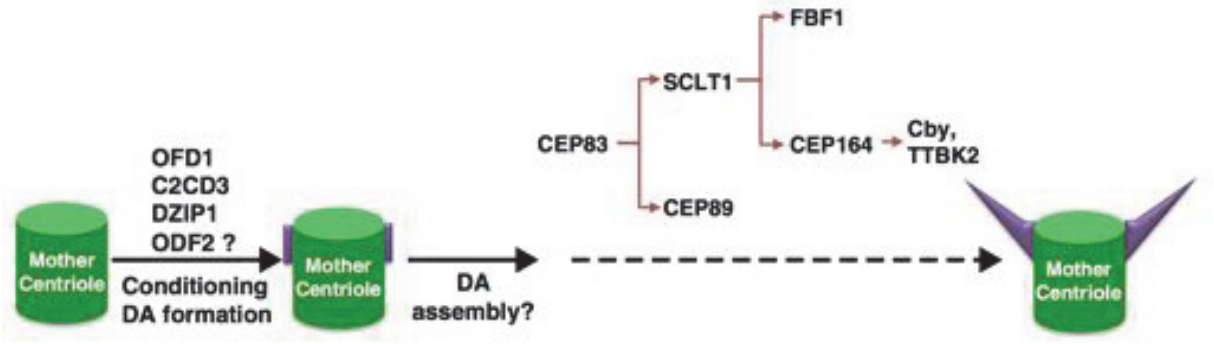


Figure 10 : *Schéma illustrant la hiérarchie et l'assemblage des appendices distaux/fibres de transition.*
Leur formation à l'extrémité distale du centriole père est sous le contrôle de OFD1, C2CD3, DZIP1 et possiblement ODF2. Puis, les composants structuraux et fonctionnels des appendices distaux/fibres de transition sont recrutés de manière séquentielle et hiérarchisée. DA : appendices distaux. Image extraite de Wei et al., 2015.

Une hiérarchie de ces différentes protéines, basée sur leurs localisations ordonnées aux appendices distaux a été établie. Celle-ci révèle que la protéine CEP83/CCDC41 est située en amont de la voie d'association des appendices distaux et orchestre le ciblage des quatre autres protéines, CEP89 et SCLT1, qui à leur tour permettent la bonne localisation de FBF1 et CEP164. En effet, la suppression de CEP83 inhibe le recrutement des 4 autres protéines précédentes.

CEP164 fut la première protéine des appendices distaux identifiée et caractérisée, et son absence entraine une altération de la ciliogenèse (Graser et al., 2007). Puis, à partir de 2013, des études par microscopie à super résolution ont permis d'étudier la localisation sub-cellulaire des protéines CEP89 (Sillibourne et al., 2013),

CEP83, SCLT1 et FBF1. La plupart de ces protéines cœur des fibres de transition sont impliquées à la fois dans l'ancrage du corps basal à la membrane et dans la ciliogenèse (Schmidt et al., 2012; Tanos et al., 2013; Burke et al., 2014).

D'autres protéines sont également impliquées dans le processus de formation des fibres de transition ou juste localisées aux niveaux de celles-ci. C'est le cas de Chibby (CBY1) et TTBK2 (Tau tubulin kinase 2), deux interacteurs de CEP164, qui sont recrutés aux fibres de transition via leurs interactions avec CEP164 et qui s'étendent jusqu'à la partie proximale de la zone de transition. Chez les mammifères, il a été montré que CBY1 est essentiel pour la ciliogenèse des cellules multiciliées via son rôle dans l'ancrage du corps basal à la membrane, mais n'est pas indispensable pour la formation des cils primaires (Voronina et al., 2009; Lee et al., 2014). Quant à TTBK2, elle permet de déclencher des évènements clés requis pour la ciliogenèse tels que le retrait de CP110 de la partie distale du centriole et le recrutement des protéines du transport intraflagellaire (Čajánek and Nigg, 2014).

De plus, l'assemblage des appendices distaux dépend également de certains composants de l'extrémité distale des centrioles père et fils. En effet, la protéine OFD1, outre son rôle dans la régulation de la taille des centrioles, permet la localisation de CEP164. C2CD3, également impliquée dans la régulation de la taille des centrioles, est requise pour le recrutement des 5 protéines constitutives des appendices distaux (Singla et al., 2010; Ye et al., 2014).

La protéine ODF2/Cenexine, un interacteur de CBY1, est requise à la fois pour la formation des appendices distaux et subdistaux (Ishikawa et al., 2005) tout comme DZIP1 (Wang et al., 2013a). Le rôle de ODF2 dans l'assemblage des appendices distaux reste encore controversé. En effet, une étude a montré que ODF2 serait nécessaire à l'assemblage des appendices distaux dans les cellules murines F9 tandis qu'une seconde, plus récente, dans des cellules épithéliales pigmentaires immortalisées de la rétine (hTERT-RPE1) a indiqué que l'absence de ODF2 n'a aucun effet sur le recrutement des 5 protéines des appendices distaux (Tanos et al., 2013).

Les appendices distaux des centrioles ne sont cependant pas retrouvés chez tous les organismes. Une analyse par microscopie électronique chez *C. elegans,* a permis de révéler une structure ressemblant à des appendices, dense aux électrons et qui émane des singlets du centriole père (Pelletier et al., 2006). Cependant, parmi les 5 composants structuraux cœur des fibres de transition, seul l'orthologue de *FBF1*, *DYF-19*, est retrouvé dans le génome de *C. elegans* et localisé de façon distale au centriole (Wei et al., 2015). La présence de fibre de transition chez *C.* elegans a été évoquée par des analyses de microscopie électronique par Perkins, où des connexions apparentes émanant des doublets de microtubules vers la membrane plasmique étaient semblables aux fibres de transition chez d'autres organismes (Perkins et al., 1986). Néanmoins, deux récentes études indiquent que ces connexions sont en réalité des artéfacts dus au traitement de l'échantillon pour la microscopie électronique (Doroquez et al., 2014; Serwas et al., 2017).

Quant à la drosophile, la présence de fibres de transition n'a pas été décrite sur les centrioles mais des structures denses aux électrons ressemblant aux fibres de transition sont clairement retrouvées dans les neurones sensoriels ciliés (Ma and Jarman, 2011; Vieillard et al., 2016). Sur les 5 protéines cœur connues chez les mammifères, on ne retrouve que les 3 suivantes : Fbf1/CG5964, Cep164/CG9170 et Cep89/CG8214

Ces observations permettent donc de suggérer que les acteurs identifiés ne sont que des constituants composant les fibres de transition spécifiques aux mammifères, et que les composantes fonctionnelles des fibres de transition ne sont pas encore toutes identifiées. La fonction de ces fibres de transition sera discutée plus en détails dans un chapitre suivant.

I-3) La racine ciliaire

La racine ciliaire est une structure filamenteuse émanant de la partie proximale du corps basal et le reliant au réseau du cytosquelette. Elle est principalement constituée de la protéine Rootletine (Yang et al., 2002).

Son rôle n'a pas été totalement identifié malgré plusieurs études aboutissant à diverses hypothèses. Des souris invalidées pour la *Rootletin*e montrent que cette structure n'est pas essentielle à la ciliogenèse, mais dans la stabilité ciliaire à long terme. En effet, les souris mutantes pour la *Rootletine* ne présentent pas de phénotypes typiques de défauts ciliaires, mais développent à 18 mois une dégénérescence rétinienne progressive. Celle-ci est associée à la désorganisation et la perte des segments externes des photorécepteurs de la rétine, ainsi qu'à la mauvaise localisation des opsines dans le segment interne et à une perte de la racine ciliaire (Yang et al., 2005).

Chez *C. elegans*, CHE-10, l'orthologue de la Rootletine, est nécessaire au maintien de l'intégrité du cil, en modulant l'assemblage de la zone de transition et en participant au recrutement de particules du transport intraflagellaire (Mohan et al., 2013).

L'étude de la fonction de la Rootletine chez la drosophile est très récente. En effet, en 2015, il a été montré que la perte de la Rootletine conduit à des défauts au niveau sensoriel (mécanosensation et chémosensation). Bien que ces défauts soient généralement associés à des défauts ciliaires, les drosophiles mutantes pour la *Rootletine* présentent un assemblage et une structure des cils des neurones sensoriels apparemment normaux (Chen et al., 2015). Le rôle de la Rootletine dans cette fonction sensorielle n'a pas encore été élucidé.

I-4) Association du corps basal avec la vésicule ciliaire

Une des étapes indispensables de la voie intracellulaire de la ciliogenèse est l'ancrage d'une vésicule ciliaire au corps basal, via les appendices distaux. La perte de l'un des 5 constituants des fibres de transition empêche l'ancrage de la vésicule ciliaire au corps basal (Tanos et al., 2013).

La vésicule ciliaire est assemblée par l'amarrage de petites vésicules appelées vésicules des appendices distaux (ou DAV : distal appendage vesicles). La fusion des DAV permet la formation de la vésicule ciliaire et nécessite les protéines SNAP29, composant du complexe SNARE, et EHD1/3, protéine de remodelage membranaire de la famille des protéines Eps15 (Lu et al., 2015).

Une fois assemblée et recouvrant l'extrémité du centriole, la vésicule ciliaire va s'allonger et former la gaine ciliaire **(Figure 11)**. Cela implique la cascade Rab11-Rabin8-Rab8. Dans un premier temps, Rabin8, le facteur d'échange de nucléotide GDP/GTP de Rab8 va être recruté à proximité du corps basal au niveau des vésicules, notamment par l'intermédiaire de Rab11, de CEP164 ainsi que de CBY1 (Knödler et al., 2010; Schmidt et al., 2012; Burke et al. 2014). La GTPase Rab8 va également être recrutée aux niveaux des vésicules par les protéines des satellites centriolaires, CEP290, PCM-1 et par une protéine des appendices subdistaux, ODF2. La suppression de CEP290 et PCM-1 empêche la localisation de Rab8 au corps basal (Kim et al., 2008).

L'activation de Rab8 va se faire par le remplacement du GDP en GTP au corps basal. Ceci se fait par DZIP1, dont la phosphorylation par la kinase GSK3β permet son association avec $Rab8^{GDP}$. Celle-ci promeut la dissociation de GDI2, l'inhibiteur de dissociation du GDP, de Rab8. La déplétion de DZIP1 empêche la localisation de Rab8 dans le cil et au corps basal (Zhang et al., 2015a). D'autres part, l'activation de Rab8 est complémentée par Rabin8, recrutée auparavant au corps basal via CBY1 et CEP164, et va permettre d'activer Rab8 à travers le remplacement du GDP en GTP. Ceci a pour conséquences l'élongation de la membrane ciliaire par l'attachement et la fusion des vésicules à la membrane périciliaire ou poche ciliaire.

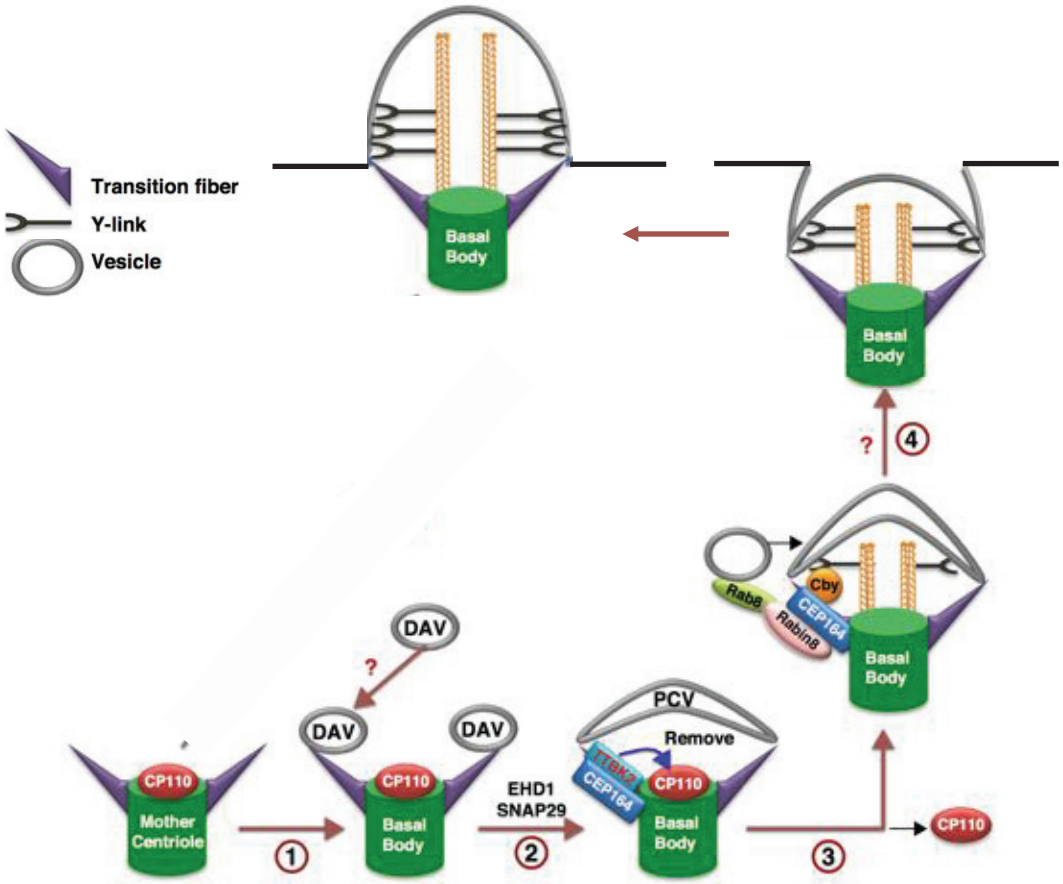


Figure 11 : *Etapes initiatrices du programme ciliogénique.*
Durant les étapes précoces de la ciliogenèse, de petites vésicules (DAV) vont s'ancrer aux fibres de transition au niveau du centriole père (1). La fusion de ces vésicules en vésicule ciliaire (PCV = Primary cilia vesicule) est réalisée grâce au recrutement de EHD1 et SNAP29 (2). En parallèle de la formation de la membrane ciliaire, TTBK2 est recrutée aux fibres de transition par CEP164 pour éliminer la protéine CP110 de l'extrémité distale du corps basal afin d'initier l'élongation de l'axonème (3). Par la suite, CBY1 et CEP164 vont permettre le recrutement de Rabin8 au corps basal pour activer Rab8 et conduire à l'élongation de la membrane ciliaire via l'attache et la fusion des vésicules à la membrane périciliaire. De façon concomitante, la formation de la zone de transition sera alors initiée à l'intérieur de cette vésicule de façon indépendante de l'IFT. La vésicule ciliaire s'ancrera avec la membrane plasmique, devenant la membrane ciliaire avec à l'intérieur l'axonème dont la croissance sera réalisée par l'IFT (4). Image adaptée de Wei et al., 2015.

Simultanément à l'ancrage de la vésicule ciliaire, des régulateurs négatifs de la ciliogenèse sont dégradés ou délocalisés des centrioles. C'est un point critique pour l'engagement du centriole père dans la nucléation et l'extension de l'axonème. La transition du centriole en corps basal implique le retrait de la protéine CP110, et de son interacteur CEP97, de l'extrémité distale du centriole père où elle bloque la polymérisation de l'assemblage des microtubules **(Figure 11)**.

D'autres protéines régulatrices ont aussi été décrites pour s'associer avec CP110 et CEP97 pour réguler l'initiation de la ciliogenèse. C'est le cas de KIF24, CEP104 et CEP290. Celles-ci, en modulant l'activité de CP110, peuvent soit activer (CEP104), ou inhiber (KIF24, CEP290) le processus ciliogénique.

La protéine KIF24 fait partie de la famille des kinésines 13 à activité dépolymérisantes des microtubules, et interagit avec CP110 et CEP97 au niveau du centriole père (Kobayashi et al., 2011). L'inhibition de KIF24 provoque la disparition de CP110, associée à la formation non programmée d'un cil pendant le cycle cellulaire. Elle assure donc une fonction répressive de la ciliation, similaire à celle de CP110.

CEP104, quant à elle, semble faire partie des régulateurs positifs de la ciliogenèse. En effet, la perte de CEP104 en cellules hTERT-RPE1, réduit leur capacité à développer un cil. Elle se localise à l'extrémité distale des deux centrioles jusqu'à ce que le corps basal forme un cil (Tsang and Dynlacht, 2013). Elle est également impliquée dans le recrutement de CEP97 aux centrioles. Elle pourrait restreindre CP110 et CEP97 au centriole père jusqu'aux phases précoces de la ciliogenèse. Une fois celle-ci initiée, la localisation de CEP104 est modifiée, et migre jusqu'au sommet du cil, libérant alors CP110 et CEP97 du centriole père.

Par ailleurs, la protéine CP110 interagit avec CEP290. La perte de fonction de cette dernière abolit l'assemblage du cil en perturbant la migration du corps basal et sa fusion avec la vésicule ciliaire, permise via l'interaction avec Rab8. Ainsi, CEP290 a une fonction positive dès les étapes précoces de la ciliogenèse. Cette fonction est antagonisée par son interaction avec CP110. Si l'interaction est inhibée, alors CP110 est dans l'incapacité de réprimer l'assemblage du cil dans les cellules quiescentes (Tsang and Dynlacht, 2013; Kobayashi et al., 2014).

Deux kinases ont été montrées pour être impliquées dans la suppression de CP110 de l'extrémité distale du centriole père et donc d'initier la ciliogenèse : la kinase TTBK2 et la kinase MARK4 (microtubule affinity regulating kinase 4). TTBK2 permet à la fois le retrait de CP110 et le recrutement de protéines de l'IFT, qui permettent d'apporter les protéines nécessaires à la construction du cil (Goetz et al., 2012). Le recrutement de TTBK2 au centriole est permis par les protéines présentes aux appendices distaux et notamment CEP164. La kinase MARK4, associée aux microtubules, interagit avec ODF2, et sont toutes 2 nécessaires à l'élimination de CP110 (Kuhns et al., 2013). En effet, la suppression de MARK4 et ODF2 bloque la ciliogénèse dès les phases précoces, car CP110 et CEP97 restent présentes au corps basal. Les mécanismes moléculaires concernant le mode d'action de TTBK2 et MARK4 dans le retrait de CP110 n'ont pas encore été identifiés mais le fait qu'aucune interaction entre ces protéines n'ait été révélée, suggère un rôle probable de la phosphorylation par ces kinases dans le retrait de CP110 et CEP97.

Le retrait de CP110 du centriole père est indispensable à la croissance de l'axonème à l'intérieur de la vésicule (Spektor et al., 2007). Le signal et le moment du retrait de CP110 reste encore inconnu, mais pourrait avoir lieu lors de l'ancrage du centriole à la membrane.

Cependant, le rôle de CP110 au cours de la ciliogenèse est controversé. En effet, alors que certaines études ont révélé que la suppression seule de CP110 conduit à la formation d'un cil ectopique (Spektor et al., 2007; Tsang and Dynlacht, 2013), d'autres études ont montré que son absence provoque une élongation anormale des microtubules centriolaires sans vésicule ciliaire (Franz et al., 2013). Récemment, une étude *in vivo* dans des souris mutantes pour *CP110*, montre, qu'elle est à l'inverse,

nécessaire pour promouvoir la ciliogenèse (Yadav et al., 2016). En effet, ces souris présentent une réduction drastique au niveau de la densité ciliaire, associée à des défauts de distribution des appendices distaux et subdistaux mais aussi d'ancrage de la vésicule ciliaire. Ces résultats *in vivo* sont en contradiction avec les données obtenues *in vitro* et suggèrent donc que la fonction de CP110 serait contexte-dépendant et impliquerait à la fois un rôle de suppresseur et de promoteur de la ciliogenèse.

I-5) Suppression d'OFD1 par processus autophagique

La protéine OFD1, localisée au niveau de la partie distale des centrioles est impliquée dans plusieurs processus. Elle régule à la fois la taille des centrioles et la formation des fibres de transition (Singla et al., 2010). Par ailleurs, OFD1 est également localisée aux satellites centriolaires où elle interagit avec PCM1, CEP290 et BBS4.

L'induction de la ciliogenèse dans des MEFs, par privation de sérum, entraine une réduction de la localisation d'OFD1 aux satellites centriolaires, corrélée avec une accumulation de LC3, une protéine localisée dans la membrane des autophagosomes (Tang et al., 2013). De plus, l'inhibition de l'autophagie dans des souris mutantes pour *ATG5* ou *ATG3*, conduit à une accumulation d'OFD1 aux satellites centriolaires. Ceci provoque alors une diminution de la densité et de la taille des cils. Suite à l'élimination d'OFD1, les protéines BBS4 et Rab8, normalement maintenues aux satellites par OFD1, vont pouvoir être relocalisées au corps basal pour former le BBSome (voir plus loin dans ce manuscrit) (Lopes et al., 2011).

Ainsi au moment de la ciliogenèse, le processus autophagique est nécessaire pour supprimer OFD1 des satellites centriolaires. OFD1 est donc fortement impliquée dans la régulation de la taille des centrioles via sa localisation à l'extrémité distale des centrioles ainsi que dans l'initiation de la ciliogenèse via sa localisation aux satellites centriolaires.

II- Formation et organisation de la zone de transition

La mise en place de la zone de transition se fait à l'intérieur de la vésicule ciliaire, à l'extrémité distale du corps basal. Elle se forme avant la croissance de l'axonème, et son assemblage se fait indépendamment du transport intraflagellaire. Au sens strict, la zone de transition correspond à la formation des liens Y, qui connectent les doublets de microtubules à la membrane ciliaire. Mais certaines études incluent également les fibres de transition comme faisant partie de la zone de transition. La zone de transition avec les fibres de transition, va former la barrière ciliaire qui joue un rôle de filtre nécessaire à la sélection des composants cellulaires autorisés à être acheminés dans le cil.

II-1) Structure de la zone de transition

La zone de transition fut identifiée à l'origine par Satir et Gilula qui la définirent d'une part, comme étant une région de transition où la membrane ciliaire rejoint la membrane plasmique et d'autre part, où des extensions émanant des doublets de microtubules se connectent à la membrane ciliaire (Gilula and Satir, 1972). Ces extensions connectent d'un côté l'interface entre les microtubules A et B d'un doublet à la membrane ciliaire. Ils ont ainsi été appelés liens Y. Ceux-ci renforcent physiquement la base de l'axonème (Williams et al., 2011). A noter que chez les vertébrés un arrêt du microtubule C au niveau distal du centriole est observé et correspond au début de la zone de transition.

Grâce à des reconstructions de tomographie électronique chez *C. elegans,* il a été proposé que ces liens Y constituent en réalité un feuillet continu sur toute la longueur de la zone de transition qui contacte la membrane au niveau d'une structure appelée collier ciliaire (Gilula and Satir, 1972). En effet, des images en microscopie électronique après congélation et fracturation ont révélé que la membrane autour de la zone de transition, présente des particules intra-membranaires, semblables à des perles, qui encerclent la membrane ciliaire pour former le collier ciliaire **(Figure 12)**. Ce collier serait physiquement associé avec la portion la plus externe des liens Y. Le nombre d'anneaux/couches composant le collier est variable d'un type cellulaire à l'autre et d'un type de cil à l'autre. Par exemple, dans des fibroblastes de poulet, on observe une seule couche composant le collier ciliaire contre 2 ou 3 couches chez *Chlamydomonas* ou encore 40 dans les cellules photoréceptrices de la rétine chez le rat (Fisch and Dupuis-Williams, 2012). Il reste toutefois un doute si le collier ciliaire est composé d'un empilement de plusieurs feuillets ou d'un seul feuillet en spiral (Reiter et al., 2012).

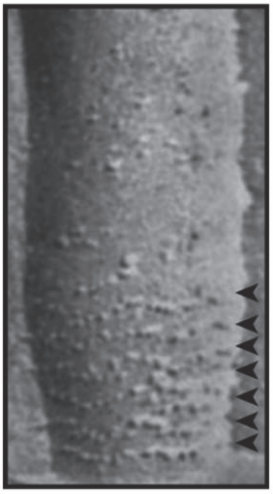


Figure 12 : *Images de microscopie de cryo-fracture révélant le collier ciliaire composé de plusieurs feuillets de perle à la base de cil motile de la trachée de rat. Les têtes de flèches révèlent les perles du collier ciliaire. Image adaptée de Gilula et Satir, 1972.*

II-2) Constituants de la zone de transition

a) Les complexes NPHP et MKS

Au niveau de la composition protéique de la zone de transition, de nombreuses protéines ont été identifiées et beaucoup d'entre elles ont été reliées à une ou plusieurs ciliopathies. Des études biochimiques ont identifié et regroupé ces protéines en deux principaux complexes à la zone de transition (Ben Chih et al., 2011; Garcia-Gonzalo et al., 2011; Sang et al., 2011;). Ces complexes ont ensuite été nommés en fonction des syndromes et des ciliopathies associées **(Figure 13)**.

Le complexe NPHP est principalement impliqué dans les néphronophtises (NPHP). Il comprend les protéines NPHP1, NPHP4 et NPHP8/RPGRIP1L. Le second complexe, MKS, est impliqué principalement dans les syndromes de Meckel et Joubert. Il inclut les 3 protéines Tectonic (TCTN1-3), les 3 protéines à domaine B9 (MKS1, B9D1 et B9D2), et les protéines à domaine coiled-coil CC2D2A et CEP290. Complètent la composition protéique de ce complexe au moment de l'écriture de ce manuscrit, AHI1 et les protéines transmembranaires TMEM67, 216, 17, 231, 107 et possiblement TMEM237 et 218 (Garcia-Gonzalo and Reiter, 2017).

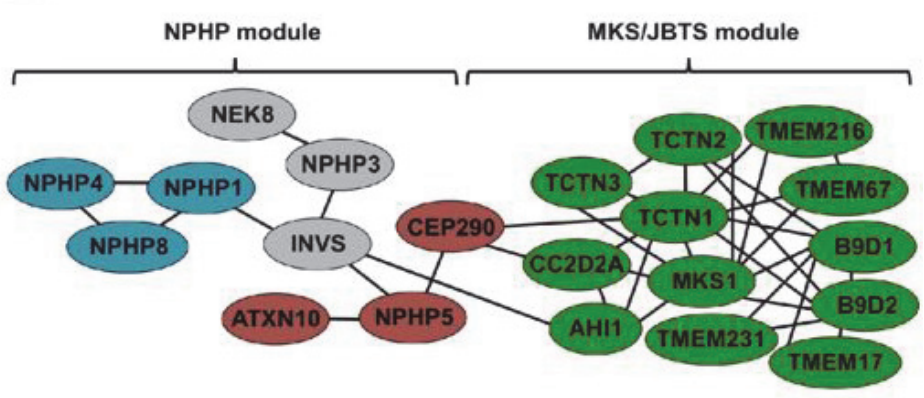


Figure 13 : *Plusieurs études et interactomes ont identifiés 2 complexes majeurs biochimiques : le complexe NPHP et le complexe MKS (Meckel)/JBTS (Joubert). Le premier regroupe principalement des protéines ayant été reliées à des nephronophtises (NPHP1, 4 et NPHP8/Rpgrip1l). Le second comprend des protéines impliquées dans les syndromes de Meckel et Joubert dont les protéines à domaine B9, les protéines Tectonic, les protéines à domaine coiled-coil (CC2D2A, CEP290, AHI1) et les protéines transmembranaires (TMEM). Ces complexes interagissent l'un avec l'autre à travers des sous réseaux ou sous complexes impliquant notamment le complexe CEP290 et NPHP5. Image extraite de Garcia-Gonzalo and Reiter, 2012.*

Ces complexes interagissent génétiquement ou physiquement les uns avec les autres à travers un réseau de protéines également présentes à la zone de transition. CEP290 pourrait cependant former un sous-module qui, bien que faisant partie du complexe MKS, interagit et forme un complexe avec NPHP5. Cette protéine du corps

basal et de la zone de transition, joue un rôle particulier dans l'assemblage des composants du complexe NPHP et MKS (Schafer et al., 2008; Sang et al., 2011; Garcia-Gonzalo and Reiter, 2017).

Récemment, des approches de microscopie à super-résolution ont permis de décrire plus précisément l'organisation de la zone de transition (Lee et al., 2014; Yang et al., 2015; Lambacher et al., 2015). L'utilisation de la technologie STED (stimulated-emission-depletion) de microscopie à haute résolution *in vitro* en cellules hTERT-RPE1 humaines, a permis d'organiser et hiérarchiser spatialement certaines protéines de la zone de transition les unes par rapport aux autres **(Figure 14)**.
Les différentes protéines s'organisent autour de l'axonème, en anneaux concentriques de diamètres différents selon les protéines considérées. Ainsi, la protéine TMEM67 du complexe MKS qui possède un domaine transmembranaire est retrouvée en périphérie de la zone de transition, associée à la membrane ciliaire et se superpose à TCTN2. La protéine MKS1, possède un domaine d'interaction avec les lipides et forme un anneau plus étroit localisé à l'intérieur de celui généré par TMEM67. Enfin, la protéine RPGRIP1L du complexe NPHP, possède un domaine d'interaction avec les microtubules, est retrouvé à proximité de l'axonème et forme l'anneau le plus interne. Ces anneaux sont positionnés à une distance de 100-200 nm du corps basal. Au vu de leur profil, TMEM67 et TCTN2 pourraient donc être associées au collier ciliaire. La protéine MKS1 pourrait quant à elle, être associée aux liens Y, entre les microtubules de l'axonème et la membrane ciliaire. RPGRIP1L, ayant un diamètre d'expression plus étroit, similaire à celui de l'axonème, pourrait créer un lien entre les microtubules et les liens Y **(Figure 14)**.

Ces observations de microscopie à haute résolution suggèrent que le module MKS est principalement associé à la membrane ciliaire, en cohérence avec la nature des protéines qui le compose. Il en est de même avec les protéines du module NPHP, qui sont retrouvées associées aux microtubules, à proximité de l'axonème, en accord avec leur capacité à se lier aux tubulines (Garcia-Gonzalo and Reiter, 2012).

Enfin, concernant CEP290, les analyses par microscopie STED la localisent de manière plus centrale et proximale que RPGRIP1L, et serait donc présente entre le corps basal et la zone de transition, au niveau des microtubules axonémaux. (Yang et al., 2015). Ceci est en concordance avec l'étude chez *C. elegans*, positionnant CEP290 de façon centrale à l'intérieur des microtubules axonémaux pour former une structure appelée le cylindre central qui fonctionne comme un échafaudage interne pour l'assemblage de la zone de transition (Schouteden et al., 2015). Néanmoins, ceci est à opposer au fait que chez *Chlamydomonas*, CEP290 est retrouvée associée et impliquée dans la formation des liens Y (Craige et al., 2010). Ceci pourrait être expliqué par des différences selon les espèces ou selon les types ciliaires. Il reste également à déterminer et clarifier si CEP290 pourrait couvrir ces deux fonctions à la zone de transition, à savoir servir de structure de base pour l'assemblage de la zone de transition et impliquée dans la formation des liens Y.

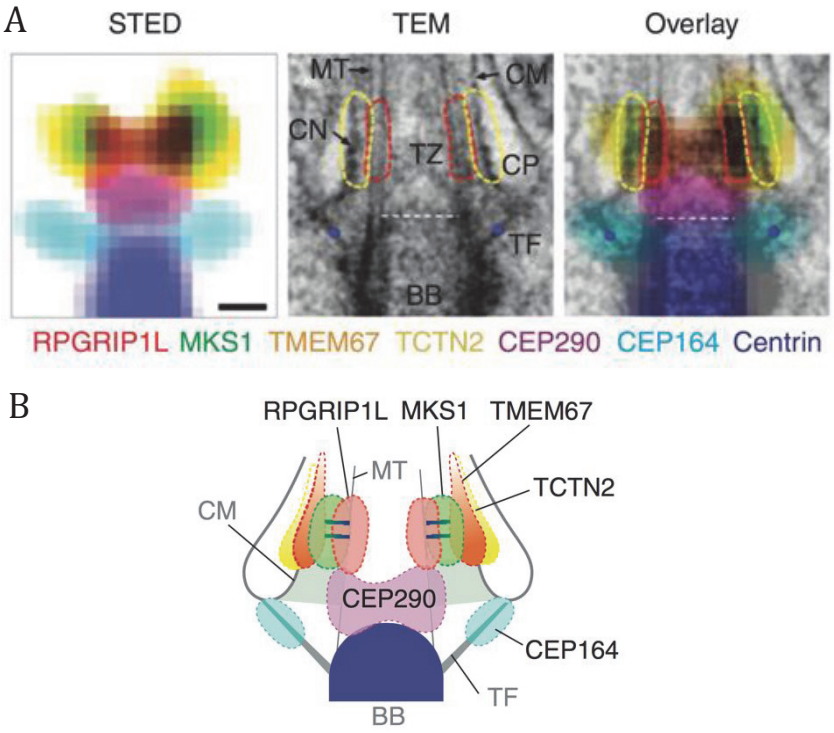


Figure 14 : *Images illustrant la localisation de protéines de la zone de transition.* ***A****. Image en provenance de microscopie à haute résolution (STED) de cils de cellules humaines RPE1 (retinal pigment epithelial). Le panneau de gauche révèle les signaux superposés de STED (le code couleur est indiqué sous les images). Le panneau central montre une image de microscopie électronique à transmission de référence, dans laquelle, les structures constituant la barrière ciliaire sont indiquées. Le panneau de droite correspond à la fusion des deux panneaux précédents.* ***B****. Schéma illustrant les données présentées en* ***A****. MT, microtubule; CN, collier ciliaire; TF, fibre de transition; CP, poche ciliaire; CM, membrane ciliaire; BB, corps basal. Images extraites de Yang et al., 2015 et adaptées par Garcia-Gonzalo and Reiter, 2017.*

Les nouvelles techniques de protéomique de plus en plus sensibles, telle que l'étiquetage de proximité par BioID ont déjà donné des résultats intéressants qui ont permis de cartographier des régions ciliaires, telle que l'interface centrosome-cil. Ces études ont permis d'identifier certaines protéines, notamment à la zone de transition mais aussi de révéler des interactions au sein de cette structure (Gupta et al., 2015). Ceci, couplé à la microscopie à haute-résolution et à la microscopie corrélative (incluant la microscopie électronique), permettra d'organiser et hiérarchiser de manière plus précise les protéines à la zone de transition.

Un modèle proposé d'organisation du réseau de protéines à la zone de transition est présenté en fin de chapitre **(Figure 15)**.

b) Autres protéines de la zone de transition

1) CBY

Chibby (CBY1) est une petite protéine coiled-coil de 14-kDa, initialement appelée PIGEA-14 (polycystin-2 interactor, Golgi- and endoplasmic reticulum-associated protein, de poids moléculaire de 14 kDa), conservée parmi les espèces animales possédant un cil motile. Elle fut identifiée à l'origine comme un interacteur de la polycystin-2 (PC2) et de la protéine GM130, un composant du compartiment golgien (Hidaka et al., 2004). PC2 est trouvé associée à la membrane des cils primaires des cellules épithéliales rénales où elle est impliquée dans la régulation de la prolifération des cellules rénales. Cette étude révéla que l'interaction entre CBY1 et PC2 permet la relocalisation de CBY1 et PC2, du cytoplasme vers le réseau trans-golgien.

Par ailleurs, CBY fut également décrite comme un antagoniste de la voie Wnt à la fois chez les mammifères et chez l'embryon de drosophile (Takemaru et al., 2003). En effet, CBY1 interagit avec la β-catenine dans le noyau et permet son export du noyau vers le cytoplasme, empêchant la formation du complexe β-catenine - Tcf/Lef. Plus précisément, la phosphorylation de Cby et de la β-catenine par Akt facilite la liaison de la protéine chaperonne 14-3-3 avec la partie N-terminale de Cby. Ceci, en coopération avec le récepteur d'export nucléaire, CRM1, conduit à l'export nucléaire de la β-catenine vers le cytoplasme et à la répression de l'activité transcriptomique exercée par la β-catenine (Li et al., 2008 and 2010). Cependant, la fonction de Cby dans la régulation de la voie Wnt chez la drosophile a par la suite été réfutée, étant donné que les drosophiles mutantes pour *cby*, ne présentent pas de défauts de signalisation de cette voie (Enjolras et al., 2012). Cette différence dans l'implication de Cby dans la voie Wnt peut être expliquer par le fait que la première étude est réalisée par ARN interférence chez la drosophile, alors que la seconde est réalisée chez un mutant *cby*. Il se pourrait donc que le résultat obtenu par ARN interférence ne soit pas spécifique à Cby.

En parallèle, un crible double hybride, réalisé à partir d'une banque d'ADN complémentaire de cerveau foetal humain, a identifié CBY1 comme interacteur de NBPF1 et la Clusturine (Vandepoele et al., 2010). CBY1 est donc décrite pour être impliquée dans la formation de deux complexes tri-moléculaire, l'un impliqué dans l'export nucléaire de la β-catenine, l'autre de fonction encore inconnue. Cette étude a donc identifié un complexe tri-moléculaire mais non relié à une fonction ciliaire. CBY1 est donc impliquée dans la formation de deux complexes tri-moléculaire, avec celui l'impliquant dans l'export nucléaire de la β-Catenine.

Il a par la suite été montré que CBY1 joue un rôle important dans la formation et la fonction des cils, interagissant avec ODF2, CEP164 et Rabin8, 3 composants importants dans le processus ciliogénique. En effet, CBY1 est localisée à l'extrémité distale du centriole père/corps basal dans des cellules murines MEFs et F9. Sa localisation centriolaire est dépendante à la fois de OFD1, une protéine composant la partie distale des centrioles et de Cenexine, une isoforme de ODF2, protéine des appendices subdistaux (Steere et al., 2012; Tateishi et al., 2013).

Des analyses en microscopie à haute résolution ont permis de montrer que CBY1 est retrouvée à la base des cils, à l'extrémité distale des centrioles avec un patron

d'expression en forme d'anneau, légèrement plus petit et positionné de façon plus apicale que les anneaux de la protéine des appendices distaux CEP164 (Tateishi et al., 2013). CBY1 serait donc localisée entre les fibres de transition et la zone de transition. CEP164 permet également le recrutement de CBY1 aux appendices distaux via leur interaction physique (Burke et al., 2014). Suite à cela, CBY1 interagit avec Rabin8 ce qui permet de stabiliser l'interaction CEP164-Rabin8. Ceci a pour conséquences le recrutement de vésicules Rab8 positive et l'assemblage général de la vésicule ciliaire coiffant l'extrémité distale du centriole père. Cette membrane ciliaire permettra notamment de faciliter la fusion et l'ancrage du corps basal avec la membrane plasmique de la cellule. Ceci est donc en concordance avec le phénotype observé chez les souris déficientes pour *CBY1*, qui présentent à la fois, une hypofertilité, ainsi que des problèmes respiratoires. Ces derniers sont associés à une réduction de la densité et de la mobilité des cils de l'épithélium respiratoire, ainsi que de défauts d'ancrage des corps basaux à la membrane plasmique (Love et al., 2010; Voronina et al., 2009). Enfin, ces souris sont également sujettes à la formation de kystes rénaux en raison d'une atteinte des cils primaires (Lee et al., 2014). Le mécanisme précis par lequel CBY1 régule la fusion de vésicules, l'ancrage et le trafic durant la ciliogenèse reste à déterminer.

CBY1 semble donc être une protéine capable de s'associer à différents partenaires et former des complexes multi-protéiques importants. Cette propriété particulière pourrait s'expliquer par les différents domaines constituant la protéine CBY1. Elle possède 3 régions : i) une région N-terminale (1-72) désordonnée comprenant notamment une séquence d'export nucléaire, ii) une région coiled-coil (73-100) permettant sa dimérisation et iii) une région non structurée dans sa partie C-terminale (100-126), possédant notamment une séquence de localisation nucléaire (Killoran et al., 2016). Ces régions désordonnées ou non structurées sont notamment décrites pour réguler l'affinité pour des partenaires d'interactions protéiques. Ainsi, la partie N-terminale de CBY1 est capable d'interagir avec les protéines 14-3-3, et l'exportine CRM1, et sa partie C-terminale permet l'interaction avec notamment la β-Catenine, TC-1 et l'importine-α. De plus, la région N-terminale et C-terminale de CBY1 sont toutes deux capables de lier la Clusterine. Ces capacités de liaison à des protéines peuvent ainsi expliquer comment CBY1 interagit avec plusieurs partenaires.

CBY1 est conservée chez la drosophile où elle est impliquée dans la mise en place de la zone de transition, à la fois dans les cils des neurones sensoriels et durant la spermatogenèse où elle facilite l'ancrage à la membrane plasmique du corps basal (Enjolras et al., 2012; Vieillard et al., 2016). Chez la drosophile, la présence de fibres de transition aux corps basal au cours de la spermatogenèse n'a pas été décrite. CEP164 qui permet le recrutement de CBY chez les mammifères n'y est également pas présente. De plus, ces études chez la drosophile révèlent que CBY présente un domaine d'expression similaire à celui des protéines de la zone de transition canonique. Elle est donc actuellement considérée comme une protéine de la zone de transition chez la drosophile et comme une protéine associée aux fibres de transition chez les mammifères. Elle n'a pour l'instant pas été reliée fonctionnellement à un module protéique de la zone de transition.

La fonction assurée par CBY1 est également retrouvée chez le xénope où CBY1 est requis pour la ciliogenèse dans les cellules multiciliées de l'épiderme embryonnaire (Shi et al., 2014). Ainsi, ces études confirment le rôle clé de CBY1 dans la ciliogenèse au cours de l'évolution.

2) FAM92A/B

Très récemment, il a été montré que CBY1 interagit avec FAM92A et FAM92B (family with sequence similarity 92) (Li et al., 2016b). Des analyses bio-informatiques prédisent que ces protéines possèdent un domaine BAR (Bin/amphiphysin/Rvs), qui permet à la fois l'interaction de protéines avec des surfaces membranaires lipidiques et la courbure des membranes. Les protéines à domaine BAR interviennent tout particulièrement dans le processus d'endocytose, de fusion et de fission vésiculaire (Daumke et al., 2014). Cette même étude montre que FAM92A et FAM92B co-localisent avec CBY1 au niveau du centriole père/corps basal. De futures études seront nécessaires pour déterminer si FAM92A et FAM92B sont des composants propres à la zone de transition et interagissant fonctionnellement avec des modules de la zone de transition. L'inhibition de FAM92A en cellules RPE1 inhibe la ciliogenèse et la surexpression de CBY1 et FAM92A/B en cellules U2OS induit la formation de larges structures membranaires tubulaires riches en Rab8. Ceci expliquerait en partie comment CBY1 facilite la ciliogenèse, le recrutement de vésicules Rab8 positives et l'assemblage de la vésicule centriolaire.

3) Protéines ESCRT

D'autres composants de la zone de transition ont été identifiés dans une analyse protéomique de la zone de transition chez *Chlamydomonas*. On y retrouve des protéines de transport impliquées dans le complexe de tri (ESCRT) (Diener et al., 2015). Ces protéines ESCRT interviennent dans le bourgeonnement des vésicules à partir de la surface cellulaire et pourraient avoir un rôle similaire dans les cils (Olmos and Carlton, 2016). En effet, les cils déversent des vésicules extracellulaires qui, chez *Chlamydomonas et C. elegans*, jouent des rôles fonctionnellement importants (Wood et al. 2013; Maguire et al., 2015). Les protéines ESCRT jouent également un rôle de médiateur dans l'élimination des midbodies au cours de la cytokinèse, un processus qui s'apparente à l'autotonie, c'est à dire à la déflagellation chez *Chlamydomonas* par coupure des microtubules à la zone de transition (Quarmby, 2004; Olmos and Carlton, 2016).

4) DZIP

Ce crible protéomique chez *Chlamydomonas* a également identifié des protéines possédant des motifs appartenant à la famille DZIP-like (Deleted in azoospermia (DAZ)-interacting protein-like). Chez les mammifères, on distingue le gène *DZIP1* (Deleted in azoospermia interacting protein 1) et son paralogue *DZIP1L* (Deleted in azoospermia interacting protein 1 like). *DZIP1* est l'orthologue humain du gène *Iguana* chez le poisson zèbre où il fût tout d'abord identifié. Les protéines de cette famille possèdent une signature protéique en doigt de zinc de type C2H2 en position N-terminale. Elles possèdent également toutes des domaines d'interaction protéique de type coiled-coil.

Chez l'Homme, le gène *DZIP1* est exprimé de façon prédominante dans les cellules souches embryonnaires et les cellules germinales (Moore et al., 2004). Les poissons zèbres mutants pour *DZIP1*/*Iguana* présentent d'une part, une anomalie de la plaque du plancher qui permet l'organisation au niveau ventral du tube neural, associé à des défauts de la voie Hedgehog. D'autre part, ce mutant présente chez l'embryon des anomalies morphologiques telles qu'une courbure importante de la queue ainsi qu'une

distance réduite entre les yeux (Brand et al., 1996; Wolff et al., 2004). L'implication de la protéine DZIP1 dans la voie Hedgehog a ensuite été décrite chez la souris révélant un rôle dans la régulation du turnover des protéines activateurs et répresseurs Gli (Wang et al., 2013a). De plus, DZIP1 joue également un rôle dans la ciliogenèse, à la fois chez le poisson zèbre dans les cellules de Küpffer (Tay et al., 2009) mais aussi en culture de cellules de mammifères (Wang et al., 2013a; Zhang et al., 2015a; Glazer et al., 2010). En effet, des études *in vitro* ont révélé que DZIP1 est nécessaire au recrutement de CEP164 et IFT88 au centriole. Par ailleurs, la localisation de DZIP1 et son paralogue DZIP1L sont controversées. Certaines études les localisent aux deux centrioles, alors que d'autres localisent DZIP1 uniquement au centriole père (Glazer et al., 2010; Wang et al., 2013). Il a également été montré que l'inhibition simultanée de l'expression de *DZIP1* et *DZIP1L* en cellule RPE1, provoque une diminution de la ciliogenèse. Ainsi, il a été proposé que DZIP1 et DZIP1L exerceraient des fonctions redondantes dans la ciliogenèse. Enfin, DZIP1 a été identifiée comme potentiel interacteur de CBY1 dans un crible protéomique, mais non confirmé pour l'instant (Li et al., 2016b).

Il reste à élucider les fonctions précises de DZIP1 et DZIP1L à la zone de transition et déterminer si l'on peut les relier physiquement ou fonctionnellement aux modules précédemment décrits des protéines cœur de la zone de transition.

5) CEP162

Pour terminer, la protéine CEP162 se localise à l'extrémité distale des centrioles et fut identifiée comme nouveau composant de la zone de transition (Wang et al., 2013b). En effet, CEP162 interagit avec des protéines de la zone de transition comme CEP290 et son absence conduit à un arrêt de la ciliogenèse en raison de l'absence de mise en place de la zone de transition à l'intérieur de la vésicule ciliaire. La perte de CEP162 conduit à la perte de localisation à la base du cil de certaines protéines de la zone de transition comme RPGRIP1L, NPHP1, TMEM67 et TCTN2. CEP162 n'a pour l'instant pas été reliée à un complexe protéique de la zone de transition, mais joue clairement un rôle crucial dans sa mise en place.

II-3) Conservation des protéines de la zone de transition

Des études de bio-informatiques concernant des protéines localisées à la zone de transition, menées dans différents modèles génétiques montrent une hétérogénéité de conservation des protéines de la zone de transition selon les organismes. **(Tableau 1)**.

Chez *C. elegans,* dépourvus de cils motiles, nous retrouvons à la fois les protéines du complexe MKS, NPHP, ainsi que CEP290 mais CBY1, AZI1 et CEP162 n'y sont pas retrouvées. Alors que les 2 principaux modules MKS et NPHP présentent des redondances fonctionnelles chez les mammifères et *C. elegans*, le module NPHP n'est pas retrouvé chez *Drosophila melanogaster.* Sa perte pourrait être notamment compensée par CBY et DILA/AZI1, qui n'ont pas été relié fonctionnellement aux autres modules protéiques pour le moment. Le gène *CBY* n'est retrouvé que dans le génome d'espèces animales possédant des cils motiles, bien que la protéine soit également localisée et impliquée à la zone de transition dans la formation des cils primaires (Lee et al., 2014).

	Mammifères	D. *melanogaster*	C. elegans
Complexe MKS/JBTS	MKS1	CG15730	MKS-1
	B9D2	CG42730	MKSR-2
	B9D1	CG14870	MKSR-1
	CC2D2A	CG43370	MKS-6
	TMEM67	CG15923	MKS-3
	TMEM216	CG8116	MKS-2
	TMEM17	CG15642	TMEM-17
	TMEM218	Aucun	TMEM-218
	TMEM237	Aucun	JBTS-14
	TMEM138	CG13999	TMEM-138
	TMEM231	CG14020	TMEM-231
	TCTN1	CG42731	TCTN-1
	TCTN2		
	TCTN3		
	AHI1	CG10931*	Aucun
Complexe NPHP-1-4-8	NPHP4	Aucun	NPHP-4
	NPHP1	Aucun	NPHP-1
	NPHP8 / RPGRIP1L	Aucun	MKS-5
Complexe CEP290 - NPHP5	CEP290/NPHP6	Cep290	CEP-290
	IQCB1/NPHP5	Aucun	Aucun
Protéines de la TZ non associées à des complexes	JBTS17/C5orf42	Aucun	Aucun
	AZI1/CEP131	Dila	Aucun
	CBY1	Cby	Aucun
	CEP162	CG42699	Aucun
	FAM92(A/B)	CG6405	Aucun
	DZIP1 (L)	CG13617	Aucun

Tableau 1 : *Tableau résumant la conservation des protéines de la zone de transition entre les mammifères et deux invertébrés, la drosophile et le nématode.*
La plupart des protéines du complexe MKS/JBTS sont conservées chez la drosophile et le nématode. (: basé sur prédiction bio-informatique). Le complexe NPHP1-4-8 est conservé chez le nématode mais est absent chez la drosophile. Seule CEP290 et non NPHP5 est conservée parmi les deux invertébrés. Enfin, parmi les protéines n'appartenant pas à un complexe précis, JBTS17 n'a pas d'orthologue chez la drosophile et le nématode. CBY1, CEP162, FAM92(A/B) et DZIP1(L) présentent des orthologues uniquement chez la drosophile.*

Enfin, malgré le caractère essentiel démontré des protéines à la zone de transition, *Plasmodium* qui assemble des flagelles par un mécanisme non canonique de ciliogenèse cytosolique, ne possède pas d'orthologues connus de gènes codant des protéines localisées à la zone de transition.

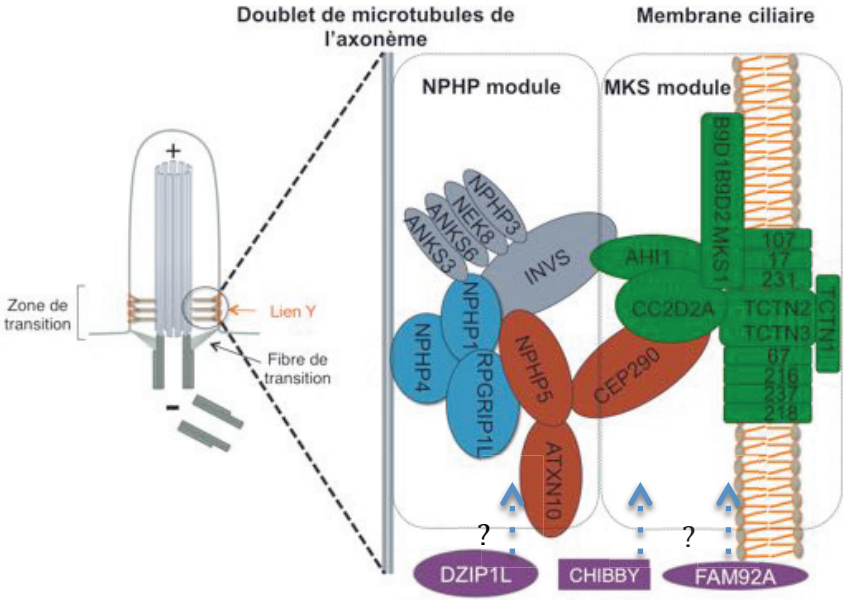


Figure 15 : *L'interactome de la zone de transition.*
Modèle proposé du réseau d'interaction entre les modules protéiques MKS, NPHP ainsi que le module permettant l'assemblage de la zone de transition, CEP290. Certaines protéines identifiées pour se comporter comme des protéines de la zone de transition dans certains organismes, n'ont pas encore été reliées à ce réseau de protéines (flèches). Schéma adapté de Garcia-Gonzalo and Reiter, 2017.

II-4) Fonctions relatives des protéines de la zone de transition

La fonction essentielle de la zone de transition durant la ciliogenèse a été révélée lorsque des ciliopathies plus ou moins sévères, telles que les syndromes de Joubert et Meckel, ou encore les néphronophtises, ont été associées à des mutations dans des gènes codant des protéines de la zone de transition (Czarnecki and Shah, 2012). Les études de la perte de fonction des composants de la zone de transition à travers l'utilisation de modèles génétiques comme la souris, la drosophile ou *C. elegans*, ont permis de révéler la fonction majeure de la zone de transition : le contrôle de l'entrée et de la sortie des composés cilaires et donc de l'assemblage et de la composition moléculaire des cils. Les mutations affectant des gènes des 2 grands modules biochimiques décrits à la zone de transition ne montrent pas la même sévérité dans les syndromes associées et sont tissus spécifiques.

Les souris mutantes pour *NPHP1* ou *NPHP4*, membres du complexe NPHP présentent des défauts ciliogéniques modérés de développement des cils des photorécepteurs de la rétine ainsi qu'une perturbation de la différenciation des spermatides (Jiang et al., 2008; Jiang et al., 2009; Won et al., 2011). Des mutations dans

le gène *RPGRIP1L* du complexe NPHP provoque la mort des souris à l'état embryonnaire ou très tôt après la naissance. De plus, les phénotypes associés sont relativement plus sévères que ceux observés dans les mutants *NPHP1* et *NPHP4* (microphtalmie, polydactylie, défaut d'asymétrie gauche/droite). Chez l'Homme, les mutations dans les gènes *NPHP1* et *NPHP4* ont seulement été associées à des néphronophtises, alors que des mutations dans le gène *RPGRIP1L*, membre du même complexe, est associé à des ciliopathies telles que le syndrome de Joubert ou Meckel (Arts et al., 2007). RPGRIP1L se comporterait donc chez les mammifères comme un membre du complexe MKS

La plupart des souris mutantes pour le gène *CEP290/NPHP6* souffrent et meurent d'hydrocéphalie avant le sevrage. Les quelques souris ne développant pas ce symptôme, survivent, sont fertiles, mais présentent cependant des défauts due à un dysfonctionnement des cils, tels qu'une dégénérescence rétinienne et des kystes rénaux (Rachel et al., 2015).

En revanche, des mutations dans des gènes du complexe MKS/JBTS conduisent à des défauts ciliogéniques plus sévères que ceux observés précédemment pour les 2 autres complexes. En effet l'absence de B9D1, MKS1 ou TCTN1 conduit chez la souris à une létalité embryonnaires ou post-natale (Weatherbee et al., 2009; Ben Chih et al., 2011; Dowdle et al., 2011; Garcia-Gonzalo et al., 2011). Ces syndromes sévères sont dus à une réduction drastique du nombre de cils en fonction des tissus. En effet, les embryons mutants pour le gène *TCTN1* sont complètement dépourvus de cils nodaux, possèdent peu de cils au niveau du tube neural, mais ne présentent pas de défaut de ciliogenèse dans les autres tissus. Ces souris présentent également des altérations de développement des membres (polydactylie) mais aussi du système nerveux central (SNC) (microphtalmie et/ou encéphalocèle occipitale). Ces phénotypes traduisent des défauts de la voie de transduction Sonic Hedgehog (SHH) et donc une implication de ces protéines dans cette voie de signalisation. La mutation chez la souris du gène *B9D1,* provoque également une quasi-absence de cils dans les cellules du nœud embryonnaire et du tube neural, alors que les cils des voies biliaires et des MEFs sont correctement formés.

La fonction des différents complexes protéiques décrits précédemment est-elle conservée à travers l'évolution ?

C. elegans possède seulement des cils primaires dans les neurones sensoriels. La ciliogenèse n'est pas altérée par la perturbation des protéines NPHP ou MKS. En revanche, elle est fortement perturbée quand ces 2 complexes sont affectés simultanément. (Williams et al., 2008a; Williams et al., 2011; Yee et al., 2015). Ceci se traduit principalement par une absence des fibres de transition et des liens Y, aboutissant à un détachement de l'axonème de la membrane (Williams et al., 2011). Cette redondance fonctionnelle est retrouvée chez la souris où les doubles mutants pour des protéines du complexe MKS et NPHP présentent des défauts de ciliogenèse plus sévères que ceux observés dans les simples mutants MKS (Yee et al., 2015). La protéine RPGRIP1L/MKS5 serait à l'interface entre les 2 complexes et permettrait l'assemblage et le recrutement de ces 2 modules (Jensen et al., 2015; Li et al., 2016a). Ce mutant présente une absence des liens Y et les protéines des complexes MKS et NPHP ne sont pas correctement localisées à la zone de transition. Cependant, l'axonème se forme en

majorité normalement. En revanche, l'axonème est perturbé dans le cas de doubles mutants *MKS5* et *NPHP4.* Ainsi, RPGRIP1L/MKS5 se comporte plus comme un membre du complexe MKS et ceci pourrait expliquer la grande sévérité des phénotypes observés chez les souris déficientes pour *RPGRIP1L* par rapport aux souris déficientes pour *NPHP1* et *NPHP4*.

Chez *C. elegans*, NPHP5 n'est pas conservé, mais CEP290 interagit et forme un module avec TMEM138 et CDKL1 (Li et al., 2016a). Ceci indique donc que chez *C. elegans*, l'organisation générale de la zone de transition en 3 complexes semble conservée.

L'ensemble de ces données et phénotypes observés chez différents mutants, indique que les protéines de ces trois modules interagissent fonctionnellement entre elles, avec parfois une fonction redondante. Malgré tout, ils possèdent des rôles distincts dans la modulation de l'assemblage et de la composition des cils.

L'étude et l'observation du comportement de ces différents modules dans l'assemblage de la zone de transition dans d'autres organismes permettraient d'améliorer les connaissances sur les interactions génétiques entre les modules et sur l'évolution de cette structure en fonction du type de cil.

De façon générale, la zone de transition en coopération avec les fibres de transition, joue un rôle de filtre, également appelé barrière de diffusion ou barrière ciliaire, nécessaire à la sélection des composants cellulaires autorisés à être acheminés dans le cil.

III-La barrière de diffusion des cils

Le cil est un compartiment unique et isolé du reste de la cellule. En effet, nous avons vu que la composition de la membrane ciliaire enveloppant l'axonème, était singulière et différente de celle de la membrane plasmique. De plus, n'ayant pas de synthèse protéique à l'intérieur du cil, le transport entre le cytoplasme et le cil de composants ciliaires doit être finement régulé. C'est la base ciliaire qui joue le rôle de filtre, de barrière de diffusion, empêchant le transport non spécifique de protéines vers le cil. Cette fonction de sélectivité est assurée par les fibres de transition, la zone de transition et l'anneau de Septine (Reiter et al., 2012) **(Figure 16)**.

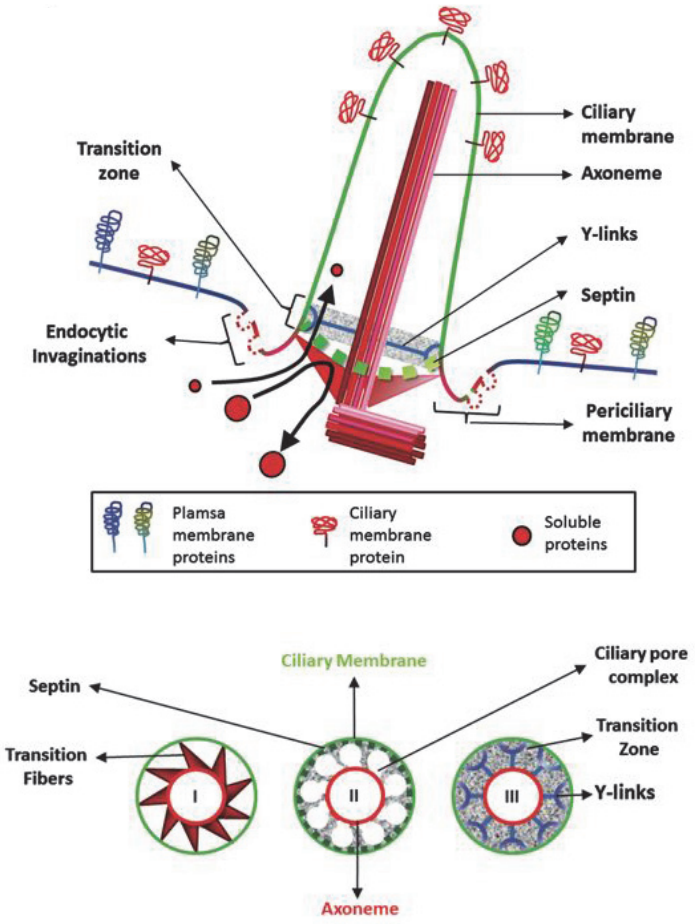


Figure 16 : *Le cil est un organite isolé du reste de la cellule comme le témoigne la membrane ciliaire qui a une composition lipidique et protéique unique, comparé à celle de la membrane plasmique. Ceci est rendu possible par la mise en place d'une barrière à la base du cil au niveau des fibres de transition, de la zone de transition, des septines ainsi que des pores ciliaires. Figure extraite de Madhivanan and Aguilar, 2014.*

III-1) Le rôle des fibres de transition dans la barrière de diffusion

Les fibres de transition exercent leur fonction de barrière de sélection en formant un filtre, localisé à l'extrémité apicale du corps basal et limitant l'entrée des molécules supérieures à 60 nm à l'intérieur du cil (Anderson, 1972) **(Figure 16)**.

Par ailleurs, les fibres de transition servent également de plateforme de stockage de vésicules et protéines à destination du cil avant l'entrée dans le cil. C'est par exemple le cas de la protéine IFT52, qui se retrouve accumulée aux fibres de transition, ou de la protéine IFT20 dont l'accumulation au centriole est permise par CCDC41. L'inhibition de cette dernière empêche le recrutement d'IFT20 au centriole et bloque la ciliogenèse à l'étape d'ancrage de la vésicule ciliaire. Enfin, CEP83 est impliquée dans le recrutement d'IFT88 à la base des cils (Deane et al., 2001; Tanos et al., 2013; Joo et al., 2013).

Les fibres de transition peuvent également agir de concert avec certaines protéines de la zone de transition dans la régulation de l'entrée de composants du cil. ARL13B est impliquée dans la formation et dans le maintien du cil. Sa localisation est notamment permise par CEP164 mais aussi par certains composants de la zone de transition tels que TCTN1, TCTN2, CC2D2A et CBY1 (Garcia-Gonzalo et al., 2011; Lee et al., 2014).

III-2) Le rôle de la zone de transition dans la barrière de diffusion

Outre un rôle dans l'assemblage des liens Y servant au maintien physique du cil à la surface de la cellule, la zone de transition agit également comme une barrière de sélection des composants destinés à être ou ne pas être dans le cil **(Figure 16)**.

Ainsi, il a été montré que les protéines de la zone de transition sont impliquées dans la bonne localisation de composants ciliaires comme des récepteurs membranaires ciliaires. En effet, la localisation constitutive au cil de deux récepteurs de la membrane ciliaire, SST3 et HTR6, est réduite en absence de B9D1, TMEM231, TMEM17 ou CC2D2A, des composants du module MKS, en cellules IMCD3 (Ben Chih et al., 2011). De plus, les protéines TCTN1, TCTN2 et CC2D2A sont nécessaires pour la localisation au cil de la GTPase ARL13B, qui à son tour, est essentielle pour la localisation d'INPP5E. Cette dernière comme indiqué précédemment est une enzyme responsable de la déphosphorylation du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PI(4,5)P2) en phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) dans le cil. (Garcia-Gonzalo et al., 2011; Garcia-Gonzalo et al., 2015). Le module MKS/JBTS possède donc une place importante dans la fonction de barrière sélective.

Néanmoins, le module NPHP participe également au bon fonctionnement de cette sélectivité du contenu ciliaire, puisque la déplétion en NPHP1 ou NPHP4 chez la souris, conduit à une mauvaise localisation de la rhodopsine dans les photorécepteurs au segment interne, au lieu du segment externe. De plus, l'absence simultanée de NPHP1 et NPHP4, ou NPHP4 seulement chez *C. elegans*, mène à une localisation anormale de particules d'IFT-B, OSM6 et OSM3 et des protéines du BBSome telles que BBS7 and BBS8 (Jauregui et al., 2008). Toujours chez *C. elegans, l*e mutant MKS5/RPGRIP1L présente une augmentation de la vitesse des particules de l'IFT à la partie proximale de l'axonème, comparé au contrôle. Ainsi, le ralentissement du trafic de ces protéines à la base de l'axonème par MKS5 pourrait suggérer une interaction entre la zone de transition et les protéines du transport intraflagellaire et donc un contrôle de la régulation des protéines ou des cargo du transport intraflagellaire (Zhao and Malicki, 2011).

Par ailleurs, les protéines de la zone de transition sont également impliquées dans la localisation de récepteurs membranaires périodiques au cil. Des études par ARN interférence révèlent que l'absence de B9D1, TMEM231, TMEM17, CC2D2A ou TCTN1 perturbe la translocation du récepteur SMO après activation de la voie Sonic HedgeHog (Garcia-Gonzalo et al., 2011; Ben Chih et al., 2011). Les phénotypes de polydactylie et d'altération du système nerveux central, observés dans des souris mutantes pour des gènes du complexe MKS s'explique donc de cette manière.

III-3) Le rôle de l'anneau de septines dans la barrière de diffusion

Dans des cellules primaires murines IMCD3 et MEFs, un des membres de la famille Septine, Septine 2 (SEPT2), est localisé à la base du cil, de façon distale aux fibres de transition, formant une structure en anneau **(Figure 16)** (Hu et al., 2010).

L'inactivation de *SEPT2* en cellules IMCD3 entraine un défaut d'assemblage et de régulation de la taille des cils. En effet, la localisation du récepteur SMO après stimulation de la voie HedgeHog à la membrane ciliaire est diminuée, et la localisation du récepteur ciliaire HTR6 est réduite (Hu et al., 2010). Toujours en IMCD3, la perte de SEPT2 perturbe le recrutement de certaines protéines de la zone de transition comme B9D1 et CC2D2A et TMEM231 (Ben Chih et al., 2011).

Chez l'Homme, les septines ne sont pas localisées à la base du cil mais uniquement le long des cils, comme observé pour les septines 2, 7 et 9 dans des cellules humaines de la rétine hTERT-RPE1 et ARPE19 (Ghossoub et al., 2013). L'inhibition des septines 7 et 9 provoque une diminution du nombre de cellules ciliées et un raccourcissement des cils. Les septines sont également exprimées dans les flagelles de spermatozoïdes de mammifères. Elles sont majoritairement localisées à l'annulus, qui est une structure séparant la pièce intermédiaire et la pièce terminale où sont retrouvées certaines protéines de la zone de transition. Les souris mâles mutantes pour *SEPT4* sont stériles, l'annulus est absent et le flagelle possède une courbure anormale. Ceci témoigne du rôle essentiel des septines dans la mise en place du flagelle de spermatozoïde (Ihara et al., 2005).

Chez le poisson zèbre, les septines sont localisées à la fois à la base des cils mais aussi dans l'axonème, comme SEPT7, dans les cils du rein de la placode nasale ou du canal de la moelle épinière. La protéine SEPT6 est également localisée tout le long des cils dans le pronéphros. Son inactivation provoque chez l'embryon une réduction de la densité ciliaire dans certains organes comme le pronéphros, le tube neural et la vésicule de Küppfer (Zhai et al., 2014). Ces défauts conduisent à des phénotypes typiques de défauts ciliaires comme une hydrocéphalie, des kystes rénaux ou encore des défauts d'asymétrie des organes.

IV-Extension de l'axonème et de la membrane ciliaire

Suite à la mise en place de la vésicule ciliaire et de la zone de transition, la polymérisation des microtubules ciliaires à l'intérieur de cette vésicule, provoque son évagination, enveloppant alors intégralement l'extrémité apicale du corps basal et formant alors une sorte de gaine. De façon concomitante, l'allongement de la vésicule ciliaire est permis par la fusion de vésicules secondaires avec celle-ci **(Figure 17)**. De plus, ces vésicules secondaires apporteraient également des composants ciliaires (voir plus tard dans ce manuscrit).

Le corps basal vient ensuite s'ancrer à la membrane plasmique via la fusion de la gaine ciliaire avec celle-ci, formant la poche ciliaire qui enchâsse le cil, alors exposé à l'extérieur de la cellule. L'axonème sera allongé grâce au transport intraflagellaire.

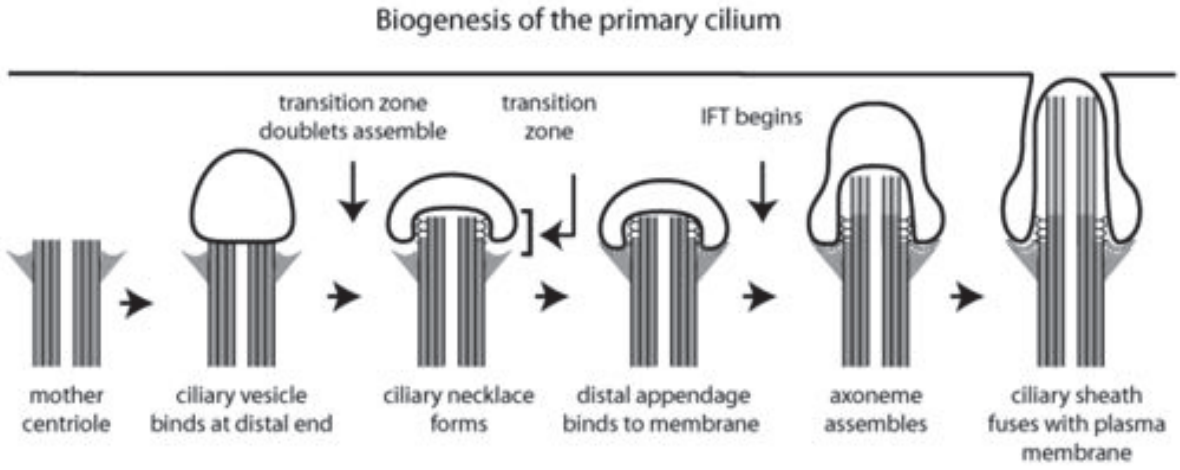


Figure 17 : *Modèle proposé dérivé de celui de Sorokin représentant la biogénèse du cil primaire. Figure extraite de Rohatgi and Snell, 2010.*

IV-1) Le transport intraflagellaire

L'allongement du cil, et de l'axonème en son sein, nécessite un mode de transport spécifique afin d'acheminer les composants ciliaires de la base du cil vers son extrémité. Il s'agit du transport intraflagellaire (IFT) **(Figure 18)**.

Les premières études ont révélé que l'ajout de sous-unités à l'axonème est réalisé à l'extrémité distale du cil (Johnson and Rosenbaum, 1992). La présence d'un filtre de sélection des composants ciliaires et l'absence de synthèse protéique dans le cil, implique la nécessité d'un mécanisme de transport actif. Ainsi, le transport intraflagellaire (IFT), permet de délivrer les différents composants ciliaires de la base du cil à son extrémité.

L'IFT a été initialement observé dans le flagelle de *C. reinhardtii* (Kozminski et al., 1993), puis dans d'autres organismes comme *Caenorhabditis elegans* (Hao et al., 2009), et dans les cellules de mammifères (Williams et al., 2014; Ishikawa and Marshall, 2015). Les particules de l'IFT s'associent en structures appelées trains d'IFT, qui se déplacent de la base vers l'extrémité du cil dans le transport antérograde, et de l'extrémité du cil vers sa base dans le transport rétrograde. Récemment, par une approche combinant microscopie électronique et fluorescence (CLEM), une étude a révélé que les trains d'IFT antérograde et rétrograde circulent respectivement sur les microtubules B et A de l'axonème (Stepanek and Pigino, 2016) expliquant pourquoi ces complexes protéiques ne se rencontrent pas à l'intérieur du cil.

Le processus de l'IFT peut être divisé en 2 phases distinctes. Premièrement, les particules et trains d'IFT sont assemblés à la base du cil où ils se lient à leurs cargos ciliaires et sont transportés vers l'extrémité distale du cil par le transport antérograde. Puis, arrivées à l'extrémité du cil, les protéines cargos sont déchargées et les particules de l'IFT sont remodelées et commutent vers un mode de transport rétrograde. Ainsi, les particules de l'IFT impliquées dans le transport antérograde sont acheminées à la base du cil où elles sont recyclées pour un autre cycle de transport (Taschner and Lorentzen, 2016).

Afin d'identifier la composition protéique de ces trains d'IFT, différentes études ont été réalisées (Piperno and Mead, 1997; Cole et al., 1998). Au final, ont été identifiés 2 sous-complexes protéiques : IFT-A et IFT-B. Le nom de chaque composant à l'intérieur d'un sous-complexe provient de leurs poids moléculaires. Leur localisation est enrichie à la base du cil et est détectable par immunofluorescence sous la forme de marquage ponctuel le long de l'axonème (Ishikawa and Marshall, 2015; Taschner and Lorentzen, 2016).

A présent 6 sous-unités ont été associées au sous complexe IFT-A (IFT144, 140, 139, 122, 121, et 43) et 16 sous-unités ont été associées au sous-complexe IFT-B (IFT172, 88, 81, 80, 74, 70, 57, 56, 54, 52, 46, 38, 27, 25, 22, et 20). Les sous-unités du complexe de l'IFT-B s'associent pour former des particules IFT qui vont servir d'intermédiaire pour lier à la fois les cargos protéiques à transporter dans le cil et les moteurs moléculaires grâce à qui le déplacement est rendu possible.

Ainsi, le complexe IFT-B/cargos est fixé sur des kinésines de la famille des kinésines II qui sont nécessaires au transport antérograde des protéines ciliaires. De plus, le transport antérograde est également nécessaire au déplacement à l'extrémité distale du cil, de protéines nécessaires au transport rétrograde. Les composants du mode de transport rétrograde sont les sous-unités du complexe de l'IFT-A et les dynéines. De la même façon que pour le transport antérograde, les particules de l'IFT-A servent d'intermédiaires pour lier à la fois les protéines ciliaires à éliminer du cil et les moteurs moléculaires de type dynéines.

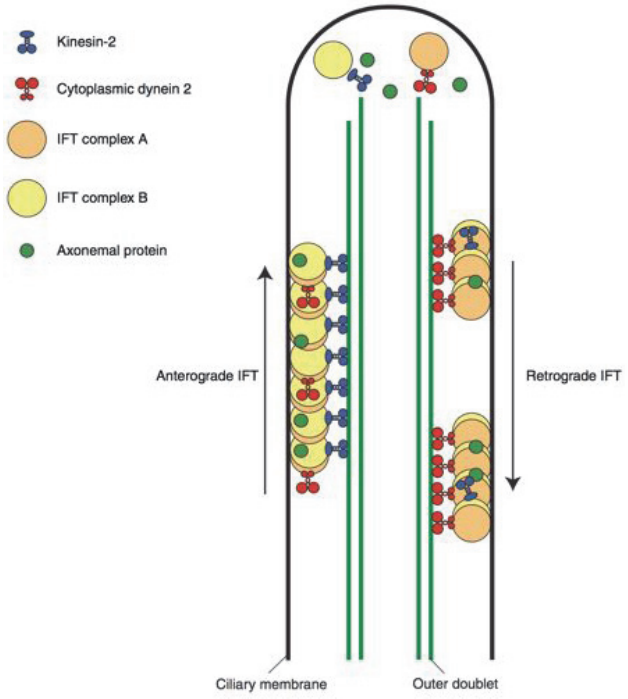


Figure 18 : *Le transport intraflagellaire (IFT). Les protéines destinées à être véhiculées dans le cil sont prises en charge par les protéines de l'IFT qui sont accumulées au niveau des fibres de transition. Les particules IFT s'assemblent à la base des cils. Le transport antérograde est assuré par les particules du complexe de l'IFT-B qui sont associées à la kinésine II. Les particules du complexe de l'IFT-A sont également transportées à l'extrémité distale du cil par les celles du complexe de l'IFT-B. Ainsi, à l'extrémité du cil, un remodelage des particules est opéré et celles du complexe IFT-A s'associent à des dynéines et assurent le transport rétrograde. Les particules de l'IFT-B sont recyclées à la base du cil par ce transport rétrograde. Schéma extrait de Ishikawa and Marshall, 2017.*

L'analyse de mutants de gènes codant des protéines composant les complexes de l'IFT-A et B a permis de révéler les fonctions essentielles de ce mode de transport dans l'assemblage et le maintien des cils.

Les mutants pour des gènes du module IFT-A présentent des défauts similaires à ceux observés chez le mutant pour la dynéine 2 cytoplasmique, à savoir des cils plus courts avec accumulation de protéines du complexe IFT-B à certains endroits du cil (Tran et al., 2008; Iomini et al., 2009). Les mutants pour des gènes du module IFT-B ont des défauts de ciliogenèse plus sévères tels que l'inhibition complète de l'assemblage des flagelles chez *Chlamydomonas* ou une réduction de la taille des cils chez la souris (Pazour et al., 2000; Tsao and Gorovsky, 2008). Ces défauts ressemblent à ceux observés chez les mutants pour la kinésine II. Afin d'illustrer ceci, l'absence chez la souris d'IFT122, un composant du module IFT-A, conduit à une diminution drastique de la taille des cils dans des MEFs et dans les cellules du noeud embryonnaire (Cortellino et al., 2009). On retrouve associé à ces cils, des renflements à leur extrémité distale, en raison de l'accumulation de protéines, avec en particulier celles impliquées dans le transport antérograde, témoignant du rôle d'IFT122 dans le transport rétrograde.

IV-2) Le BBSome

Les particules de l'IFT s'associent et prennent en charge leur cargo à transporter avant leur entrée dans le cil, au niveau des fibres de transition. Leur assemblage implique la présence d'un autre complexe très conservé résidant à la base des cils : le BBSome. Ce complexe, découvert en 2007, est composé de 8 protéines (BBS1-2-4-5-7-8-9 et BBIP10/BBS18) et seule BBS4 est localisée également aux satellites centriolaires (Loktev et al., 2008; Nachury et al., 2007) **(Figure 19)**.

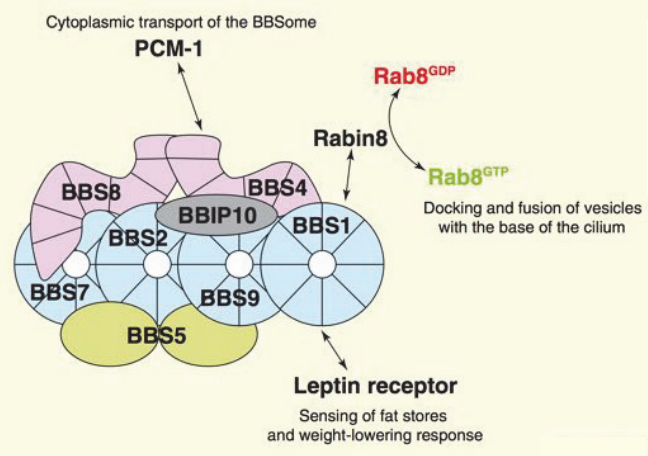


Figure 19: *Structure et composition du complexe BBSome. Figure extraite de Jin and Nachury, 2007.*

L'association du BBSome débute avec la stabilisation de BBS7 par 3 protéines similaires à des chaperonines, BBS3, BBS10 et BBS12, qui se lient à BBS7. Ceci permet l'assemblage du cœur du BBSome composé par BBS2, BBS7 et BBS9. S'ajoutent ensuite les sous-unités BBS1, BBS5 et BBS8. Le pré-BBSome est alors transporté au corps basal où s'ajoute le dernier constituant, BBS4, afin de former le complexe final appelé « holo-BBSome » alors capable d'entrer dans le cil.

Outre le fait de permettre avec les particules de l'IFT d'acheminer des protéines permettant la croissance de l'axonème, le BBSome est également impliqué dans le véhiculage de protéines ou récepteurs nécessaires à la transduction de voie de signalisation, comme le récepteur SMO ou la protéine SSTR3.

Etant donné que les particules de l'IFT subissent un remodelage à l'extrémité distale du cil afin d'être ramenées à la base du cil pour le recyclage, il est proposé que le BBSome soit impliqué dans l'assemblage des particules de l'IFT à la base mais aussi à l'extrémité des cils chez *C. elegans* (Wei et al., 2012). Par ailleurs, le BBSome interagit également avec Rabin8 à la base du cil permettant l'activation de Rab8 ce qui conduit à l'extension de la membrane ciliaire (Nachury et al., 2007). Le syndrome de Bardet-Biedl, caractérisé notamment par une obésité, une dystrophie rétinienne, des malformations rénales et une polydactylie, est la conséquence de mutations affectant une majorité de gènes de ce complexe ou de composants nécessaires à la régulation de son assemblage (Jin and Nachury, 2009).

Le BBSome, en collaboration avec la zone de transition participe à la sélection et au transport du contenu protéique vers le cil. Les souris mutantes pour *TCTN1* ou *BBS1* ont une densité en cil à peu près normale alors que le double mutant pour ces gènes n'a pas de cil (Yee et al., 2015). Les protéines composant le BBSome étant associées et trafiquant avec les particules de l'IFT, il se pourrait que certaines protéines de la zone de transition et du BBSome exercent des fonctions redondantes dans la ciliogenèse dépendante du transport intraflagellaire (Lechtreck et al., 2009; Wei et al., 2012; Williams et al., 2014). En effet, ces protéines pourraient permettre le chargement de protéines cargo, comme la tubuline, sur les particules de l'IFT (Craft et al., 2015) ou permettre l'entrée dans le cil des protéines de l'IFT en cas de zone de transition défectueuse. Cependant, il reste à élucider comment se fait l'interaction entre les protéines de la zone de transition et ces complexes de trafic intraflagellaire.

L'activité du BBSome doit donc être finement régulée. Il a été montré que la zone de transition, et plus précisément CEP290/NPHP6 et son interacteur NPHP5, sont nécessaires à la cohésion du complexe BBSome. En effet, la déplétion en NPHP5 ou CEP290 provoque respectivement la dissociation et la perte de localisation de BBS2, BBS5 et de BBS8 (Barbelanne et al., 2015).

IV-3) Acheminement des protéines vers le cil

L'allongement du cil nécessite l'acheminement à la base du cil de composants en provenance du cytoplasme tel que des protéines et des lipides. Ces composants permettront l'élongation à la fois de la gaine ciliaire mais aussi de l'axonème, via le mécanisme de transport propre au cil. L'acheminement des composants vers la base du cil se fera par des mécanismes de diffusion pour les protéines cytosoliques, ou de transports membranaires pour les protéines transmembranaires (Sung and Leroux, 2013).

a) Les motifs de ciblage au cil

La prise en charge et l'acheminement des protéines localisées dans les citernes du réseau trans-golgien (TGN = Trans Golgi Network) à destination du cil, est notamment permise via l'identification de séquences de ciblage ciliaire (CTS = Ciliary Targeting Sequence). Elles sont présentes dans la séquence protéique de certaines protéines et notamment des récepteurs ciliaires. Ces motifs semblent nécessaires, mais pas indispensable selon les protéines, à leur bonne localisation. Ces séquences sont le plus souvent retrouvées dans la région C-terminale des protéines et moins fréquemment en N-terminale. On en trouve également dans des boucles intracellulaires de protéines possédant plusieurs domaines transmembranaires. Ces séquences de ciblages sont diverses et suggèrent une prise en charge de ces composants par différents acteurs.

Le motif de séquence majoritairement retrouvé est le motif VxP, spécifique des protéines transmembranaires ou associées aux membranes tels que certains récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), des récepteurs polycystine 1 et 2, de la rhodopsine ou

de la protéine INPP5E (Deretic et al., 1998). Cependant ce motif ne semble pas être essentiel pour la localisation de certaines protéines puisqu'une mutation dans le motif VxP dans la région C-terminale d'INPP5E n'influe pas sur sa localisation ciliaire (Humbert et al., 2012). Un autre type de motif, existe, AxxxQ et est présent dans la troisième boucle intracellulaire des récepteurs SSTR3 et HTR6 (Berbari et al., 2008). Ceci concernerait les protéines associées aux membranes.

b) L'implication du transport intraflagellaire

Outre la prise en charge des composants ciliaires à la base du cil vers le cil, des composants du transport intraflagellaire tel que IFT20, semblent faciliter le transport vers le cil de protéines cytoplasmiques. En effet, sa diminution d'expression n'influe pas la longueur du cil mais affecte plutôt la localisation de la polycystine 2, une protéine transmembranaire. De façon cohérente, IFT20 a été trouvée localisée au niveau de l'appareil de Golgi, ce qui suggèrerait un rôle dans le transport vers le cil de protéines issues du Golgi. Cette fonction semble unique à quelques protéines de l'IFT puisque la suppression d'IFT88 ne reproduit pas de phénotype similaire (Follit et al., 2006).

c) La cascade Rab11-Rabin8-Rab8

La cascade Rab11-Rabin8-Rab8 est également impliquée dans l'acheminement de composants à la base des cils. Dans les cellules photo-réceptrices chez le xénope, la surexpression du variant Rab8 bloqué dans sa forme GTP conduit à l'accumulation de vésicules riches en rhodopsine à proximité du corps basal (Moritz et al., 2001). D'autres études ont ensuite révélé que Rab8 est localisée à la membrane ciliaire et est un constituant majeur qui conduit à la formation du cil (Nachury et al., 2007; Cortellino et al., 2009). La fusion des vésicules riches en Rab8 à la membrane ciliaire est également permise par le complexe de l'exocyste. Ce dernier est un complexe constitué de 8 protéines et impliqué dans le trafic et l'attachement de vésicules. La protéine Sec15 du complexe de l'exocyste est localisée, comme Rab8, tout le long de la membrane du cil en cellules hTRT-RPE1. Sa déplétion résulte en une forte réduction de la taille des cils (Feng et al., 2012). Sec15 interagirait avec Rabin8 et cette interaction est renforcée par la phosphorylation de Rabin8 par NRD2, une kinase montrée pour avoir un rôle au cil (Chiba et al., 2013). L'effet de la déplétion de Sec15 sur l'activation de Rab8 et comment Sec15 est acheminée au corps basal n'ont pas été analysés.

d) Translocation de protéines transmembranaires

Bien que la plupart des mécanismes de ciblage au cil implique la distribution de protéines cytoplasmiques via une voie vésiculaire, une importante alternative existe et implique la translocation de protéines transmembranaires provenant de la membrane plasmique qui entoure le cil. L'exemple le plus étudié est celui du récepteur SMO, rapidement transloqué dans le cil par diffusion latérale dans la membrane ciliaire, après

stimulation de la voie Hedghog (Briscoe and Thérond, 2013). Une étude a révélé qu'après stimulation de cette voie, SMO est rapidement transloquée de la membrane plasmique vers le cil, jusqu'à une heure après stimulation. Puis, c'est le réservoir intracellulaire de SMO qui devient la source principale de SMO ciliaire. Ce type de transport en provenance de la membrane plasmique vers la membrane ciliaire a également été rapporté chez *Chlamydomonas* pour le transport des agglutinines (Hunnicutt et al., 1990).

e) Les protéines Tubby

Un autre groupe de gènes ayant un rôle dans le trafic de protéines vers le cil est la famille de gènes Tubby (Mukhopadhyay and Jackson, 2011). Elle est constituée de Tubby et de plusieurs gènes Tubby-like (TULP = Tubby-Like Protein). L'absence des protéines codées par ces gènes conduit à une non localisation de certains récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), incluant les opsines, SSTR3, MCHR1, et NPY (Loktev and Jackson, 2013; Sun et al., 2012; Hagstrom et al., 2001). Les protéines de cette famille partagent une région C-terminale conservée qui contient 12 repliements et interagit avec les phosphoinositides (Santagata et al., 2001). La région N-terminale est plus variable et pourrait jouer plusieurs rôles, comme la liaison de TULP3 avec les membres du complexe A de l'IFT (Mukhopadhyay et al., 2010). Le fait que TULP3 soit requise au transport de RCPGs, qu'elle se lie aux phosphoinositides membranaires et à certains composants de l'IFT, a suggéré que TULP3 pourrait lier les vésicules péri-ciliaires avec les composants de l'IFT-A. Cela permettrait ainsi d'acheminer les vésicules contenant des RCPGs à proximité des fibres de transition et de la zone de transition. Des souris mutantes pour *TULP3* présentent le même phénotype que les souris déficientes pour certaines protéines du complexe BBS, à savoir un syndrome d'obésité. Ceci est associé à un défaut de recrutement du récepteur NPY2R dans les cils des neurones de l'hypothalamus, région notamment impliquée dans la régulation de la prise alimentaire. L'absence de localisation du récepteur pourrait donc expliquer l'obésité survenue chez ces souris (Loktev and Jackson, 2013).

f) Modification lipidique de protéines

Enfin, il existe un mécanisme de transport vers la membrane ciliaire, de protéines ayant subies une modification lipidique. Ces modifications permettent ainsi leur association à la membrane ciliaire et sont principalement des myristoylations dans leur région N-terminale. Ces protéines sont parfois sous forme solubles dans le cytoplasme via leurs interactions avec des polypeptides. L'acteur clé dans le transport de ces protéines ciliaires est la protéine UNC119. UNC119 a la capacité de lier les résidus myristoyle. Ainsi, NPHP3 étant myristoylée, elle est prise en charge par UNC119 et est véhiculée jusqu'à la membrane ciliaire. Il est fort probable que d'autres protéines présentant ce résidu peuvent être également acheminées vers la membrane ciliaire. (Wright et al., 2011).

La majorité des composants structuraux liés à la motilité, tels que la tubuline, les fibres radiaires et les bras de dynéines, sont solubles dans le cytoplasme de la cellule et ne nécessitent pas de transport vésiculaire pour leur acheminement vers le compartiment ciliaire. Le mécanisme de transport les impliquant est encore peu connu. Il a été suggéré que la base du cil pourrait également fonctionner de façon similaire au pore nucléaire. Ainsi, un mécanisme de transport similaire à celui utilisé pour traverser le pore nucléaire pourrait être impliqué. En effet, la kinésine KIF17 contient des séquences caractéristiques semblables au signal de localisation nucléaire (NLS) (Dishinger et al., 2010) et la délétion de ce motif empêche sa localisation au cil, renforçant cette hypothèse. De plus, alors que de nombreux composants nucléaires requièrent les Importines afin de pénétrer dans le noyau, la liaison de KIF17 et RP2 avec l'Importine β2 est nécessaire à leur bonne localisation au cil (Hurd et al., 2011). Enfin, d'autres composants du pore nucléaire comme les nucléoporines (NUP37, NUP35, NUP62, NUP93, NUP133 et NUP214) sont retrouvées au cil où elles co-localisent avec la protéine de la zone de transition CEP290. Ceci renforce donc l'hypothèse qu'une structure similaire au complexe du pore nucléaire serait présente à proximité de la zone de transition (Kee et al., 2012).

Une fois passée cette étape, le système de transport intraflagellaire ainsi que d'autres processus de transport de cargo se mettent en place et permettent de délivrer dans le cil, du matériel cytoplasmique, nécessaire à sa croissance ainsi qu'à celle de l'axonème.

V-Maintien de la stabilité des cils et flagelles – Les modifications post-traductionnelles des tubulines

Les tubulines, protéines clés de l'axonème des cils et flagelles subissent des modifications post-traductionnelles (PTM = post-translational modifications), telles que l'acétylation, la détyrosination, la glutamylation et la glycylation **(Figure 22)**. Ces modifications sont hautement conservées d'un organisme à un autre. Ces PTM ne sont pas distribuées de façon uniforme et s'accumulent principalement sur des réseaux de microtubules à longue durée de vie, comme les microtubules du corps basal ou de l'axonème. Par exemple, la détyrosination, polyglutamylation et polyglycylation des tubulines affectent en majorité le tubule B de l'axonème, alors que les tubulines du tubule A ne sont pas modifiées la plupart du temps. Ceci pourrait traduire une fonction précise affectée aux microtubules en fonction de leur position. Par ailleurs, certaines études ont montré qu'au cil, ces PTM participaient à l'assemblage, le désassemblage, la motilité des cils et la maintenance. C'est ce dernier point qui nous intéresse ici.

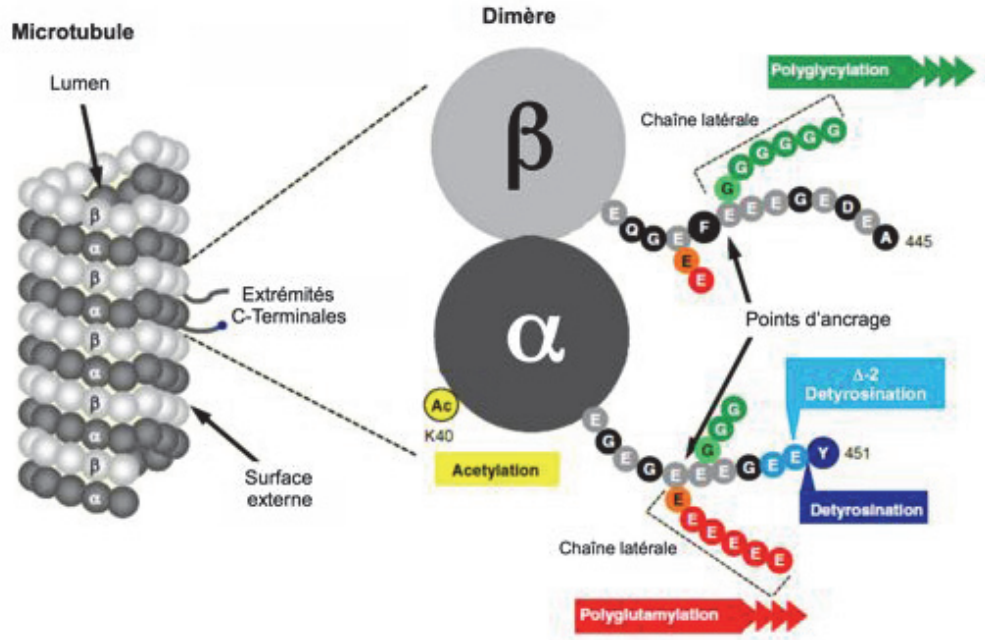


Figure 22 : *Principales modifications post-traductionnelles des tubulines. L'acétylation est réalisée en lysine 40 de la tubuline α. La glycylation et glutamylation sont réalisées sur des résidus glutamates présents dans la partie C-terminale de la tubuline α et de la tubuline β. L'élimination d'une tyrosine en position C-terminale de la tubuline α est réalisée par la détyrosination. Enfin, la Δ-2 détyrosination consiste en la suppression du dernier acide glutamique présent au niveau des tubulines déjà détyrosinées. Cette réaction est cependant irréversible. Image adaptée de Janke, 2014.*

V-1) Acétylation des tubulines

L'acétylation des tubulines a lieu uniquement sur la tubuline alpha et en majorité sur une lysine en position 40. Elle est la seule PTM connue pour être localisée dans la lumière des microtubules et affecte aussi bien les microtubules centraux qu'externes (Soppina et al., 2012). Cette modification est réalisée par une acétyltransférases, ATAT1, sur des microtubules à longue durée de vie (Shida et al., 2010). La réaction inverse de désacétylation est réalisée principalement par HDAC6 et SIRT2. Il semblerait que l'acétylation en lysine 40 favorise la cohésion entre les protofilaments des microtubules (Cueva et al., 2012). L'analyse fonctionnelle *in vitro* d'*ATAT1* via l'utilisation de siARN révèle un léger retard dans l'assemblage des cils primaire. En revanche, l'étude du mutant murins pour *ATAT1*, ne décèlent pas de défauts structurels majeurs, excepté une légère diminution de la taille des spermatozoïdes (Kalebic et al., 2013). Ceci suggère que l'acétylation n'est pas requise pour le maintien, la stabilité et la motilité des cils.

V-2) Détyrosination des tubulines

La détyrosination des tubulines résulte en l'élimination d'une tyrosine dans la région C-terminale de la tubuline α. L'enzyme responsable de cette réaction est une carboxypeptidase non identifiée pour le moment (Arce and Barra, 1983). La réaction de détyrosination est fortement présente au niveau des microtubules très stables, comme ceux retrouvés au niveau de l'axonème de très nombreux cils (Poole et al., 2001; Quinones et al., 2011). La réaction inverse est réalisée par une tubuline tyrosine ligase (TTL) sur des tubulines polymérisées en microtubules (Prota et al., 2013).

Les souris déficientes pour les TTL meurent rapidement après la naissance en raison de défauts dans l'organisation du réseau neuronal (Erck et al., 2005). Etant donné que l'enzyme impliquée dans la réaction de détyrosination n'a pas encore été identifiée, le rôle de cette modification dans l'assemblage et la fonction des cils reste encore inconnu. Cependant, des études de détyrosination *in vitro* augmentent à la fois la vitesse et la processivité de la kinésine 2 impliquée dans le transport antérograde sur le tubule B (Sirajuddin et al., 2014). Ainsi, cette modification post-traductionnelle pourrait être impliquée dans le maintien de l'assemblage du cil via la régulation du transport de cargo par le transport intraflagellaire.

Une autre modification de la forme détyrosinée des tubulines existe, la Δ2-Tubuline. Elle consiste en la suppression de l'acide glutamique dans la région C-terminale. Cette modification irréversible est fortement retrouvée au niveau de réseaux de microtubules stables tels que dans les cils mais sa fonction est également inconnue aujourd'hui (Paturle-Lafanechère et al., 1994).

V-3) Glutamylation des tubulines

La glutamylation correspond à l'addition de chaines d'acides glutamiques sur des résidus glutamates présents au niveau du domaine C-terminal des tubulines α et β. La réaction de glutamylation est générée par un sous-ensemble d'enzymes apparentées aux TTL : les glutamylases de la famille TTLL (Tubuline Tyrosine Ligase Like) (Janke et al., 2005). On dénombre plusieurs membres dans cette famille et ils diffèrent dans leurs implications de glutamylation. En effet, TTLL4, 5 et 7 sont impliquées dans l'initiation de l'addition du premier acide glutamique de la chaine alors que TTLL1, 6, 11 et 13 ont un rôle dans l'élongation de cette chaine d'acides glutamiques. TTLL7 permet à la fois d'initier l'addition de résidus glutamate mais permet aussi l'élongation de la chaine de résidus glutamate. Ces enzymes sont enrichies dans les cils et au corps basal, via leur interaction avec des protéines centrosomales ou ciliaires comme CEP41 ou FAP234 et le transport intraflagellaire (Lee et al., 2012; Kubo et al., 2014). La réaction de glutamylation est réversible et réalisée par des déglutamylases de la famille des carboxypeptidases cytosoliques (CCP1, 4, 5 et 6).

La glutamylation des tubulines au cil est impliquée à la fois dans la structure et dans la motilité des cils et des flagelles. En effet, la perte de fonction de TTLL1 dans des souris résulte en une réduction de la motilité des cils qui tapissent l'épithélium des voies respiratoires associée à des défauts d'assemblage des flagelles de spermatozoïde, tels que des troncatures d'axonèmes (Ikegami et al., 2010; Vogel et al., 2010). Les souris mutantes pour TTLL5 présentent également des défauts d'assemblage d'axonème des spermatozoïdes, puisqu'un doublet de microtubule est fréquemment manquant (Lee et al., 2013).

La motilité ciliaire est notamment contrôlée par les bras de dynéines axonémales. On distingue les bras de dynéines internes (IDA), principalement impliqués dans l'ondulation des cils, et les bras de dynéines externes (ODA), impliqués dans la fréquence de battement. Il a été montré que l'absence de TTLL6 résulte en une réduction de la fréquence de battement (Suryavanshi et al., 2010; Pathak et al., 2011). De plus, chez *Chlamydomonas*, un mutant auquel il manque les bras de dynéines externe (ODA) conserve une légère motilité ciliaire, générée par les bras de dynéines internes. Le double mutant pour les *ODA* et *TTLL9* supprime complètement cette motilité (Kubo et al., 2010). Ainsi, ces résultats indiquent que la glutamylation des tubulines est impliquée, à la fois dans la régulation des ODAs, mais aussi dans le contrôle de l'ondulation des cils par les IDAs.

V-4) Glycylation des tubulines

La glycylation des tubulines correspond à l'ajout et l'enchaînement de chaines de glycines sur des résidus glutamates, présents au niveau de la région C-terminale des tubulines α et β. Cette réaction est contrôlée par des glycines ligases qui appartiennent elles aussi à la famille des TTLL. De façon identique à la glutamylation, on retrouve des protéines impliquées dans l'initiation de la glycylation, permise notamment par TTLL3 et des protéines impliquées dans l'élongation de ces chaines de glycines, telle que TTLL10. Des études fonctionnelles en cellules épendymaires multiciliées, montrent que TTLL8 seule, ou en coopération avec TTLL3, sont impliquées dans l'assemblage ou le maintien des cils (Bosch Grau et al., 2013) et qu'une certaine redondance fonctionnelle existe parmi les protéines TTLL. Chez le poisson zèbre, une étude a montré que la diminution d'expression de *TTLL3* conduit à un changement de direction du battement ciliaire dans le pronéphron. De plus la double mutation pour *TTLL3* et *TTLL6* (impliquée dans la glutamylation) provoque une quasi absence de motilité ciliaire associée à des défauts d'ultrastructure de l'axonème (Pathak et al., 2011).

La polyglycylation des tubulines est donc également essentielle au maintien de la stabilité des axonèmes. Ces données indiquent que la glycylation et la glutamylation exercent des fonctions similaires dans le maintien de la structure des cils et la motilité.

VI-La ciliogenèse cytosolique

Précédemment, nous avons vu que la plupart des cellules génèrent un cil par la voie classique appelée ciliogenèse compartimentée, où le cil forme une protrusion à la surface de la cellule à partir d'un corps basal et est enveloppé par une extension de la membrane plasmique. Un second type de cil a été décrit et diffère principalement du type précédent par le fait que, l'axonème ou tout du moins une portion de l'axonème, se retrouve exposé au cytoplasme de la cellule.

Quatre types cellulaires sont aujourd'hui décrits pour présenter ce type de cils ou de flagelles. Les flagelles des gamètes de *Plasmodium*, de *Giardia intestinalis*, de la drosophile et des mammifères. Les mécanismes par lesquels ces types de cils sont assemblés restent largement méconnus, mais des données récentes chez la drosophile permettent de proposer des hypothèses quant à la façon dont ces différents types de cils seraient assemblés. Tomer Avidor-Reiss et Michel Leroux proposent trois modes de ciliogenèse cytosolique qu'ils ont classés selon le dégré de divergence par rapport au mode de ciliogenèse compartimenté (Avidor-Reiss and Leroux, 2015).

VI-1) Assemblage du flagelle de spermatozoïde humain

Le flagelle de spermatozoïde humain serait assemblé selon le mode de ciliogenèse cytosolique primaire car il serait initialement assemblé selon le mode compartimenté avant qu'une partie de l'axonème soit exposée au cytoplasme. Des analyses en microscopie électronique indiquent que l'initiation de la croissance de l'axonème associé à un corps basal aurait lieu dans le cytoplasme des spermatocytes humains, ce qui n'est pas observé lors de la spermatogenèse chez la souris où le centriole s'ancre à la membrane plasmique avant que le flagelle initie son élongation **(Figure 20)**.

Cet axonème du flagelle est allongé grâce au transport intraflagellaire (Mykytyn et al., 2004; Lo et al., 2012). Par la suite, le corps basal et le flagelle sont invaginés dans la cellule et le corps basal va s'ancrer au noyau. Ceci forme donc à cette étape un cil motile complètement compartimenté. A l'extrémité distale du corps basal, à la base du cil compartimenté se trouve l'annulus, une structure composée notamment de septines. (Toure et al., 2011). Cette structure va migrer le long de l'axonème et s'éloigner du corps basal, découvrant l'axonème mobile et mature, exposé au cytoplasme (Kwitny et al., 2010). Ainsi, l'axonème mature se compose de deux portions. La portion courte, avec l'axonème exposé au cytoplasme qui constitue la pièce intermédiaire où vont se positionner les mitochondries, et la portion distale longue de l'axonème du flagelle qui est compartimentée et correspond à la pièce terminale. Entre les 2 pièces se situe l'annulus où sont notamment retrouvées apposées, certaines protéines de la zone de transition (Basiri et al., 2014). Plus tard, le phénomène d'individualisation éliminera le cytoplasme présent autour de la pièce intermédiaire.

Les mécanismes d'assemblage sont peu connus, mais les quelques études réalisées ont montré que l'IFT et le BBSome sont essentiels pour la formation des spermatozoïdes chez les mammifères (Fath, 2005; Kierszenbaum et al., 2011; Lehti et al., 2013; Lo et al., 2012; Mykytyn et al., 2004). En effet, les souris mutantes pour *IFT88* et *KIF3A* (une sous-unité de la kinésine II) présentent des flagelles plus courts voire absents. Ceci indique que les protéines de l'IFT semblent requises pour l'assemblage de la portion compartimenté et non compartimenté de l'axonème. Plus précisément, ces composants pourraient être nécessaires pour la ciliogenèse compartimentée, qui précède la décompartimentation et l'exposition d'une portion de l'axonème au cytoplasme (Kierszenbaum et al., 2011; Lehti et al., 2013; Lo et al., 2012). De plus, le fait que les kinésines KIF3A et IFT88 soient présentes le long du flagelle au cours de la spermiogenèse chez les rongeurs (Hall et al., 2013; Kierszenbaum et al., 2011), laisse imaginer que la machinerie de l'IFT participerait à la maintenance de l'axonème compartimenté après l'initiation de la ciliogenèse cytosolique.

Enfin, la localisation de protéines de la zone de transition (CEP290 et MKS1) apposée à l'annulus (Basiri et al., 2014), pourrait avoir une fonction dans la distinction de l'axonème compartimenté et non compartimenté. Le rôle d'AZI1/CEP131, une autre protéine de la zone de transition, a également été mis en lumière chez les mammifères dans l'assemblage du flagelle de spermatozoïde. En effet, les souris mutantes pour *AZI1*, présentent une forte réduction du nombre de spermatozoïde et sont plus courts que les spermatozoïdes contrôles. Ils présentent également une distribution anormale en tubulines acétylées ainsi qu'en IFT88 (Hall et al., 2013).

Ainsi, les protéines de la zone de transition et les composants de l'IFT/BBSome pourraient réaliser des fonctions non canoniques lors de la ciliogenèse compartimentée, durant la spermatogenèse chez les mammifères.

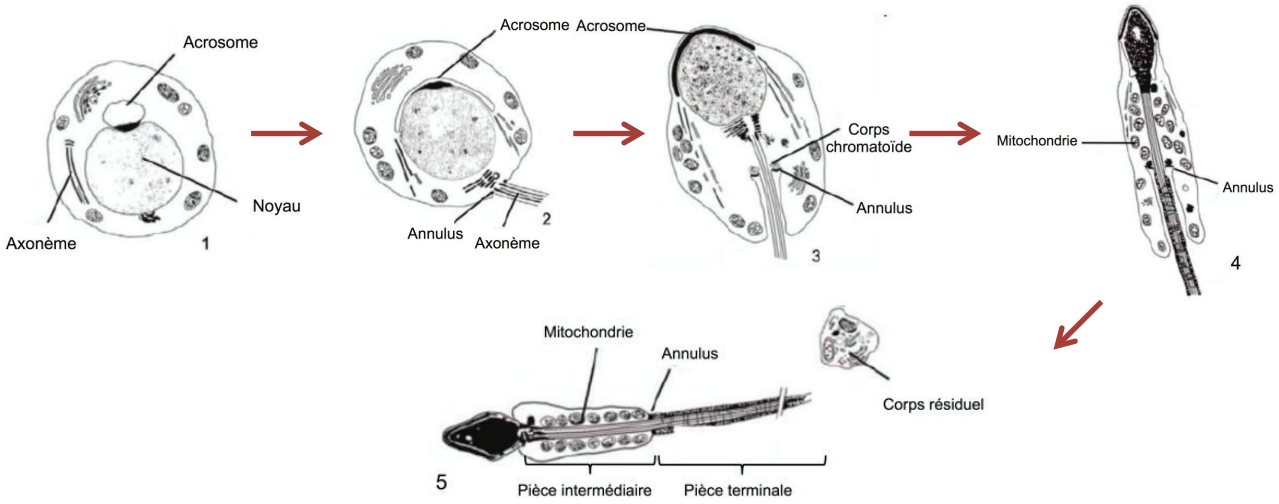


Figure 20: *Assemblage général du flagelle de spermatozoïde chez l'Homme.*
Un axonème est nucléé à partir du centriole dans le cytoplasme et l'acrosome, un dérivé de l'appareil de Golgi, s'assemble à proximité du noyau (1). Puis, l'ensemble corps basal-axonème s'ancre à la membrane plasmique et l'acrosome s'étale autour du noyau (2). Par la suite, le corps basal et l'axonème associé, invaginent la membrane plasmique en retournant dans le cytoplasme et s'ancrent au noyau. Une structure, l'annulus, se forme à l'extrémité distale du corps basal et commence à s'éloigner de celui-ci, exposant l'axonème au cytoplasme (3). Au niveau de la pièce intermédiaire correspondant à la région décompartimentée de l'axonème, s'associent des mitochondries au cours de la migration de l'annulus (4). La fin de la spermiogenèse marque 2 régions sur le flagelle : une région compartimentée (pièce terminale) et une région non compartimentée (pièce intermédiaire), toute deux séparées par l'annulus. Le cytoplasme est éliminé dans le corps résiduel (5). Images adaptées de Toure et al., 2011.

VI-2) Assemblage du flagelle de Giardia intestinalis

Le flagelle de *Giardia intestinalis* serait également assemblé selon le mode de ciliogenèse primaire. Il présente des similarités avec celui des mammifères dans le sens où l'axonème du flagelle présente à la fois une région cytosolique et une région distale compartimentée. L'axonème est toujours nucléé à partir du corps basal (Nohynková et al., 2006), mais le fait que les composants de la zone de transition ne soient pas conservés chez *Guardia* ne permet pas d'expliquer clairement comment la région cytosolique est formée. Quant aux protéines de l'IFT, elles sont retrouvées à la région cytosolique de l'axonème ainsi qu'au segment ciliaire lié à la membrane. L'utilisation de dominant négatif et la déplétion de la kinésine 2 résulte en un raccourcissement de la portion compartimentée, indiquant que l'IFT est seulement requise pour la ciliogenèse compartimentée chez *Guardia* (Hoeng et al., 2008; Carpenter and Cande, 2009).

VI-3) Assemblage du flagelle de spermatozoïde chez la drosophile

La formation du flagelle de spermatozoïde de la drosophile est décrite comme un mode de ciliogenèse secondaire et il se réalise indépendamment du transport intraflagellaire. Par contre des données récentes montrent qu'elle requiert les protéines de la zone de transition. Ce mécanisme d'assemblage chez la drosophile sera décrit plus loin dans ce manuscrit.

VI-4) Assemblage du flagelle de spermatozoïde chez Plasmodium

L'assemblage du flagelle de *Plasmodium* constitue le mode tertiaire de ciliogenèse cytosolique. Durant la gamétogenèse, les corps basaux et les axonèmes sont assemblés rapidement dans le cytoplasme par une structure amorphe jouant le rôle de centre organisateur des microtubules près de la membrane plasmique. Puis, un phénomène appelé exflagellation provoque l'interaction des axonèmes, alors ancrés aux noyaux, avec la membrane plasmique, exposant ainsi les flagelles enveloppés de membranes à l'extérieur de la cellule pour former des gamètes individuels. Ainsi, il apparaît que le flagelle de *Plasmodium* se forme intégralement dans le cytoplasme. D'autres études seront nécessaires pour déterminer si l'extrémité distale de l'axonème est lié ou non à la membrane étant donné la rapidité de ce mode de ciliogenèse (environ 15 minutes) (Tembhare et al., 2009). Enfin, l'absence simultanée chez cet organisme des composants de l'IFT et de la zone de transition renforce l'idée qu'un mécanisme membranaire n'est pas impliqué (Briggs et al., 2004; Sinden et al., 2010).

Ces modes d'assemblages cytosoliques **(Figure 21)** sont donc assez différents du mode d'assemblage classique compartimenté beaucoup plus répandu. Néanmoins, il fournit de sérieux avantages. En effet, chez *Plasmodium*, nous avons vu que la ciliogenèse était réalisée en 15 minutes. De plus, des cils plus longs pourraient de cette façon être assemblés, comme c'est le cas chez la drosophile où le flagelle mesure environ 2 millimètres. Le transport intraflagellaire ne pouvant peut être assurer que la formation de cils et flagelles plus courts. Enfin, ce mode d'assemblage cytosolique permettrait de fournir la demande importante en énergie pour le battement des flagelles chez les mammifères. En effet, autour de la pièce intermédiaire comportant l'axonème non-compartimenté, s'assemblent des mitochondries cytoplasmiques. Ceci n'est pas possible lorsque l'axonème est compartimenté, comme c'est le cas dans la pièce terminale qui se retrouve à l'intérieur d'une membrane.

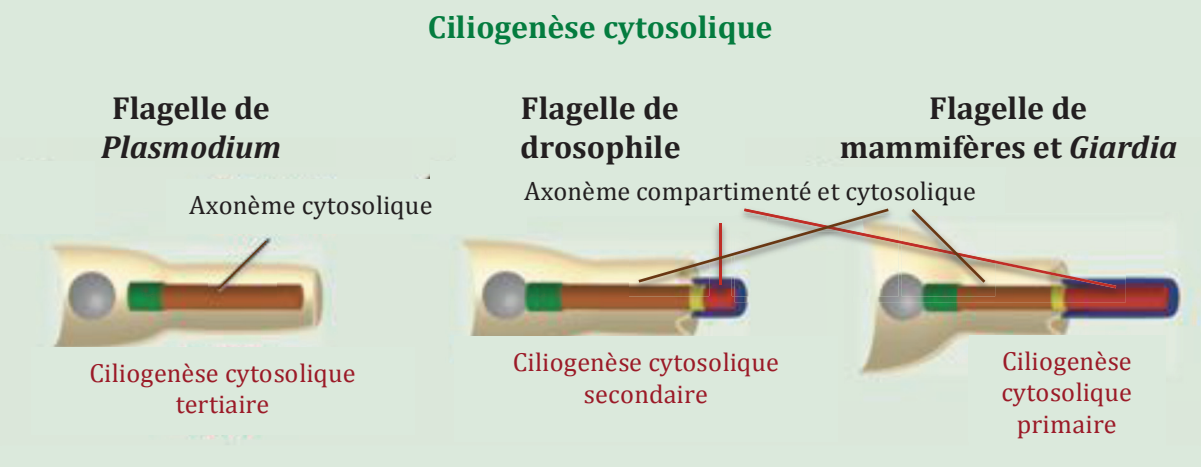


Figure 21 *: Schéma illustrant les différents modes de ciliogenèse cytosolique. Le flagelle de plasmodium est uniquement cytosolique et ne comporte pas de compartimentation. L'axonème du flagelle de drosophile possède une grande région cytosolique et une petite région compartimentée. Les flagelles de mammifère et de Giardia intestinalis possèdent également une région non compartimentée ainsi qu'une région compartimentée. Cette dernière, en comparaison avec la drosophile, est plus longue que la région cytosolique. Image adaptée de Avidor-Reiss and Leroux, 2015.*

C - La drosophile, un modèle efficace pour étudier l'assemblage des cils et flagelles

La drosophile est un organisme modèle très utilisé en recherche dans de nombreux domaines tels que le comportement, l'étude du développement, la génétique ou encore la biologie cellulaire. Ceci est en partie dû à son temps de génération plutôt court (10 jours à 25°C) associé à un fort taux de fécondité et couplé à une facilité de manipulation de son génome en raison d'un grand nombre d'outils disponibles. De plus, le génome de l'Homme présente environ 60% de similitude avec celui de la drosophile, ce qui en fait un bon modèle de transposition pour l'étude des pathologies humaines, tels que les désordres neuronaux ou bien la stérilité.

Dans le cadre de la ciliogenèse, la drosophile peut être considérée comme un puissant modèle puisque seulement deux types cellulaires différenciés sont ciliés : les neurones sensoriels de type I ainsi que les cellules germinales, les autres cellules étant dépourvues de cils. Ces cils sont impliqués dans la proprioception et la mécanosensation, l'olfaction, l'ouïe, le goût et la fertilité. Ainsi, des défauts ciliaires sont facilement identifiables chez la drosophile puisqu'ils se manifestent par des défauts de coordination des membres ou de fertilité.

Renforçant la puissance de ce modèle pour l'étude de l'assemblage ciliaire, les deux types de cellules ciliées résument les différents modes d'assemblage ciliaire ainsi que les grands types ultrastructuraux existant chez les vertébrés. En effet, d'une part, les neurones sensoriels de type I contiennent à la fois des cils immotiles avec une architecture en 9+0, mais aussi des cils motiles contenant une organisation en 9+0. D'autres parts, dans les cellules germinales, le flagelle motile de spermatozoïde possède une architecture en 9+2. Concernant le mode d'assemblage ciliaire, les cils des neurones sensoriels sont assemblés selon une ciliogenèse compartimentée, IFT dépendante, alors que les flagelles de spermatozoïde s'assemblent selon une ciliogenèse cytosolique, IFT indépendante.

Enfin, la drosophile est un bon modèle pour l'étude de l'assemblage du centriole puisque la présence des centrioles chez cet organisme n'est pas indispensable pour le développement. En effet, les mutants pour *sas-4* se développent bien jusqu'au stade adulte, mais décèdent suite à des défauts sévères de coordination en raison de l'absence de cils dans les neurones sensoriels (Basto et al., 2006). Ceci indique que chez la drosophile, les centrioles ne sont pas indispensables pour former le fuseau mitotique, mais le sont pour la formation de l'axonème.

I-Les cils des neurones sensoriels

Le système nerveux de la drosophile contient deux types de neurones sensoriels : les neurones sensoriels de type I et les neurones sensoriels de type II. Les neurones sensoriels de type I comportent une seule dendrite contre plusieurs pour les neurones sensoriels de type II. Les neurones sensoriels de type I sont ciliés et impliqués dans divers processus tels que l'audition, la proprioception, la mécanosensation, la chémosensation ou encore l'olfaction. Les neurones sensoriels de type II, non ciliés sont quant à eux impliqués dans la nociception et la thermosensation. Ces derniers n'étant pas ciliés, je ne traiterai que des neurones sensoriels de type I dans ce manuscrit (Singhania and Grueber, 2014).

Les cils des neurones sensoriels de type I du système nerveux périphérique sont présents dans 2 types d'organes sensoriels : les neurones des organes sensoriels externes (ES) ou sensilles, impliqués dans la mécanosensation, la chémosensation, l'olfaction et le goût, et les neurones des organes chordotonaux (CH), impliqués dans l'audition et la proprioception **(Figure 23)**.

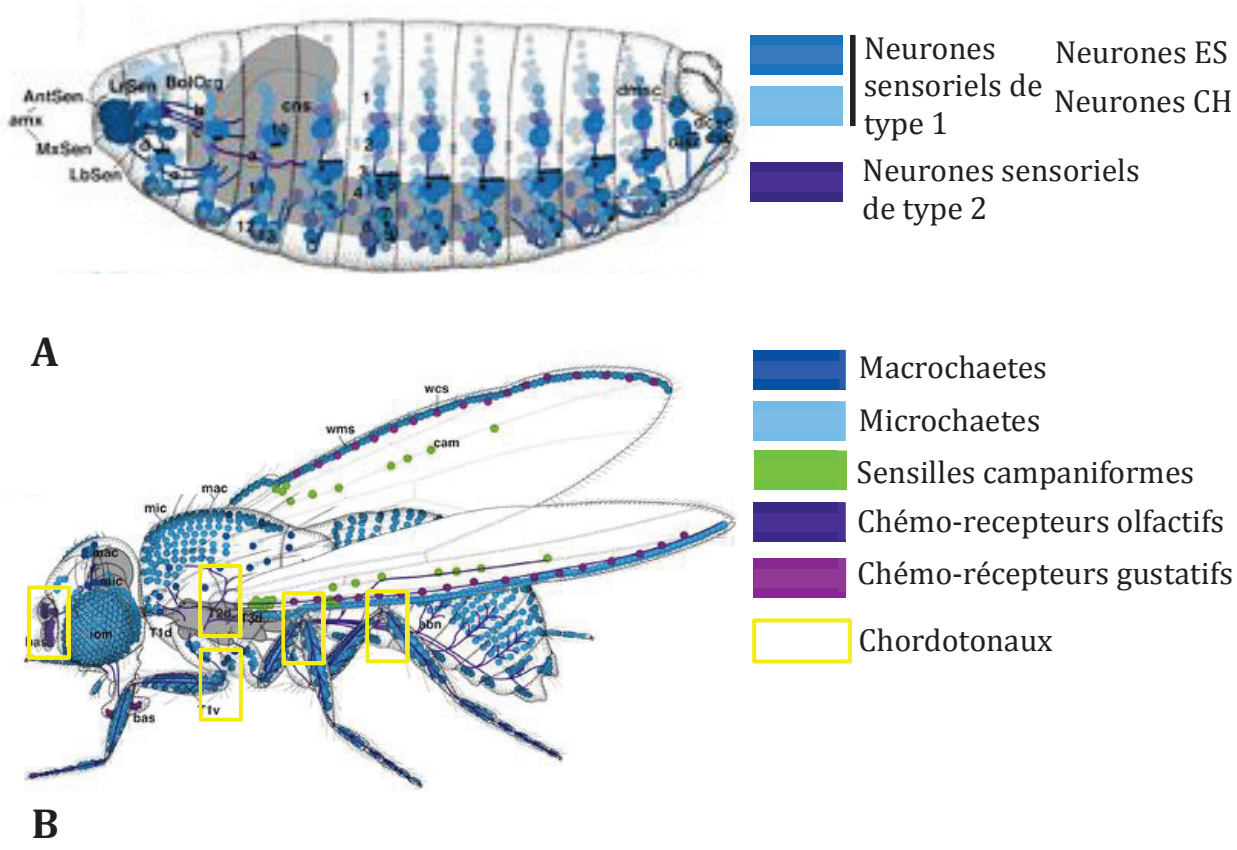


Figure 23 : *Localisation des neurones du système nerveux périphérique chez la drosophile.* ***A.*** *Schéma illustrant ces neurones chez l'embryon dans la paroi de chaque segment dans la partie antérieure.* ***B.*** *Schéma illustrant la position de ces neurones chez l'adulte. Les soies (microchaetes et macrochaetes) sont localisées sur tout le corps de la drosophile. Les mécano-récepteurs/chémo-récepteurs gustatifs et chémo-récepteurs olfactifs ont une localisation plus restreinte, respectivement sur la partie dorsale des ailes et dans l'antenne. Enfin, les neurones chordotonaux sont localisés dans l'antenne dans l'organe de Johnston's, à la jonction des pattes ainsi qu'à la jonction aile-thorax. Schéma adapté de Hartenstein, Atlas of Drosophila Development, 1993.*

1-1) Les organes sensoriels externes

a) Structure et fonctions

Les organes sensoriels externes (ES) sont les organes sensoriels les plus abondants chez *Drosophila melanogaster* **(Figure 23B)**. On les retrouve chez l'adulte au niveau des soies sensorielles ou chaete, et au niveau des sensilles campaniformes. Ces organes sensoriels externes sont principalement impliqués dans des fonctions mécano-sensorielles telles que le toucher, la locomotion et le vol. D'autres organes sensoriels externes sont présents et exercent des fonctions chémo-sensorielles telles que l'olfaction et le goût. C'est notamment le cas des chémo-récepteurs olfactifs des organes sensoriels

externes présents au niveau de l'antenne (segment a3), et des chémo-récepteurs gustatifs présents, entre autre, dans les palpes labiaux de la trompe et les ailes (Keil, 1997; Keil, 2012; Jarman, 2002; Kernan, 2007; Tuthill and Wilson, 2016).

D'un point de vue structurel, l'architecture de ces organes sensoriels externes est très similaire **(Figure 24A)**. En effet, ils sont composés d'un ou plusieurs neurones au contact de 3 cellules de soutien : la cellule thécogène, proche du neurone, l'entoure et sécrète la gaine de la dendrite; la cellule trichogène sécrète la cuticule entourant la structure externe de l'organe sensoriel; la cellule tormogène ou cellule coiffe, la plus externe, qui sécrète la cloison de la cavité lymphatique du récepteur où la dendrite du neurone s'y projette. Ce neurone est donc composé d'une part d'une dendrite qui se projette dans cette cavité lymphatique et s'arrête à la structure sensorielle, et d'autre part d'un axone qui est connecté au système nerveux central**.**

Un cil modifié est présent à l'extrémité de la dendrite et possède une conformation en 9+0. Ce cil est divisé en deux segments : le cil connecteur dans sa partie proximale, et d'un corps tubulaire constitué d'un réseau dense de microtubules dans sa partie distale **(Figure 24B)**. Ce dernier est rattaché à la structure externe sensorielle par la coiffe dendritique qui encapsule le corps tubulaire et crée le lien entre le neurone et l'organe externe. La coiffe dendritique de certains neurones sensoriels externes comme les soies contiennent la protéine transmembranaire NompA. Celle-ci permet la transduction de signaux mécanique en signal électrique. La localisation de cette protéine est essentielle puisque des drosophiles déficientes pour *nompA* présentent des défauts de coordination. Ceci est dû à la suppression de la transduction du signal dans les organes mécano-sensoriels et est associée à des défauts d'assemblages des organes sensoriels (Chung et al., 2001). La transduction de ce signal mécanique est également permise par le produit du gène *nompC*, une sous unité des canaux ioniques de la famille des canaux ioniques TRPN, localisée au niveau du corps tubulaire, entouré de la coiffe dendritique.

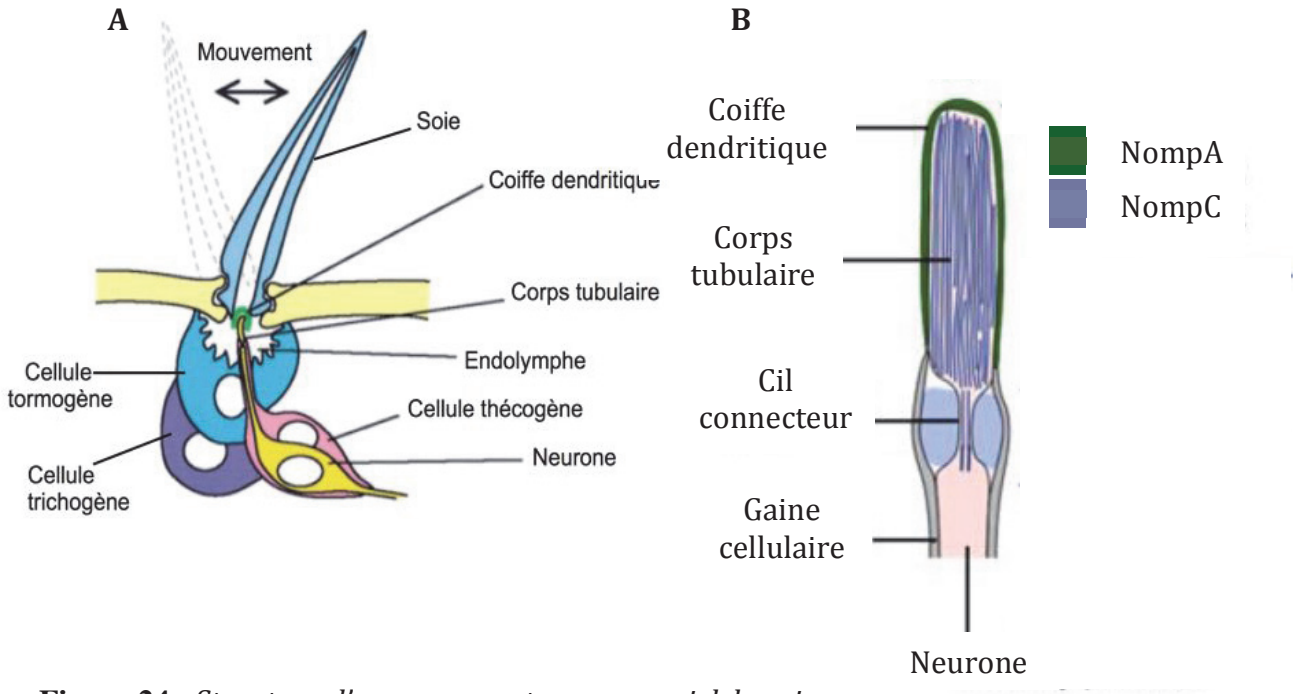


Figure 24 : *Structure d'un organe externe sensoriel, la soie.*
A. *Le neurone mono-dendritique est entouré de la cellule thécogène. La dendrite du neurone se projette dans la cavité lymphatique formée par la cellule tormogène. La cellule trichogène sécrète la cuticule entourant l'organe sensoriel, la soie. Un cil court appelé cil connecteur est présent à l'extrémité de la dendrite et se prolonge en corps tubulaire. Le corps tubulaire est entouré d'une matrice extracellulaire, la coiffe dendritique, qui est formée à partir de la cellule tormogène. Cette coiffe permet de connecter le cil modifié à la structure externe sensorielle. Schéma adapté de Jarman, 2002.* ***B.*** *Magnification de la région du cil connecteur où sont représentées les localisations des récepteurs NompA et NompC. Schéma adapté de Kernan, 2007.*

b) Exemple de l'une des fonctions exercées par les organes sensoriels externes : celui de la soie

La transduction de signaux mécanique chez la drosophile implique notamment le gène *nompC* identifié comme étant essentiel à la transduction de ces signaux (Walker et al. 2000). Des données décrivant avec précision le mécanisme de transduction de signaux mécaniques impliquant NompC chez la drosophile ont été révélées récemment (Zhang et al., 2015b).

Lorsque la soie est stimulée par un contact physique ou une vibration, elle va subir un mouvement de flexion conduisant à une torsion du corps tubulaire de la dendrite. Ceci, provoque l'ouverture des canaux ioniques membranaires, notamment NompC. Ce dernier possède au niveau de sa région cytoplasmique des répétitions d'Ankyrines qui s'associent avec les microtubules du corps tubulaire, faisant ainsi le lien entre les microtubules du cil et le récepteur membranaire NompC. L'ouverture du canal provoque un phénomène de dépolarisation de la membrane plasmique formant un potentiel d'action au niveau du neurone transformant alors le signal mécanique en signal électrique, qui sera véhiculé le long de l'axone du neurone jusqu'à sa prise en charge par le système nerveux central.

I-2) Les organes chordotonaux

a) Structure et fonctions

Les organes chordotonaux, également appelés scolopidies, sont des mécano-récepteurs internes et ne possèdent donc pas de structures externes. On les trouve localisés au niveau des articulations des pattes ainsi qu'à la base des ailes. Ils sont impliqués dans la proprioception qui correspond à la perception des différentes parties du corps. On retrouve également des organes chordotonaux dans l'antenne, dans l'organe de Johnston's impliqué dans l'audition et la gravitaxie.

L'organe chordotonal est composé de neurones mécano-sensoriels associés à 3 types de cellules de soutien : la cellule scolopale, la cellule ligament et la cellule coiffe **(Figure 25)**. A l'extrémité de la dendrite du neurone, se trouve le cil qui baigne dans la cavité lymphatique créée par la cellule scolopale. L'extrémité distale de la cellule scolopale est entourée par la cellule coiffe qui permet la liaison avec la cuticule et produit la coiffe dendritique qui enchâsse l'extrémité du cil. Celle-ci, comme dans les organes sensoriels externes, contient la protéine NompA (Chung et al., 2001; Boekhoff-Falk and Eberl, 2014). Au niveau du cil sont présents des récepteurs ioniques permettant la transduction du signal mécanique en signal électrique.

Les deux centrioles père et fils sont situés l'un au-dessus de l'autre à l'extrémité de la dendrite. Le cil des neurones des organes chordotonaux est nucléé à partir du centriole père distal (appelé corps basal distal). Le centriole proximal (appelé dans ce cas corps basal proximal), permet quant à lui l'ancrage de la racine ciliaire. Les 2 corps basaux sont équivalents d'un point de vue structurel. Néanmoins, la Centrobine, décrite pour être un marqueur du centriole fils (Zou et al., 2005) est retrouvée exclusivement au corps basal proximal dans les cils de tous les neurones sensoriels de type I (Gottardo et al., 2015). Ceci indique une asymétrie dans la composition moléculaire entre ces deux centrioles. De plus, lorsque l'on force l'expression de la Centrobine aux deux centrioles, la ciliogenèse est inhibée. A l'inverse, la suppression de la Centrobine dans les neurones sensoriels de type I conduit à la formation de deux cils. La Centrosomine est quant à elle localisée au centriole père (Gottardo et al., 2015). Ces données confirment que malgré l'absence de différences structurelles entre les 2 centrioles, il existe une asymétrie moléculaire fournissant à l'un des deux centrioles la capacité à nucléer un cil. Par ailleurs, même si la présence d'appendices distaux n'a pas été décrite chez la drosophile, des structures denses aux électrons ressemblant aux fibres de transition sont par contre retrouvées dans les neurones sensoriels ciliés (Ma and Jarman, 2011; Vieillard et al., 2016). De plus, alors que chez les mammifères, une vésicule ciliaire s'ancre au corps basal au moment de la mise en place de la zone de transition et de la formation d'une ébauche d'axonème, l'étape d'ancrage des corps basaux à la membrane, dans l'assemblage cils des neurones sensoriels n'a jamais été réalisée.

Les cils des organes chordotonaux ont une conformation en 9+0 et sont constitués de deux parties, séparées par la dilatation ciliaire. La partie proximale du cil se distingue par la présence de bras de dynéines externes, attestant une différence fonctionnelle entre les deux parties du cil. On retrouve également une différence dans la composition de leur membrane ciliaire, puisque celle de la partie distale du cil contient le récepteur ionique NompC, alors que celle de la partie proximale du cil contient les

récepteurs membranaires Iav et Nan. Enfin, on retrouve associée au niveau de la dilatation ciliaire, la protéine RempA, orthologue d'IFT140 chez les mammifères et membre du complexe IFT-A.

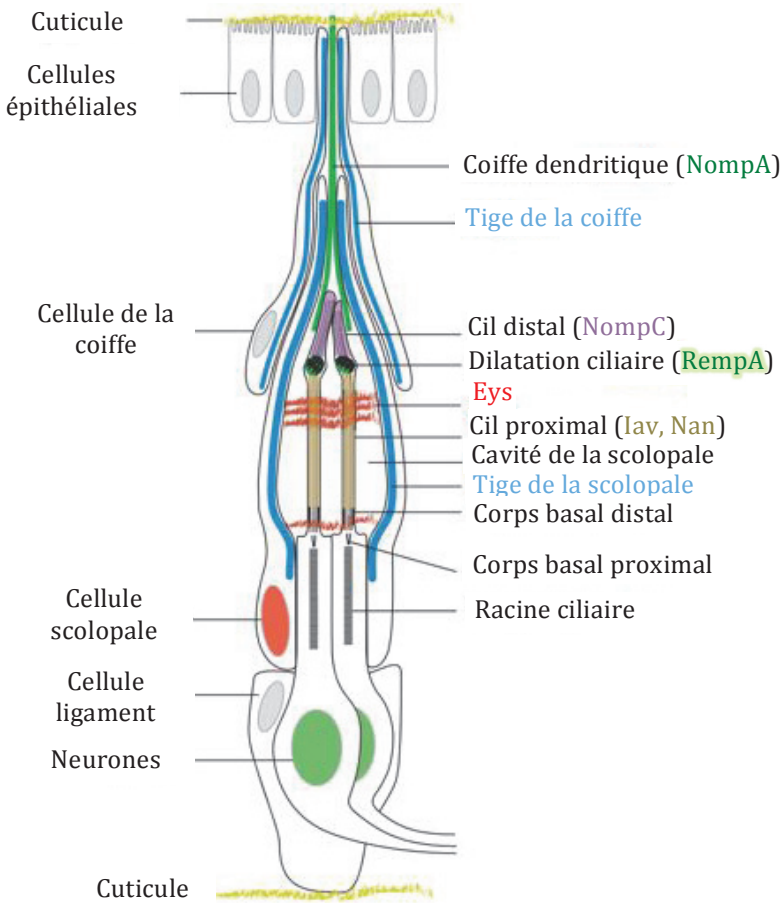


Figure 25 : *Structure d'un organe chordotonal.*
L'organe chordotonal est relié de part et d'autre à la cuticule. Le corps neuronal est relié à la cuticule proximale par la cellule ligament. La dendrite de ce neurone se projette dans la cavité de la cellule scolopale. La partie distale de la cellule scolopale est entourée de la cellule de la coiffe. Celle-ci permet la liaison avec la cuticule et contient la coiffe dendritique qui encapuchonne l'extrémité du cil. Le cil est constitué de deux parties (distale et proximale) séparées par la dilatation ciliaire. La partie proximale du cil est nucléée à partir du corps basal distal, où la zone de transition lui est apposée distalement. Les positions des différents récepteurs impliqués dans la mécano-sensation sont indiquées. Schéma adapté de Boekhoff-Falk and Eberl, 2014.

b) Exemple de l'une des fonctions exercées par les organes chordotonaux : l'audition chez la drosophile.

Chez la drosophile, les mécanismes de l'audition et de la gravitaxie sont assurés par l'organe de Johnston's présent dans l'antenne **(Figure 26)**. Cette dernière comprend une arista, permettant de capter les sons, et trois segments nommés a1, a2 et a3. L'organe de Johnston's, contenant les neurones chordotonaux, est localisé dans le

segment a2. D'un point de vue fonctionnel, l'émission des ondes sonores conduit au mouvement de l'arista et à la rotation du segment a3 de l'antenne au niveau de la jonction a2/a3. Ce mouvement mécanique est alors transmis à l'organe de Johnston's, provoquant l'étirement des cils et la transduction du signal auditif. De façon similaire au processus de transduction de signal dans les organes sensoriels externes, la transduction du signal dans l'antenne et les organes chordotonaux nécessite l'ouverture des canaux ioniques. Ceci provoque la dépolarisation de la membrane dendritique et la formation de potentiels d'action qui seront véhiculés le long du neurone jusqu'à sa prise en charge par le système nerveux central.

Nous avons vu précédemment qu'il y avait une différence qualitative de distribution des récepteurs présents dans la membrane ciliaire de chaque partie du cil. Ces récepteurs sont impliqués de façons différentes dans la transduction du signal. En effet, le récepteur NompC, localisé dans la membrane ciliaire de la partie distale du cil est impliqué dans l'amplification du signal mécanique, tandis que les récepteurs Iav et Nan, localisés dans la membrane ciliaire de la partie proximale du cil, sont nécessaires à l'amplification du signal électrique (Walker et al., 2000; Kim et al., 2003; Gong et al., 2004). Ainsi, les drosophiles déficientes pour *nompC* ont une réduction de leur signal auditif alors que les drosophiles déficientes pour *iav* et *nan*, ont une perte totale du signal auditif en raison du blocage de la transduction du signal mécanique en signal électrique.

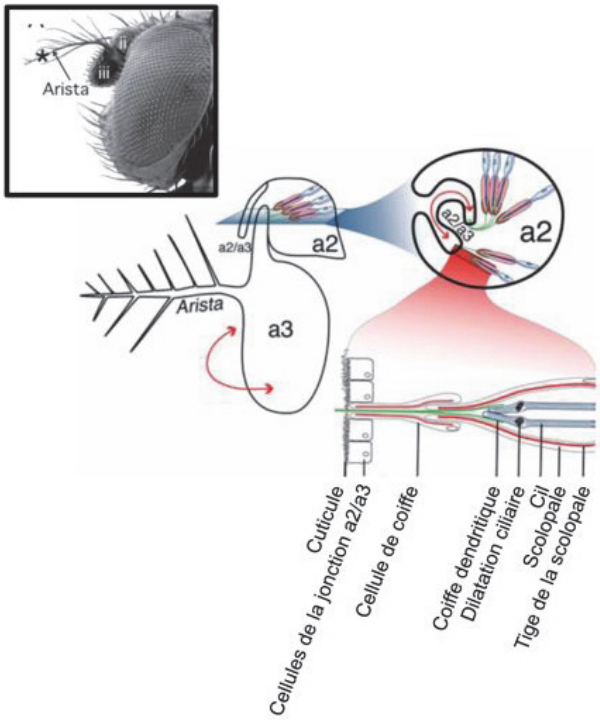


Figure 26 : *Représentation schématique de l'organe de Johnston's responsable de l'audition chez la drosophile.*
La stimulation sonore au niveau de l'arista, provoque la rotation du segment antennaire a3 par rapport au segment a2 au niveau de la jonction a2/a3. Ce mouvement provoque l'étirement des cils et déclenche la transduction du signal auditif. Schéma adapté de Eberl and Boekhoff-Falk, 2007.

I-3) Assemblage des cils des neurones sensoriels

Les cils des neurones sensoriels, se forment selon un mode de ciliogenèse compartimenté et donc dépendant du transport intraflagellaire. Des mutants pour des protéines de l'IFT chez la drosophile, présentent des phénotypes caractéristiques de défauts ciliaires tels qu'un manque de coordination ainsi qu'une diminution de l'audition, associé à une absence ou une diminution de la taille des cils (Sarpal et al., 2003; Han et al., 2003). Par exemple, les drosophiles mutantes pour *nompB*, l'orthologue de *IFT88* chez les mammifères, membres de l'IFT-B, conduit à la perte ou la réduction de la majorité des cils des neurones sensoriels. Ceci témoigne de l'importance du transport intraflagellaire dans l'assemblage des cils des neurones sensoriels. Les drosophiles mutantes pour des gènes du complexe IFT-A, comme *rempA*, localisée au niveau de la dilatation ciliaire **(Figure 25)**, présentent une réduction de taille ciliaire associé à une perte de la localisation du récepteur Iav (Lee et al., 2008).

Des anomalies au niveau du corps basal et de la zone de transition conduisent également à des défauts d'assemblage et de fonctionnement des cils des neurones sensoriels. En effet, il a été décrit que la suppression de la protéine Unc (Uncoordinated), présente à la fois au centriole et à la zone de transition, entraine des défauts de coordination, associés à d'importants défauts ultra-structuraux des cils des neurones sensoriels (Baker et al., 2004).

L'étude de différents mutants de protéines de la zone de transition tels que Cby, Cep290 et Dila/AZI1, démontre son rôle dans l'assemblage des cils des neurones sensoriels. En effet, des défauts sensoriels de proprioception et de mécano-sensation sont observés chez les mutants *cby et cep290* (Enjolras et al., 2012*;* Basiri et al., 2014). Le mutant *cby* présente des défauts d'ultrastructure de l'axonème et de la zone de transition des cils qui entraîne une altération de la fonction de barrière de diffusion. On observe ainsi, une perturbation de la localisation au cil de protéines de l'IFT ou couplée à l'IFT (IFT88 et ARL13B) chez ce mutant. De plus, ces drosophiles ont également une réduction de leur audition.

Le mutant *dila* présente des gros défauts de coordination associés à une absence ou un raccourcissement des cils, qui présentent d'importants défauts d'ultrastructure (Ma and Jarman, 2011). Récemment, l'équipe a montré que l'absence simultanée de Cby et Dila dans les neurones sensoriels, inhibe à la fois la formation de la zone de transition et de l'axonème (Vieillard et al., 2016).

En revanche, les drosophiles mutantes pour les gènes du module MKS, ne présentent pas de défaut de coordination. Le mutant *mks1* présente uniquement des défauts mineurs des cils sensoriels durant le développement, tels qu'une zone de transition plus courte ainsi qu'un cil plus fin, mais ces défauts ne sont plus visibles chez l'adulte (Pratt et al., 2016).

Enfin, la composition lipidique de la membrane ciliaire chez la drosophile dans les neurones sensoriels, est également importante pour la bonne localisation et fonction de récepteurs membranaires. Ceci fait intervenir la protéine Tulp, unique membre chez la drosophile de la famille des protéines TUBBY, responsable de la localisation correcte

des récepteurs Iav et NompC. En effet, chez le mutant *INPP5E,* on trouve une modification de la composition lipidique de la membrane ciliaire. Dans les neurones chordotonaux, on observe une accumulation de PI(4,5)P2 à la base de la partie proximale du cil au niveau du corps basal. Ceci a pour effet d'entrainer un enrichissement de Tulp au niveau de la région membranaire riche en PI(4,5)P2 et empêche la bonne localisation de Iav et NompC. Ceci se traduit par des défauts d'audition des mouches (Park et al., 2013; Park et al., 2015).

Ainsi, la composition lipidique de la membrane ciliaire des cils des neurones sensoriels est nécessaire et essentielle, tout comme celle des mammifères, à l'intégrité du transport de récepteurs.

II-Le flagelle de spermatozoïde

II-1) La spermatogenèse

L'appareil reproducteur chez la drosophile est constitué de deux testicules, reliés via leur partie distale aux vésicules séminales, stockant les spermatozoïdes matures **(Figure 27)**

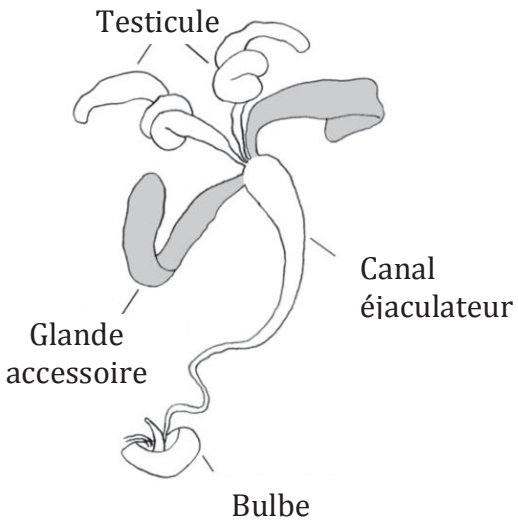


Figure 27 : *Appareil reproducteur des mâles chez la drosophile.*
Les testicules sont associés aux vésicules séminales via leur partie distale. Les spermatozoïdes matures et fonctionnels sont transportés et stockés dans ces vésicules séminales puis passent dans le canal éjaculateur ainsi que dans le bulbe éjaculateur avant de se propulser dans le tractus génitale de la femelle. Leur transport est facilité par un fluide sécrété par les glandes accessoires. Adapté de Ravi Ram and Wolfner, 2007.

Le testicule est une structure en spirale polarisée, où l'apex du testicule, également appelée hub, contient les cellules souches germinales en prolifération, alors que la base du testicule contient les spermatozoïdes matures différenciés **(Figure 28)**.

Les cellules souches germinales présentes au niveau du hub vont subir des divisions asymétriques aboutissant à la formation de nouvelles cellules souches ainsi qu'une spermatogonie. Ces spermatogonies sont entourées de 2 cellules somatiques, les cellules cystes, qui permettront de contenir toutes les cellules issues d'une même spermatogonie au cours de la différenciation.

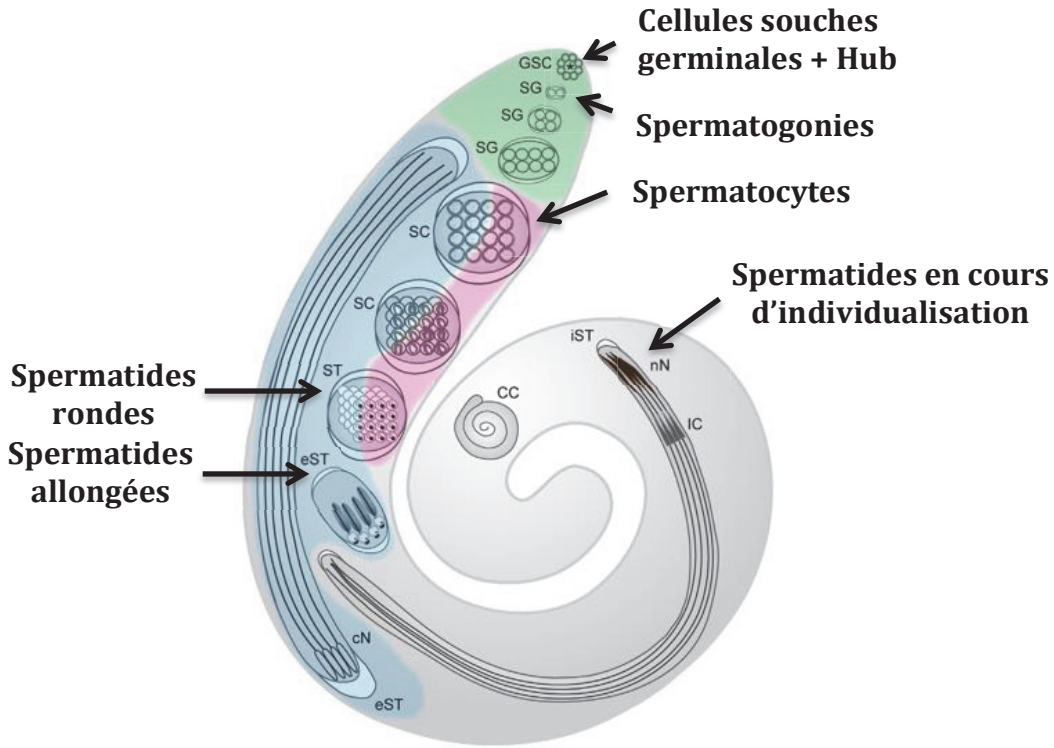


Figure 28 : *Schéma d'un testicule adulte de drosophile illustrant les différents stades de différenciation cellulaire ainsi que leur organisation spatiale au cours de la spermatogenèse.*
Les cellules souches germinales (GSC) sont en contact avec le hub et se divisent de manière asymétrique pour former des spermatogonies (SC). Ceux-ci vont subirent plusieurs mitoses aboutissant à la formation de cystes contenant 2, 4 ou 8 spermatogonies puis d'un cyste de 16 spermatocytes (SC). Ceux-ci subiront une étape méiotique et donneront des spermatides rondes haploïdes (ST). Durant la spermiogenèse, la membrane des cystes s'allongera en même temps que l'axonème et le noyau subit une morphogenèse en canoë (cN), puis en aiguille (nN), formant des spermatides allongées (eST). Une fois l'allongement et la morphogenèse du noyau terminés, les spermatides subiront une étape d'individualisation (iST) où le complexe d'individualisation (IC) se formera au contact des noyaux et migrera le long de l'axonème. Ensuite chaque spermatide se verra entouré de sa propre membrane et les cystes se condenseront, formant une structure enroulée (CC). La dynamique de production de différents phosphoinositides est importante tout au long de la spermatogenèse, via la régulation de processus clé comme le renouvellement des cellules souches, les cytokinèses ainsi que l'élongation de l'axonème. Le gradient de différents phosphoinositides au cours de la spermatogenèse est également représenté : PIP_2 (bleu), PIP_3 (vert), PIP_4 (rose). Schéma adapté de Brill et al., 2016.

Chaque spermatogonie va subir quatre divisions mitotiques associées à des cytokinèses incomplètes. Ces 4 divisions successives conduisent à la formation d'un cyste de 16 spermatocytes primaires, partageant leur cytoplasme au niveau de ponts cytoplasmiques appelés ring canal. Chaque spermatocyte possède 2 paires de centrioles **(Figure 29)**. Les spermatocytes vont maturer et chaque paire de centrioles va migrer vers la membrane plasmique et s'y ancrer pour former un petit cil correspondant à une zone de transition. Durant leur ancrage, la taille des centrioles va augmenter de 200 nm à environ 1,8 μm.

A la méiose, les deux paires de centrioles vont être internalisées dans le cytoplasme, invaginant la membrane plasmique qui forme un capuchon ciliaire membranaire autour de la partie distale de chaque cil/zone de transition. Chaque spermatocyte va donc subir 2 divisions méiotiques tout en maintenant un cil/zone de transition connecté à la membrane plasmique à l'extrémité de chaque centriole. La méiose aboutit à la formation d'un cyste de 64 cellules appelées spermatides rondes, contenant chacune un seul corps basal, qui s'ancre dans la membrane nucléaire. A proximité du noyau se trouve le « Nebenkern » qui correspond à une structure dérivée des mitochondries, et qui contient 2 mitochondries géantes, en raison de la fusion des nombreuses mitochondries présentes dans le cytoplasme de la cellule. Se trouve également à proximité du noyau, l'acrosome, une structure dérivée du Golgi, nécessaire à la fécondation.

Le capuchon ciliaire et la zone de transition présents à l'extrémité distale du corps basal vont être remodelés pour permettre l'élongation de l'axonème. A la base de ce capuchon, le ring centriole permet de connecter la membrane ciliaire à l'axonème (Basiri et al., 2014; Vieillard et al., 2016) **(Figure 31-B)**. Le capuchon ciliaire va s'allonger et l'axonème va pouvoir initier son élongation, via l'ajout de tubulines et la polymérisation des microtubules à l'extrémité distale de la zone de transition à l'intérieur du capuchon ciliaire. Simultanément, la progression de la zone de transition, composée du ring centriole et du capuchon ciliaire le long de l'axonème néoformé, découvre celui-ci au contact du cytoplasme de la cellule.

L'allongement de l'axonème s'accompagne de l'allongement de la membrane plasmique ainsi que des deux dérivés mitochondriaux, positionnés de part et d'autre de l'axonème. Ce stade cellulaire est appelé spermatide allongée. Le noyau, initialement de forme sphérique, va également subir des modifications structurales durant l'allongement de l'axonème et de la cellule pour acquérir une forme d'aiguille, où se trouve l'acrosome.

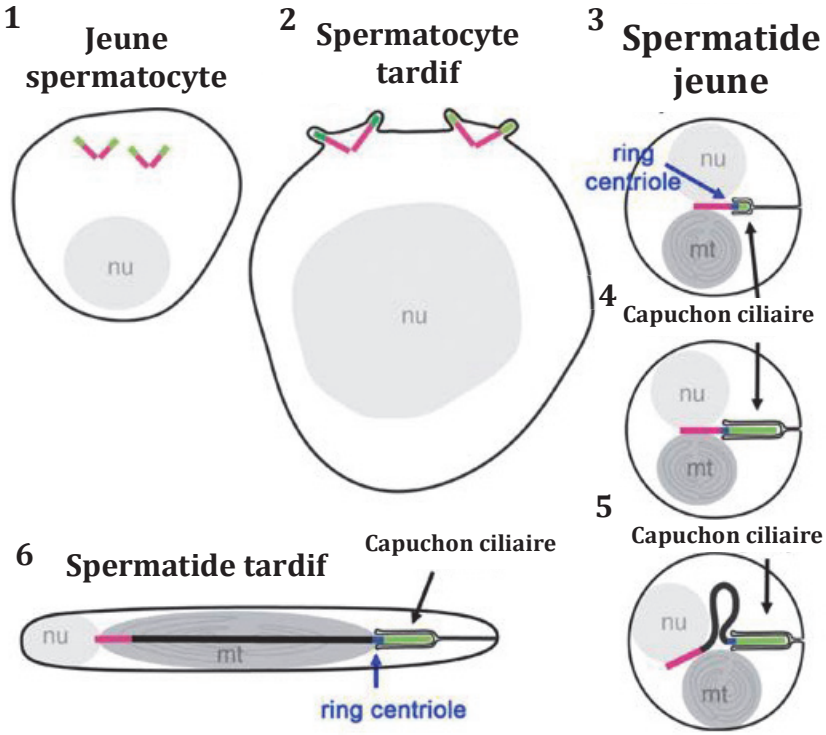


Figure 29 : *Schéma illustrant la spermatogenèse chez la drosophile.*
Les spermatogonies ayant subies les mitoses successives donnent naissance à des cystes de 16 spermatocytes possédant 2 paires de centrioles dans le cytoplasme (1). La maturation des spermatocytes s'accompagne d'un changement de taille de la cellule et par la migration et l'ancrage des centrioles à la membrane plasmique où une zone de transition/cil se met en place, encapuchonné dans une membrane (2). Les centrioles retournent dans le cytoplasme en invaginant la membrane, puis subissent une étape méiotique et donnent naissance aux spermatides rondes où le corps basal s'ancre au noyau (3) L'extrémité distale du centriole contenant la zone de transition/cil primaire devient le capuchon ciliaire, toujours associé à la membrane plasmique, avec à sa base le ring centriole. Les mitochondries ont fusionné pour former le « Nebenkern ». *Le capuchon ciliaire s'allonge (4) et l'élongation de l'axonème débute (5). Lors de l'élongation de l'axonème, le capuchon ciliaire migre dans la direction opposée au corps basal et s'allonge. Parallèlement à l'élongation de l'axonème, la membrane plasmique et les dérivés mitochondriaux (mt) s'allongent et le noyau (nu) subit un changement de morphologie (6). Schéma adapté de* Vieillard et al., 2016.

Dans le cytoplasme, vont venir s'associer à l'axonème des protéines accessoires, permettant la motilité du flagelle. Les bras de dynéines internes et externes vont être associés aux tubules A, ainsi que les fibres radiaires, qui connectent les doublets périphériques de microtubules à la paire centrale. Enfin, une gaine composée de réticulum endoplasmique va entourer l'axonème jusqu'à l'individualisation des spermatides **(Figure 31C)**.

Une fois l'élongation de l'axonème achevée, la maturation des spermatides en spermatozoïde est réalisée par l'étape d'individualisation **(Figure 30)**.

Cette étape qui permet d'isoler chaque spermatide dans une membrane plasmique unique est notamment permise par la mise en place au niveau des noyaux d'un complexe d'individualisation composé en partie de cônes d'actine (Fabrizio et al., 1998). 64 cônes d'actines vont donc s'associer aux 64 noyaux des 64 spermatides et vont commencer leur migration simultanée vers l'extrémité distale des spermatides tout en concentrant et éliminant le cytoplasme. Cette accumulation est visible et appelée renflement cystique au niveau des cônes en migration.

Cette étape d'individualisation implique plusieurs processus dont le complexe des cônes d'actine, l'activation d'un gradient de caspase 3 clivée permettant l'élimination du cytoplasme (Huh et al., 2004), ainsi que des modifications post-traductionnelles des tubulines telle que la polyglycylation des tubulines. Ce renflement cystique continue sa migration jusqu'à atteindre la partie distale des spermatides où il se détache dans le cytoplasme formant ainsi le « waste bag »

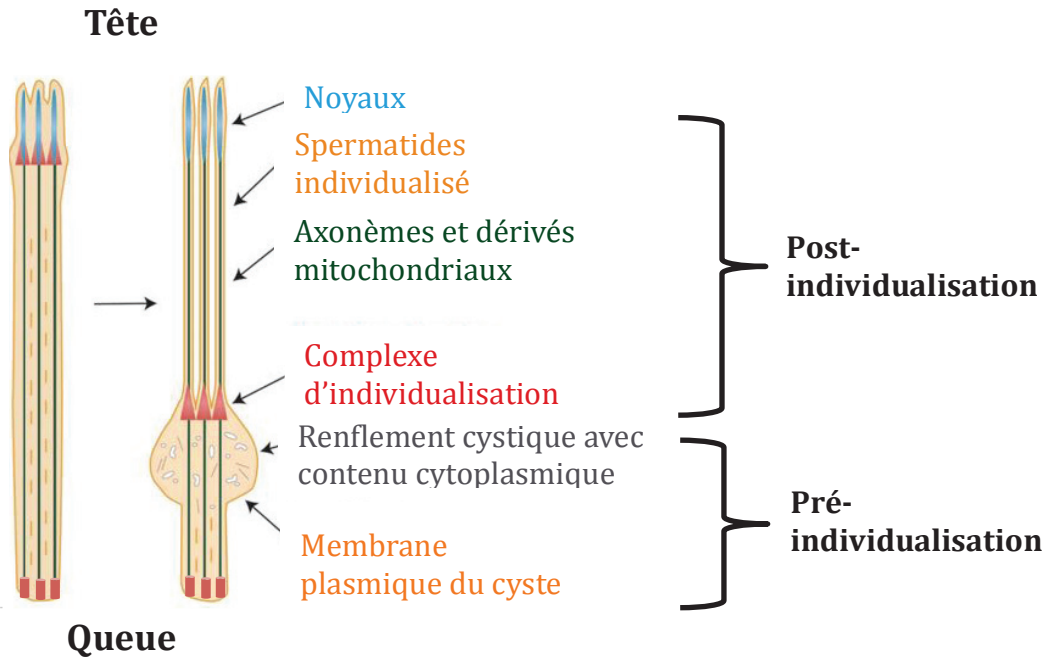


Figure 30 : *Schéma illustrant l'individualisation des spermatides chez la drosophile. Les cônes d'actine du complexe d'individualisation se forment autour des noyaux des spermatides qui sont localisés à l'extrémité apicale du cyste. Au fur et à mesure de la migration des cônes d'actine le long des flagelles des spermatides, le complexe d'individualisation supprime le contenu cytoplasmique et isole chaque spermatide dans sa propre membrane plasmique. Schéma adapté de* Steinhauer, 2015.

II-2) Structure et assemblage du flagelle au cours de la spermatogenèse.

a) Rôle du centriole dans l'assemblage du flagelle

Les centrioles chez la drosophile présentent différentes ultrastructures en fonction du type cellulaire. Les centrioles/corps basaux des cellules somatiques comme les neurones sensoriels ou chez l'embryon, sont constitués de neuf doublets de microtubules d'environ 200 nm de long. Dans les cellules germinales, les centrioles sont composés de neuf triplets de microtubules de longueur plus importante (1,8 μm) (Gottardo et al., 2013). En comparaison, les mammifères possèdent des centrioles constitués uniquement de 9 triplets de microtubules de longueur inférieure (~500 nm)

L'analyse en microscopie électronique du centriole dans les cellules germinales de la drosophile n'a pas permis de révéler la présence de structures définies comme étant des appendices distaux/fibre de transition ou subdistaux. De façon similaire aux cils des neurones sensoriels, il n'a pas non plus été observé de vésicules ciliaires s'associant au centriole lors de l'ancrage des centrioles/corps basaux à la membrane plasmique des spermatocytes dans les testicules de drosophile.

Les 4 centrioles d'un spermatocyte sont capables de nucléer un cil et les centrioles pères et fils sont indistinguables au niveau ultrastructure. Il est cependant possible de les distinguer en se basant sur leur position respective, le centriole fils étant positionné orthogonalement à la base de la paroi du centriole père. De plus, des études ont montré que la protéine Ana2 se localise préférentiellement au niveau du centriole fils au stade spermatocyte (Stevens et al., 2010). Enfin, alors que les 2 centrioles ont normalement une taille similaire, les drosophiles mutantes pour *klp10A*, une kinésine dépolymérisante, présentent un centriole père plus long que le centriole fils qui ne parvient alors plus à recruter la protéine centriolaire Dplp (Delgehyr et al., 2012; Gottardo et al., 2016). Ceci démontre qu'une asymétrie moléculaire des centrioles père et fils est maintenue au cours de la maturation des spermatocytes malgré leur capacité à tous les 2 de former un cil.

Au cours de la spermatogenèse chez la drosophile, l'initiation de la ciliogenèse s'effectue lors de l'ancrage des centrioles à la membrane plasmique. Chez les mammifères, de manière générale, une étape importante dans l'initiation de l'assemblage de l'axonème est le retrait de CP110 et CEP97 de l'extrémité distale du centriole qu'ils coiffent. Ceci permet alors l'initiation de l'assemblage de l'axonème à partir du centriole. Certaines études in vitro ont montré que sa déplétion, tout comme celle de CEP97 conduisait soit à une augmentation de la taille des centrioles, soit à la formation d'un cil ectopique ou bien encore à l'élongation anormale de microtubules centriolaires (Spektor et al., 2007; Tsang and Dynlacht, 2013). A l'inverse, une étude plus récente in vivo, révèle que CP110 est nécessaire pour promouvoir la ciliogenèse (Yadav et al., 2016).
Chez la drosophile, CP110 et Cep97 sont conservées et certaines études ont révélé que CP110 et Cep97 sont majoritairement localisées à l'extrémité distale des centrioles pères et fils des spermatocytes. Ceci, dans le cas ce CP110 a été réalisé par des marquages en immunofluorescence en utilisant un anticorps anti CP110, révélant la

protéine CP110 endogène, mais aussi en visualisant la protéine de fusion en condition de surexpression. Cependant, dans les spermatocytes matures, la présence de CP110 à l'extrémité distale du centriole est uniquement détectée dans les drosophiles transgéniques surexprimant la protéine de fusion, mais plus par l'anticorps, reconnaissant la protéine endogène. L'absence de CP110 à l'extrémité distale des centrioles des spermatocytes matures en contexte physiologique normal pourrait correspondre à la mise en place du cil, observé lors de l'ancrage du cil à la membrane plasmique. D'autres études seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Une des études, réalisée en spermatocyte, indique que la taille des centrioles n'est pas affectée en absence de CP110, mais que le cil se formant lors de l'ancrage des corps basaux à la membrane plasmique est légèrement plus court. Cette même étude a analysé la fonction de CP110 dans d'autres tissus chez la drosophile, et révèle que dans les cellules de disques d'ailes au stade larvaire, les centrioles présentent une augmentation de 10% de leur taille en absence de CP110. De plus, son absence dans ces cellules, ainsi que dans des cellules de cerveau de larve et de culture de cellules S2, conduit à une extension de microtubules émanant du centriole et pouvant atteindre une longueur 50 fois plus grande que la taille du centriole (Franz et al., 2013). Ces longues extensions de microtubules sont visibles en microscopie électronique et ne sont pas révélées lors de marquages spécifiques du centriole par immunofluorescence.
Une seconde étude, réalisée en culture de cellules S2 de drosophiles, révèle que la perte de CP110 par ARN interférence conduit, à la différence des mammifères, à une diminution de la taille des centrioles (Delgehyr et al., 2012).
Ainsi, à l'instar des mammifères, la fonction de CP110 dans la régulation de la taille des centrioles semble donc également varier selon le système cellulaire utilisé. Il se pourrait également, au vu des résultats révélés, que CP110 ait une fonction double : celle de réguler à la fois la taille des centrioles mais aussi la croissance de microtubules centriolaires, en coiffant l'extrémité distale des centrioles.

Concernant Cep97, son rôle aux centrioles des spermatocytes n'a pas été encore analysé, mais son absence dans les cellules souches germinales males provoque une augmentation de la taille des centrioles, mais pas à une extension anormale de microtubules provenant du centriole. De plus, la pénétrance du phénotype d'allongement de la taille du centriole en absence de Cep97 est plus importante que celle observée en l'absence de CP110 (Galletta et al., 2016). Ceci pourrait indiquer que chez la drosophile, CP110 et Cep97, tout en partageant des fonctions communes sur la régulation de la taille du centriole, exerceraient des fonctions distinctes sur la régulation de la croissance de microtubules provenant du centriole.

L'analyse de la localisation de CP110 et Cep97 aux centrioles des cils des neurones sensoriels n'a pas encore été décrite, et celle-ci pourrait fournir d'importantes informations sur la fonction de CP110 et Cep97 dans les cellules ciliées chez la drosophile. De même, de plus amples études sur leur localisation dans des mutants du ring centriole, permettront de mettre en évidence une interaction fonctionnelle au niveau de la zone de transition.

Dans les spermatocytes, lors de l'ancrage du centriole à la membrane plasmique, les doublets A et B continuent leur élongation pour former un cil/zone de transition **(Figure 31A)**. Le tubule C du triplet de microtubules ne continue pas son élongation et

perds des protofilaments, formant une structure en forme d'hélice appelée tubule accessoire et associée au tubule B, dont la fonction reste aujourd'hui encore inconnue (Tokuyasu, 1975). Par ailleurs, proche de cette hélice se forme une extension, qui associée à l'hélice ressemble aux liens Y retrouvés à la zone de transition chez les vertébrés. Cette structure est présente tout le long du cil/zone de transition à l'extrémité distale des centrioles **(Figure 31A)** (Tates, 1971**;** Gottardo et al., 2013**;** Riparbelli et al., 2013).

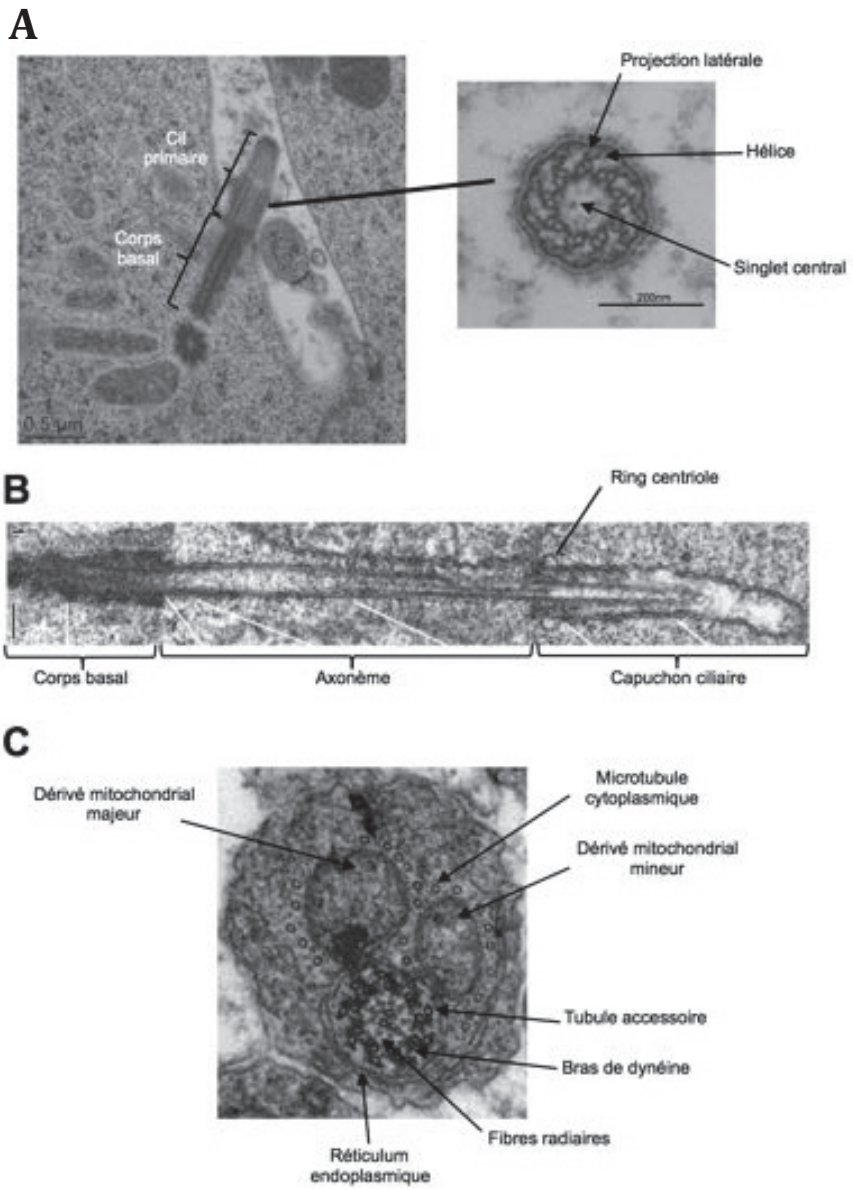


Figure 31 : *Images illustrant l'ultrastructure du cil/zone de transition et flagelle respectivement au stade spermatocyte et spermatide.*
A. *Au stade spermatocyte, chaque corps basal dérivant des 2 paires de centrioles va s'ancrer à la membrane plasmique et initier la formation des cils/zone de transition. Ce cil/zone de transition est constitué de doublet de microtubules, ainsi que d'une structure en forme d'hélice s'associant au tubule B. Un microtubule central parcours le centriole et s'étends au delà de celui-ci.* **B.** *Coupe longitudinale d'une spermatide révélant l'axonème en cours d'élongation. Le corps basal est ancré au noyau, et la polymérisation des*

microtubules de l'axonème se réalise à l'intérieur du capuchon ciliaire, à l'opposé des noyaux. Image extraite de Gottardo et al., 2013. **C**. *Coupe transversale de l'axonème de spermatide, constitué de 9 doublets de microtubules périphériques associés à une paire centrale de microtubules et d'un tubule accessoire. Les protéines accessoires telles que les bras de dynéines ancrés au tubule A et des fibres radiaires reliant la paire centrale de microtubules aux doublets périphériques sont également retrouvées, fournissant le caractère motile. L'axonème est entouré d'une gaine de réticulum endoplasmique et les deux dérivés mitochondriaux sont entourés par de nombreux microtubules cytoplasmiques. A et C images de Jean-Luc Duteyrat.*

La paire centrale est assemblée à partir d'un singlet de microtubule central qui se met en place dès le stade spermatocyte, à l'intérieur du corps basal. Ce singlet s'étend au-delà du corps basal. Au cours du stade spermatide, un deuxième singlet de microtubule viendra s'y associer pour former la paire centrale (Carvalho-santos et al., 2012). En l'absence de la protéine centriolaire Bld10, le singlet de microtubule ne se forme pas. Par conséquent, la paire centrale n'est pas assemblée, supprimant au flagelle sa capacité de mobilité. Bld10 est également impliquée dans la formation des centrioles. Son absence conduit à leur raccourcissement, mais ils restent capables de former un axonème indiquant que les centrioles conservent tout de même leur fonction de matrice pour l'assemblage de l'axonème (Mottier-Pavie and Megraw, 2009).

Les centrioles sont donc naturellement impliqués dans la formation de l'axonème, et ceci est une nouvelle fois confirmé dans les drosophiles mutantes pour *sas-4,* qui sont dépourvus de centrioles et conduisant à une absence d'axonème (Basto et al., 2006).

En revanche, les protéines du transport intraflagellaire ne sont pas impliquées dans l'assemblage de l'axonème du flagelle de spermatozoïde. En effet, les drosophiles mâles mutantes pour *nompB* ou pour *DmKap* et *klp64D*, 2 sous unités de la kinésine II, sont fertiles et ne présentent aucun défaut d'assemblage de l'axonème du flagelle alors que les neurones sensoriels de type I sont dépourvus de cils (Han et al., 2003; Sarpal et al., 2003).

b) Rôle de la zone de transition dans l'assemblage du flagelle

Les protéines de la zone de transition sont requises pour l'assemblage de l'axonème du flagelle de spermatozoïde. Chez la drosophile, le module NPHP n'est pas conservé. Nous retrouvons donc le module MKS, la protéine Cep290, ainsi que d'autres protéines qui, non reliées à ces modules, ont été identifiées comme protéines de la zone de transition. Des analyses en microscopie à fluorescence classique et à super-résolution ont montré que certaines protéines de la zone de transition, conservées des mammifères à la drosophile, comme Cep290, Cby, MKS1, B9D1, sont localisées à l'extrémité distale du centriole des spermatocytes et spermatides rondes, à l'intérieur du capuchon ciliaire (Basiri et al., 2014; Vieillard et al., 2016; Pratt et al., 2016). Les domaines d'expression de ces différentes protéines à la zone de transition à l'intérieur de ce capuchon ciliaire ont été mesurés afin de déterminer la taille de cette structure. Au stade spermatocyte, les domaines d'expression des différentes protéines de la zone de

transition sont indistinguable les uns des autres. Une fois l'allongement du flagelle initié, le capuchon ciliaire subit un remodelage et s'allonge. On observe alors une redistribution des protéines de la zone de transition. En effet, la zone de transition est alors distinguée en 2 parties, le capuchon ciliaire et le ring centriole, à la base de celui-ci. Les protéines appartenant au module MKS se retrouvent localisées dans le capuchon ciliaire, alors que les autres protéines se retrouvent majoritairement associées au ring centriole. Ces protéines sont donc différentiellement localisées à la zone de transition et leur rôle associé semble lui aussi dépendant de leur localisation.

Les protéines Unc, Cby, Cep290, Dila/AZI1 sont localisées au ring centriole, faisant le lien entre le capuchon ciliaire et l'axonème. Certaines études ont caractérisé la fonction de ces protéines et ont révélé que leur absence se traduit par d'importants défauts au cours de la spermatogenèse. Ainsi, les mâles mutants pour *unc* et double mutant pour *cby/dila* sont stériles et les noyaux des spermatides ne sont plus associés en grappe, mais dispersés tout le long du cyste. De plus, les axonèmes de ces mutants présentent de gros défauts d'ultrastructure révélés par l'absence de plusieurs doublets de microtubules (Baker et al., 2004; Vieillard et al., 2016). Enfin, une étude révèle que Cep290 est requise pour la formation de la zone de transition, pour la compartimentation de l'axonème au niveau du capuchon ciliaire, et pour l'intégrité de l'axonème (Basiri et al., 2014).

A l'inverse, le fait de supprimer des protéines du complexe MKS ne conduit pas à d'importants défauts au cours de la spermatogenèse. En effet, l'absence simultanée de deux gènes du module MKS, *b9d2* et *tctn,* ne provoque que de légers défauts à la zone de transition, associés à une légère hypofertilité et de légers défauts d'ultrastructure de l'axonème (Vieillard et al., 2016). L'étude du mutant *mks1* confirme que l'absence du module MKS dans les testicules de drosophiles n'entrainent que de légers défauts d'assemblage des cils. Son absence conduit principalement à un défaut de localisation des protéines du module MKS à la zone de transition, seulement associé à une réduction de la taille de la zone de transition/cil formé au stade spermatocyte (Pratt et al., 2016).

Ces résultats indiquent premièrement que l'absence de protéines localisées à la zone de transition le long du capuchon ciliaire (protéines du module MKS : Mks1, B9d1, B9d2) conduit à des défauts moins sévères que l'absence des protéines localisées au ring centriole (Cby, Unc, Dila, Cep290). Par ailleurs, ces défauts indiquent clairement que les protéines de la zone de transition sont requises pour la formation du flagelle de spermatozoïde chez la drosophile.

II-3) Processus impliqués dans l'élongation des spermatides

a) Implication de la dynamique lipidique à la membrane plasmique

Les phosphatidylinositol phosphates 1 (PIP) sont des lipides membranaires jouant un rôle crucial durant la morphogenèse cellulaire, dont l'organisation du cytosquelette, le trafic membranaire, la polarité cellulaire, le contrôle du cycle cellulaire et la signalisation. Les niveaux de PIP sont notamment essentiels dans la maintenance des cellules souches germinales, la prolifération des spermatogonies, la formation de la queue des spermatozoïdes, la morphogenèse des noyaux et la production de spermatozoïdes matures. Des phosphatases et des kinases produisent des modifications en phosphate au niveau des PIP pour former diverses formes, notamment PI4P, PI(4,5)P2 et PI(3,4,5)P3. Durant la spermatogenèse, il existe un gradient de ces lipides au sein des cellules participant à différents processus **(Figure 28)**.

Certaines études chez la drosophile ont mis en lumière le rôle de ces phosphoinositides au cours de la spermatogenèse. Ainsi, il apparaît que le PIP3 est nécessaire dès les stades précoces de spermatogenèse, puisqu'il semble important pour permettre le bon équilibre entre renouvellement des cellules souches germinales et leur différenciation en spermatogonie. Le PIP4, conjointement avec le PIP2 sont impliqués dans la régulation des différentes cytokinèses méiotiques permettant la différenciation des spermatocytes en spermatides. Le PIP2 et les composants du trafic membranaire sont notamment impliqués dans l'assemblage de l'axonème du flagelle dans des étapes faisant intervenir un processus membranaire. En effet, après la méiose, le corps basal s'ancre dans l'enveloppe nucléaire, associant l'axonème du flagelle au noyau. De plus, l'assemblage de l'axonème se réalise à son extrémité distale, où le capuchon ciliaire membranaire entoure la région de polymérisation des microtubules. La surexpression de *sigD*, une phosphatase qui déphosphoryle le PI(4,5)P2 en PI(4)P, conduit à des défauts d'élongation des spermatides. Ces défauts sont dus à une absence d'ancrage du corps basal au noyau et à une perturbation de l'intégrité de la zone de transition qui est entourée par le capuchon ciliaire membranaire, relié à la membrane plasmique. En effet, la localisation de Unc à l'extrémité distale de spermatides, au niveau du ring centriole est perdue. (Wei et al., 2008). Ainsi, le PIP2, est impliqué dans la régulation de l'élongation de l'axonème et l'ancrage du corps basal dans l'enveloppe nucléaire.

b) Implication des dérivés mitochondriaux et des microtubules cytoplasmiques associés

L'élongation des dérivés mitochondriaux est également impliquée dans le processus d'élongation des spermatides. Il a été montré que l'axonème et le « Nebenkern » peuvent s'allonger indépendamment. L'absence de *sas-4* conduit à l'absence de centriole et donc d'axonème. Les spermatides dépourvues d'axonème parviennent tout de même à s'allonger, mais leur taille est inférieure à celle des spermatides sauvages (Basto et al., 2006). En parallèle, les mutants pour *fzo* et *nmd*, 2 gènes impliqués dans la fusion et la prolifération des mitochondries présentent des

défauts d'allongement, indépendants de l'axonème (Noguchi et al., 2011). Il semble donc que la présence de microtubules cytoplasmiques qui entourent les mitochondries joue un rôle de moteur d'élongation des spermatides. De plus, le fait que la perte de l'axonème ou la suppression de gènes impliqués dans des processus mitochondriaux, raccourcissent l'allongement des spermatides, indique que l'axonème et les dérivés mitochondriaux sont tous deux nécessaires pour orchestrer une élongation correcte des spermatides.

L'allongement des mitochondries le long des microtubules cytoplasmiques est régulé par Milton et dMiro (Aldridge et al., 2007; Noguchi et al., 2011). Milton est une protéine adaptatrice permettant la liaison kinésine-microtubule, et dMiro est une GTPase associée à Milton. La déplétion de l'une ou de l'autre conduit à des défaut importants d'allongement des spermatides, similaires à ceux observés chez le mutant *klp59D* (Noguchi et al., 2011).

c) Modifications post-traductionnelles des tubulines

Les modifications post-traductionnelles des tubulines sont importantes pour l'assemblage de l'axonème et la biogenèse d'un spermatozoïde mature et fertile. L'absence d'acétylation en Gly56 de la β2-tubuline conduit à des défauts d'assemblage. De plus, la suppression d'une glycylase, TTLL3, conduit à une forte réduction de polyglycylation, réduisant la maturation de l'axonème et impactant sur la fertilité des mâles (Raff et al., 2008; Rogowski et al., 2009). La protéine Hmw (Hemingway), est retrouvée associée aux microtubules des spermatides. Sa déplétion perturbe la cinétique d'apparition de ces modifications. En effet, son absence provoque la polyglycylation, ainsi que la détyrosination des tubulines, contrairement aux drosophiles sauvages chez lesquelles la polyglycylation n'a lieu qu'après la perte de détyrosination (Soulavie et al., 2014). La glycylation des tubulines a lieu durant l'étape d'individualisation, après l'assemblage des cônes d'actine. La glycylation est notamment permise par la protéine ciliaire Bug22, dont la déplétion conduit à une forte réduction de la polyglycylation des tubulines des spermatides, nécessaire à la migration de la machinerie d'individualisation (Mendes Maia et al., 2014).

D - Objectifs de la thèse

La zone de transition par sa fonction dans la sélection du contenu protéique ciliaire, joue un rôle indispensable dans l'assemblage des cils et des flagelles. Deux principaux modules biochimiques NPHP1-4-8 et MKS/JBTS y ont été identifiés. Ces modules interagissent l'un avec l'autre via des sous-modules important impliquant notamment CEP290 et NPHP5. La protéine CBY1 a été identifiée comme une nouvelle protéine de la base des cils, requise pour l'assemblage de la zone de transition. De plus, l'équipe a mis en évidence le rôle essentiel de Cby dans l'assemblage cytosolique du flagelle de drosophile. Enfin, nous avons révélé que Cby interagit avec d'autres protéines de la zone de transition comme Dila chez la drosophile et que toutes deux coopèrent pour recruter les protéines du complexe MKS à la zone de transition (Vieillard et al., 2016). Cependant, les mécanismes qui permettent de recruter Cby à la zone de transition et qui la relient aux autres complexes de cette structure sont mal connus.

Afin de comprendre la structure et la fonction de la zone de transition, je me suis plus particulièrement intéressé au rôle de CBY à la zone de transition chez la drosophile. Ce modèle me permet également d'aborder la question de la diversité moléculaire de la zone de transition durant les deux modes de ciliogenèse compartimentée et cytosolique.

J'ai dans un premier temps cherché à identifier de nouveaux partenaires biochimiques de CBY en réalisant un crible protéomique en cellules de mammifères. Ce crible m'a permis d'identifier principalement deux protéines DZIP1L et FAM92A comme partenaires de CBY1. J'ai validé leurs interactions chez les mammifères et chez la drosophile démontrant ainsi leur conservation au cours de l'évolution. J'ai par ailleurs analysé la fonction de l'orthologue de DZIP1L et FAM92A chez la drosophile et montré qu'elles forment avec Cby un nouveau module biochimique, jouant un rôle important dans la mise en place de la zone de transition.

De plus, avant mon arrivée, l'équipe a réalisé un crible double hybride à partir d'une banque d'ADN complémentaire de testicules de drosophiles afin d'identifier des partenaires biochimiques de Cby spécifiques de la spermatogenèse. J'ai commencé l'analyse des différents candidats obtenus et révélé certaines interactions avec CBY ainsi que des nouvelles informations sur leur rôle dans la ciliogenèse et spermatogenèse chez la drosophile.

Chapitre II : RESULTATS

A - Partie I : crible protéomique : Article

Drosophila DZIP1, FAM92 and CBY define a novel functional module of the ciliary transition zone

Résumé :

La zone de transition est une structure présente à la base de la plupart des cils indispensable à l'assemblage correct des cils et des flagelles. Notre point d'entrée pour l'étude de la zone de transition est le gène *cby* que l'équipe a identifié comme codant une nouvelle protéine de la zone de transition chez la drosophile. Malgré certaines études s'intéressant à la fonction de CBY à la zone de transition chez les mammifères et la drosophile, son rôle précis et ses mécanismes d'actions ne sont pas encore totalement caractérisés. De plus, CBY n'a pour l'instant pas été relié à un des complexes décrits à la zone de transition.

C'est pourquoi, durant ma thèse, je me suis focalisé sur la recherche et l'identification d'interacteurs de CBY1 chez les mammifères et la drosophile. Pour cela, j'ai réalisé un crible protéomique en utilisant la technique LAP-Tag en cellule de mammifères (IMCD3), exprimant de façon stable la protéine CBY1 fusionnée à deux tags : la GFP et le peptide S. Ce crible m'a permis d'identifier plusieurs candidats et notamment les protéines DZIP1L et FAM92A. Quelques données disponibles dans la littérature, indiquent que DZIP1L appartient à la famille des protéines Iguana, qui sont impliquées dans la signalisation Hedgehog et l'assemblage des cils. Chez l'Homme, on distingue *DZIP1* et *DZIP1L*, deux paralogues alors que chez la drosophile, il n'existe qu'un seul orthologue, *CG13617.* Concernant FAM92A, elle a été récemment décrite comme un interacteur de CBY1 en cellules de mammifères à la zone de transition avec une implication dans le recrutement de vésicules riches en Rab8. Ceci est cohérent avec la fonction de CBY1 dans le recrutement de vésicules Rab8 positives à l'extrémité distale du corps basal afin de former la vésicule ciliaire. Ceci facilitant alors l'ancrage du corps basal à la membrane plasmique. Chez les mammifères, il existe plusieurs paralogues, alors que chez la drosophile, il n'existe qu'un seul orthologue, le gène *CG6405.*

J'ai confirmé dans un premier temps l'interaction biochimique chez les mammifères entre DZIP1L et CBY1, puis montré dans un second temps que les interactions DZIP1-Cby ainsi que FAM92-Cby sont également conservées chez la drosophile. J'ai ensuite caractérisé fonctionnellement le rôle de DZIP1 et de FAM92 chez la drosophile. Une partie du travail sur FAM92 a été réalisé par Céline Augière, doctorante dans l'équipe. Nous montrons, que durant la spermatogenèse, DZIP1 et FAM92 sont requises pour l'assemblage de la zone de transition. En effet, leurs absences conduisent à la perte ou la perturbation du domaine d'expression de certaines protéines de la zone de transition déjà décrites comme Cep290, Mks1. Ceci est à corréler avec une absence d'ancrage du corps basal à la membrane plasmique. Le défaut d'ancrage est également associé à l'absence de capuchon ciliaire à l'extrémité distale du corps basal.

Dans les spermatocytes, l'absence d'ancrage du corps basal provoque l'assemblage d'axonèmes anormalement longs en provenance des centrioles, dans le cytoplasme. Dans les neurones sensoriels, l'absence de DZIP1 conduit à un important défaut d'assemblage ciliaire puisque le cil n'est quasiment plus détectable. Le rôle de FAM92 dans les cils des neurones sensoriels est toujours en cours de caractérisation.

L'ensemble de mes travaux a ainsi permis d'identifier un nouveau module protéique à la zone de transition, impliqué dans l'assemblage de celle-ci et permettant d'obtenir de nouvelles informations sur le rôle de Cby à l'intérieur de cette zone de transition.

J'ai choisi de présenter mes résultats principaux sous forme d'article scientifique. L'analyse fonctionnelle de FAM92 a été en partie réalisée par Céline Augière et est toujours en cours.

***Drosophila* DZIP1, FAM92 and CBY work cooperatively to build the ciliary transition zone**

Jean-André Lapart[1], Céline Augière[1], Alain Mangé[2], Elisabeth Cortier[1], Jean-Luc Duteyrat[1], Julie Jerber[1,3], Jérôme Solassol[2], Joëlle Thomas[1]*, Bénédicte Durand[1]*@

1- Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR-5310, INSERM U-1217, Institut NeuroMyoGène, F-69622, Villeurbanne, France

2- IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier, F-34298, France; INSERM, U1194, Montpellier, F-34298, France; Université de Montpellier, Montpellier, F-34090, France; Institut régional du Cancer de Montpellier, Montpellier, F-34298, France.

3- Open Targets, Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridge, CB10 1SD, UK

* Equal contribution

@ corresponding author

Abstract

Cilia and flagella are cellular extensions that play major roles in sensory and motile functions. The transition zone (TZ), located at the base of the cilia, is a specialized complex acting like a ciliary gate. Three protein complexes (CEP290, NPHP and MKS) cooperate in most eucaryotes to assemble the TZ. Mutations in genes coding for TZ proteins are associated with human ciliopathies. Here we characterized 2 Cby interactors, DZIP1 and FAM92 that are conserved between mammals and *Drosophila.* We show that they are located with Cby at the TZ in the 2 types of ciliated cells in *Drosophila melanogaster.* Depletion of DZIP1 or FAM92 leads to severe ciliary defects demonstrating their important role at the TZ. Without DZIP1 or FAM92 sperm flagella formation is impaired. Both are required to build the transition zone, including ring centriole and ciliary cap. Moreover, no sensory cilia are assembled in absence of DZIP1. Our results also show a complex relationship between Cby, DZIP1 and FAM92 for proper TZ organization and hence define a new functional module of the ciliary TZ.

Introduction

Cilia and flagella are highly conserved organelles present on the surface of eukaryotic cells. They play major roles in cellular functions like mobility, signaling during development and homeostasis. Their importance is highlighted by the discovery of human diseases, classified as ciliopathies that are associated with defects in the structure and/or cilia function (Badano et al., 2006; Baker and Beales, 2009; Brown and Witman, 2014). Cilia and flagella are composed of 3 principal compartments starting with the basal body, derived from the mother centriole, at the proximal part that serves to nucleate the microtubule projection, the transition zone (TZ) and the axoneme that forms the microtubule-based skeletal structure. Since the last decade, more focus has been put on the TZ structure as many genes linked to cilia diseases such as the Meckel syndrome (MKS) and Joubert syndrome or nephronophthisis (NPHP) are caused by defects in proteins of the TZ (Czarnecki and Shah, 2012). The TZ is located at the base of cilia, at the distal part of the basal body and is characterized by microtubule-ciliary connectors named Y-links, and the ciliary necklace. The TZ functions as a ciliary gate by sorting selected components in and out of the cilia, thus controlling the specific composition of the ciliary compartment (Garcia and Reiter, 2016; Gonçalves and Pelletier, 2017; Reiter et al., 2012).

TZ assembly starts during the first steps of cilia formation when the mother centriole associates with cytoplasmic vesicles before docking to the plasma membrane. Assembly of multiple proteins is spatially and timely controlled and several studies indicate that TZ proteins fall into mainly 3 different modules namely MKS, NPHP and CEP290. Extensive genetic and biochemical studies associated with super resolution microscopy analysis helped to establish a hierarchy of these components and a structural view of the TZ architecture (Garcia-Gonzalo et al., 2011; Sang et al., 2011; Williams et al., 2011; Chih et al., 2012; Gupta et al., 2015; Garcia and Reiter, 2016; Gonçalves and Pelletier, 2017; Reiter et al., 2012). Although largely conserved from *C. elegans* to mammals, variations exist between model organisms and all TZ proteins are not conserved in all ciliated species. For example, the NPHP module, present in mammals and *C. elegans*, is not conserved in *Drosophila*. Orthologs of CEP290 and several members of the MKS module are conserved in flies indicating that these 2 modules are implicated in TZ assembly (Baker et al., 2004; Basiri et al., 2014). Disruption of MKS proteins in *Drosophila* does not severely affect cilia formation and

function compared to the strong ciliary phenotype in CEP290 mutant flies, which is in agreement with the sequential assembly of TZ (Basiri et al., 2014; Pratt et al., 2016). Besides, additional components of the TZ have been identified but how they interact with the other components of TZ is not yet clear. Among these other proteins, Chibby (Cby), a conserved TZ component in vertebrates and flies (Burke et al., 2014; Enjolras et al., 2012; Shi et al., 2014; Tateishi et al., 2013; Vieillard et al., 2016; Voronina et al., 2009), is required for cilia function both in mammals and *Drosophila*. In fly, there are 2 main ciliated tissues, sensory neurons where cilia are necessary for the transduction of most senses and sperm germ cells (Gogendeau and Basto, 2009). Interestingly, sensory cilia assemble through a compartmentalized process (Han et al., 2003; Sarpal et al., 2003) that relies on intraflagellar transport (IFT). On the opposite, in male germ cells, flagella assembly is cytosolic and IFT independent (Avidor-Reiss and Leroux, 2015; Basiri et al., 2014; Han et al., 2003; Sarpal et al., 2003). We recently showed that Azi1/Dila, another additional TZ protein, also associated with centriolar satellites in vertebrates (Chamling et al., 2014; Hall et al., 2013; Villumsen et al., 2013), cooperates with Cby to build the TZ by acting upstream of CEP290 and MKS components (Vieillard et al., 2016). In *Drosophila* germ cells the timely control of membrane cap assembly by the TZ is required to restrict aberrant microtubule extension (Hall et al., 2013; Ma and Jarman, 2011; Vieillard et al., 2016). Cby and Azi1 are however absent in *C. elegans*, which doesn't harbor motile cilia, illustrating transition zone variety together with cilia diversification.

Despite the increasing number of studies, mechanisms of TZ assembly in *Drosophila* are still unresolved and how Cby is connected to the other TZ modules or with the centriole is still poorly defined.

Here we report the identification and characterization of two Cby interacting proteins, DZIP1 and FAM92, conserved from mammal to *Drosophila*. We show that DZIP1 and FAM92 are both expressed in ciliated type I sensory neurons and male germ cells in *Drosophila* and are located at the TZ with Cby. Functional analysis of DZIP1 and FAM92 indicate that they are both necessary for ciliogenesis in sensory neurons and are required for ciliary cap and ring centriole assembly in spermatocytes. We therefore propose that Cby, DZIP1 and FAM92 form a new biochemical TZ module in *Drosophila* that is conserved in mammals. This new module act in synergy with other conserved modules and is essential to construct a functional TZ.

Results

DZIP1L and FAM92A interacts with Cby1 in mouse IMCD3 cells

To address how Cby exerts its functions at the transition zone, we developed a LAP-tag purification strategy in mouse IMCD3 cells to identify novel Cby1-interacting proteins (Nachury, 2008). We generated stable IMCD3 cell lines expressing either LAP-mCby1 or control LAP-GFP. We checked that LAP-mCby1 indeed localizes at the base of the primary cilia in these cells, whereas the control LAP-GFP only labels the cytoplasm (Fig. S1). We performed two successive IP on both cell lines followed by mass spectrometry of the retrieved proteins, as described in Materials and Methods. Twenty-two potential Cby1 interactors were specifically purified with LAP-mCby1 but not with LAP-GFP (identified proteins are listed in Table S1). In addition to the multiple isoforms of 14-3-3 proteins previously shown to interact with Cby (Li et al., 2008), we also identified DZIP1-like (DZIP1L) and FAM92A. In agreement with our results, FAM92A/B were recently shown to interact with CBY1 in human cells (Li et al., 2016b). DZIP1L belongs to the Iguana family of proteins, which includes its vertebrate paralogue DZIP1. DZIP1L is a 87-kDa protein that shares with DZIP1 a putative conserved Zinc Finger-C2H2 domain at it's N-terminus, also identified as the DZIP1_N domain (IPR032714). It also possesses coiled-coil domains known to be involved in protein interactions. We confirmed the possible interaction between mouse DZIP1L and Cby1 by Co-IP assays in COS-7 cells. As shown in Figure 1A, DZIP1L is specifically immunoprecipitated with GFP-mCby1, whereas DZIP1L does not interact with the GFP control under the same conditions. Hence, our results demonstrate that DZIP1L is a Cby1 interactor in mouse. DZIP1L was described to locate at centrioles and to be required for ciliogenesis in cultured mammalian cells (Glazer et al., 2010), but its function *in vivo* has not been investigated yet. Interestingly, its paralog, DZIP/Iguana is described to be a key actor of ciliogenesis in zebrafish and mouse (Sekimizu et al., 2004; Tay et al., 2010; Wolff et al., 2004) and was identified as a potential CBY1 interactor in human cells (Li et al., 2016b). Here, we demonstrate that Cby1 interacts with its paralog DZIP1L in mouse, illustrating the conservation of the Cby module between mouse and humans, with DZIP1 and FAM92 family components interacting with Cby.

Cby1 is conserved in animals with motile cilia and thus found in *Drosophila,* but not in *C. elegans*. We thus looked for DZIP1L (Fig 1B) and FAM92A (data not shown) orthologs in various species. Interestingly, DZIP1/1L and FAM92A/B each show a unique ortholog in *Drosophila*, CG13617 and CG6405 respectively, but are absent from *C. elegans* genome in agreement with Cby occurrence in animal species with motile cilia. Proteins with DZIP1_N domain can be found in a few protozoa such as *Trypanosoma brucei*, *Shistosoma mansoni* ou *Chlamydomonas* but also in a few fungi. FAM92A orthologs are only present in animals harboring motile cilia. *Drosophila*, CG13617 shares 21% of identity with DZIP1L (Fig. S2) and 19% with DZIP1 (not shown). CG6405 shares 35% of identity with FAM92A (Fig. S3) and 25% with FAM92B (not shown). CG13617 and CG6405 will be named respectively DZIP1 and FAM92 hereafter.

Drosophila DZIP1 and FAM92 interact with Cby and are expressed in ciliated tissues

We first assessed if the interaction between DZIP1L and FAM92A with Cby1 was conserved in *Drosophila*. We performed Co-IP assays in cell lysates from COS-7 cells expressing *Drosophila* Cby-GFP and Flag-DZIP1/CG13617 or HA-FAM92/CG6405. As shown in Figure 1C, DZIP1/CG13617 specifically interacts with Cby. As well, we observed that *Drosophila* FAM92/CG6405 and Cby interact (Fig. 1D). These results demonstrate that DZIP1 and FAM92 cooperate with Cby in *Drosophila* and show that DZIP1, FAM92 and Cby define a novel biochemical interacting module in *Drosophila*. To investigate the localization of DZIP1 and FAM92 in *Drosophila*, we constructed transgenic flies expressing C-terminus GFP-tagged proteins under the control of their native promoters (see Material and Methods). *Drosophila* presents only two ciliated tissues: type I sensory neurons and male germ cells. Type I sensory neurons, present from embryos to adults, comprise chordotonal and external sensory (ES) neurons, which harbor motile and immotile cilia respectively. In adults, type I sensory neurons are found on different body parts, in particular in the antennae, which play major functions in several sensory behaviors and present both types of ciliated neurons. We first looked at the localization of DZIP1 and FAM92 in chordotonal neurons in the antennae (Fig. 2). DZIP1 and FAM92 were observed at the tip of the sensory dendrites labelled with 22C10, as a dot at the base of the cilia (Fig. 2A, C). The same pattern of DZIP1 and FAM92 expression was found in the cilia of external sensory organs (Fig. 2B, D, arrows). We confirmed by super-

resolution 3D structured-illumination microscopy (3D-SIM) that DZIP1 is indeed located at the transition zone and completely overlap with Cby expression domain in sensory neurons (Fig. 2E). Similar results have been observed for FAM92 (data not shown). These data indicate that DZIP1 and FAM92 locate at the ciliary transition zone in sensory neurons.

In testes, 2 pairs of centrioles/Basal Bodies (BB) are present in each spermatocyte. During spermatocyte maturation, each centriole elongates, docks to the plasma membrane and extends a TZ capped by the plasma membrane, the resulting structure being described as a primary cilia-like structure (Fig. 3A) (Gottardo et al., 2013; Riparbelli et al., 2012; Tates, 1971; Vieillard et al., 2016). During meiosis, the TZ and membrane cap are engulfed in the cytoplasm together with the basal bodies and form a ciliary cap hooding the distal end of basal bodies. After meiosis and at the onset of axoneme elongation, the ciliary cap is remodeled and extended. A distinct domain, the ring centriole, appears at the base of the ciliary cap (Basiri et al., 2014; Vieillard et al., 2016; Fabian and Brill, 2012) and both the ring centriole and ciliary cap progressively migrate away from the BB while the axoneme grows (Fig. 3A; Gottardo et al., 2013; Riparbelli et al., 2013; Tates, 1971). We observed that in young spermatocytes, during centriole elongation, DZIP1 and FAM92 appear together with Cby on centriolar distal ends (Fig. 3B). We found that DZIP1 extends a little more distal to Unc at the tip of the basal bodies in spermatocytes (Fig. 3C). Using 3D-SIM we show that DZIP1 completely overlaps with Cby (Fig. 3E). Similar observations are made for FAM92 (Fig 3D, F). In spermatids, when the TZ starts to migrate away from the basal body, Cby, Unc and CEP290 become restricted to the ring centriole, whereas MKS components are also redistributed all along the extended membrane cap, in addition to being enriched at the ring centriole {Vieillard:2016bd}. We observed that DZIP1 and FAM92 strongly accumulate with Unc and Cby at the ring centriole, but can also be detected at lower levels along the membrane cap. Last, like other ciliary cap and ring centriole components, DZIP1 and FAM92 are disassembled from flagellar tips at the onset of sperm individualization (not shown). Altogether, these results demonstrate that DZIP1 and FAM92 are transition zone proteins in *Drosophila*.

DZIP1 and FAM92 are required to build cilia in *Drosophila*

To understand the role of DZIP1 and FAM92 in ciliated cells of *Drosophila*, we expressed

RNAi directed against *DZIP1* or *FAM92* upon the control of an ubiquitous actin driver or the PNS specific scabrous driver (sca) or the testis specific driver Bam and searched for sensory and fertility defects. Using the sca driver to deplete DZIP in the sensory neurons, we observed a strong uncoordinated phenotype, reflecting a severe impaired function of sensory neurons indicating that DZIP1 plays an important role in these cells (Movie S1). Immunofluorescence analysis of chordotonal and ES neurons of *DZIP1* knockdown (KD) flies are in agreement with these observations. In control, chordotonal and ES neurons clearly show cilia labeled with GT335 (Fig. 4A1-A1' arrowhead, B1-B1' arrowhead). Almost no cilia extending from the dendrites can be detected in *DZIP1* knockdown flies (Fig. 4A2-2', B2-2').

Using a Bam-Gal4 driver to express DZIP1 shRNA, we observed that the adult males are hypofertile. Whole mount testis analysis show severe dispersion of the nuclei along the cysts and impaired actin cone organization and migration, being hallmarks of defective axoneme elongation and spermatid individualization respectively (Fig S4).

For FAM92, Actin-Gal4 driven shRNA expression leads to a moderate uncoordinated phenotype that still needs to be quantified and we did not observed defects of the sensory cilia using the GT335 antibody. As for DZIP1, we observed a strong disorganization of the testis by inducing RNAi with the Bam-Gal4 driver (Fig. S4B).

Altogether these results indicate that DZIP1, but also more moderatly FAM92, are required for ciliogenesis in *Drosophila*.

DZIP1 and FAM92 are required to build the *Drosophila* TZ/ring centriole and ciliary cap assembly during spermatogenesis

In spermatocytes, defects of known TZ/ring centriole components affect ciliary cap formation, resulting in the aberrant growth of microtubules extending from centrioles (Vieillard et al., 2016), as revealed by CG6652::GFP, a specific marker of the axoneme. This marker was hence used to address the function of DZIP1 and FAM92 in the formation of the TZ/ring centriole and ciliary cap during *Drosophila* spermatogenesis. In control spermatocytes, CG6652::GFP only decorates the ciliary cap, whereas huge CG6652::GFP extensions were visualized in *DZIP1* or *FAM92* knockdowns at this stage (Fig. 5A, upper panels). In early elongating spermatids, CG6652::GFP decorates both the ciliary cap and growing axoneme in control cells, but also reveals dramatic extensions of CG6652::GFP (Fig. 5A, lower panels). At both stages, we also observed that CG6652::GFP splits in different

branches, indicating that the growing axonemes break apart, as we previously observed in *Cby* and *Dila* double mutants (Vieillard et al., 2016).

To confirm that DZIP1 and FAM92 are required to organize the ring centriole, we next looked at core ring centriole components both in *DZIP1* and *FAM92* knockdowns. CEP290 has been shown to be a TZ protein located at the ring centriole (Basiri et al., 2014) and necessary for TZ assembly in various organisms including *Drosophila* (Craige et al., 2010; Li et al., 2016a; Rachel et al., 2015). In control testes, CEP290 is located at the TZ or ciliary cap in spermatocytes and round spermatids (Fig. 5B). In elongating spermatids, CEP290 is retained at the ring centriole at the base of the ciliary cap and hence moves distally as the axoneme grows (Fig. 5B, arrowhead). In *DZIP1* and *FAM92* KD, we observed that CEP290 localization is altered with a clear expansion of its expression domain in spermatocytes and round spermatids. Moreover, in elongating spermatids of *DZIP1* KD, CEP290 does not separate from the basal body as in control cells indicating that ring centriole formation and migration is impaired and does not allow proper axoneme elongation (Fig. 5B, arrow). Unc is another ring centriole protein, in addition to its localisation at centrioles, known to be essential for axonemal assembly (Baker et al., 2004). In control spermatocytes, Unc labels both the centriole and the transition zone (Fig. 5B, lower panels) and in control spermatids, Unc labels the ring centriole, which migrates distally from the BB also labelled by Unc. In *DZIP1* and *FAM92* knockdowns, the expression domain of Unc was dramatically expanded in spermatocytes and did not separate from the basal body in elongating spermatids (Fig. 5B, arrows). Note that the size of the centriole is not altered in absence of DZIP1 or FAM92 as revealed by a centriolar marker (not shown). Because ring centriole components are required to organize the TZ, we last looked at a prototypical TZ protein MKS1, which is a key component of the MKS complex (Weatherbee et al., 2009). In *Drosophila*, MKS1 is required to assemble the MKS complex, but removal of MKS components leads to only very mild defects of cilia assembly (Pratt et al., 2016; Vieillard et al., 2016). In spermatocytes, MKS1 localization at the ciliary cap is strongly reduced in *DZIP1* knockdown cells compared to control cells (Fig. 5C). MKS1 does not migrate away from the basal body in elongating spermatids, in agreement with the above observation indicating that ring centriole formation and migration is impaired in *DZIP1* KD. In absence of FAM92, MKS1 localisation is also affected compared to controls (Fig. 5C). Surprisingly, two opposite phenotypes could be observed: either a reduction to a complete absence of MKS1 at centriole pairs (upper panel)

or an aberrant expansion of its expression domain (lower domain) at only one centriole of the pair. These results suggest that a precise balance of FAM92 abundance is required to organize the MKS complex at basal bodies.

To confirm that aberrant microtubule extensions reflect an absence of the ciliary cap formation, we used PLC-delta fused to RFP to label the ciliary cap in spermatocytes and round spermatids (Fig. 5D). Centrioles (labelled with Unc::GFP) dock to the membrane in control testes and the ciliary cap can be clearly distinguished (Fig. 5D, arrows). In both *FAM92* and *DZIP1* KD, we could not detect any ciliary cap surrounding the elongated Unc staining in spermatocytes, nor in spermatids for *DZIP1* KD. Note that even though the presence of aberrant axonemal extensions is incompletely penetrant as shown by CG6652::GFP labeling (average of 50% of centrioles show these extensions), it is perfectly correlated with an absence of the ciliary cap (Fig. 5D). Thus, knockdown of *DZIP1* and *FAM92* alters ciliary cap formation in spermatocytes.

Altogether, these observations indicate that DZIP1 and FAM92 are required to build the TZ in *Drosophila* male germ cells.

Behavioral asymmetry between the daughter and mother centrioles during *Drosophila* ciliary cap assembly

Strikingly the above observations indicate a functional asymmetry between each centriole from one pair in spermatocytes, even though both are able to build a ciliary cap. *Drosophila* spermatogenesis is a unique system as both, the mother and daughter centrioles are simultaneously competent to build a TZ. However, our study reveals a systematic asymmetry in the behavior of each centriole in one pair. Indeed, in *DZIP1* KD, microtubule extensions were observed in 25% of the cases on both centrioles but in 75% of the centriole pairs, only one centriole showed the microtubule extensions. Even more strikingly, in *FAM92* knockdown, 95% of the centriole pairs present microtubule extensions on only one of the centriole. To determine if this asymmetry is correlated with centriole age, we looked more closely to centriole pairs showing only one affected centriole (Fig. 6). We determined for each pair, which of the daughter or mother centriole is affected, based on the principle that the daughter centriole, being nucleated from the mother centriole, is orthogonally positioned on the lateral wall of the mother centriole {Fu:2015ih}. In *DZIP* KD, among 52

centriole pairs for which mother and daughter identities could be unequivocally assigned, we found 44 daughter centrioles (85%) and 8 mother centrioles (15%) affected by the absence of DZIP1 (Fig 6B, left panel). As well, in *FAM92* KD, 86% of the daughter and only 14% of the mother centrioles were affected (Fig. 6B, right panel). Such a behavioral asymmetry between the mother and daughter centriole was also previously shown in *Klp10* mutant spermatocytes, which show pronounced elongation of the mother centriole compared to the daughter (Gottardo et al., 2016). Altogether, these observations indicate that in *Drosophila* spermatogenesis, although all centrioles have the capacity to generate a ciliary cap, a remnant asymmetry of the daughter and mother centriole is revealed in unbalanced situations.

DZIP1, FAM92 and Cby work cooperatively to build the *Drosophila* TZ

To determine the functional hierarchy between Cby, DZIP1 and FAM92, we looked at their respective localization in *Cby*^{1} *mutant* and *DZIP1* or *FAM92* knockdowns during spermatogenesis (Fig. 7). In control testes, both DZIP1, FAM92 and Cby are present at the transition zone at the tip of the centrioles in spermatocytes. In *DZIP1* KD, the localisation of Cby is disturbed (Fig. 7A). Cby was extinguished at one centriole of the pair but was markedly unaffected at the other centriole (Fig. 7A, arrowhead). Overall, the expression level of Cby::Tom was reduced at least four times compared to the control. As a consequence, in round spermatids, Cby is either absent from the ring centriole or when present, does not separate from the basal body (Fig. 7A, arrow), in agreement with defective ring centriole formation. As well, FAM92 (Fig. 7B) is either present at only one centriole of the pair (Fig. 7B, arrowhead) or lost at both centrioles in *DZIP1* KD. When FAM92 is present at the tip of the centriole in spermatocytes, the level of expression of FAM92 is 57% weaker compared to control. In round spermatids, FAM92 expression is completely lost in *DZIP1* KD. Conversely, in *FAM92* KD, the expression domain of DZIP1 (Fig. 7D) is expanded at the distal end of centrioles, in spermatocytes. Interestingly, only one centriole of each pair presents this expansion of the DZIP1 expression domain. We however observed conflicting results for Cby::Tom in absence of FAM92 (from no variations to complete extinction of Cby::Tom). We anticipate these are likely correlated with incomplete penetrance of the shRNA efficiency and we are currently developing new shRNA do address this point.

In *cby*^{1} knockout flies, the expression domain of DZIP1 is strongly expanded compared to the

control, whereas FAM92 is completely lost (Fig. 6C). Altogether, these observations suggest a complex relationship between Cby, DZIP1 and FAM92, with all three proteins being reciprocally important for the proper organization and homeostasis of the TZ or ciliary cap. DZIP1 appears to be required to recruit Cby and FAM92 at centrioles as removing DZIP1 strongly affects both Cby and FAM92 overall amounts at centrioles. FAM92 requires Cby for its assembly at centrioles and we are still quantifying the effect of FAM92 depletion on Cby. In addition, both Cby and Fam92 are required to restrict DZIP1 expression domain at the TZ. This suggests that Cby and FAM92 form a functional cap for DZIP1, and hence control the balanced assembly of the TZ.

Disscussion

I-DZIP1, FAM92 et CBY forment un complexe protéique chez la souris et la drosophile

Les résultats de cette étude indiquent que chez la souris, DZIP1L et FAM92A interagissent avec CBY1. De même, chez la drosophile, DZIP1 et FAM92, les deux seuls orthologues présents dans cet organisme, interagissent avec Cby, comme nous avons pu le démontrer dans un système hétérologue en cellules cos-7 non ciliées. De plus, ces expériences démontrent que ces trois protéines sont purifiées simultanément dans des expériences de LAP-Tag en cellules IMCD3. Ces résultats indiquent donc que ces trois protéines forment un complexe protéique dans les cellules murines. Nous n'avons pas vérifié que ces trois protéines forment un complexe ternaire chez la drosophile. Néanmoins, une première expérience d'immunoprécipitation de DZIP1-GFP à partir de testicules de drosophile et suivie d'une analyse par spectrométrie de masse, a permis de détecter la protéine FAM92 (données non montrées), ce qui suggère que ces deux protéines forment un complexe suffisamment stable pour être purifié. Cependant, ces expériences très préliminaires doivent être réitérées dans des conditions plus stringentes, car de nombreuses protéines non spécifiques semblent également avoir été purifiées. Nous n'avons pas non plus vérifié si DZIP1 et FAM92 pouvaient elles-mêmes interagir directement en cellules cos-7 et ces expériences sont en cours.

Plusieurs données obtenues au cours de cette étude ou dans la littérature confortent également la conclusion que ces protéines forment un complexe à la base des cils. Ces trois protéines co-purifient également ensemble par des approches similaires de LAP-Tag dans des cellules humaines HEK293 (Li et al., 2016b). Nous montrons par des approches de 3D-SIM que les domaines d'expression de ces trois protéines se superposent parfaitement dans les deux tissus ciliés de la drosophile. D'autre part, chez l'Homme, il a été montré par des expériences de co-immunoprécipitation que CBY1 interagit avec FAM92A et FAM92B et leurs localisations se superposent en microscopie à super-résolution (Li et al., 2016b), ce qui démontre une conservation de ce module dans les différentes espèces animales. La localisation de DZIP1 et DZIP1L n'a pas été analysée précisément au regard de CBY1 chez les vertébrés, mais leur localisation à l'extrémité distale du centriole père et leur présence à la

base des cils est en accord avec nos observations chez la drosophile (Glazer et al., 2010; Wang et al., 2013a). De plus, très récemment, une étude vient de révéler le rôle de DZIP1L chez l'homme (Lu et al., 2017). En effet, celle-ci montre que DZIP1L est retrouvé muté chez des patients atteints de maladie rénales polykystiques récessive autosomale.
Cette étude, via l'utilisation de modèles murins et de poisson zèbre, révèle que DZIP1L co-localise avec TCTN1, une protéine de la zone de transition, et la Septine2, une protéine impliquée dans la barrière de diffusion, avec qui elle interagit. Ces données sont en accord avec la présence de DZIP1L comme partenaire de CBY1 à la base des cils.

II-Chez la drosophile, Cby, DZIP1 et FAM92 participent à l'assemblage de la zone de transition

Nos résultats démontrent que DZIP1 et FAM92 se comportent comme Cby chez la drosophile et sont situées au niveau de la zone de transition. En effet, leur domaine d'expression se superpose parfaitement à celui des autres protéines connues de la zone de transition et en particulier les composants du complexe MKS, complexe conservé de la zone de transition des cils et des flagelles des protozoaires à l'Homme (Baker et al., 2004; Enjolras et al., 2012; Basiri et al., 2014; Pratt et al., 2016; Vieillard et al., 2016). Ainsi, au niveau des organes sensoriels de la drosophile, nos données révèlent que ces deux protéines sont situées à la zone de transition des cils, marquée par la présence de Cby. Ce domaine se superpose également au domaine d'expression des protéines Mks1, Cep290 et Unc comme cela a été décrit précédemment (Vieillard et al., 2016; Pratt et al., 2016). En spermatogenèse, FAM92 et DZIP1 se confondent également avec les autres protéines de la zone de transition connues.

Cependant, l'observation de la dynamique de recrutement de DZIP1 et FAM92 au cours de la spermatogenèse montre qu'elles sont recrutées précocement au cours de la maturation des spermatocytes en même temps que Cby, alors que nos travaux précédents montrent que le complexe MKS est recruté postérieurement à Cby au cours de la maturation des spermatocytes (Vieillard et al., 2016). De plus, au cours de l'initiation de l'élongation de l'axonème, la zone de transition est remaniée pour former le ring centriole et le capuchon ciliaire. Dans ce dernier, sont retrouvées notamment les protéines du module MKS, alors que Cby, Unc et Cep290 sont plus spécifiquement concentrées au niveau du ring centriole. Nos observations suggèrent que DZIP1 et FAM92 sont majoritairement localisées au ring centriole, mais peuvent être également présentes le long du capuchon ciliaire. Ces données indiquent que ces protéines auraient, au cours de la spermatogenèse, un rôle plus spécifique au niveau de la base du capuchon ciliaire. Ceci est à rapprocher de certaines données de la littérature qui indiquent que chez les mammifères, CBY1 et DZIP1 se localiseraient non pas à la zone de transition, définit par la présence des protéines du complexe MKS, mais juste en dessous, à l'interface entre les fibres de transition et la zone de transition elle-même (voir figure 14 introduction) (Wang et al., 2013a; Lee et al., 2014). Par ailleurs, une étude récente localise DZIP1L à la zone de transition des cellules RPE-1. Celle-ci révèle également qu'en son absence, la localisation de récepteurs PC1 et PC2 est altérée. Ceci souligne le rôle de DZIP1L dans la fonction de barrière de diffusion de la zone de transition, même si son rôle dans l'assemblage de la zone de transition n'a pas été observé (Lu et al., 2017).

Ainsi, la zone de transition pourrait adopter des configurations différentes d'une espèce à l'autre mais également entre les différents tissus de la drosophile, sans que l'on comprenne encore comment ces variations sont corrélées à des fonctions ou des organisations spécifiques des cils. Afin de déterminer avec précision l'organisation du module CBY dans les différents types ciliaires et dans les différents organismes, il serait intéressant d'observer leur localisation par microscopie à super-résolution en déplétion par émission stimulée (STED), dont la résolution est supérieure à celle du 3D-SIM que nous avons utilisé.

III-DZIP1, FAM92 et Cby sont requises pour la mise en place des cils et des flagelles chez la drosophile

III-1) Dans les cils des neurones sensoriels

La perte de DZIP1 par l'expression d'un shARN exprimé spécifiquement dans les neurones sensoriels conduit à un phénotype non-coordonné des drosophiles. Ce phénotype est lié à une quasi-absence des cils des neurones sensoriels impliqués notamment dans la proprioception et la gravitaxie Ceci a été vérifié par marquage immunologique mais aussi par des observations préliminaires en microscopie électronique. Celles-ci révèlent une forte réduction du nombre de cils dans les neurones chordotonaux. Par ailleurs, des observations complémentaires seront nécessaire afin de déterminer si l'ultrastructure de la zone de transition est perturbée. De la même manière, la déplétion de FAM92 dans les neurones sensoriels conduit à une perte de coordination moins sévère, et l'analyse par immunofluorescence indique que le cil est toujours présent. La différence dans la sévérité de ce phénotype s'explique probablement par l'efficacité du shARN. En effet, nous avons quantifié, seulement au cours de la spermatogenèse, l'efficacité des shARN en regardant l'extinction de DZIP1-GFP et FAM92-GFP après expression de shRNA dirigés respectivement contre ces 2 gènes. DZIP1-GFP disparaît complètement des centrioles alors que FAM92-GFP est toujours présente de manière significative. Sur la base de ces observations, il n'est donc pas possible de conclure de manière formelle sur le rôle que peut jouer FAM92 dans l'assemblage de la zone de transition et du cil sensoriel. Par contre, ces résultats démontrent un rôle primordial de DZIP1 dans l'assemblage de ceux-ci. Il sera nécessaire de créer des mutants nuls de Dzip1 et Fam92 afin de pouvoir conclure définitivement sur leurs rôles respectifs dans l'assemblage de la zone de transition. Pour cela, une approche par CrispR/Cas9 est en cours au laboratoire.

III-2) Dans les flagelles de spermatozoïdes

La déplétion de DZIP1 induite par l'expression d'un shARN spécifiquement dans les testicules de drosophiles conduit à une désorganisation sévère de la spermatogenèse, associée à d'importants défauts d'assemblage de la zone de transition. Nous n'avons pas regardé l'ultrastructure des flagelles, mais le phénotype prononcé de dispersion des noyaux est en faveur d'un défaut sévère d'assemblage des axonèmes, a minima semblable à celui décrit dans des mutants de protéines situées au niveau du ring centriole, comme Unc, Cby ou Cep290 (Baker et al., 2004; Enjolras et al., 2012; Basiri et al., 2014). Des études de

microscopie électronique sur des mutants nuls pour Dzip1 sont programmées afin de valider cette conclusion.

Par contre, la désorganisation de la zone de transition est caractérisée par des atteintes sévères de la localisation ou du recrutement des protéines de la zone de transition, comme Mks1 du module MKS, mais aussi des protéines Cep290, Cby, FAM92 et Unc. Deux phénotypes sont distinguables : pour certaines protéines du ring centriole comme Unc ou Cep290, on observe, une extension de leur domaine d'expression. Concernant les protéines du complexe MKS, l'absence de DZIP1 conduit, soit à une diminution d'intensité de marquage de Mks1, soit à une expansion de son domaine d'expression. Une explication possible est une efficacité variable du shRNA: la perte de DZIP1 à des niveaux faibles conduirait à une désorganisation partielle du capuchon ciliaire et une extension du domaine d'expression de Mks1 alors qu'une réduction plus sévère de DZIP1 conduirait à une perte totale du capuchon et donc de la protéine Mks1. Seule l'obtention d'un mutant nul permettra de lever cette ambiguïté.

La même démarche expérimentale a été utilisée pour caractériser FAM92 et un phénotype similaire est observé dans les testicules. D'importants défauts d'assemblage de la zone de transition sont observés mais le phénotype semble moins pénétrant. A nouveau, ceci pourrait être lié à la pénétrance incomplète et variable des shARN utilisé, et, à nouveau, seule l'obtention d'un mutant nul, dont la réalisation est en cours, nous permettra de conclure sur le rôle de FAM92.

L'ensemble de ces résultats montre que DZIP1 et FAM92 jouent un rôle primordial dans l'assemblage des cils chez la drosophile. Ces 2 protéines sont également impliquées dans l'assemblage des cils chez les vertébrés. La perte de FAM92A a été associée à une diminution de la ciliogenèse (Li et al., 2016b) et la perte de DZIP1L conjointement à celle de DZIP1 réduit fortement la ciliogenèse dans des cellules en cultures (Glazer et al., 2010). Cette même étude montre que la perte de DZIP1 ou Iguana chez le poisson zèbre entraine des défauts très sévères de ciliogenèse. Récemment, une étude a révélé que DZIP1L était impliquée dans la fonction de barrière de diffusion, dans des cultures de cellules primaires murines de fibroblastes embryonnaires (Lu et al., 2017). En revanche, l'implication de la protéine FAM92 dans l'assemblage de la zone de transition n'a pas été étudiée dans ces organismes. Nous montrons chez la drosophile, qu'une fonction de DZIP1L à la zone de transition est conservée mais semble plutôt être reliée à la mise en place et dans le contrôle de l'intégrité de cette structure. Ainsi, DZIP1L pourrait jouer un rôle de coiffe de la zone de transition. De façon similaire, nous démontrons que la protéine FAM92 joue un rôle très important dans la mise en place de la zone de transition chez la drosophile.

IV-Hiérarchie fonctionnelle du module CBY dans l'assemblage de la zone de transition

Au cours de la spermatogenèse, la perte de DZIP1 abolit le recrutement de Cby et FAM92 à la zone de transition. L'absence de Cby, provoque quant à elle une extension du domaine d'expression de DZIP1 et une absence totale de FAM92 au centriole. Enfin, la perte de FAM92, engendre une extension du domaine d'expression de DZIP1. Son effet sur la localisation de Cby au centriole est ambigu au moment de l'écriture de cette étude, compte

tenu de la faible efficacité du shRNA dirigé contre FAM92. Au vu des résultats actuels, on peut tout de même proposer qu'au sein de ce nouveau module protéique, DZIP1 est en amont, suivie de Cby puis FAM92.

Chez les mammifères, la déplétion de CBY1 empêche également le recrutement de FAM92A/B au centriole (Li et al., 2016b). De plus, chez les mammifères, DZIP1 agit en amont de CBY1 (Wang et al., 2013a). Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que la hiérarchie entre ces protéines est conservée des mammifères à la drosophile.

Chez C. elegans et la drosophile, l'absence de la plupart des protéines du module MKS/JBTS n'induit pas de phénotype important dans l'assemblage des cils. En revanche la déplétion simultanée des protéines du complexe MKS/JBTS et NPHP chez C. elegans, conduit à d'importants défauts (Williams et al., 2008). Il existe donc une redondance et une interaction fonctionnelle entre ces deux modules. Chez la drosophile, les protéines du module NPHP sont absentes. En revanche d'autres protéines de la zone de transition comme Cep162, Dila/Azi1, et les protéines du module Cby, DZIP1 et FAM92 y sont présentes alors qu'elles ne sont pas retrouvées chez C. elegans. Cela suggère potentiellement qu'une interaction génétique serait possible entre ces gènes et ceux du module MKS chez la drosophile. Une telle interaction a été démontrée dans l'équipe où le double mutant cby-B9d1 ou le triple mutant cby-B9d1-tctn montrent des défauts sévères d'organisation de la zone de transition (Vieillard, données non publiées). Il est important de rappeler que chez les vertébrés CEP162, CBY, DILA/AZI1, DZIP1 et FAM92A, sont décrites à la base de la zone de transition en dessous du complexe MKS (Wang et al. 2013b; Lee et al., 2014; Wang et al., 2013a; Li et al., 2016b). En revanche, toutes ces protéines se superposent avec le complexe MKS au niveau de la zone de transition chez la drosophile.

Ainsi, l'absence de certains complexes chez la drosophile, pourrait être compensée par un rôle différent des modules de protéines centrés autour de Cby, Dila/Azi1 et Cep162, dont la distribution varie entre les mammifères et la drosophile et même chez la drosophile entre les cils sensoriels et les spermatides. Nous devrons déterminer plus précisément le type d'interactions génétiques entre les gènes du module Cby et les autres composants de la zone de transition, quand nous aurons obtenu et caractérisé les mutants nuls de Dzip1 et Fam92.

V-Mécanismes d'ancrage des corps basaux à la membrane plasmique chez la drosophile

De manière remarquable, nos résultats montrent qu'au cours de la spermatogenèse, la réduction des niveaux d'expression de DZIP1 et de FAM92 conduit à un défaut d'ancrage des centrioles à la membrane plasmique. Ceci se caractérise par la formation d'extensions microtubulaires aberrantes provenant du centriole (voir figure 5 de l'article), phénotype que nous avons pu associer systématiquement à un défaut de mise en place du capuchon ciliaire (Vieillard et al., 2016 et résultats non publiés). Ceci indique qu'en spermatogenèse DZIP1 et FAM92 sont directement ou indirectement impliquées dans l'ancrage des corps basaux à la membrane plasmique.

Aucun défaut d'ancrage du centriole n'a pour l'instant été répertorié chez les mammifères concernant DZIP1/DZIP1L ou FAM92A, mais le mutant murin pour CBY1,

présentent des défauts d'ancrage des corps basaux dans les cellules multiciliées de l'épithélium respiratoire (Voronina et al., 2009; Burke et al., 2014). Les données disponibles chez les vertébrés donnent quelques indications sur les mécanismes par lesquels CBY, en interaction avec DZIP1 et FAM92, peuvent contrôler l'initiation de la ciliogenèse. DZIP1L est le paralogue de DZIP1 chez les mammifères et d'Iguana chez le poisson zèbre (Glazer et al. 2010). Chez les mammifères, DZIP1 est nécessaire à l'activation de Rab8 (Zhang et al., 2015), permettant sa localisation au centriole où elle est recrutée par Rabin8, son facteur d'échange de GDP en GTP, lui-même recruté au centriole par CBY1. Ceci promeut alors l'allongement de la vésicule ciliaire. Les protéines FAM92 possèdent un domaine BAR et sont retrouvées en cellules RPE1, co-localisant au centriole avec CBY1. L'absence de FAM92A se traduit par une réduction drastique de la densité en cil dans ces mêmes cellules. En culture de cellules, la surexpression simultanée de FAM92A et CBY1 conduit à la génération de structures membranaires riches en Rab8. Ceci expliquerait comment CBY1 à l'aide de DZIP1 et FAM92 agit sur le recrutement de Rab8 à l'extrémité distale du centriole et dans la mise en place d'une vésicule ciliaire au cours de l'initiation de la ciliogenèse.

Cependant, les données préliminaires que nous avons collectées chez la drosophile ne sont pas complètement en accord avec ces observations. D'une part, les données disponibles chez la drosophile ne permettent pas d'affirmer l'existence d'une vésicule ciliaire avant l'ancrage à la membrane plasmique. D'autre part, si Rab8 se localise au niveau du capuchon ciliaire, il semble qu'elle ne soit recrutée qu'à partir du stade spermatide à ce niveau (Vieillard et al. 2016), même si elle a occasionnellement été trouvée au centriole aux stades spermatocytes. De plus, l'analyse d'un mutant nul de rab8 (obtenu en collaboration avec P. Therond) indique que Rab8 n'est pas requise pour la mise en place du capuchon ciliaire mais seulement pour l'élongation de l'axonème à partir du stade spermatide. Ainsi, l'axe Cby-Rab8 serait actif seulement au cours des phases d'élongation de l'axonème, mais pas aux stades précoces de l'initiation de la ciliogenèse ou de l'ancrage des corps basaux. Il n'est pas exclu cependant, que l'absence de phénotype des spermatocytes mutants pour rab8 reflète une redondance fonctionnelle avec d'autres protéines Rab chez la drosophile. Il est à noter que malgré le rôle décrit pour Rab8 en cellules en culture, le double mutant murin Rab8a et b ne montre pas de défaut de ciliogenèse (Sato et al., 2014).

VI-Maintenance d'une asymétrie des centrioles au cours de la spermatogenèse chez la drosophile

L'absence de DZIP1 et FAM92 conduit, à une perturbation de la localisation des protéines de la zone de transition et à une extension aberrante de microtubules centriolaires. De manière remarquable, dans un grand nombre de cas, sur la paire de centriole, 1 seul des deux centrioles présente ces défauts. Nous avons pu observer que dans 85% des cas, seul le centriole fils, positionné perpendiculairement au centriole père, présentait ces défauts. Ainsi, bien que les 2 centrioles de chaque paire soient capables de former un cil, le centriole fils apparaît plus sensible que le centriole père à une perturbation des protéines de la zone de transition.

A la fin du stade spermatocyte, les deux centrioles sont d'un point de vue ultrastructure identiques, mais ces résultats indiquent qu'une asymétrie fonctionnelle persiste au sein de chaque paire. Ce résultat est en accord avec l'observation que des drosophiles mutantes pour klp10A, une kinésine dépolymérisante, présentent un centriole

père plus long que le centriole fils, qui ne parvient plus à recruter la protéine centriolaire dPlp (Delgehyr et al., 2012; Gottardo et al., 2016). Aucune protéine n'a été décrite pour être exprimée de manière asymétrique sur les centrioles des spermatocytes de drosophile. Par contre, il a été montré que dans les neuroblastes de drosophile, la Centrobine est localisée au centriole fils et est nécessaire dans le maintien à ce centriole, du matériel péricentriolaire afin d'orienter la cellule au cours de la division cellulaire (Januschke et al., 2013). La perte de la Centrobine supprime cette fonction. En revanche, en forçant l'expression de la Centrobine, le centriole père acquiert cette fonction. De plus, dans les neurones ciliés de la drosophile, l'expression ectopique de la Centrobine aux deux centrioles inhibe la ciliogenèse alors que sa suppression conduit à la formation d'un cil aux deux centrioles de la paire (Gottardo et al. 2015). L'expression de la Centrobine dans les spermatocytes n'a pas été décrite. Il serait donc important de déterminer si de telles asymétries moléculaires entre les centrioles pères et fils existent en spermatocytes, mais sans impacter pour autant la capacité de ces centrioles à faire ou ne pas faire un cil. Elles ne seraient alors révélées que dans un contexte de perturbation de protéines de la zone de transition.

Conclusion

L'ensemble de cette étude a permis d'identifier un nouveau complexe centré autour de Cby et présent à la base des cils chez les mammifères et au sein de la zone de transition chez la drosophile. Ce complexe est d'une importante toute particulière pour l'assemblage de la zone de transition des flagelles, mais aussi des cils des neurones sensoriels.
Même si certaines études ont montré que l'un des deux interacteurs, Fam92, interagit avec Cby en cellules de mammifères, je montre que ce complexe est conservé des mammifères à la drosophile. Chez la drosophile, j'ai identifié que ces deux protéines sont de nouvelles protéines de la zone de transition jouant un rôle clé dans l'assemblage de la zone de transition à la fois au cours de la spermatogenèse, mais aussi dans les neurones sensoriels en ce qui concerne Dzip1.

Afin d'augmenter la portée de mes résultats, il sera nécessaire de répondre à quelques questions toujours en suspend au moment du rendu de ce manuscrit. Ainsi, il sera important compléter la caractérisation fonctionnelle de Fam92 dans l'assemblage des cils des neurones sensoriels. De plus, Dzip1 et Fam92 étant localisées à la zone de transition, il sera primordial d'observer l'ultrastructure de cette région, à la fois dans les neurones sensoriels, mais aussi au cours de la spermatogenèse, étant donné les défauts importants observés au cours de la spermatogenèse en leur absence. Ceci sera réalisé par des observations en microscopie électronique lors de l'obtention des mutants. En effet, le shARN dirigé contre FAM92 n'étant pas efficace, il sera sans doute plus aisé d'observer les défauts en microscopie électronique dans un mutant nul. Nous planifions également au laboratoire, la génération d'un second shARN dirigé contre FAM92, dans le cas où nous ne parviendrions pas à obtenir le mutant. L'obtention de ces mutants permettra également de déterminer si la pénétrance incomplète des phénotypes observés en l'absence de Dzip1 est due à un phénomène de compensation ou s'il reste suffisamment d'ARN messager de Dzip1, expliquant que toutes les cellules ne présentent pas de défauts d'assemblage de la zone de transition. Enfin, ces mutants permettront de clarifier certaines observations et phénotypes mis en évidence.

Plusieurs mutants de protéines de la zone de transition ont été caractérisés chez la drosophile. Afin de compléter la hiérarchie d'assemblage de la zone de transition au travers

du complexe identifié, il sera primordial d'observer le comportement de Dzip1 et Fam92 dans ces divers mutants. Cela nous permettra de déterminer avec précision, l'importance des différents acteurs de la zone de transition et peut-être de déterminer l'ordre d'apparition de ces différents modules.

Au sein du complexe identifié, Cby interagit avec Dzip1 et Fam92, mais nous n'avons pas encore mis en évidence d'interaction entre Dzip1 et Fam92. Il serait intéressant de tester leur interaction, en co-immunoprécipitation classique, ou via diverses méthodes de détection d'interaction protéine-protéine comme le PLA (Proximity Ligation Assay) ou le BiFC (Bimolecular Fluorescence complementation). Enfin, nous pourrions également générer des mutants de domaines, afin de déterminer quelle région protéique de Cby permet l'interaction avec Fam92 et Dzip1 dans un premier temps, chez la drosophile. Dans un second temps, nous pourrions effectuer la même stratégie mais cette fois en générant des mutants de domaine de Dzip1 et Fam92, pour déterminer quelles sont leurs régions permettant l'interaction avec Cby.

Ces expériences complémentaires nous permettront d'en apprendre davantage sur les mécanismes d'action de Dzip1 et Fam92 et plus généralement du module Cby au sein de la zone de transition. Elles permettront également de mieux comprendre les processus d'assemblage de la zone de transition dans les différents tissus ciliés chez la drosophile, possédant des zones de transition aux comportements dynamiques différents.

Material and Methods

Plasmids

Cby1 CDS was PCR amplified from mouse ependymal primary cell cDNA. PCR product was cloned into pDONR223 (Invitrogen) and then subsequently Gateway cloned into the pG-LAP3 vector containing the EGFP-TEV-S peptide tag in N-terminus (gift from P. Jackson, Torres JZ et al. 2009)

For the generation of GFP and HA tagged proteins, CDS of mice Cby1 and DZIP1L were obtained by PCR and cloned respectively in pEGFP-N1 (Clontech) and pCDNA3.1-HA (gift from S Kochbin, IAB, Grenoble, France) plasmids.

CDS of *Drosophila* Cby, DZIP1/CG13617) and FAM92/CG6405) were obtained by PCR and cloned as above in frame with GFP (Cby) or 3xFlag (DZIP1/CG13617 and FAM92/CG6405) in pEGFP-N1 (Clontech) and pCDNA3.1-3xFlag respectively.

Drosophila reporter gene constructs of DZIP1/CG13617 was obtained by cloning 1,6 kb upstream regulatory sequences and the entire coding sequence in frame with GFP of pJT61 (Vieillard et al. 2016). The 4 kb fragment of FAM92/CG6405 including 1,4 kb of upstream regulatory sequences, the entire coding sequence fused to the multipurpose tag cassette including GFP and the 3'UTR was obtained by PCR on fosmid from the FlyFos library (Sarov et al. 2016). The resulting constructs were integrated in plateform 53B2 (II). All transgenic lines were obtained from BestGene Inc.

Cell culture and transfection

IMCD3 (a gift from A. Benmerah, Institut Imagine, Paris) were cultured in DMEM/HAM'S F12 medium supplemented with 10% FBS, 1X non-essential amino acids, 100 U/ml penicillin-streptomycin and 100 µg/ml hygromycin. COS-7 cells were maintained in DMEM medium containing 10% FBS, 1X non-essential amino acids and 100 U/ml penicillin-streptomycin.

Transfections were performed using jetPRIME (Polyplus transfection) according to the manufacturer's instructions.

Stable cell lines.

IMCD3 cell lines expressing LAP-mCby1 or control LAP-GFP were created using the Flp-In system kit (Invitrogen) and established method (Torres JZ et al. 2009).

Tandem affinity purification and mass spectrometry of CBY1-interacting proteins

Two rounds of purification of Cby1-complexes proteins were performed. Cells were seeded in 35 15-cm dishes and grown to confluence before serum starvation for 24h to induce primary cilia formation. Cells were washed once with ice-cold PBS1X and purification was performed as described previously (Nachury, 2008). Briefly, cells were collected by scraping and resuspended in 11 ml lysis buffer containing HEPES pH7.5 0.05M, EGTA pH8 1mM, MgCl2 1mM, KCl 300mM, Glycerol 10%, NP-40 0.31% and 1X protease inhibitor cocktail (Roche). Cby1-complexes were purified using GFP-TRAP (Chromotek). S-Tag mCby1 was cleaved off GFP beads by TEV cleavage and the eluate was further purified on S-protein agarose (Merck) and eluted in 100 µl 2x Laemmli Sample Buffer.

For protein identification, samples were separated by 10% SDS-PAGE. The gels were stained with Coomassie and then cut into 4 slices. Each gel slice was washed, reduced with 10 mM DTT, alkylated with 55 mM iodoacetamide, and subjected to in-gel trypsin digestion overnight (*Trypsin* Protease, MS Grade, Thermo Scientific *Pierce*). The extracted tryptic peptides were cleaned up using OMIX C18 100 µl pipette tips (Agilent), and lyophilized before being reconstituted for the LC-MS/MS analysis.

The peptides were separated using an Eksigent Ultra nano-LC HPLC system coupled with an AB Sciex Triple TOF 5600 mass spectrometer. The LC separations were performed using a Discovery Bio Wide Pore HPLC column (C18, 3 µm, 100x5 mm). The mobile phases used were 0.1% formic acid in water (A) and 100% acetonitrile with 0.1% formic acid. The gradient elution steps were performed with a flow rate of 5 µl/min as follows: 0-40% B for 106 min, 40-80% for 5 min, and then 80% B for an additional 5 min. All data were acquired using Analyst software (AB Sciex) in the data dependent mode. Peptide profiling was performed using a mass range of 350-1600 Da, followed by a MS/MS product ion scan from 100 to 1500 Da. For each survey MS1 scan (accumulation time of 250 msec), MS/MS spectra (accumulation time of 75 msec per MS/MS) were obtained for the 30 most abundant precursor ions. The protein identification was performed with the ProteinPilot Software 5.0 (AB Sciex). The MS/MS spectra obtained were searched against the mouse UniProt Proteome database (release 2015_09 with 46470 proteins). The search parameters for tryptic cleavage and accuracy are built-in functions of the software. The other data analysis parameters were as follows: Sample type: identification; Cys-alkylation: Iodoacetamide;

Digestion: Trypsin; Instrument: TripleTOF 5600; Special factor: gel based ID, and biological modifications; Species: Homo sapiens; Search effort: Thorough ID. Proteins comprising one or more peptides with a high confidence score (95%) and a low false discovery rate (FDR) (estimated local FDR of 1%) were considered positively identified.

Co-IP and western blotting

Co-IP assays were performed using transfected COS-7 cells, harvested in ice-cold PBS1X. Cell pellet was resuspended in lysis buffer (NaCl 150mM, Tris-HCl 0.05M pH 7.2, NP-40 1%, Desoxycholate Na 1%) with protease inhibitor cocktail (Roche) 1X and incubated for 1h at 4°C under agitation. Cell lysates were cleared by centrifugation at 13 000 rpm for 20 min at 4°C. Supernatants were incubated with either GFP-TRAP (Chromotek) or Flag-coupled beads (Sigma) as indicated for 1 or 2h at 4°C. The beads were collected and washed five times with 1 ml of ice-cold lysis buffer before SDS-PAGE. Eluates were loaded on 10 or 12% SDS-PAGE. After migration, proteins were transferred onto a PVDF membrane (Amersham Hybond P 0.45 PVDF) and immunoblotted with the following antibodies.

Primary antibodies used for western blotting were as follows : mouse and rat anti-Flag M2 1 :1000 (Sigma), rat anti-HA 1 :1000 (Roche), rabbit anti-GFP 1 :3000(Abcam). HRP-conjugated secondary antibodies used for western blotting were as follows : goat anti-mouse 1:3000 (Biorad), goat anti-rabbit 1:3000 (Biorad) and goat anti-rat 1:20000 (Sigma). Membranes were visualized using ECL prime from GE Healthcare.

Fly stocks and maintenance

The shRNA against CG13617 (v100489) and CG6405 (v106675) were obtained from the Vienna *Drosophila* Stock Center. The *cby*^{1} mutant and Cby::GFP and Cby::Tomato transgenes were previously described (Enjolras *et al.*, 2012). The Bam-GAL4::VP16 construct was described previously (Chen and McKearin, 2003) and the actin 5C-GAL4 was a gift from B. Lopin, LBBE, Lyon . The Unc::GFP transgene was a gift from M. Kernan (Baker *et al.*, 2004) and CEP290::GFP was a gift from T. Avidor- Reiss (Blachon *et al.*, 2009; Basiri *et al.*, 2014). PLCdeltaPH-mRFP stock was a gift from J. Brill (SickKids, Toronto, Canada, Wei et al. 2008) 6652::GFP and Unc::mKate transgenes have been described in Vieillard et al. 2016

The flies were raised on standard media between 21 and 25°C.

Immunofluorescence and confocal microscopy

Testes from young adult flies or pupae were dissected in PBS1X, fixed 15 minutes in PBS1X/PFA 4%, squashed between coverslip and slide and frozen in liquid nitrogen. Coverslip was removed and slide was soaked for 2 min in ethanol 100% at -20°C. Testes were permeabilized 15 min in PBS1X/Triton 0.1% (PBT) and blocked 2h in PBT/BSA 3%/NGS 5%.

For methanol fixation, testes from young adult flies or pupae were dissected in PBS1X, perforated with a tungsten needle on a slide and squashed. Slide was frozen in liquid nitrogen and coverslip removed. Samples were fixed 10 min in methanol 100% at -20°C, washed in PBS1X and blocked 1h in PBS1X/BSA0.1%.

Primary antibodies were incubated in blocking buffer overnight at 4°C. Fixed testes were then washed in PBS1X and incubated 2h in secondary antibodies diluted in PBS1X. Slides were washed in PBS1X and rinsed in ultrapure water. Slides were mounted using Vectashield containing Hoescht 1:1000.

Antennae were processed as previously described (Vieillard *et al.* 2015). Briefly, *Drosophila* heads from 38-45h pupae were dissected in PBS1X, fixed 1h in PBS1X/PFA 4% and washed in PBS1X. Antennae were permeabilized 1h in PBS1X/Triton 0,3%, blocked 1h in PBS1X/Triton 0.3%/BSA 3%/NGS 5% and incubated in primary antibodies diluted in blocking solution for 48h at 4°C. Samples were washed 3 times in PBS1X and incubated in secondary antibodies diluted in PBS1X for 48h at 4°C. Antennae were washed 3 times in PBS1X and mounted in Vectashield.

Most slides were imaged using the IX83 microscope from Olympus equipped with an iXon Ultra 888 EMCDD camera from Andor and the IQ3 software from Andor. The PlanApo N Apochromat 60x 1.42NA objective from Olympus was used for all acquisitions.

All images were processed with ImageJ. Figures were created with Adobe photoshop. Only contrasts and offset were adjusted.

3D-SIM microscopy

Squashed testes or antennaes were performed on 12 diameter round coverslip with a 44x60mm overlaying coverslip. Immunofluorescence protocols were the same as above using PFA. Images were acquired using the Elyra PS.1 system from Zeiss (Carl Zeiss, AG, Jena) equipped with a PCO edge 5.5 camera and the ZEN 2012 SP2 software (black edition). The

objective used for all acquisitions is a Plan-apochromat 63x 1.4 NA.

Live imaging

Live imaging experiment was done as previously described (Vieillard *et al.* 2016).

Briefly, unfixed testes of young adults or pupae were dissected in PBS1X at room temperature, placed in a drop of PBS1X or PBS1X/FCS0,5% on glass bottom poly-lysine (Sigma) coated petri dishes (Will-Co). Cells were pulled out of the testes using thinned capillaries and left to attach for 5-15 min.

Antibodies

The antibodies used were the following: mouse anti-Futsch (1:250 DSHB=22c10), mouse anti-g-Tubulin (1:500 Sigma), mouse anti-polyglutamylated-Tubulin antibody (1:500 Enzo life science GT335), rabbit anti-HRP (1:500 Jackson Immuno Research), rabbit anti-GFP (1:1000 Abcam), guinea pig anti-Asterless (1/30000 gift from C. Rogers, University of Arizona, Tucson, AZ; Klebba et al. 2013). B9D1 (CG14870) antibody was used at 1: 2500 dilution (Vieillard et al. 2016).

The following secondary antibodies were used (all at 1:1000 dilution): goat anti-mouse Alexa 488 or Alexa 594, goat anti-rabbit Alexa 488 or Alexa 647, donkey anti-rabbit Alexa 568, goat anti-guinea pig Alexa 488 or Alexa594 or Alexa 647 (Invitrogen) and donkey anti-guinea pig Alexa 647 (Jackson Immuno Research).

Electron microscopy.

Samples were processed as previously described (Enjolras *et al.* 2012; Vieillard *et al.* 2015).

References

Avidor-Reiss, T., and Leroux, M.R. (2015). Shared and Distinct Mechanisms of Compartmentalized and Cytosolic Ciliogenesis. Curr Biol *25*, R1143–R1150.

Badano, J., Mitsuma, N., Beales, P., and Katsanis, N. (2006). The Ciliopathies: An Emerging Class of Human Genetic Disorders. Annu Rev Genomics Hum Genet *7*, 125–148.

Baker, J.D., Adhikarakunnathu, S., and Kernan, M.J. (2004). Mechanosensory-defective, male-sterile unc mutants identify a novel basal body protein required for ciliogenesis in Drosophila. *131*, 3411–3422.

Baker, K., and Beales, P.L. (2009). Making sense of cilia in disease: the human ciliopathies. American Journal of Medical Genetics Part C, Seminars in Medical Genetics *151C*, 281–295.

Basiri, M.L., Ha, A., Chadha, A., Clark, N.M., Polyanovsky, A., Cook, B., and Avidor-Reiss, T. (2014). A Migrating Ciliary Gate Compartmentalizes the Site of Axoneme Assembly in Drosophila Spermatids. Current Biology 1–19.

Brown, J.M., and Witman, G.B. (2014). Cilia and Diseases. BioScience *64*, 1126–1137.

Burke, M.C., Li, F.-Q., Cyge, B., Arashiro, T., Brechbuhl, H.M., Chen, X., Siller, S.S., Weiss, M.A., O'Connell, C.B., Love, D., et al. (2014). Chibby promotes ciliary vesicle formation and basal body docking during airway cell differentiation. J Cell Biol *207*, 123–137.

Chamling, X., Seo, S., Searby, C.C., Kim, G., Slusarski, D.C., and Sheffield, V.C. (2014). The Centriolar Satellite Protein AZI1 Interacts with BBS4 and Regulates Ciliary Trafficking of the BBSome. PLoS Genet *10*, e1004083.

Chih, B., Liu, P., Chinn, Y., Chalouni, C., Komuves, L.G., Hass, P.E., Sandoval, W., and Peterson, A.S. (2012). A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain. Nature Cell Biology *14*, 61–72.

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

Czarnecki, P.G., and Shah, J.V. (2012). The ciliary transition zone: from morphology and molecules to medicine. Trends Cell Biol *22*, 201–210.

Enjolras, C., Thomas, J., Chhin, B., Cortier, E., Duteyrat, J.L., Soulavie, F., Kernan, M.J., Laurencon, A., and Durand, B. (2012). Drosophila chibby is required for basal body formation and ciliogenesis but not for Wg signaling. J Cell Biol *197*, 313–325.

Fabian, L., and Brill, J.A. (2012). Drosophila spermiogenesis: Big things come from little packages. Spermatogenesis *2*, 197–212.

Garcia, G., and Reiter, J.F. (2016). A primer on the mouse basal body. Cilia *5*, 1–9.

Garcia-Gonzalo, F.R., Corbit, K.C., Sirerol-Piquer, M.S., Ramaswami, G., Otto, E.A., Noriega,

T.R., Seol, A.D., Robinson, J.F., Bennett, C.L., Josifova, D.J., et al. (2011). A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. Nature Genetics *43*, 776–784.

Glazer, A.M., Wilkinson, A.W., Backer, C.B., Lapan, S.W., Gutzman, J.H., Cheeseman, I.M., and Reddien, P.W. (2010). The Zn finger protein Iguana impacts Hedgehog signaling by promoting ciliogenesis. Dev Biol *337*, 148–156.

Gogendeau, D., and Basto, R. (2009). Centrioles in flies: The exception to the rule? Semin Cell Dev Biol *21*, –173.

Gonçalves, J., and Pelletier, L. (2017). The Ciliary Transition Zone: Finding the Pieces and Assembling the Gate. 1–11.

Gottardo, M., Callaini, G., and Riparbelli, M.G. (2013). The cilium-like region of the Drosophila spermatocyte: an emerging flagellum? J Cell Sci *126*, 5441–5452.

Gottardo, M., Callaini, G., and Riparbelli, M.G. (2016). Klp10A modulates the localization of centriole- associated proteins during Drosophila male gametogenesis. Cell Cycle *15*, 3432–3441.

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

Hall, E.A., Keighren, M., Ford, M.J., Davey, T., Jarman, A.P., Smith, L.B., Jackson, I.J., and Mill, P. (2013). Acute versus chronic loss of mammalian Azi1/Cep131 results in distinct ciliary phenotypes. PLoS Genet *9*, e1003928.

Han, Y.-G., Kwok, B.H., and Kernan, M.J. (2003). Intraflagellar transport is required in Drosophila to differentiate sensory cilia but not sperm. Current Biology *13*, 1679–1686.

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

Li, F.-Q., Chen, X., Fisher, C., Siller, S.S., Zelikman, K., Kuriyama, R., and Takemaru, K.-I. (2016b). BAR Domain-Containing FAM92 Proteins Interact with Chibby1 to Facilitate Ciliogenesis. Mol Cell Biol MCB.00160–16.

Li, F.-Q., Mofunanya, A., Harris, K., and Takemaru, K.-I. (2008). Chibby cooperates with 14-3-3 to regulate beta-catenin subcellular distribution and signaling activity. J Cell Biol *181*, 1141–1154.

Ma, L., and Jarman, A.P. (2011). Dilatory is a Drosophila protein related to AZI1 (CEP131) that is located at the ciliary base and required for cilium formation. J Cell Sci.

Nachury, M. (2008). Tandem affinity purification of the BBSome, a critical regulator of Rab8 in ciliogenesis. Methods Enzymol *439*, 501–513.

Pratt, M.B., Titlow, J.S., Davis, I., Barker, A.R., Dawe, H.R., Raff, J.W., and Roque, H. (2016). Drosophila sensory cilia lacking MKS proteins exhibit striking defects in development but only subtle defects in adults. J Cell Sci *129*, 3732–3743.

Rachel, R.A., Yamamoto, E.A., Dewanjee, M.K., May-Simera, H.L., Sergeev, Y.V., Hackett, A.N., Pohida, K., Munasinghe, J., Gotoh, N., Wickstead, B., et al. (2015). CEP290 alleles in mice disrupt tissue-specific cilia biogenesis and recapitulate features of syndromic ciliopathies. Hum Mol Genet *24*, 3775–3791.

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

Riparbelli, G., Callaini, G., and Megraw, T.L. (2012). Assembly and Persistence of Primary Cilia in Dividing Drosophila Spermatocytes. Dev Cell *23*, 425–432.

Riparbelli, M.G., Cabrera, O.A., Callaini, G., and Megraw, T.L. (2013). Unique properties of Drosophila spermatocyte primary cilia. Biology Open *2*, 1137–1147.

Sang, L., Miller, J.J., Corbit, K.C., Giles, R.H., Brauer, M.J., Otto, E.A., Baye, L.M., Wen, X., Scales, S.J., Kwong, M., et al. (2011). Mapping the NPHP-JBTS-MKS protein network reveals ciliopathy disease genes and pathways. Cell *145*, 513–528.

Sarpal, R., Todi, S.V., Sivan-Loukianova, E., Shirolikar, S., Subramanian, N., Raff, E.C., Erickson, J.W., Ray, K., and Eberl, D.F. (2003). Drosophila KAP interacts with the kinesin II motor subunit KLP64D to assemble chordotonal sensory cilia, but not sperm tails. Current Biology *13*, 1687–1696.

Sekimizu, K., Nishioka, N., Sasaki, H., Takeda, H., Karlstrom, R.O., and Kawakami, A. (2004). The zebrafish iguana locus encodes Dzip1, a novel zinc-finger protein required for proper regulation of Hedgehog signaling. Development *131*, 2521–2532.

Shi, J., Zhao, Y., Galati, D., Winey, M., and Klymkowsky, M.W. (2014). Chibby functions in Xenopus ciliary assembly, embryonic development, and the regulation of gene expression. Dev Biol *395*, 287–298.

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

Tates, A. (1971). Cytodifferentiation during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster:* an electron microscope study. Ph.D. Thesis. J.H. Pasmans, the A compléter...

Hague.

Tay, S.Y., Yu, X., Wong, K.N., Panse, P., Ng, C.P., and Roy, S. (2010). The iguana/DZIP1 protein is a novel component of the ciliogenic pathway essential for axonemal biogenesis. Dev Dyn *239*, 527–534.

Vieillard, J., Paschaki, M., Duteyrat, J.-L., Augière, C., Cortier, E., Lapart, J.-A., Thomas, J., and

Durand, B. (2016). Transition zone assembly and its contribution to axoneme formation in Drosophilamale germ cells. J Cell Biol *214*, 875–889.

Villumsen, B.H., Danielsen, J.R., Lou Povlsen, Sylvestersen, K.B., Merdes, A., Beli, P., Yang, Y.-G., Choudhary, C., Nielsen, M.L., Mailand, N., et al. (2013). A new cellular stress response that triggers centriolar satellite reorganization and ciliogenesis. The EMBO Journal *32*, 3029–3040.

Voronina, V.A., Takemaru, K.-I., Treuting, P., Love, D., Grubb, B.R., Hajjar, A.M., Adams, A., Li, F.-Q., and Moon, R.T. (2009). Inactivation of Chibby affects function of motile airway cilia. J Cell Biol *185*, 225–233.

Weatherbee, S.D., Niswander, L.A., and Anderson, K.V. (2009). A mouse model for Meckel syndrome reveals Mks1 is required for ciliogenesis and Hedgehog signaling. Hum Mol Genet *18*, 4565–4575.

Williams, C.L., Li, C., Kida, K., Inglis, P.N., Mohan, S., Semenec, L., Bialas, N.J., Stupay, R.M., Chen, N., Blacque, O.E., et al. (2011). MKS and NPHP modules cooperate to establish basal body/transition zone membrane associations and ciliary gate function during ciliogenesis. J Cell Biol *192*, 1023–1041.

Wolff, C., Roy, S., Lewis, K.E., Schauerte, H., Joerg-Rauch, G., Kirn, A., Weiler, C., Geisler, R., Haffter, P., and Ingham, P.W. (2004). iguana encodes a novel zinc-finger protein with coiled-coil domains essential for Hedgehog signal transduction in the zebrafish embryo. Genes Dev *18*, 1565–1576.

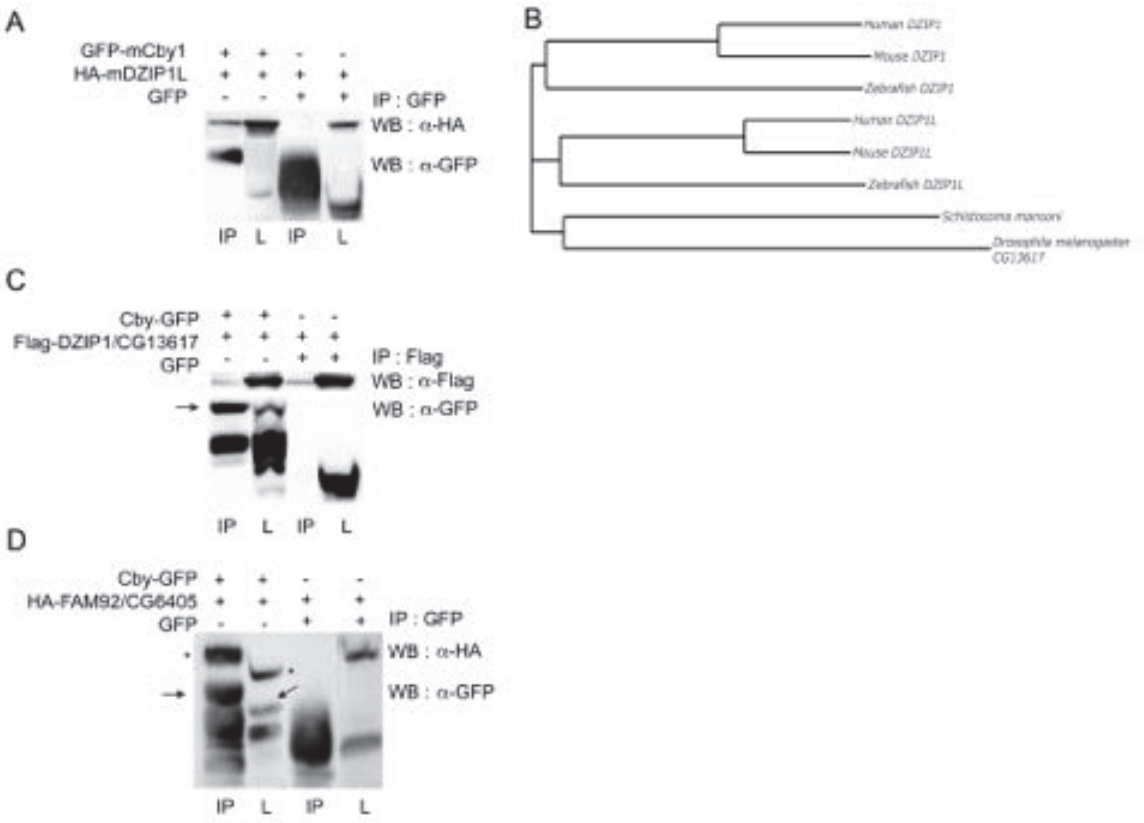


Figure 1

Figure 1. Cby interacts with DZIP1 and FAM92 proteins

(A, C, D) COS-7 cells were transfected with the indicated plasmids, and cell lysates were immunoprecipitated with GFP or Flag antibodies coupled beads. Both cell lysates (L) and immunoprecipitates (IP) were detected by western blotting with GFP, HA and/or Flag antibodies. (A) Murine mDZIP1L specifically interacts with mCby1 but not with GFP. (B) Phylogenic tree of DZIP1L using clustalO and treeview. DZIP1L gene is conserved in *Drosophila* and in protozoa. (C) *Drosophila* DZIP1/CG13617 specifically interacts with *Drosophila* Cby but not with GFP. Specific band corresponding to Cby-GFP is indicated by an arrow. (D) *Drosophila* FAM92/CG6405 specifically interacts with *Drosophila* Cby but not with GFP. HA-FAM92/CG6405 and Cby-GFP are indicated by a star and an arrow respectively.

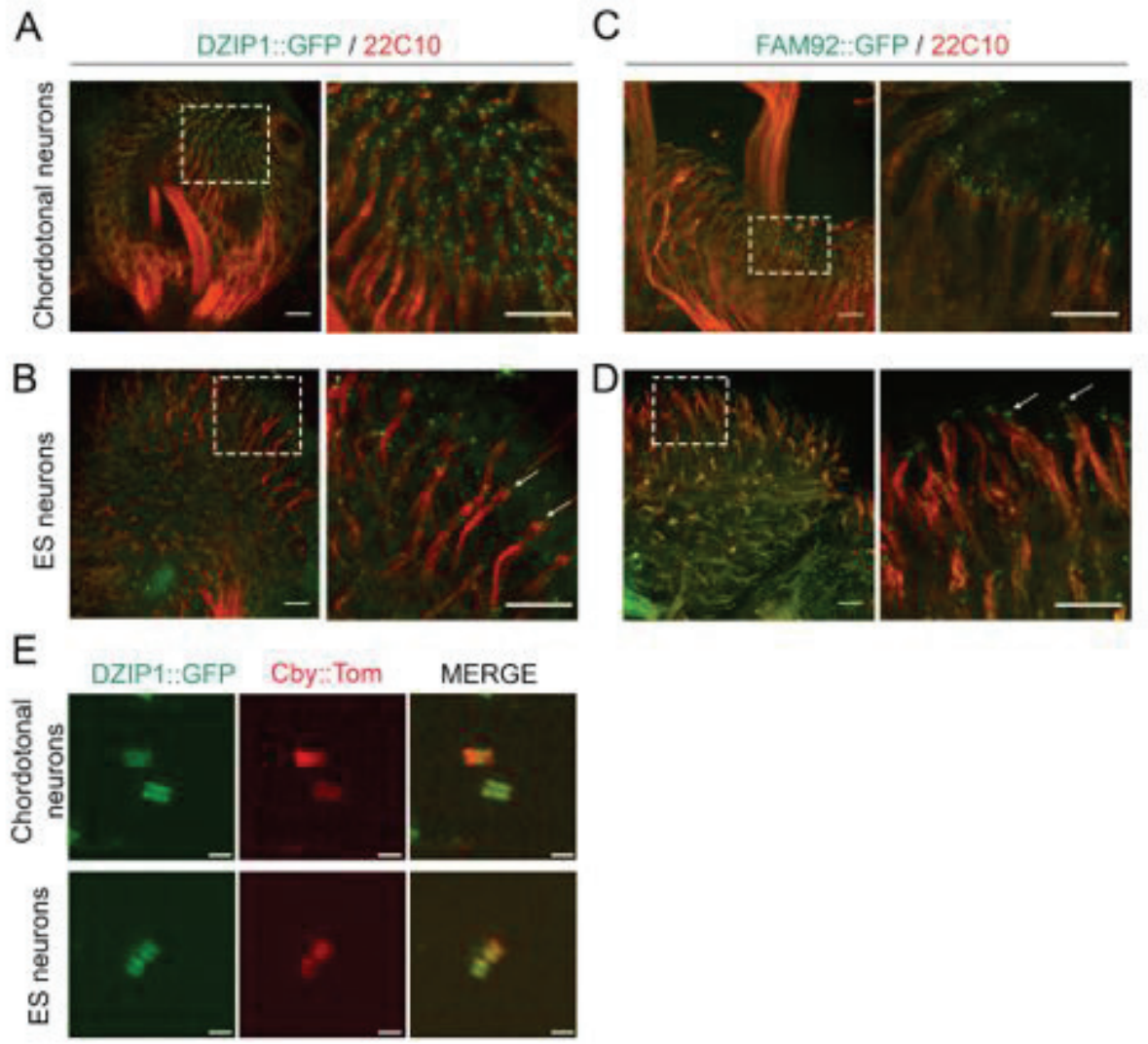


Figure 2

Figure 2. *Drosophila* DZIP1 and FAM92 are expressed in all ciliated sensory neurons and locate at the ciliary transition zone

Whole-mount staining of the second and third antennal segment showing neuronal cell bodies and dendrites (22C10 = Futsch), DZIP1::GFP and FAM92::GFP. (A, C) second segment showing chordotonal neurons and (B, D) external sensory neurons. DZIP1::GFP and FAM92::GFP are present at the tip of the dendrites in each neurons. A three-fold magnification of the insets is represented for each panel. Arrows point to DZIP1::GFP and FAM92::GFP localization at the tip of the dendrite. (E) 3D-SIM imaging of chordotonal and ES neurons. *Drosophila* DZIP1 and Cby overlap at the transition zone. Bars=10 µm for A, B, C, D. Bars=0,5 µm for E (3D-SIM).

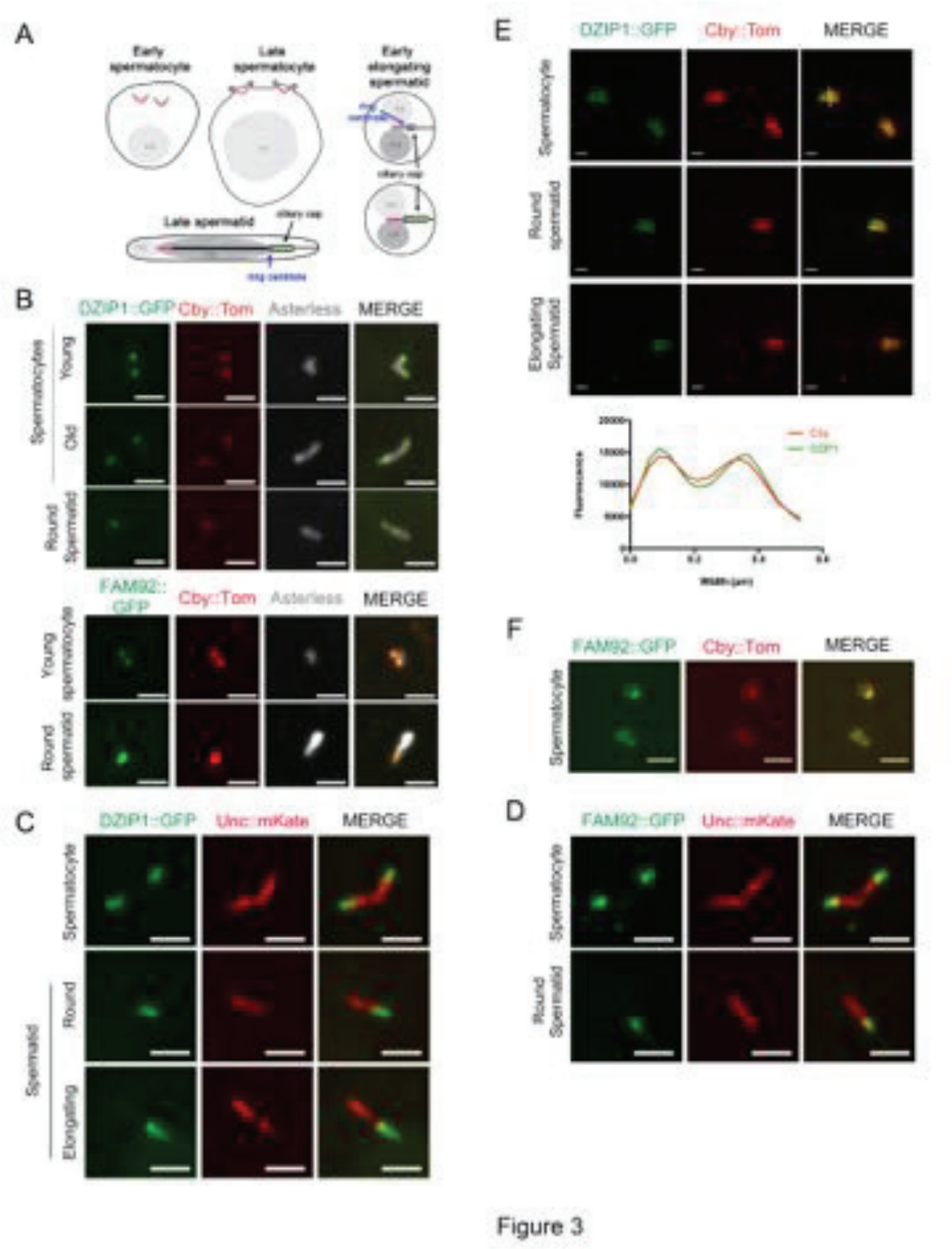


Figure 3

Figure 3. *Drosophila* DZIP1 and FAM92 are located at the transition zone during spermatogenesis

(A) Scheme illustrating centriole/basal bodies (BB) behavior during spermatogenesis in male germ cells. In early spermatocytes, the two pairs of centrioles (magenta) start to assemble TZ and accumulating TZ components (green) at their tips. Then, spermatocyte mature, centrioles convert to BBs (magenta) and dock to the plasma membrane while extending cilia/TZ (green). During meiosis, BBs with cilia/TZ are internalized retaining the ciliary cap

(green) connected to the plasma membrane. In round spermatid, BBs are apposed to the nuclear membrane and the ciliary cap (green) connected to the plasma membrane is extended. The base of the ciliary cap, the ring centriole (blue), allows its connection to the BB. At the onset of axoneme elongation, the ciliary cap still extends, the axoneme grows (black), and the TZ (ciliary cap and ring centriole) starts to migrate away from the basal body. (B–F) Localization of DZIP1 and FAM92 in *Drosophila* male germ cells. (B) confocal imaging of whole-mount testes showing DZIP1::GFP, FAM92::GFP, Cby::Tom and Asterless (centriole). DZIP1 and FAM92 appear in young spermatocytes together with Cby at the TZ. (C) Unc labels the BB. DZIP1 and Unc overlap along the TZ/cilia in spermatocyte. The ring centriole labeled with Unc separates from the BB in elongating spermatids and partially overlaps with *Drosophila* DZIP1, which is more distal than Unc and also localizes in the ciliary cap (D) FAM92 behave like DZIP1 and partially overlap with Unc (E) 3D-SIM imaging of male germ cells. *Drosophila* DZIP1 and Cby overlap in spermatocytes, round spermatids and elongating spermatids. DZIP1 overlaps with Cby both at the TZ/ciliary cap and at the ring centriole as observed on a scan profile of fluorescence intensity (grayscale units) across (white line) the TZ/ring centriole. (F) 3D-SIM imaging of FAM92 in spermatocytes. Like DZIP1, FAM92 and Cby overlap. Bars=2 µm

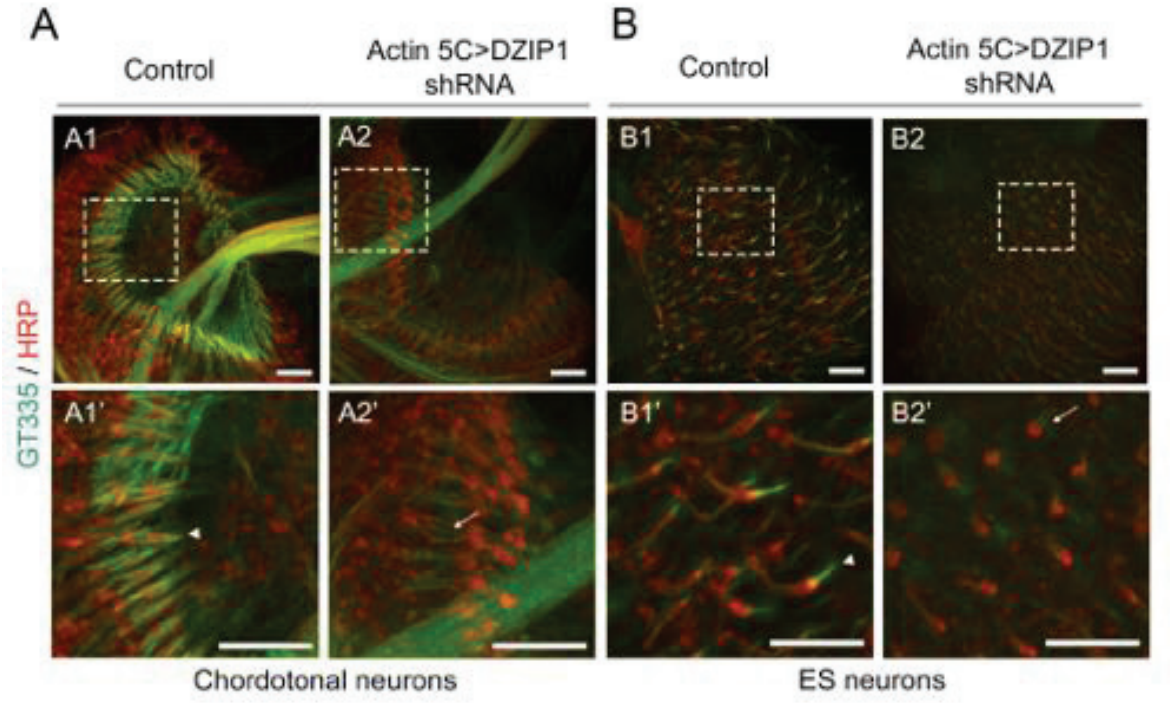


Figure 4

Figure 4. DZIP1 and FAM92 are required for ciliogenesis in *Drosophila*

(A) Whole-mount staining of chordotonal organs of the second antennal segment showing neuronal cell bodies and dendrites (HRP) and cilia (arrowhead) (GT335 antibody). Cilia are almost missing in *DZIP1* KD (B) Whole-mount staining of external sensory (ES) organs of the third antennal segment showing neuronal cell bodies and dendrites (HRP) and cilia (arrowhead) (GT335 antibody). Most cilia are missing in *DZIP1* KD. (A1', A2', B1', B2') magnification of the inset shown in (A1', A2', B1', B2'). Bars=10 µm.

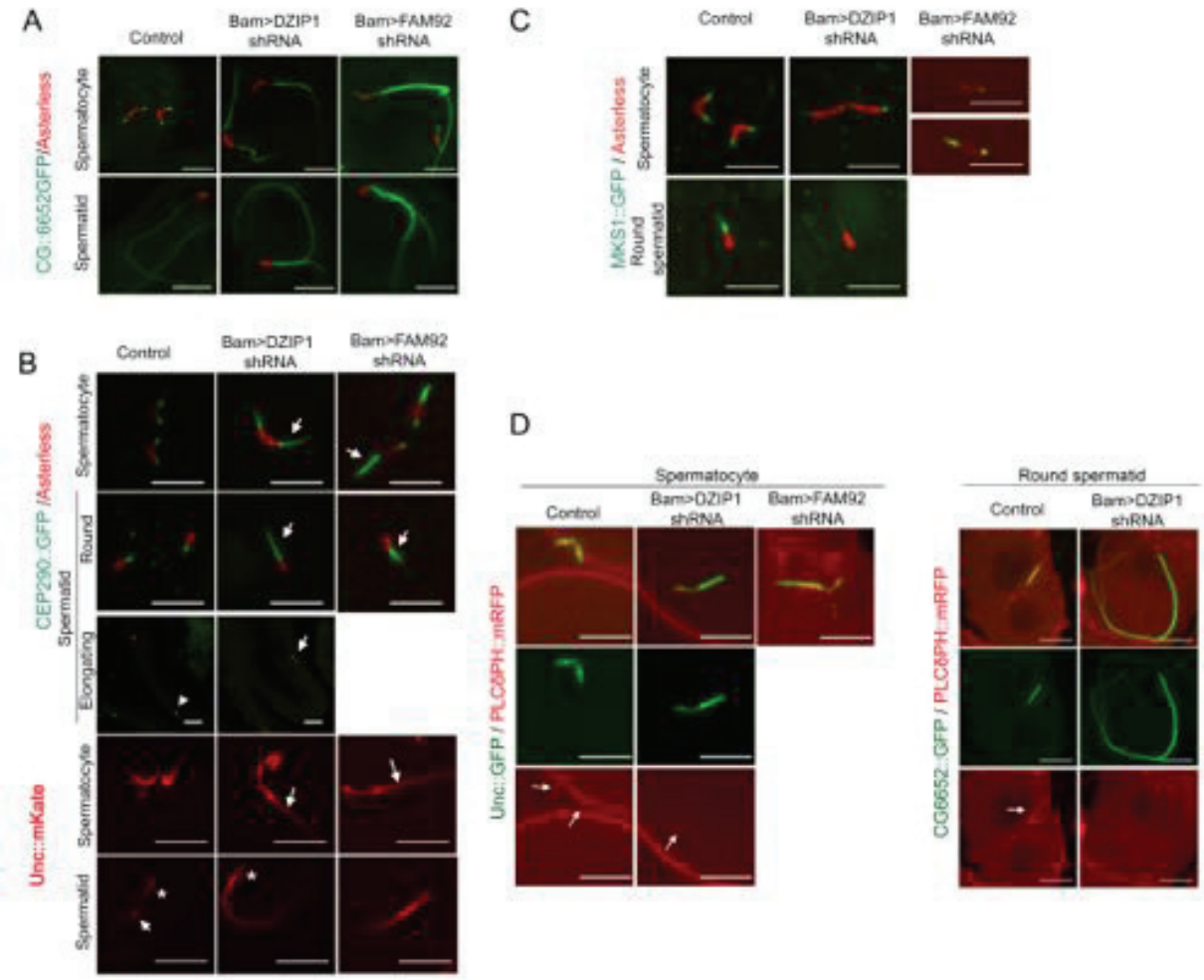


Figure 5

Figure 5. DZIP1 and FAM92 are required for ciliary cap formation in *Drosophila* male germ cells

(A) Confocal imaging of squashed testes showing aberrant extensions of microtubules in spermatocytes and spermatids. CG6652::GFP only labels the axoneme in testes. (B) CEP290::GFP and Unc::mKate localization are expanded (arrow) in *DZIP1* and *FAM92* knockdowns. After meiosis, in *DZIP1* KD, CEP290::GFP is still present at the tip of the basal body (arrow) compared to control where it migrates away from the basal body (arrowhead). In *DZIP1* and *FAM92* knockdowns, the expression domain of Unc::mKate is expanded in spermatocyte (arrows) and the transition zone part of Unc::mKate does not migrate as in the control (arrow), but is continuous with the centriolar part of Unc::mKate (stars).

(C) MKS1 is reduced at the ciliary cap in *DZIP1* or *FAM92* KD. (D) Confocal live imaging of *Drosophila* spermatocytes labeled with PLC δ PH::mRFP showing the centrioles (Unc::GFP) docked to the plasma membrane and the protruding ciliary cap (arrows) in control cells. In DZIP1 KD, either one centriole of the centriole pair or both centrioles of the pair fail to form a ciliary cap. Confocal imaging of *Drosophila* spermatids labeled with PLC δ PH::mRFP showing the cilia (CG6652::GFP) partially surrounded by the ciliary cap (arrows) in control

cells. In *DZIP1* KD, aberrant extensions of microtubules are not linked to ciliary cap due to a failing of centriolar docking in spermatocyte.
Bars=5 μm.

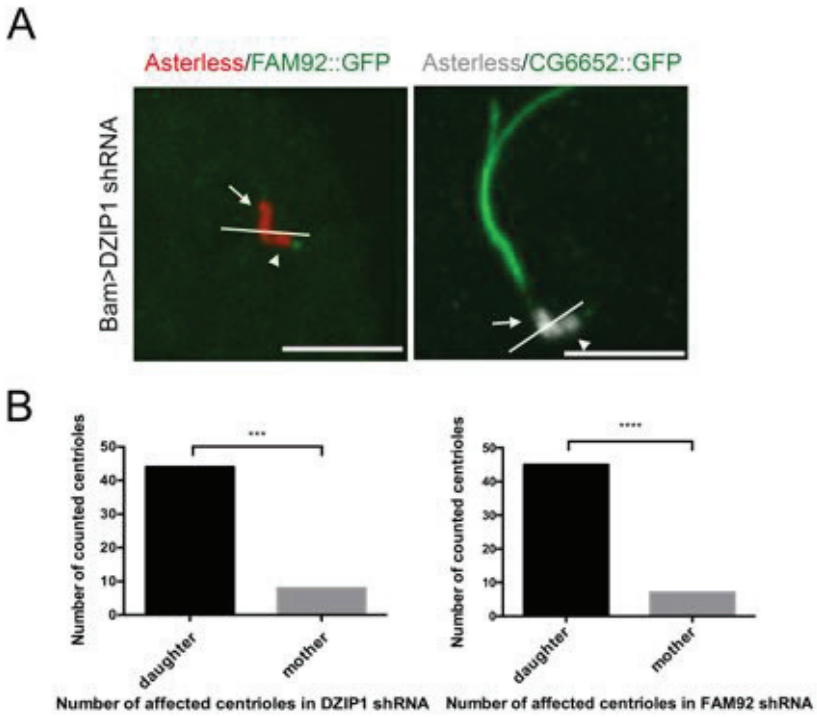


Figure 6

Figure 6. Asymmetry between mother and daughter centrioles in *Drosophila* spermatogenesis

(A) Confocal imaging of squashed testes showing absence of transition zone protein (FAM92::GFP) and aberrant extensions of microtubules (CG6652::GFP) at the daughter centriole (arrows) compared to the mother centriole (arrowhead). The dotted line allows to distinguish mother and daughter centriole. Daughter centriole is nucleated from the mother centriole and is orthogonally positionned to the mother centriole.

(B) Quantification of number of centrioles where only daughter or mother centriole is affected in absence of *Drosophila* DZIP1 (left) or FAM92 (right). In DZIP1 shRNA, 52 centriole pairs were observed and among them, 44 show only a defect at daughter centriole against 8 for mother centriole. In FAM92 shRNA, 52 centriole pairs were observed and among them, 45 show only a defect at daughter centriole against 7 for mother centriole. ****, $p<0.0001$; ***, $p<0.001$. Bars=5 µm.

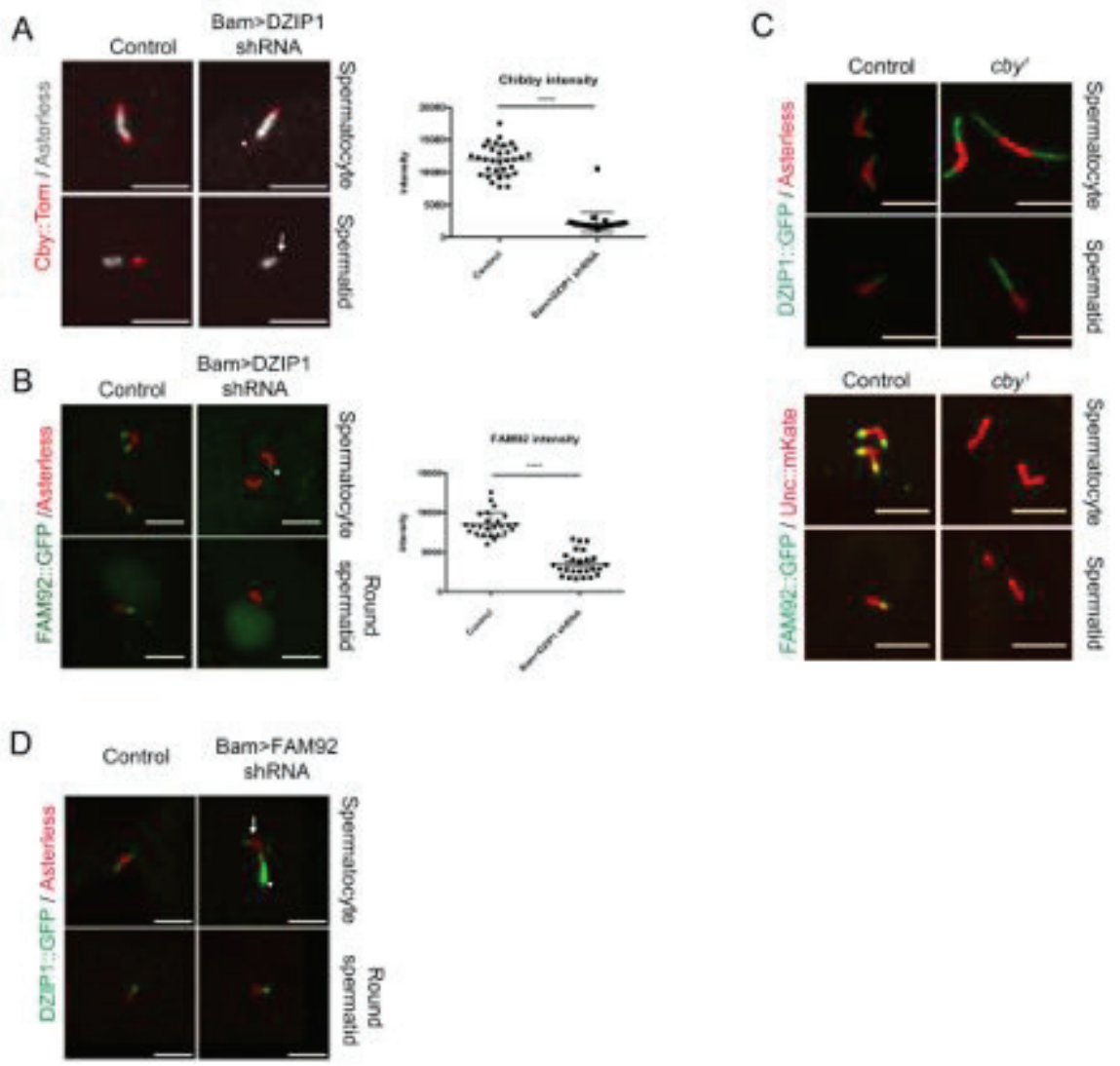


Figure 7

Figure 7. DZIP1, FAM92 and Cby inter-dependently organize the ciliary TZ

(A) In control spermatocytes, Cby::Tom is present at the tip of the centrioles but its localization is expanded at one centriole of the pair (arrowhead) in *DZIP1* KD. After meiosis, in *DZIP1* KD, Cby is still present at the tip of the basal body (arrow) compared to control where Cby and the transition zone has started to migrate. In addition, Cby intensity at the two centrioles of the pair is reduced compared to the control as quantified in the plotted graphe on the right. Scattered plots with mean and SD are shown, control n=32 , DZIP1 shRNA n=32). ****, p<0.0001.

(B) In *DZIP1* KD mutants FAM92::GFP is either absent at both centrioles or only severely reduced at one of the two centrioles of the pair in spermatocytes (arrowhead) and absent from the tip of basal body in spermatids compared to the control. FAM92 reduced intensity has been quantified and plotted on graph. Scattered plots with mean and SD are shown, control n=25, FAM92 shRNA n=25. ****, p<0.0001. (C) In Cby^{1} mutants, DZIP1::GFP domain is strikingly expanded both in spermatocytes and spermatids. (D) In *FAM92* KD, DZIP1::GFP domain is either unchanged (arrow) or expanded on one centriole of the pair (arrowhead) Bars=5 µm.

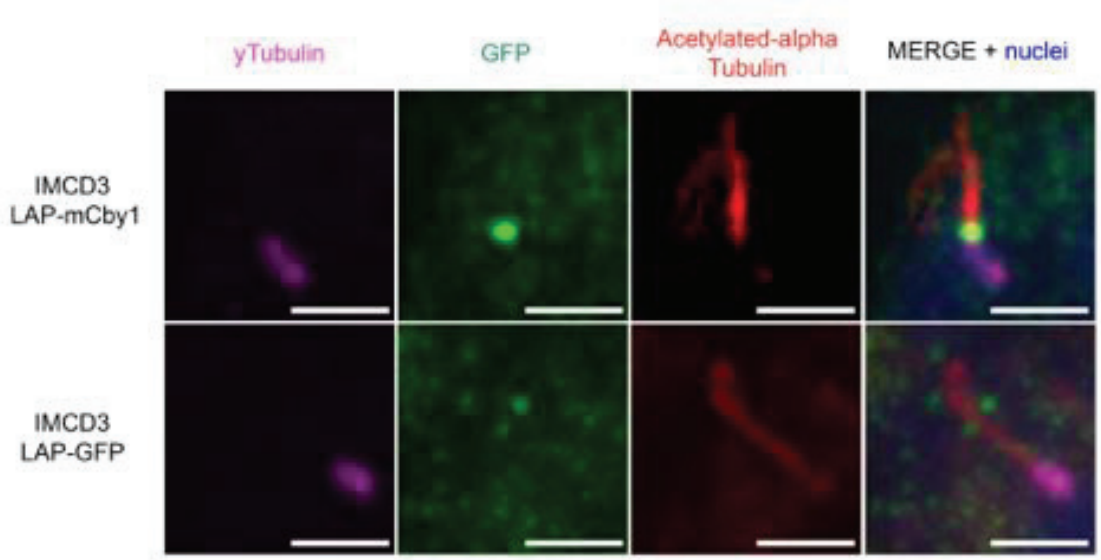


Figure S1

Figure S1. LAP-mCby1 localizes at the base of primary cilia in IMCD3
Upper panels: mouse IMCD3 cells were fixed after 48h of serum deprivation. LAP-mCby1 labelled with anti-GFP antibody (green) localizes at the base of the cilium (acetylated-alpha tubulin in red) at the distal part of the centriole (gamma-tubulin, purple).
Lower panels: in the same conditions, LAP-GFP is only found in the cytoplasm of the cells.
Bars=2 µm.

Table S1. Proteins identified by mass spectrometry from two rounds of LAP-Tag purification. Proteins in red were specifically retrieved in both replicates with LAP-CBY1 but not with LAP-GFP. Proteins in black were specifically retreived in only one replicate with LAP-CBY1 but not with LAP-GFP. DZIP1L and FAM92A1 are highlighted in yellow

			LAP1			LAP2		
Accession	Gene name	Protein Name	Coverage (%)	Spectral count	Unique peptide (>95%CI)	Coverage (%)	Spectral count	Unique peptide (>95%CI)
Q499E4	Dzip1l	Zinc finger protein DZIP1L	28,17	118	20	16,02	21	7
P62259	Ywhae	14-3-3 protein epsilon	53,73	112	15	45,49	57	9
Q9D1C2	Cby1	Protein chibby homolog 1	66,93	74	12	66,14	52	10
P61982	Ywhag	14-3-3 protein gamma	38,06	56	8	30,36	47	5
P63101	Ywhaz	14-3-3 protein zeta/delta	34,69	51	8	35,51	32	6
P68510	Ywhah	14-3-3 protein eta	33,74	46	7	30,49	36	4
P99024	Tubb5	Tubulin beta-5 chain	23,65	32	9	24,32	16	7
Q8BP22	Fam92a1	Protein FAM92A1	22,82	32	5	40,85	39	11
P68373	Tuba1c	Tubulin alpha-1C chain	24,05	31	7	20,27	24	7
P20029	Hspa5	78 kDa glucose-regulated protein	9,47	12	4	9,01	8	3
Q8VED5	Krt79	Keratin, type II cytoskeletal 79	19,21	86	11	19,59	176	28
Q61781	Krt14	Keratin, type I cytoskeletal 14	43,18	212	28			
Q9CQV8	Ywhab	14-3-3 protein beta/alpha	24,39	44	6			
P62806	Hist1h4a	Histone H4	38,83	19	5			
Q9DC23	Dnajc10	DnaJ homolog subfamily C member 10	5,67	13	2			
P15864	Hist1h1c	Histone H1.2	16,98	9	3			
Q9Z2X1	Hnrnpf	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	8,43	9	1			
Q9JJG9	Noa1	Nitric oxide-associated protein 1	2,31	6	1			
Q65CL1	Ctnna3	Catenin alpha-3	1,45	6	1			
P04444	Hbb-bh1	Hemoglobin subunit beta-H1	6,80	4	1			
Q60865	Caprin1	Caprin-1	3,27	3	1			
Q62266	Sprr1a	Cornifin-A	16,67	3	1			

Table S1. Proteins identified by mass spectrometry from two rounds of LAP-Tag purification

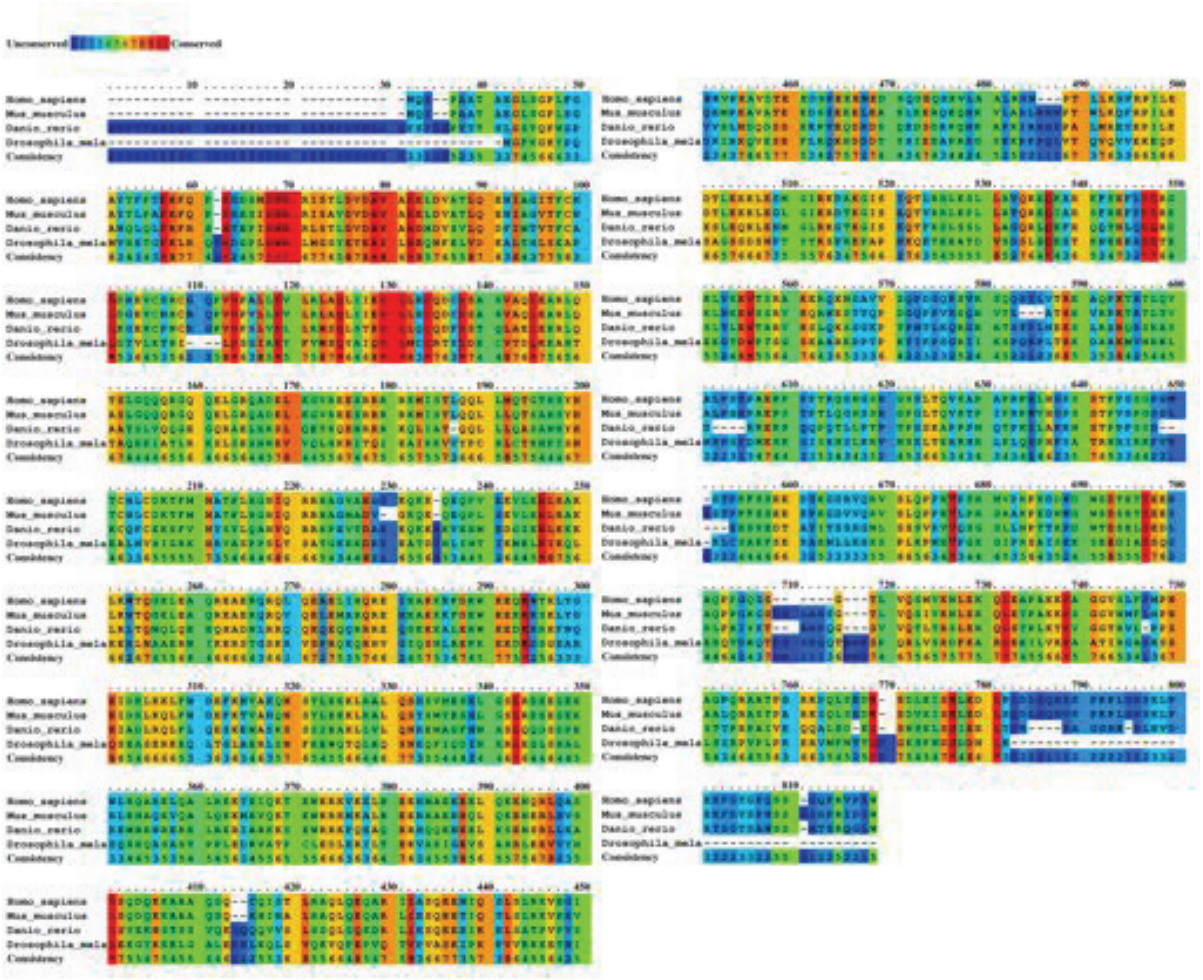


Figure S2

Figure S2. Protein sequences comparison of DZIP1L.
The amino-acid conservation scoring is preformed by PRALINE. The scoring scheme works from 0 for the least conserved alignment position, up to 10 for the most conserved alignment position.

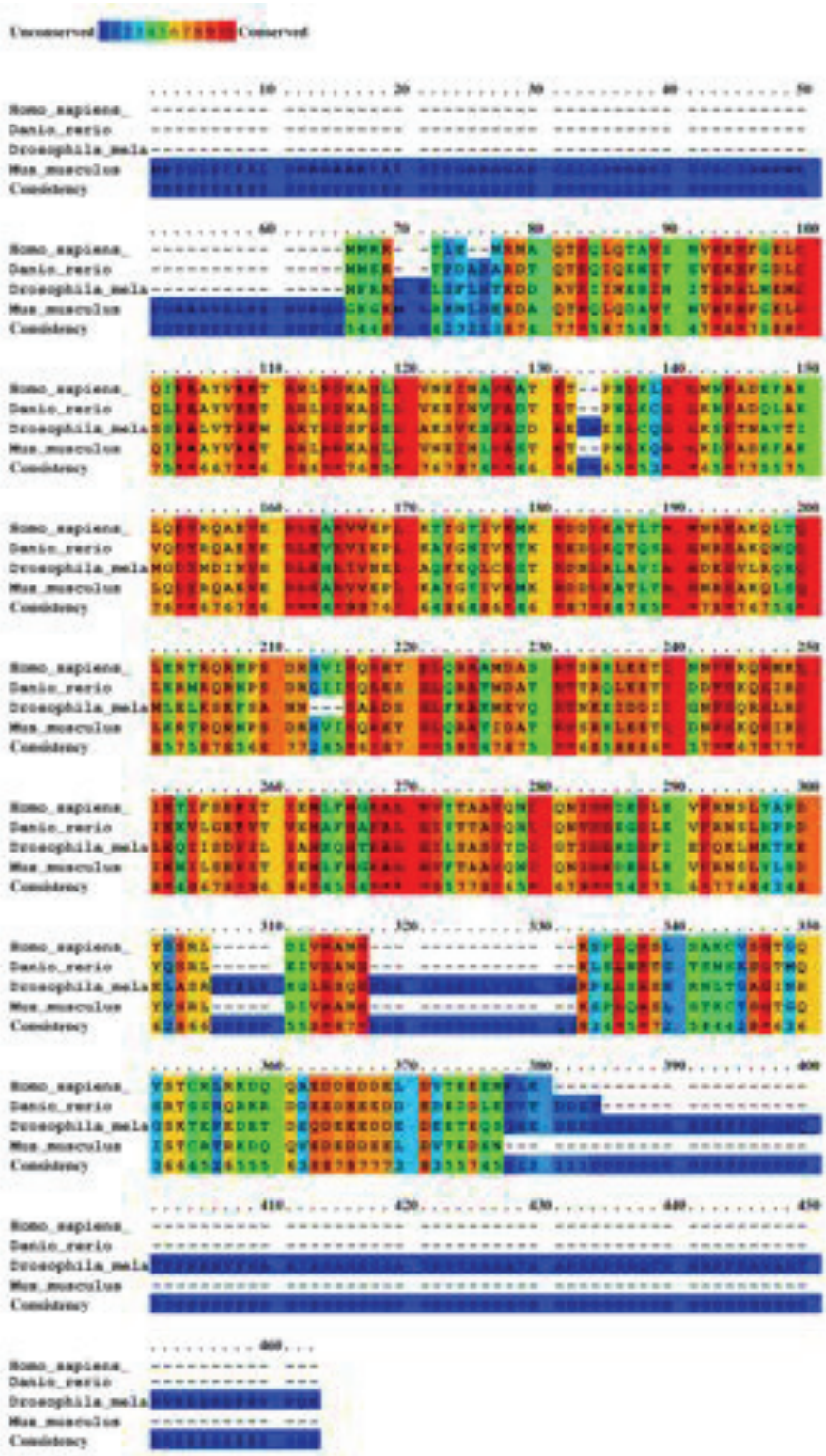


Figure S3

Figure S3. Protein sequences comparison of FAM92A

The amino-acid conservation scoring is preformed by PRALINE. The scoring scheme works from 0 for the least conserved alignment position, up to 10 for the most conserved alignment position.

Movie 1 :

https://www.dropbox.com/s/k4w2q2pv600dzvw/Video%20non%20coordination%20drosophile%20DZIP1%20shRNA%20-1.AVI?dl=0

Movie 2 :

https://www.dropbox.com/s/h0fs5z0sfe184ez/Video%20non%20coordination%20drosophile%20DZIP1%20shRNA%20-2.mp4?dl=0

Movie S1. Uncoordinated behavior of flies depleted in DZIP1
Movies illustrating the phenotype of non-coordination obtained in *Drosophila* expressing DZIP1 shRNA under the contrôle of scabrous promoter. This non-coordination behavior is linked to defects in cilia of chordotonal neurons.

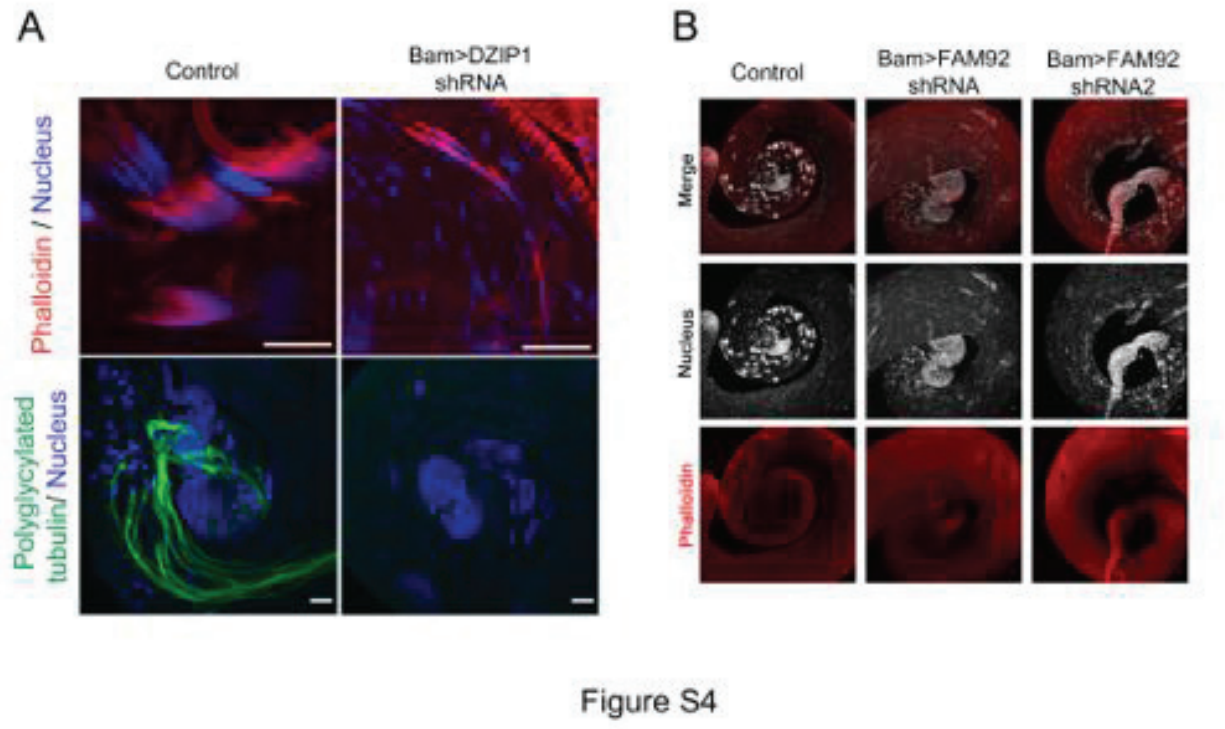


Figure S4

Figure S4. DZIP1 and FAM92 are necessary for correct spermatogenesis
(A) Confocal analysis of whole mount testis of control and *DZIP1* KD stained for nucleus (Hoechst), actin cones (phalloidin) and polyglycylated tubulin (Axo49). Most of the nuclei are dispersed in *DZIP1* KD compared to control indicating failure of axoneme elongation. Most of actin cones are disorganized and Axo49 staining is lost in *DZIP1* KD compared to control, indicating failure of spermatid individualization. (B) Epifluorescence analysis of whole mount testis of control and *FAM92* KD stained for nucleus (Hoechst) and actin cones (phalloidin). Most of the nucleus and actin cones are dispersed in *FAM92* KD compared to control indicating both failure of spermatid elongation and individualization. Bars=10 µm.

B - Partie II : Analyse du crible double hybride

La seconde stratégie a été de réaliser un crible double hybride chez la drosophile, en utilisant Cby comme appât, sur une banque d'ADN complémentaire de testicules de drosophiles, crible réalisé par la société Hybrigenics. Celui-ci a été réalisé dans le but d'identifier de nouveaux partenaires de Cby afin de comprendre son rôle dans l'assemblage de la zone de transition et plus spécifiquement lors de la ciliogenèse cytosolique. Ce crible nous a permis d'identifier 7 candidats potentiels comme étant des interacteurs de Cby.

Dans un premier temps, j'ai analysé l'ensemble de ces candidats par co-immunoprécipitation pour confirmer ou non l'interaction biochimique avec Cby. La génération de mouches transgéniques exprimant ces protéines en fusion avec la GFP a été réalisée en parallèle afin d'étudier leur profil d'expression. Enfin, nous avons pour certains gènes, réalisé les mutants par CRISPR-Cas9 afin de les caractériser fonctionnellement **(Tableau 2)**.

Dans la suite de ce chapitre, je vais vous présenter les avancées obtenues sur chacun de ces candidats. Une partie des données ont été collectées par une autre doctorante, Céline Augière, et ne seront donc décrits que brièvement.

Gène (Drosophile)	Orthologue mammifère	Fonction potentielle	Validation de l'intéraction	Profil d'expression / localisation	Mutant
CG5987	TTLL - Famille des Tubulin tyrosine ligase-like	Modification/stabilisation des tubulines	NON	Le long des microtubules / accumulation région proximale à la zone de transition	OUI
CG3213	ODF2 - Outer dense fiber 2 / Cenexin	Orthologue des protéines des fibres dense (structure non identifiée chez la drosophile)	NON	Extrémité distale des centrioles des neurones sensoriels	OUI
CG13164/Salto	sip2 / septin interacting protein 2 / SALTO	Transport de vésicule / Fusion-courbure de membrane	NON	Centriolar adjunct/ corps dense /accrosome / périnucléaire/ Partiellement zone de transition	OUI
CG32655	Pas d'orthologue	Aucun domaine prédit	OUI	Non disponible	NON
CG12184	Protéine contenant un domaine ALMS	Domaine ALMS, imliqué dans le ciblage de protéine au centriole et impliqué dans la formation du cil	En cours	Centriolaire / axonème / vesicles / corps dense / centriolar adjunct	OUI
CG8086	ODF3 / Outer dense fiber 3	Orthologue des protéines des fibres denses (structure non identifiée chez la drosophile)	A tester	Non disponible	NON
CG33140	Protéine contenant un domaine MYCBP (Myc Binding Protein)	Localisation à la paire centrale	Oui	Axonème – probablement paire central.	NON

Tableau 2 : *Tableau résumant l'avancement dans l'analyse des différents candidats obtenus par le crible double hybride. Gènes en bleu: interaction biochimique validée - Gènes en rouge: interaction biochimique non confirmée – Gènes en noir: interaction non testée*

Les résultats obtenus par les expériences de co-immunoprécipitation en cellules cos-7 m'ont permis de confirmer une interaction biochimique entre Cby et CG32655 ou CG33140. Par cette approche, je n'ai pas pu confirmer l'interaction entre Cby et 3 des candidats. Un candidat est toujours en cours d'analyse et pour le moment, aucune expérience n'a encore été réalisée pour le gène *CG8086*, orthologue d'*ODF3* chez les mammifères dont la protéine est présente au niveau des fibres denses externes localisée le long de l'axonème des spermatozoïdes chez la souris.

I-Analyse du gène *CG32655*

Très peu d'informations sont disponibles à propos du gène *CG32655.* En effet, aucune donnée n'est disponible chez la drosophile et la recherche d'orthologues chez les mammifères n'a donné aucun résultat. De plus, des analyses bio-informatiques n'ont pas permis d'identifier de domaines protéiques particuliers.
J'ai effectué une co-immunoprécipitation en cellules cos-7 après transfection de plasmides codant pour Cby fusionnée à la GFP et CG32655 couplées au tag HA.
J'ai révélé une interaction biochimique entre Cby et CG32655 **(Figure 32).**

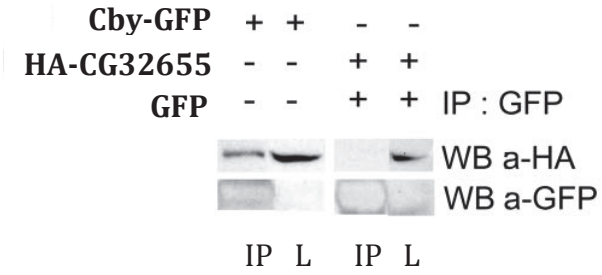


Figure 32 : *CG32655 interagit avec Cby. HA-CG32655 interagit spécifiquement avec Cby-GFP mais pas avec la GFP seule. (NB : la bande correspondant à Cby-GFP et la GFP n'apparaissent pas dans le lysat cellulaire) (IP : Immunoprécipitat ; L : Lysat cellulaire).*

Selon le site Flybase, ce gène est prédit pour être exprimé uniquement dans les testicules de drosophile. La génération future de drosophiles transgéniques exprimant la protéine fusionnée à la GFP ainsi que du mutant, devra nous permettre d'obtenir plus d'informations sur la fonction potentielle de cette protéine et de son rôle avec Cby.

II-Analyse du gène *CG33140*

J'ai débuté l'analyse de ce gène en validant l'interaction avec Cby par co-immunoprécipitation en cellules cos-7 après transfection de plasmides codant pour la protéine Cby-GFP avec HA-CG33140 **(Figure 33)**. Parallèlement, nous avons généré au laboratoire une lignée de drosophile transgénique exprimant la protéine CG33140 fusionnée à la GFP. J'ai donc étudié dans un premier temps son profil d'expression au cours de la spermatogenèse. **(Figure 34).**

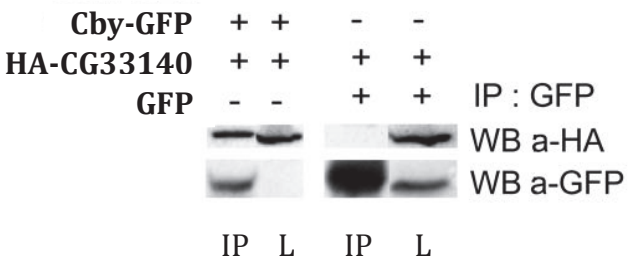


Figure 33 : *CG33140 interagit avec Cby. HA-CG33140 interagit spécifiquement avec Cby-GFP mais pas avec la GFP seule. (NB : la bande correspondant à Cby-GFP n'apparaît pas dans le lysat cellulaire) (IP : Immunoprécipitat ; L : Lysat cellulaire).*

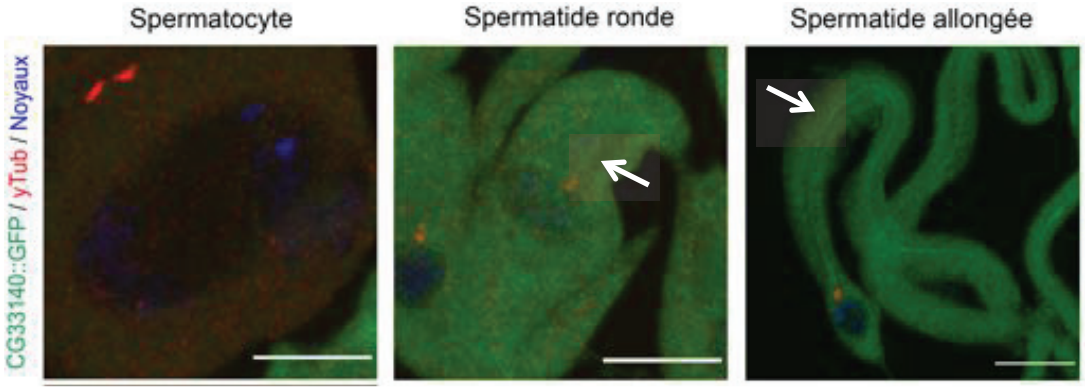


Figure 34 : *Immunofluorescence indiquant le profil d'expression de CG33140-GFP au cours de la spermatogenèse.*
La protéine CG33140-GFP n'est pas présente au stade spermatocyte, où l'on ne détecte que le marquage centriolaire (γ Tubuline) ainsi que les noyaux. Après la méiose, CG33140-GFP est localisée de façon fibreuse émanant du centriole (flèches). Puis, le marquage de CG33140-GFP s'allonge de manière concomitante à l'élongation des spermatides. Barre d'échelle : 10 μm.

Le gène *CG33140* ne semble pas être exprimé au stade spermatocyte. En effet, je ne détecte un signal qu'à partir du stade spermatide où la protéine CG33140 est localisée de façon fibreuse, émanant du centriole et parcourant toute la cellule. Sa localisation rappelle celle de l'axonème marqué par le transgène CG6652 (voir précédemment chapitre résultat partie A).

Pour déterminer si cette protéine est un composant de l'axonème, j'ai analysé sa localisation dans un mutant *sas-4* qui est dépourvu de centriole et donc d'axonème **(Figure 35)**. Le marquage de CG33140-GFP disparaît dans ce mutant, confirmant que la protéine CG33140 est bien localisée au niveau de l'axonème. De plus, le marquage de CG33140 semble plus fin et plus discret que celui de CG6652. Cette protéine pourrait donc être associée à la paire centrale de l'axonème. En accord avec cette hypothèse, la protéine CG33140 possède un domaine MYCBP-associated protein (Myc binding protein associated protein). Or, il a été montré chez *Chlamydomonas,* que la protéine FAP174, orthologue de MYCBP-1, une protéine qui se lie à AKAP et à l'onco-protéine Myc, est localisée au niveau de la paire centrale de l'axonème (Rao et al., 2016). Ceci est donc en adéquation avec la localisation observée de CG33140 en spermatogenèse. Par ailleurs, je

n'ai pas détecté de marquage de cette protéine dans les cils des neurones chordotonaux qui sont des cils motiles mais dépourvus de paire centrale. Ceci renforce donc l'hypothèse que cette protéine pourrait être associée à la paire centrale de l'axonème.

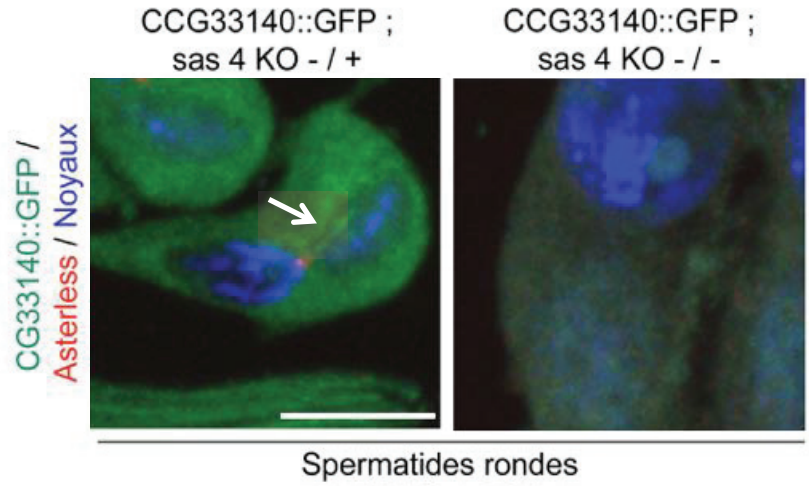


Figure 35 : *Immunofluorescence révélant que la protéine CG33140-GFP est associée à l'axonème.*
Le mutant sas-4 ne posséde pas de centriole et est dépourvu d'axonème. Dans le contrôle (gauche), le marquage de CG33140-GFP en spermatide ronde est fibreux (flèche) et en provenance du centriole, dans le mutant sas-4, le marquage de la protéine CG33140-GFP disparaît indiquant que la protéine est un composant de l'axonème. Barre d'échelle : 10 µm.

J'ai également comparé les profils d'expression de CG33140 et Cby au cours de la spermatogenèse **(Figure 36)**. Cby-Tom, localisée à la zone de transition au niveau du ring centriole, est présente de façon distale au marquage axonémal de CG33140. Etant donné l'interaction biochimique mise en évidence et basé sur leur profil d'expression, le seul endroit où ces 2 protéines pourraient interagir est au niveau du ring centriole. Je n'ai pas observé de modification de localisation ni de défaut évident de CG33140 en absence de Cby. L'analyse de la diminution d'expression de *CG33140* par ARN interférence ne m'a pas permis d'identifier de défauts particuliers au cours de la spermatogenèse.

Néanmoins, le fait que Cby ne soit conservé que dans les espèces possédant un cil motile, pourrait conférer à celui-ci un rôle dans la mise en place de la paire centrale. Enfin, le gène *CG33140* est regroupé en un cluster de 4 gènes possédant un fort pourcentage d'identité. Il pourrait s'agir d'un cluster de gènes codant des protéines accessoires de l'axonème mais aussi de la paire centrale. De futures études sur le rôle de CG33140 dans l'assemblage de l'axonème et/ou dans la motilité de l'axonème, permettront peut être de révéler des informations sur la présence de Cby dans les espèces possédant un cil motile et sur une fonction de Cby dans l'établissement de la paire centrale.

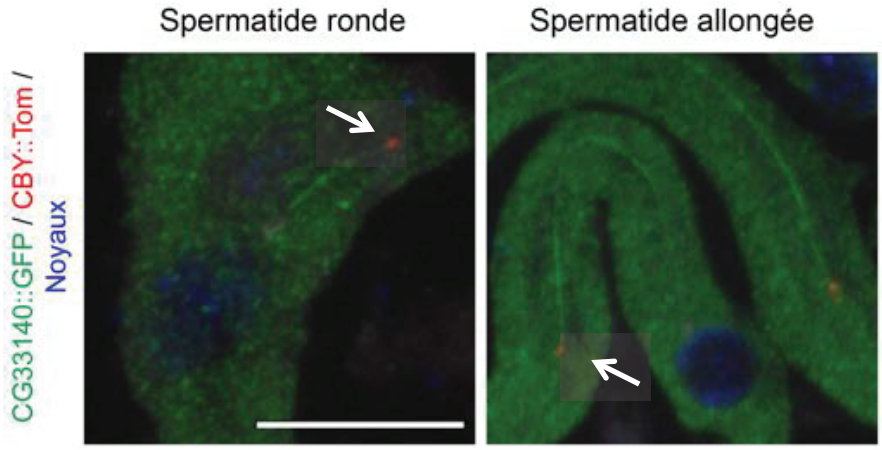


Figure 36 : *Co-Immunofluorescence entre la protéine CG33140-GFP et Cby-Tom. La protéine Cby-Tom localisée au ring centriole (flèche) à la base de la zone de transition est également retrouvée à l'extrémité distale du marquage fibreux et axonémale de CG33140-GFP. Barre d'échelle : 10 µm.*

III-Analyse du gène *CG13164/salto*

Le gène *CG13164* initialement nommé *sip2* (septin interacting protein) a été renommé *salto* par notre équipe. Plus précisément, c'est l'isoforme possédant un domaine BAR impliqué dans la fusion/courbure de membrane qui fut identifié comme interacteur de Cby. Je n'ai cependant pas confirmé son interaction avec Cby en co-immunoprécipitation. Afin de caractériser la fonction de ce gène, l'équipe a généré des mouches transgéniques exprimant la protéine Salto-GFP ainsi que le mutant *salto* par CRISPR/Cas9. L'étude du profil d'expression de Salto a révélé une localisation différente de celle de Cby, et le mutant ne semble pas présenter un phénotype lié à un défaut d'assemblage de la zone de transition. Cette étude a été réalisée par Céline Augière et ne sera donc pas décrite plus en avant dans ce document.

IV-Analyse du gène *CG3213*

Le gène *CG3213* est l'orthologue du gène *ODF2* chez les mammifères. Chez ces derniers, on distingue plusieurs isoformes de la protéine ODF2, dont la Cenexine qui possède une région C-terminale supplémentaire, qui sont toutes deux localisées aux appendices subdistaux. Chez la drosophile, on distingue deux orthologues, *CG3213* et *CG8851* qui partagent une homologie d'environ 30% au niveau protéique et sont localisés de manière adjacente au locus. De façon intéressante, Cenexine a été montrée pour être nécessaire au recrutement de CBY1 au centriole chez les mammifères (Chang et al., 2014). Par co-immunoprécipitation je n'ai pas pu confirmer l'interaction biochimique entre Cby et CG3213. Néanmoins, l'analyse du gène *CG3213* est en cours et réalisée par Céline Augière, en collaboration avec l'équipe de Monica Bettancourt-Dias à l'Institut Gulbenkian d'Oeiras, et ne sera pas détaillé ici.

Au moment de l'écriture de ce manuscrit, seul son profil d'expression dans les cils des neurones sensoriels, réalisé par l'équipe de M. Bettencourt-Dias, est disponible. La protéine CG3213 serait localisée à l'extrémité distale du centriole, à la base du cil, ce qui correspondrait à la zone de transition. De notre coté, nous avons généré le double mutant *CG8851 et CG3213* par saut d'élément transposable (minos). Ce double mutant est stérile et présente une légère non-coordination, mais nous ne connaissons pas précisément le mode d'action de ces deux gènes. La caractérisation des défauts de ce double mutant est actuellement en cours au laboratoire.

V-Analyse du gène *CG5987*

Le gène *CG5987* est l'orthologue du gène *TTLL13*, codant chez les mammifères, une Tubuline tyrosine ligase like responsable de la glutamylation des microtubules. Afin de caractériser ce gène, nous avons généré une lignée de drosophile transgénique exprimant la protéine CG5987-TdTom. De plus, nous avons à disposition une lignée possédant un élément transposable inséré dans le sixième exon du gène. L'analyse par RT-PCR montre l'absence de transcrit pour *CG5987* indiquant que cette lignée se comporte comme un mutant nul. Les expériences de co-immunoprécitation en cellules cos-7 n'ont pas permis de révéler une interaction biochimique entre Cby et CG5987.

Céline Augière a réalisé l'analyse de la distribution de cette protéine et montre qu'elle n'est pas présente dans les cils des neurones sensoriels et est spécifique des testicules de drosophile. La protéine est retrouvée tout le long des spermatides avec, selon les stades d'élongation, une accumulation de manière proximale à la zone de transition sous forme d'une « queue de comète ». Le mutant *CG5987* est stérile et son analyse n'a pas révélé de défaut d'assemblage de la zone de transition ou de défauts similaires à ceux obtenus en absence de protéines de la zone de transition. En effet, il présente un défaut d'individualisation des spermatides ainsi qu'un entortillement des cystes tardifs. Des analyses complémentaires sont actuellement encore en cours et pourraient révéler une fonction plus générale dans la spermatogenèse.

VI-Analyse du gène *CG12184*

Le gène *CG12184* code une protéine possédant un domaine ALMS (Alström). Ce domaine est notamment retrouvé dans la protéine ALMS1 chez les mammifères et la mutation du gène *ALMS1* est impliquée dans le syndrome d'Almström (Hearn et al., 2005). Ce domaine protéique est impliqué dans le ciblage de protéines au niveau du centriole. Chez les mammifères, il existe 3 protéines possédant ce domaine et la déplétion de ces protéines inhibe la ciliogenèse. De plus, la suppression d'ALMS1 inhibe la cohésion des centrioles provoquant notamment leur séparation au sein de la paire (Knorz et al., 2010). Chez la drosophile, il existe 2 gènes codant pour 2 protéines possédant un domaine ALMS : *CG12184* et *CG12179*.

La validation de l'interaction entre CG12184 et Cby par co-immunoprécipitation est actuellement en cours.

Nous avons dans un premier temps généré une lignée de drosophile transgénique exprimant la protéine CG12184 en fusion avec la GFP et j'ai analysé son profil d'expression dans les tissus ciliés. CG12184-GFP n'est pas retrouvée dans les cils des neurones sensoriels et est donc spécifique des cellules ciliées au cours de la spermatogenèse **(Figure 37A)**.

Au stade spermatocyte, CG12184-GFP est présente sous forme de vésicules qui co-localisent partiellement avec les vésicules golgiennes. De plus, elle est également localisée à l'extrémité proximale de la paire de centrioles.

Dans les spermatides, la protéine CG12184-GFP, est retrouvée à l'interface du noyau et du centriole, au niveau d'une zone correspondant probablement au centriolar adjunct qui permet l'ancrage du centriole au noyau. La protéine est aussi présente dans la lumière du centriole et s'accumule à son extrémité distale. Lors de l'allongement des spermatides, on observe un marquage fibreux rappelant celui de la protéine CG33140, pouvant alors correspondre à la paire centrale de l'axonème, le marquage étant trop fin pour être l'axonème. Cependant, dans un mutant *sas-4*, dépourvu de centrioles et d'axonèmes, j'observe encore du marquage fibreux qui correspond plus au marquage des microtubules cytoplasmiques que l'on trouve dans les cystes, proches de la mitochondrie (non montré). A ce stade, la protéine s'accumule également au niveau de l'acrosome. Dans les spermatides tardives, la protéine se localise également tout le long du noyau, au niveau d'une structure appelée le corps dense tout en étant maintenue à la région proximale du centriole au centriolar adjunct. Enfin, la protéine est dispersée tout le long du cyste sous la forme de vésicules qui s'accumulent à l'extrémité distale des cystes, à une région qui pourrait correspondre à la zone de transition. Cependant, je n'ai pas pu détecter de dynamique de localisation de CG12184-GFP similaire à celles des protéines de la zone de transition, migrant de l'extrémité distale du corps basal, à l'extrémité distale des spermatides.

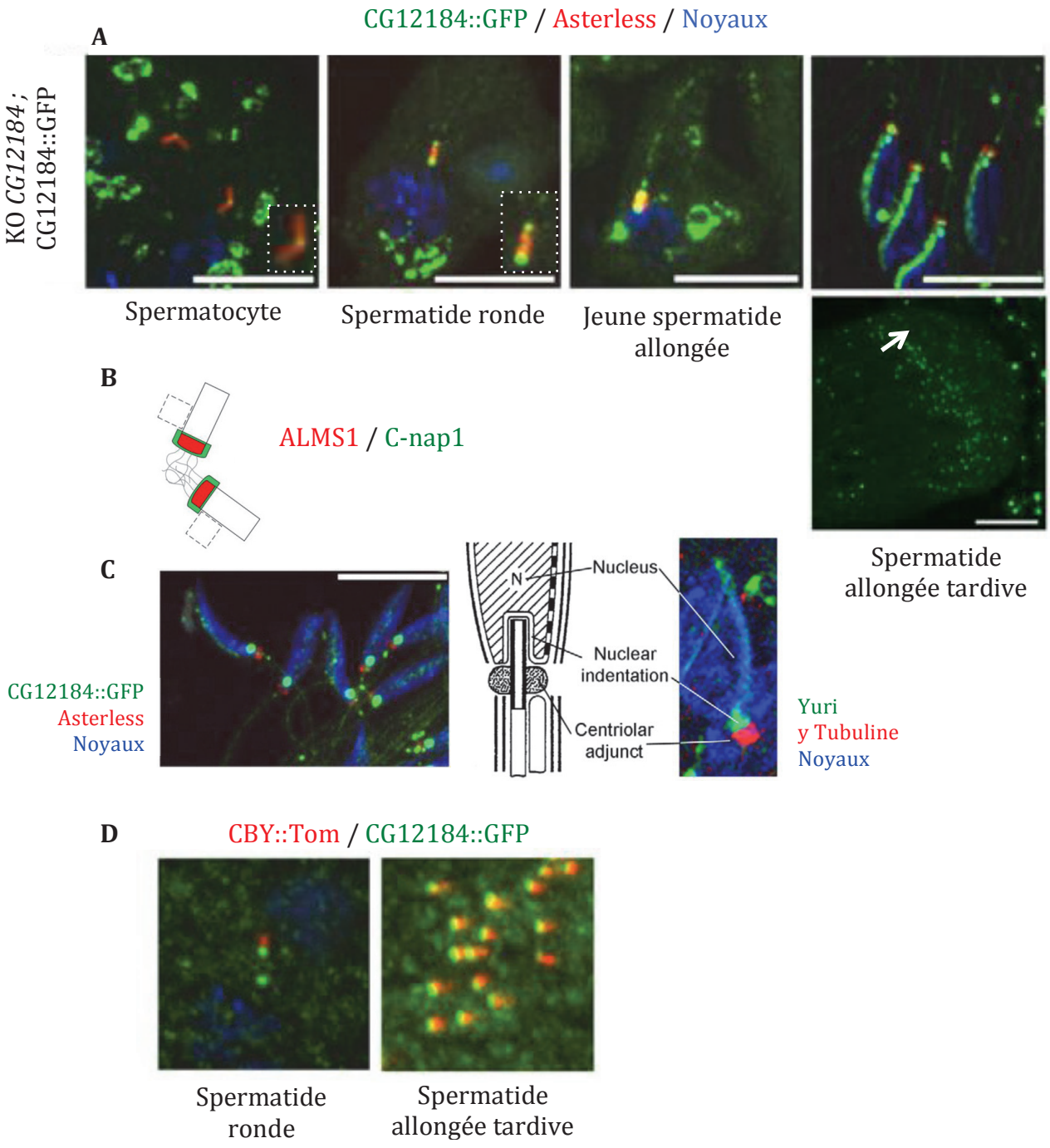


Figure 37 : *Images illustrant la localisation de CG12184-GFP au cours de la spermatogenèse.*
A. *La protéine CG12184-GFP est localisée durant les stades précoces de spermatogenèse sous forme de vésicules mais est également localisée à la partie proximale des centrioles d'une même paire. Ce marquage rappelle la localisation aux centrioles de la protéine ALMS1 chez les mammifères comme schématisé en B. Au stade spermatide ronde, la protéine s'accumule principalement de part et d'autre du centriole, alors ancré au noyau, et l'on note un marquage fibreux à l'intérieur puis émanant du centriole (flèche). Une accumulation dans la région proximale du noyau à l'acrosome est aussi observée. Au cours de l'allongement, le marquage fibreux s'allonge également rappelant celui de l'axonème, ou d'un composant de l'axonème. Enfin, durant les stades tardifs de l'allongement des*

spermatides, la protéine CG12184-GFP semble toujours localisée à l'axonème ainsi qu'au centriolar adjunct à l'interface centriole-noyau, et le long du noyau au corps dense. A l'extrémité distale des spermatides, se trouve une accumulation de la protéine, à une région proche de la zone de transition (flèche). ***C.*** *Le centriolar adjunct est une structure permettant l'ancrage du corps basal dans la membrane nucléaire et plusieurs protéines, dont la protéine Yuri, sont localisées comme CG12184-GFP dans cette région. Image extraite de* Texada et al., 2008*.* ***D.*** *Au stade spermatide ronde, CG12184-GFP est retrouvée aux extrémités du corps basal, accolée à la zone de transition (ring centriole) représentée par Cby-Tom. Aux stades tardifs de spermatogenèse, la protéine CG12184-GFP est retrouvée à nouveau accolée à la zone de transition.*

Afin de caractériser fonctionnellement ce gène, nous avons généré par CRISPR/Cas9 un mutant null. Celui-ci n'est pas stérile et ne présente pas de défauts particuliers au cours de la spermatogenèse. Ceci peut éventuellement s'expliquer par la présence au même locus du gène *CG12179*, second gène chez la drosophile codant une protéine à domaine ALMS. Ces deux gènes partagent environ 87% d'homologie au niveau protéique. Il est donc probable qu'une redondance génétique existe entre ces deux gènes expliquant alors l'absence de phénotype dans le simple mutant *CG12184.*

Pour tester cette hypothèse, j'ai analysé une lignée de drosophile possédant une insertion d'un élément transposable de type élément p dans la séquence codante du gène *CG12179*. Par RT-PCR, j'ai vérifié l'absence de transcrit (non montré) mais cette lignée ne présente pas de défaut de spermatogenèse particulier. Ceci conforte donc l'hypothèse de redondance génétique entre les deux gènes. Nous sommes actuellement en train de générer le double mutant *CG12184-CG12179*

Nous n'avons pas réalisé le profil d'expression de CG12179 afin de comprendre s'il est similaire ou très différent de celui de CG12184. L'obtention du double mutant permettra de déterminer si les protéines à domaine ALMS chez la drosophile, ont comme chez l'Homme une fonction importante au centriole et dans la ciliogenèse.

Chez les mammifères, l'absence de la protéine ALMS1, similairement localisée **(Figure 37B)**, conduit à un défaut de cohésion des deux centrioles d'une même paire (Knorz et al., 2010) en accord avec la localisation observée chez la drosophile.

Aux stades post-méiotiques, la protéine CG12184-GFP est associée à l'axonème. Si l'on se base sur la zone de marquage, il se pourrait que la protéine soit plus précisément associée à la paire centrale de microtubule. Afin de tester cette hypothèse, il faudrait analyser sa localisation dans un mutant dépourvu de paire centrale comme c'est le cas du mutant *bld10* (Bettencourt-Dias et al., 2012). CG12184 pourrait être impliquée dans la stabilisation de la paire centrale sans être indispensable pour sa formation. Il serait donc important de pouvoir tester les interactions fonctionnelles possibles entre CG12184 et d'autres protéines de la paire centrale comme CG33140 que j'ai aussi identifié au cours de ce travail **(Figure 37D)**.

La protéine CG12184-GFP est également localisée au niveau du centriolar adjunct **(Figure 37C)**. Les protéines comme Yuri et Spag4 sont elles aussi retrouvées à cette structure et l'absence de ces 2 protéines conduit à la dissociation noyau-corps basal

(Texada et al., 2008; Kracklauer et al., 2010). Il serait important de tester les interactions possibles entre *CG12184* et les gènes *yuri* et *spag4*. La surexpression de *CG12184* dans le mutant *yuri* ou *spag4*, pourrait permettre de sauver le phénotype ou inversement, la perte de CG12184 pourrait aggraver le phénotype observé dans un mutant *yuri*.

Enfin, CG12184-GFP est localisée de façon proximale à la base de la zone de transition dans les spermatides rondes et tardives **(Figure 37A, D).** Elle pourrait jouer un rôle dans la stabilisation de cette région, rôle qui ne serait révélé qu'en contexte sensibilisé pour des défauts de la zone de transition. Il serait donc important de tester les interactions fonctionnelles entre CG12184 et les autres mutants disponibles des protéines de la zone de transition.

VII-Bilan des informations obtenues par le crible double hybride

Ce crible double hybride a été à l'origine réalisé afin d'identifier des nouveaux partenaires de Cby à la zone de transition au cours de la spermatogenèse. Ceci, dans le but de comprendre le rôle de Cby à la zone de transition, comment il peut être relié aux autres protéines connues de la zone de transition, et enfin quel mécanisme fournit le caractère mobile à cette zone de transition.

Ce crible nous a permis d'identifier 2 nouveaux interacteurs biochimiques de Cby, CG32655 et CG33140. Pour les 5 autres candidats restants, je n'ai pas mis en évidence une interaction entre ceux-ci et Cby dans mes conditions expérimentales. Ceci n'exclut bien évidemment pas une interaction potentielle, ni que certains de ces candidats soient de faux positif. Pour continuer l'analyse de ces autres candidats, il faudra refaire les expériences de co-immunoprécipitation en modifiants différents paramètres, en particulier la stringence du tampon de lyse et /ou lavage et les temps de lyses et de lavage. Parallèlement, des techniques alternatives d'identification d'interaction protéines-protéines pourraient être utilisées, telles que le PLA (Proximity Labelling Assay) ou le BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation). En effet, ces techniques sont plus sensibles que l'immunoprécipitation et s'affranchissent des conditions de lyse de la cellule. Le PLA se base sur une immunofluorescence basique, accompagnée d'une PCR directement sur tissus. Le BiFC se base sur la reconstruction de la GFP et donc d'émission de fluorescence lorsque deux protéines, chacune fusionnée à un fragment de GFP, interagissent entres elles. Ces techniques alternatives pourraient être réalisées directement sur tissus, en testicules de drosophile, et permettraient également de visualiser directement le lieu d'interaction de ces protéines.

Ces autres candidats non validés comme interacteurs de Cby et spécifiquement exprimés pour la plupart uniquement dans les testicules de drosophiles, présentent des profils d'expression très variés qui pourraient permettre de comprendre d'autres processus au cours de la spermatogenèse, liés ou non à Cby, chez la drosophile.

Cette stratégie double-hybride n'a pas permis pour l'instant (en attente du profil d'expression de CG32655 et CG3213 et CG8086), d'identifier de nouveaux composants de la zone de transition associés à Cby. Néanmoins, les fonctions des deux nouveaux partenaires biochimiques identifiés au cours de la spermatogenèse reste à être déterminées et permettront d'en apprendre davantage sur la fonction de Cby dans la

mise en place de la zone de transition et plus globalement dans la formation du flagelle de spermatozoïde.

L'analyse des profils d'expressions de ces candidats nous a permis d'obtenir des informations intéressantes pour la compréhension de la spermatogenèse en générale chez la drosophile.

Ainsi, le gène *CG3213*, orthologue du gène *ODF2* chez les mammifères dont la protéine est responsable du recrutement de CBY1 à l'extrémité distale du centriole, serait localisée à la base de cils dans les neurones sensoriels et nous analysons actuellement sa fonction possible au niveau de la zone de transition ainsi que sa localisation au cours de la spermatogenèse.

Les protéines CG33140 et CG12184 apparaissent toutes les deux comme étant des composants de l'axonème et possiblement de la paire centrale. Ainsi, étant donné que *CBY* n'est retrouvée que dans les espèces possédant un cil motile, il se pourrait que CBY participe à la stabilisation de la paire centrale ou de protéines accessoires permettant de fournir à l'axonème un caractère motile. L'analyse du mutant *cby* n'a pas révélé d'absence de la paire centrale de l'axonème des spermatides, mais Cby pourrait participer à sa mise en place ou à sa stabilité de façon indirecte. Par ailleurs, CG12184 est retrouvée apposée à la zone de transition au stade spermatide ronde avant l'allongement de l'axonème et au stade spermatide allongée en fin d'allongement du flagelle. Cette protéine pourrait donc avoir une fonction dans le maintien de la zone de transition au centriole avant d'initier la croissance de l'axonème et dans le maintien de la zone de transition en fin d'allongement de l'axonème. L'analyse du double mutant *CG12184-CG12179* et de ses interactions avec les gènes requis pour la mise en place de la zone de transition permettra de répondre à cette question.

Au final, ce crible aura permis d'identifier 2 nouveaux partenaires biochimiques de Cby dont leur fonction au cours de la spermatogenèse seront à déterminer. De plus, la majorité des candidats obtenus ne sont exprimés que dans les testicules de drosophile et jouent donc probablement un rôle au cours de la spermatogenèse chez la drosophile. L'analyse de la fonction de ces gènes, nous permettra de mieux comprendre la spermatogenèse chez la drosophile.

CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble des travaux de recherche réalisés pendant ma thèse a permis d'identifier notamment deux nouveaux partenaires de la protéine Chibby (CBY) et ainsi caractériser un nouveau complexe protéique composé des protéines CBY, DZIP1 et FAM92. Toutes trois sont localisées à la base des cils, au niveau de la zone de transition, et requises pour l'assemblage des cils et des flagelles chez la drosophile. J'ai pu montrer que ce complexe est conservé entre les mammifères et la drosophile et qu'il représente un élément essentiel dans l'assemblage de la zone de transition des cils sensoriels et des flagelles chez la drosophile.

Chez les mammifères, CBY1 est recrutée aux fibres de transition à l'extrémité du corps basal à travers son interaction avec la protéine des appendices subdistaux ODF2/Cenexine et la protéine des fibres de transition, CEP164. DZIP1 a également été montrée pour interagir avec la protéine des fibres de transition CEP164, permettant sa localisation à cette structure (Wang et al., 2013a; Tateishi et al., 2013). Aucune étude n'a montré que les fibres de transition, ou tout du moins, une structure similaire aux fibres de transition, sont présentes au centriole/corps basal des spermatocytes dans les testicules de drosophile. Nos observations de microscopie électronique ne nous permettent pas non plus de trancher sur leur présence ou non au centriole et au corps basal au cours de la spermatogenèse, alors que de telles structures sont présentes à la base des cils des neurones sensoriels (Ma et Jarman., 2011; Vieillard et al. 2016). Seuls 3 des gènes codant des protéines des fibres de transition sont conservés chez la drosophile. Il s'agit de *cep164/CG9170, fbf1/CG5964 et cep89/CG8214.* Le gène *cep164* n'est pas exprimé dans les testicules de drosophile mais est présent dans les cils des neurones sensoriels. Le rôle de ce gène dans les neurones sensoriels n'a pas encore été précisé. L'étude du gène *cep89/CG8214* est actuellement en cours dans l'équipe. Concernant le gène *fbf1/CG5964*, nous avons analysé son profil d'expression au cours de la spermatogenèse chez la drosophile via la génération d'une lignée transgénique exprimant la protéine CG5964 sous son promoteur endogène, fusionnée à la GFP. La protéine est principalement distribuée sous une forme vésiculaire, au niveau du trans-Golgi **(Figure 38)**. Elle est parfois retrouvée à proximité du centriole des spermatocytes mais de façon ponctuelle. Cette localisation vésiculaire est également retrouvée dans les cils des neurones sensoriels (non montré).
Ceci indique que CG5964 ne serait pas un composant structural du centriole. Des expériences de vidéo-microscopie en temps réel permettraient de déterminer le timing précis d'apparition au centriole de la protéine et si cela coïncide avec un stade de différenciation précis. D'autre part, il serait important de vérifier cette localisation en absence de la protéine endogène, car il est possible que les deux protéines soient en compétition. Nous ne pourrons réaliser cela qu'après avoir obtenu un mutant nul du gène *CG5964*.

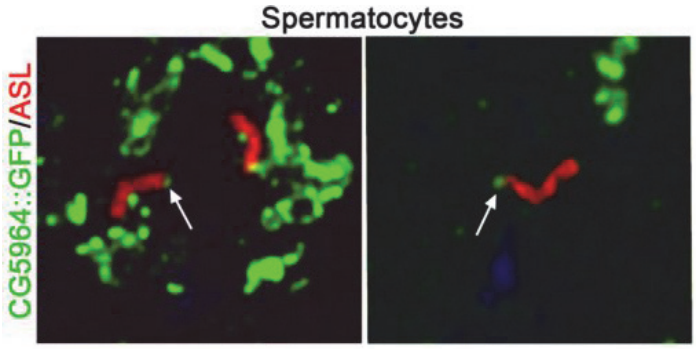


Figure 38: *Profil de la localisation de Fbf1/CG5964 dans les spermatocytes de drosophile. Fbf1/CG5964 est localisée au niveau de l'appareil de Golgi et elle est également parfois présente à l'extrémité distale de certains centrioles (flèches).*

Si chez la drosophile, la présence et le rôle des fibres de transition dans l'ancrage des corps basaux est encore à démontrer, l'absence de DZIP1 (ce travail) ou simultanément de Cby et Dila (Vieillard et al. 2016) à la zone de transition, conduisent à un défaut d'ancrage des corps basaux à la membrane plasmique dans les spermatocytes similaire à celui observé en absence de CBY1 dans les cellules multiciliées de la souris. Ainsi, chez la drosophile Cby et ses partenaires pourraient être suffisants pour permettre un ancrage des corps basaux en absence de protéines cœur des fibres de transition comme Cep164. De plus, les protéines localisées à la base de la zone de transition, au ring centriole, fourniraient une fonction d'ancrage des corps basaux à la membrane, en absence apparente de fibres de transition « conventionnelles ». En accord avec cette hypothèse, jusqu'à présent, seules Cby, DZIP1 et FAM92, toutes trois localisées au ring centriole, sont décrites pour être nécessaires à l'ancrage du corps basal à la membrane dans les spermatides de drosophile (Enjolras et al. 2012; Vieillard et al. 2016). L'absence d'autres protéines comme Cep290, localisées au ring centriole, présentent d'importants défauts de ciliogenèse mais l'ancrage du corps basal n'a pas été regardé. En revanche, le capuchon ciliaire apparaît plus court en son absence. L'absence de la protéine Unc conduit à de forts défauts ciliogéniques, mais l'intégrité du capuchon ciliaire n'a pas été testée dans ce mutant. Le fait que l'absence de Cby, Dzip1 ou Fam92 engendre des défauts d'ancrage du corps basal à la membrane pourrait suggérer que le module CBY, ait conservé une fonction similaire dans les testicules de drosophile, à celle clairement définie pour CBY1 chez les mammifères, dans l'ancrage du corps basal à la membrane. Ceci, malgré le fait que chez les mammifères, cette étape nécessitant l'ancrage du corps basal à une vésicule ciliaire alors que chez la drosophile, la présence de vésicule ciliaire n'a pour l'instant pas été confirmé.

Par ailleurs, il est important de noter que nous n'avons pas analysé précisément l'ancrage des corps basaux dans les neurones sensoriels de la drosophile en absence de DZIP1 et FAM92. Une observation préliminaire en microscopie électronique à transmission dans les neurones chordotonaux de drosophiles exprimant spécifiquement le shARN DZIP1 dans les neurones sensoriels, ne révèle pour l'instant pas de défaut au niveau des corps basaux, ceux-ci étant bien positionnés, mais il est difficile de conclure si ceux-ci sont ancrés ou non. De plus amples observations seront nécessaires, qui seront réalisées sur les mutants nuls. De façon similaire, nos résultats précédents sur l'analyse du double mutant *cby/dila* ne nous permettent pas d'être catégorique sur un défaut

d'ancrage des corps basaux à la membrane plasmique dans les neurones sensoriels, comme nous avons pu l'être pour les testicules. En effet, alors que l'absence de Cby et Dila conduit à des défauts d'ancrage des corps basaux à la membrane des spermatocytes, les corps basaux sont bien positionnés dans les cils des neurones sensoriels (Vieillard et al., 2016). Par ailleurs, l'équipe a montré que l'absence de Cby dans les cils des neurones sensoriels conduisait à la perturbation de la localisation de certaines protéines comme NompB/IFT88 et Arl13b. Ainsi Cby pourrait avoir une fonction différente au sein des différentes zones de transition, celle des cils des neurones sensoriels et celles des flagelles de spermatozoïde. En effet, ces deux zones de transition présentent des différences importantes. La zone de transition des centrioles des spermatocytes subit un remodelage lors de la méiose avec un allongement du capuchon ciliaire. Celle-ci est également dynamique, puisque la zone de transition des cils flagelles de spermatozoïde est mobile, contrairement à celle des neurones sensoriels qui est immobile et localisée à l'extrémité distale du corps basal.
Pour conclure sur le mécanisme d'ancrage des corps basaux, beaucoup reste à faire pour caractériser finement les défauts d'ancrage des différents mutants de protéines de la zone de transition chez la drosophile ainsi que pour comprendre le rôle éventuel des protéines des fibres de transition dans ce processus.

- Quel est le rôle du module CBY dans la dynamique de la zone de transition ?

Aucune donnée ne décrit actuellement le mécanisme par lequel la zone de transition au cours de la spermatogenèse chez la drosophile initie sa migration lors de l'allongement de l'axonème. Les différents modes d'assemblage des cils et des flagelles et le caractère dynamique de la zone de transition pour ces derniers, suggèrent qu'il existe d'importantes différences dans la composition des zones de transition des deux types de cils chez la drosophile.

L'absence de DZIP1 et FAM92 provoque un défaut d'ancrage des corps basaux à la membrane, et donc une absence du capuchon ciliaire, autour de la zone de transition. Dans les stades spermatides rondes, alors que dans le contrôle la zone de transition initie sa migration lors de l'allongement de l'axonème, mes travaux montrent, qu'en absence de DZIP1 et FAM92, que certaines protéines de la zone de transition comme Cep290, restent localisées au centriole, malgré l'allongement ''anormal'' de l'axonème. Ceci suggère que DZIP1 et FAM92 permettent de recruter des composants qui permettraient la migration de la zone de transition.

Plusieurs candidats pourraient jouer un rôle particulier au niveau de la zone de transition comme Cep164. Cette protéine est décrite pour être essentielle à la formation des fibres de transition dans plusieurs organismes (Graser et al., 2007). Un orthologue de *CEP164* est présent chez la drosophile, mais n'est exprimé que dans les neurones sensoriels (Flybase). Ceci pourrait expliquer les différences de comportement entre les zones de transition des deux tissus chez la drosophile. Il serait intéressant de pouvoir, soit dépléter Cep164 des neurones ciliés, ou plus encore de forcer son expression en spermatogenèse pour comprendre le rôle cette protéine à la zone de transition

L'autre protéine candidate est Cep162 qui pourrait participer à la dynamique de la zone de transition au cours de l'allongement du flagelle de spermatozoïde. En effet, chez les mammifères, CEP162 est une protéine de liaison aux microtubules localisée à la zone de transition. Son absence conduit à un arrêt prématuré de la ciliogenèse, en raison d'un défaut de recrutement des protéines de la zone de transition et donc de sa non formation à l'intérieur de la vésicule ciliaire (Wang et al., 2013b). CEP162 est une ATPase qui contient des similarités structurales avec le moteur moléculaire de type kinésine et possède un domaine de liaison au centriole. De plus, des analyses bio-informatiques de l'orthologue de *CEP162* chez la drosophile, *CG42699*, indiquent que la protéine CG42699 ne contient pas la région essentielle pour la liaison au centriole chez les mammifères.

L'hypothèse qui est discutée est que Cep162 serait, via son domaine similaire au domaine moteur de la kinésine, impliquée dans la migration de la zone de transition. J'ai récemment initié l'étude de la localisation de CG42699 fusionnée à la GFP au cours de la spermatogenèse, en association avec un marqueur de la zone de transition, Cby **(Figure 39)**. Initialement, la protéine est localisée à l'extrémité distale des centrioles, à la zone de transition avec Cby, en spermatocyte. De façon intéressante, le marquage de Cep162 diminue après la méiose au stade spermatide ronde et disparaît complètement lorsque la zone de transition, indiquée par Cby ici, commence à migrer.

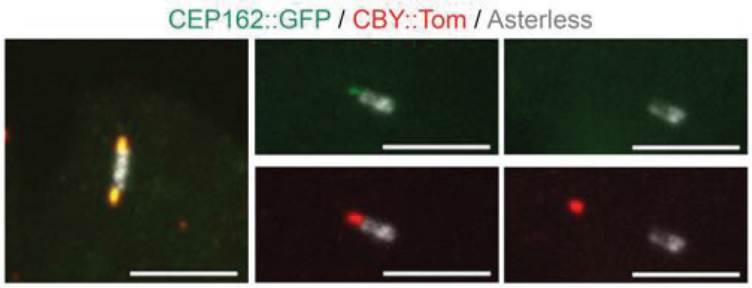


Figure 39 : *Localisation* de Cep162/CG42699 *au cours de la spermatogenèse.*
Cep162-GFP *se localise à l'extrémité distale des centrioles (Asterless), à la zone de transition avec* Cby-Tom *au stade spermatocyte et spermatide ronde. Lors de la migration de la zone de transition, matérialisée par Cby, le marquage de Cep162 disparaît et n'est plus localisé à la zone de transition.*

Ces résultats préliminaires soutiennent l'hypothèse que l'initiation de la migration de la zone de transition serait liée à Cep162. Plus précisément, ce serait la suppression de Cep162 à l'extrémité distale du centriole, qui permettrait la migration de la zone de transition. Ce processus n'impliquerait donc pas son domaine moteur semblable à celui des kinésines. Il serait intéressant d'observer le comportement de la zone de transition dans un mutant *cep162,* mais plus encore de comprendre les mécanismes à l'origine de la perte de Cep162 au moment de l'initiation de l'élongation de l'axonème. Enfin, il serait intéressant de pouvoir forcer l'expression de Cep162 au niveau du centriole au cours de la spermatogenèse.

Perspectives

L'identification d'un nouveau complexe protéique nécessaire à la formation de la zone de transition permet de déterminer plus précisément comment cette structure complexe s'assemble. Cependant, malgré des interactions fonctionnelles mises en évidence, nous n'avons pas encore identifié de protéines permettant de créer le lien entre ce complexe et tous ceux déjà décrits à la zone de transition.

De même, l'étude réalisée à partir d'un crible double hybride réalisé à partir d'une banque d'ADN complémentaire de testicules de drosophile m'a permis d'identifier 7 candidats potentiels comme étant des interacteurs potentiels de Cby. Parmi ceux-ci, j'ai validé l'interaction biochimique avec Cby pour 2 candidats : CG33140 et CG32655.

L'analyse du profil d'expression de la protéine CG33140 a permis de montrer que celle-ci était associée à l'axonème et possiblement à la paire centrale. En effet, CG33140 possède un domaine protéique MYCBP, domaine également retrouvé dans FAP174, une protéine trouvée chez Chlamydomonas qui est associée à la paire centrale de l'axonème (Rao et al., 2016). Cette observation sera à confirmer via l'analyse de la localisation de CG33140 dans un mutant dépourvu de paire centrale.
Le fait d'avoir potentiellement identifié un composant de la paire centrale comme interacteur direct de Cby reste cohérent. En effet, Cby est présent uniquement chez les métazoaires possédant un cil motile et indique que Cby pourrait jouer un rôle dans la mise en place de la paire centrale. Cependant nos données sur l'ultrastructure de l'axonème en absence de *cby* révèlent bel et bien la présence d'une paire centrale. Ceci pourrait suggérer que Cby n'est pas essentiel dans la mise en place de la paire centrale si son rôle dans celle-ci était confirmé.

Pour le moment, nous n'avons pas encore le profil d'expression de CG32655, une protéine de fonction inconnue et sans orthologues chez les mammifères. Ces données sont indispensables pour vérifier dans un premier temps si CG32655 est associée à Cby à la zone de transition avec un rôle plus spécifique chez la drosophile.
Concernant les 5 autres candidats restants, je n'ai pas mis en évidence une interaction entre ceux-ci et Cby dans mes conditions expérimentales. Ceci n'exclut bien évidemment pas une interaction potentielle, ni que certains de ces candidats soient de faux positif.
Ces autres candidats non validés comme interacteurs de Cby et spécifiquement exprimés pour la plupart uniquement dans les testicules de drosophiles, présentent des profils d'expression très variés qui pourraient permettre de comprendre d'autres processus au cours de la spermatogenèse, liés ou non à Cby, chez la drosophile.

Cette stratégie double-hybride n'a pas permis pour l'instant (en attente du profil d'expression de CG32655 et CG3213 et CG8086), d'identifier de nouveaux composants de la zone de transition associés à Cby. Néanmoins, les fonctions des deux nouveaux partenaires biochimiques identifiés au cours de la spermatogenèse restent à être déterminées et permettront d'en apprendre davantage sur la fonction de Cby dans la mise en place de la zone de transition et plus globalement dans la formation du flagelle de spermatozoïde.

Au final, les 2 approches utilisées pour identifier de nouveaux partenaires de Cby, par crible protéomique en cellules de mammifères et double hybride sur une banque d'ADN complémentaire de testicules de drosophile, ont permis de trouver un certains nombres de candidats. Les orthologues drosophiles des candidats identifiés en cellules de mammifères ne correspondent pas à ceux identifiés dans le crible double hybride, et FAM92 et DZIP1 n'ont pas été retrouvés dans le crible double hybride.

D'autres études via des approches de protéomique, ont elles aussi recherché des interacteurs spécifiques de CBY1. Par ailleurs elles sont également généré des interactomes afin d'identifier de façon plus générale des interactions protéine-protéine du compartiment ciliaire.

Un crible double hybride, réalisé à partir d'une banque d'ADN complémentaire de cerveau foetal humain, a identifié CBY1 comme interacteur de NBPF1 et la Clusturine (Vandepoele et al., 2010). Cette étude a donc identifié un complexe tri-moléculaire mais non relié à une fonction ciliaire. Un autre complexe tri-moléculaire comprenant CBY1 a également été identifié par double hybride, et correspond au complexe 14-3-3/CBY1/β-Catenine (Li et al., 2010) qui est impliqué dans l'inhibition de la voie β-Catenine par CBY1. CBY1 est donc une protéine capable de s'associer à différents partenaires et former des complexes multi-protéiques importants.

Récemment, une étude, basée sur une approche de protéomique par Tap-tag a recherché de potentiels interacteurs de CBY1 en cellules humaines HEK293 et a notamment identifié FAM92A (Li et al., 2016). Cette même étude a également identifié DZIP1 comme potentiel interacteur de CBY1 mais ne l'a pas validé. Outre ces deux candidats, ce crible a également identifié Hspa5 (ou GPR78), que l'on retrouve dans notre crible (Voir Tableau S1 de l'article). Cette protéine fait partie de la famille de protéines chaperones de type Hsp70 mais sa fonction est encore mal comprise et elle n'a pas encore été associée à la ciliogenèse. Un orthologue existe chez la drosophile (Hsc70-3) et il sera intéressant de déterminer sa fonction dans les deux tissus ciliés de la drosophile. Hspa5 est également trouvée dans une étude protéomique globale sur le cil, pour interagir avec CBY1 Cette étude inclue la recherche de partenaires pour 217 protéines ciliaires (Boldt et al., 2016). Parmi les 217 protéines, se trouvaient CBY1, et ni DZIP1/DZIP1L ni FAM92A n'ont été retrouvées pour interagir avec CBY1. De même, les interacteurs de CBY1 déjà identifiés (ODF2, Cep164, Rabin8 n'ont pas été retrouvée. En revanche, cette étude révèle une potentielle interaction entre DZIP1 et FAM92. Le fait de n'avoir pas identifié d'interacteurs de CBY1 déjà connus pourrait provenir du fait que cette étude n'a pas été réalisée sur des cellules où l'induction de la ciliogenèse par privation en sérum fut réalisée. En revanche, cette étude, ainsi qu'une autre (Wheway et al., 2015) identifient la protéine c21orf2 comme potentiel interacteur de CBY1. C21orf2 se localise à la base du cil et la déplétion perturbe la ciliogenèse. En 2015 a également été réalisé une étude protéomique à partir de zones de transition isolées de Chlamydomonas (Diener et al., 2015). CBY1 n'est pas présent chez cet organisme mais cette étude a identifié des protéines apparentées à la famille DZIP1 et DZIP1L. Ces données semblent en accord avec les différentes études localisant les protéines DZIP1 ou DZIP1L au niveau du centriole/zone de transition. Par ailleurs, ces protéines, contrairement à CBY1 semblent avoir été conservées à travers l'évolution, et pas seulement restreintes au règne des métazoaires.

Très récemment, une étude protéomique a recherché des interacteurs de DZIP1L chez l'homme par une approche en double hybride. Celle-ci n'a mis en évidence ni CBY1, ni FAM92A mais une protéine, SEPT2, localisée à proximité de la zone de transition et impliquée dans la barrière de diffusion. Ceci est cohérent avec le rôle de DZIP1L dans la barrière de diffusion mis en évidence dans ces travaux.

Enfin, 2 dernières études de protéomique sur le cil ont été réalisées. Celles-ci ont utilisé une nouvelle approche plus sensible que celles utilisant classiquement le TAP-tag. Celles-ci sont basées sur la biotinylation de protéines se localisant à proximité de la protéine d'intérêt. La première, utilisant le BioID, a généré une vaste carte d'interaction protéine-protéine de l'interface centrosome-cil, révélant des modules protéique important pour la biogenèse du cil et du centrosome, mais aussi un lien dynamique entre ces deux processus (Gupta et al., 2015). Cependant, malgré l'utilisation de protéines de la zone de transition et d'appendices distaux comme appâts, ces travaux n'ont identifié ni CBY1, ni DZIP1L, ni FAM92A. Enfin, la seconde étude, a elle aussi réalisé un marquage de proximité par biotinylation, mais cette fois en utilisant l'enzyme APEX peroxydase, fusionnée à une protéine ciliaire (NPHP3-APEX) (Mick et al., 2015). Le principe est similairement le même que pour le BioID. Ces approches variant principalement sur le temps de d'incubation avec la biotine, et le rayon de biotinylation des protéines autour de la protéine en fusion avec l'enzyme. Cette étude n'a pas identifié de protéines localisées au centriole ni à la zone de transition. Les auteurs justifient cette absence à juste titre, par la localisation ciliaire de leur protéine et par le diamètre de biotinylation autour de leur protéine ciliaire. Cependant, ces deux études valident le fait d'utiliser ces nouvelles approches de marquage de proximité pour l'identification de réseau de protéines, dans un compartiment donné, ici le cil.

Ces différentes études ont utilisées des approches variées et ont généré des résultats qui peuvent pour certains se recouper, mais pour d'autres être totalement indépendant. Cela met en lumière les avantages et limites de chacune des approches. Le fait que CBY1, ou certains de ses partenaires connus ne soient pas mis en évidence, peut révéler une interaction faible ou labile entre CBY1 et ses partenaires. Ceci pourrait provenir de la structure protéique de CBY1, et notamment par la présence de 2 domaines désordonnés, qui permettent rapidement de réguler l'affinité pour des partenaires d'interaction. Ces données soulignent donc l'importance et l'utilité d'utiliser plusieurs approches afin de répondre à une problématique.

Pour aller plus loin dans le cadre de cette étude, il faudra identifier de nouveaux partenaires biochimiques du complexe Cby, en utilisant ces nouvelles méthodes de protéomique plus sensibles et plus souples dans leur mise en place. Ces nouvelles méthodes nécessitant moins de matériel protéique que celle utilisée lors de ma thèse et permettant également la congélation des échantillons sans crainte de rompre les interactions. Ainsi, au laboratoire, nous optimisons actuellement les conditions afin de réaliser une expérience de marquage de proximité en fusionnant Cby à l'ascorbate peroxidase (APEX), et ce directement chez la drosophile. L'APEX biotinyle toutes les protéines environnantes dans un rayon de 20 nm. Ceci permettra d'une part d'identifier de nouveaux partenaires de Cby et impliqués dans l'assemblage de ce complexe. D'autre part, ceci permettra également de réaliser une cartographie de ce compartiment de la zone de transition à proximité de notre protéine d'intérêt. Etant donné que la biotinylation est activable par l'ajout d'H_2O_2, il est tout à fait possible de réaliser des

cinétiques de cartographie protéique de l'environnement de la zone de transition. Ainsi, la biotinylation peut se faire sur des testicules de drosophile au stade larvaire. Ceci nous permettra d'obtenir des informations sur la mise en place de la zone de transition afin d'identifier les composants nécessaires à son assemblage. Réalisée sur des testicules de pupes, la biotinylation servira à décrire la composition protéique de la zone de transition au moment de sa migration. Enfin, biotinyler des testicules de mouches adultes plus âgées permettra peut-être d'identifier des protéines nécessaires à la stabilisation de la zone de transition. Les résultats préliminaires révèlent dans un premier temps que la protéine fusion Cby-APEX se localise parfaitement à la zone de transition. Dans un second temps, nous détectons un signal de biotinylation au niveau de la zone de transition, indiquant potentiellement que Cby-APEX biotinylerait des protéines dans un environnement proche de Cby. Ces résultats sont encourageants pour la mise en place de cette stratégie qui permettra d'identifier de nouveaux interacteurs de Cby et de compléter les résultats préalablement obtenus avec le crible protéomique et le crible double hybride. Cette stratégie permettra alors d'identifier des partenaires directs et/ou indirects de Cby, mais aussi des protéines qui transitent à la zone de transition à proximité de Cby. Cette stratégie sera dans un premier temps réalisé autour de Cby mais pourra être étendue aux autres interacteurs de Cby, Dzip1 et Fam92 afin de compléter la composition du module Cby et d'identifier d'autres liens avec d'autres modules protéiques au sein de la zone de transition que nous n'identifierions pas avec Cby.

Ce crible protéomique sera réalisé à la fois dans les flagelles de spermatozoïde mais aussi dans les neurones sensoriels. Les résultats obtenus permettront de recouper les analogies et mettre en évidence les différences d'assemblage de cette zone de transition lors des deux types de ciliogenèse différentes : compartimentée et cytosolique. Ceci révèlera également par quels mécanismes le module Cby est nécessaire à l'initiation de l'assemblage de la zone de transition aussi bien lors de la ciliogenèse compartimentée que de la ciliogenèse cytosolique.

CONCLUSION

En conclusion générale, mes travaux de thèse ont permis l'identification d'un nouveau module protéique incluant CBY, DZIP1 et FAM92, nécessaire à l'assemblage de la zone de transition et plus généralement des cils et des flagelles chez la drosophile. Si je montre que ce module est requis pour l'assemblage des autres modules très étudies de la zone de transition, les approches que j'ai développées n'ont pas permis de comprendre quelles sont les protéines à l'interface du module CBY et ces autres complexes décrits à la zone de transition. De plus, mes travaux montrent les limites de l'approche double hybride pour identifier ces composés. Il sera donc nécessaire de poursuivre les approches biochimiques afin d'identifier les protéines reliant les différents modules et comprendre comment s'échafaude la zone de transition. De plus, la caractérisation de plus en plus précise des différences et convergences qui existent dans la composition moléculaire et l'architecture des zones de transition selon le type cellulaire et l'organisme, est un enjeu important pour comprendre comment ces variations influencent l'architecture et la fonction ciliaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aldridge, A. C., Benson, L. P., Siegenthaler, M. M., Whigham, B. T., Stowers, R. S. and Hales, K. G. (2007). Roles for Drp1, a dynamin-related protein, and milton, a kinesin-associated protein, in mitochondrial segregation, unfurling and elongation during Drosophila spermatogenesis. *Fly (Austin)* **1**, 38–46.

Anderson, R. G. (1972). The three-dimensional structure of the basal body from the rhesus monkey oviduct. *The Journal of Cell Biology* **54**, 246–265.

Arce, C. A. and Barra, H. S. (1983). Association of tubulinyl-tyrosine carboxypeptidase with microtubules. *FEBS Lett.* **157**, 75–78.

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

Avidor-Reiss, T. and Leroux, M. R. (2015). Shared and Distinct Mechanisms of Compartmentalized and Cytosolic Ciliogenesis. *Current Biology* **25**, R1143–R1150.

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

Azimzadeh, J. and Marshall, W. F. (2010). Building the Centriole. *Current Biology* **20**, R816–R825.

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

Baker, J. D., Adhikarakunnathu, S. and Kernan, M. J. (2004). Mechanosensory-defective, male-sterile unc mutants identify a novel basal body protein required for ciliogenesis in Drosophila. *Development* **131**, 3411–3422.

Baker, K. and Beales, P. L. (2009). Making sense of cilia in disease: The human ciliopathies. *Am. J. Med. Genet.* **151C**, 281–295.

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

Barratt, C. L. R., Kay, V. and Oxenham, S. K. (2009). The human spermatozoon - a stripped down but refined machine. *J. Biol.* **8**, 63.

Basiri, M. L., Ha, A., Chadha, A., Clark, N. M., Polyanovsky, A., Cook, B. and Avidor-Reiss, T. (2014). A Migrating Ciliary Gate Compartmentalizes the Site of Axoneme Assembly in Drosophila Spermatids. *Current Biology* **24**, 2622–2631.

Basto, R., Lau, J., Vinogradova, T., Gardiol, A., Woods, C. G., Khodjakov, A. and Raff, J. W. (2006). Flies without centrioles. *Cell* **125**, 1375–1386.

Bellomo, D., Lander, A., Harragan, I. and Brown, N. A. (1996). Cell proliferation in mammalian gastrulation: the ventral node and notochord are relatively quiescent. *Dev. Dyn.* **205**, 471–485.

Ben Chih, Liu, P., Chinn, Y., Chalouni, C., Komuves, L. G., Hass, P. E., Sandoval, W. and Peterson, A. S. (2011). A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane

domain. *Nature Publishing Group* **14**, 61–72.

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

Berbari, N. F., Bishop, G. A., Askwith, C. C., Lewis, J. S. and Mykytyn, K. (2007). Hippocampal neurons possess primary cilia in culture. *J. Neurosci. Res.* **85**, 1095–1100.

Berbari, N. F., Johnson, A. D., Lewis, J. S., Askwith, C. C. and Mykytyn, K. (2008). Identification of ciliary localization sequences within the third intracellular loop of G protein-coupled receptors. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 1540–1547.

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

Bielas, S. L., Silhavy, J. L., Brancati, F., Kisseleva, M. V., Al-Gazali, L., Sztriha, L., Bayoumi, R. A., Zaki, M. S., Abdel-Aleem, A., Rosti, R. O., et al. (2009). Mutations in INPP5E, encoding inositol polyphosphate-5-phosphatase E, link phosphatidyl inositol signaling to the ciliopathies. *Nat. Genet.* **41**, 1032–1036.

Blacque, O. E., Li, C., Inglis, P. N., Esmail, M. A., Ou, G., Mah, A. K., Baillie, D. L., Scholey, J. M. and Leroux, M. R. (2006). The WD repeat-containing protein IFTA-1 is required for retrograde intraflagellar transport. *Molecular Biology of the Cell* **17**, 5053–5062.

Boekhoff-Falk, G. and Eberl, D. F. (2014). The Drosophila auditory system. *WIREs Dev Biol* **3**, 179–191.

Boldt, K., van Reeuwijk, J., Lu, Q., Koutroumpas, K., Nguyen, T.-M. T., Texier, Y., van Beersum, S. E. C., Horn, N., Willer, J. R., Mans, D. A., et al. (2016). An organelle-specific protein landscape identifies novel diseases and molecular mechanisms. *Nat Comms* **7**, 11491.

Bosch Grau, M., Gonzalez Curto, G., Rocha, C., Magiera, M. M., Marques Sousa, P., Giordano, T., Spassky, N. and Janke, C. (2013). Tubulin glycylases and glutamylases have distinct functions in stabilization and motility of ependymal cilia. *The Journal of Cell Biology* **202**, 441–451.

Brailov, I., Bancila, M., Brisorgueil, M. J., Miquel, M. C., Hamon, M. and Vergé, D. (2000). Localization of 5-HT(6) receptors at the plasma membrane of neuronal cilia in the rat brain. *Brain Res.* **872**, 271–275.

Brand, M., Heisenberg, C. P., Warga, R. M., Pelegri, F., Karlstrom, R. O., Beuchle, D., Picker, A., Jiang, Y. J., Furutani-Seiki, M., van Eeden, F. J., et al. (1996). Mutations affecting development of the midline and general body shape during zebrafish embryogenesis. *Development* **123**, 129–142.

Briggs, L. J., Davidge, J. A., Wickstead, B., Ginger, M. L. and Gull, K. (2004). More than one way to build a flagellum: comparative genomics of parasitic protozoa. *Current Biology* **14**, R611–2.

Brill, J. A., Yildirim, S. and Fabian, L. (2016). Phosphoinositide signaling in sperm development. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **59**, 2–9.

Briscoe1, J. and Thérond, P. P. (2013). The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature Publishing Group* **14**, 416–429.

Burke, M. C., Li, F.-Q., Cyge, B., Arashiro, T., Brechbuhl, H. M., Chen, X., Siller, S. S., Weiss, M. A., O'Connell, C. B., Love, D., et al. (2014). Chibby promotes ciliary vesicle formation and basal body docking during airway cell differentiation. *The Journal of Cell Biology* **207**, 123–137.

Callaini, G., Whitfield, W. G. and Riparbelli, M. G. (1997). Centriole and centrosome dynamics during the embryonic cell cycles that follow the formation of the cellular blastoderm in Drosophila. *Experimental Cell Research* **234**, 183–190.

Carpenter, M. L. and Cande, W. Z. (2009). Using morpholinos for gene knockdown in Giardia intestinalis.

Eukaryotic Cell **8**, 916–919.

Carvalho-Santos, Z., Azimzadeh, J., Pereira-Leal, J. B. and Bettencourt-Dias, M. (2011). Evolution: Tracing the origins of centrioles, cilia, and flagella. *The Journal of Cell Biology* **194**, 165–175.

Carvalho-Santos, Z., Machado, P., Alvarez-Martins, I., Gouveia, S. M., Jana, S. C., Duarte, P., Amado, T., Branco, P., Freitas, M. C., Silva, S. T. N., et al. (2012). BLD10/CEP135 is a microtubule-associated protein that controls the formation of the flagellum central microtubule pair. *Developmental Cell* **23**, 412–424.

Chang, J., Seo, S., Lee, K., Nagashima, K., Bang, J., Kim, B., Erikson, R. L., Lee, K.-W., Lee, H., Park, J.-E., et al. (2014). Essential role of Cenexin1, but not Odf2, in ciliogenesis. *Cell Cycle* **12**, 655–662.

Chen, J. V., Kao, L.-R., Jana, S. C., Sivan-loukianova, E., Mendonça, S., Cabrera, O. A., Singh, P., Cabernard, C., Eberl, D. F., Bettencourt-Dias, M., et al. (2015). Rootletin organizes the ciliary rootlet to achieve neuron sensory function in Drosophila. *The Journal of Cell Biology* **211**, 435–453.

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

Christopher, K. J., Wang, B., Kong, Y. and Weatherbee, S. D. (2012). Forward genetics uncovers Transmembrane protein 107 as a novel factor required for ciliogenesis and Sonic hedgehog signaling. *Developmental Biology* **368**, 382–392.

Chung, Y. D., Zhu, J., Han, Y. and Kernan, M. J. (2001). nompA encodes a PNS-specific, ZP domain protein required to connect mechanosensory dendrites to sensory structures. *Neuron* **29**, 415–428.

Clare, D. K., Magescas, J., Piolot, T., Dumoux, M., Vesque, C., Pichard, E., Dang, T., Duvauchelle, B., Poirier, F. and Delacour, D. (2014). Basal foot MTOC organizes pillar MTs required for coordination of beating cilia. *Nat Comms* **5**, 4888

Cole, D. G., Diener, D. R., Himelblau, A. L., Beech, P. L., Fuster, J. C. and Rosenbaum, J. L. (1998). Chlamydomonas kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in Caenorhabditis elegans sensory neurons. *The Journal of Cell Biology* **141**, 993–1008.

Cortellino, S., Wang, C., Wang, B., Bassi, M. R., Caretti, E., Champeval, D., Calmont, A., Jarnik, M., Burch, J., Zaret, K. S., et al. (2009). Defective ciliogenesis, embryonic lethality and severe impairment of the Sonic Hedgehog pathway caused by inactivation of the mouse complex A intraflagellar transport gene Ift122/Wdr10, partially overlapping with the DNA repair gene Med1/Mbd4. *Developmental Biology* **325**, 225–237.

Craft, J. M., Harris, J. A., Hyman, S., Kner, P. and Lechtreck, K. F. (2015). Tubulin transport by IFT is upregulated during ciliary growth by a cilium-autonomous mechanism. *The Journal of Cell Biology* **208**, 223–237.

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

Cueva, J. G., Hsin, J., Huang, K. C. and Goodman, M. B. (2012). Posttranslational Acetylation of α-Tubulin Constrains Protofilament Number in Native Microtubules. *Current Biology* **22**, 1066–1074.

Czarnecki, P. G. and Shah, J. V. (2012). The ciliary transition zone: from morphology and molecules to medicine. *Trends in Cell Biology* **22**, 201–210.

Čajánek, L. and Nigg, E. A. (2014). Cep164 triggers ciliogenesis by recruiting Tau tubulin kinase 2 to the mother centriole. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, E2841–50.

Daumke, O., Roux, A. and Haucke, V. (2014). BAR Domain Scaffolds in Dynamin-Mediated Membrane Fission. *Cell* **156**, 882–892.

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

Delgehyr, N., Rangone, H., Fu, J., Mao, G., Tom, B., Riparbelli, M. G., Callaini, G. and Glover, D. M. (2012). Klp10A, a Microtubule-Depolymerizing Kinesin-13, Cooperates with CP110 to Control Drosophila Centriole Length. *Current Biology* **22**, 502–509.

Deretic, D., Schmerl, S., Hargrave, P. A., Arendt, A. and McDowell, J. H. (1998). Regulation of sorting and post-Golgi trafficking of rhodopsin by its C-terminal sequence QVS(A)PA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 10620–10625.

Diener, D. R., Pietro Lupetti and Rosenbaum, J. L. (2015). Proteomic Analysis of Isolated Ciliary Transition Zones Reveals the Presence of ESCRT Proteins. *Current Biology* **25**, 379–384.

Dishinger, J. F., Kee, H. L., Jenkins, P. M., Fan, S., Hurd, T. W., Hammond, J. W., Truong, Y. N.-T., Ben Margolis, Martens, J. R. and Verhey, K. J. (2010). Ciliary entry of the kinesin-2 motor KIF17 is regulated by importin-β2 and RanGTP. *Nat Cell Biol* **12**, 703–710.

Doroquez, D. B., Berciu, C., Anderson, J. R., Sengupta, P. and Nicastro, D. (2014). A high-resolution morphological and ultrastructural map of anterior sensory cilia and glia in Caenorhabditis elegans. *Elife* **3**, e01948.

Dowdle, W. E., Robinson, J. F., Kneist, A., Sirerol-Piquer, M. S., Frints, S. G. M., Corbit, K. C., Zaghloul, N. A., Zaghloul, N. A., van Lijnschoten, G., Mulders, L., et al. (2011). Disruption of a ciliary B9 protein complex causes Meckel syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **89**, 94–110.

Dzhindzhev, N. S., Tzolovsky, G., Lipinszki, Z., Schneider, S., Lattao, R., Fu, J., Debski, J., Dadlez, M. and Glover, D. M. (2014). Plk4 Phosphorylates Ana2 to Trigger Sas6 Recruitment and Procentriole Formation. *Current Biology* **24**, 2526–2532.

Eberl, D. F. and Boekhoff-Falk, G. (2007). Development of Johnston's organ in Drosophila. *Int. J. Dev. Biol.* **51**, 679–687.

Enjolras, C., Thomas, J., Chhin, B., Cortier, E., Duteyrat, J.-L., Soulavie, F., Kernan, M. J., Laurençon, A. and Durand, B. (2012). Drosophila chibby is required for basal body formation and ciliogenesis but not for Wg signaling. *The Journal of Cell Biology* **197**, 313–325.

Erck, C., Peris, L., Andrieux, A., Meissirel, C., Gruber, A. D., Vernet, M., Schweitzer, A., Saoudi, Y., Pointu, H., Bosc, C., et al. (2005). A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 7853–7858.

Fabrizio, J. J., Hime, G., Lemmon, S. K. and Bazinet, C. (1998). Genetic dissection of sperm individualization in Drosophila melanogaster. *Development* **125**, 1833–1843.

Fath, M. A. (2005). Mkks-null mice have a phenotype resembling Bardet-Biedl syndrome. *Human Molecular Genetics* **14**, 1109–1118.

Feng, S., Knödler, A., Ren, J., Zhang, J., Zhang, X., Hong, Y., Huang, S., Peränen, J. and Guo, W. (2012). A Rab8 guanine nucleotide exchange factor-effector interaction network regulates primary ciliogenesis. *J. Biol. Chem.* **287**, 15602–15609.

Fisch, C. and Dupuis-Williams, P. (2012). Ultrastructure of cilia and flagella - back to the future! *Biology of the Cell* **103**, 249–270.

Follit, J. A., Tuft, R. A., Fogarty, K. E. and Pazour, G. J. (2006). The intraflagellar transport protein IFT20

is associated with the Golgi complex and is required for cilia assembly. *Molecular Biology of the Cell* **17**, 3781–3792.

Franz, A., Roque, H., Saurya, S., Dobbelaere, J. and Raff, J. W. (2013). CP110 exhibits novel regulatory activities during centriole assembly in Drosophila. *The Journal of Cell Biology* **203**, 785–799.

Galletta, B. J., Jacobs, K. C., Fagerstrom, C. J. and Rusan, N. M. (2016). Asterless is required for centriole length control and sperm development. *The Journal of Cell Biology* **213**, 435–450.

Garcia-Gonzalo, F. R. and Reiter, J. F. (2012). Scoring a backstage pass: mechanisms of ciliogenesis and ciliary access. *The Journal of Cell Biology* **197**, 697–709.

Garcia-Gonzalo, F. R. and Reiter, J. F. (2017). Open Sesame: How Transition Fibers and the Transition Zone Control Ciliary Composition. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**, a028134.

Garcia-Gonzalo, F. R., Corbit, K. C., Sirerol-Piquer, M. S., Ramaswami, G., Otto, E. A., Noriega, T. R., Seol, A. D., Robinson, J. F., Bennett, C. L., Josifova, D. J., et al. (2011). A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nature Publishing Group* **43**, 776–784.

Garcia-Gonzalo, F. R., Phua, S. C., Roberson, E. C., Garcia, G., III, Abedin, M., Schurmans, S., Inoue, T. and Reiter, J. F. (2015). Phosphoinositides Regulate Ciliary Protein Trafficking to Modulate Hedgehog Signaling. *Developmental Cell* **34**, 400–409.

Ghossoub, R., Hu, Q., Failler, M., Rouyez, M.-C., Spitzbarth, B., Mostowy, S., Wolfrum, U., Saunier, S., Cossart, P., Jamesnelson, W., et al. (2013). Septins 2, 7 and 9 and MAP4 colocalize along the axoneme in the primary cilium and control ciliary length. *Journal of Cell Science* **126**, 2583–2594.

GIBBONS, I. R. and GRIMSTONE, A. V. (1960). On flagellar structure in certain flagellates. *J Biophys Biochem Cytol* **7**, 697–716.

Gilula, N. B. and Satir, P. (1972). The ciliary necklace. A ciliary membrane specialization. *The Journal of Cell Biology* **53**, 494–509.

Glazer, A. M., Wilkinson, A. W., Backer, C. B., Lapan, S. W., Gutzman, J. H., Cheeseman, I. M. and Reddien, P. W. (2010). The Zn Finger protein Iguana impacts Hedgehog signaling by promoting ciliogenesis. *Developmental Biology* **337**, 148–156.

Goetz, S. C., Liem, K. F., Jr and Anderson, K. V. (2012). The Spinocerebellar Ataxia-Associated Gene Tau Tubulin Kinase 2 Controls the Initiation of Ciliogenesis. *Cell* **151**, 847–858.

Gong, Z., Son, W., Chung, Y. D., Kim, J., Shin, D. W., McClung, C. A., Lee, Y., Lee, H. W., Chang, D.-J., Kaang, B.-K., et al. (2004). Two interdependent TRPV channel subunits, inactive and Nanchung, mediate hearing in Drosophila. *J. Neurosci.* **24**, 9059–9066.

Gottardo, M., Callaini, G. and Riparbelli, M. G. (2013). The cilium-like region of the Drosophila spermatocyte: an emerging flagellum? *Journal of Cell Science* **126**, 5441–5452.

Gottardo, M., Callaini, G. and Riparbelli, M. G. (2016). Klp10A modulates the localization of centriole-associated proteins during Drosophila male gametogenesis. *Cell Cycle* **15**, 3432–3441.

Gottardo, M., Pollarolo, G., Llamazares, S., Reina, J., Riparbelli, M. G., Callaini, G. and Gonzalez, C. (2015). Loss of Centrobin Enables Daughter Centrioles to Form Sensory Cilia in Drosophila. *Current Biology* **25**, 2319–2324.

Graser, S., Stierhof, Y.-D., Lavoie, S. B., Gassner, O. S., Lamla, S., Le Clech, M. and Nigg, E. A. (2007). Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation. *The Journal of Cell Biology* **179**, 321–330.

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

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

Hagiwara, H., Ohwada, N., Aoki, T., Suzuki, T. and Takata, K. (2008). The primary cilia of secretory cells in the human oviduct mucosa. *Med Mol Morphol* **41**, 193–198.

Hagstrom, S. A., Adamian, M., Scimeca, M., Pawlyk, B. S., Yue, G. and Li, T. (2001). A role for the Tubby-like protein 1 in rhodopsin transport. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**, 1955–1962.

Hall, E. A., Keighren, M., Ford, M. J., Davey, T., Jarman, A. P., Smith, L. B., Jackson, I. J. and Mill, P. (2013). Acute Versus Chronic Loss of Mammalian Azi1/Cep131 Results in Distinct Ciliary Phenotypes. *PLoS Genet* **9**, e1003928.

Han, Y.-G., Kwok, B. H. and Kernan, M. J. (2003). Intraflagellar transport is required in Drosophila to differentiate sensory cilia but not sperm. *Current Biology* **13**, 1679–1686.

Hao, L., Acar, S., Evans, J., Ou, G. and Scholey, J. M. (2009). *Chapter 13 - Analysis of Intraflagellar Transport in C. elegans Sensory Cilia*. Methods in cell biology **93**, 235-266

Hartenstein, V. (1993). *Atlas of Drosophila development*.

Hearn, T., Spalluto, C., Phillips, V. J., Renforth, G. L., Copin, N., Hanley, N. A. and Wilson, D. I. (2005). Subcellular localization of ALMS1 supports involvement of centrosome and basal body dysfunction in the pathogenesis of obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Diabetes* **54**, 1581–1587.

Hildebrandt, F., Benzing, T. and Katsanis, N. (2011). Ciliopathies. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1533–1543.

Hidaka, S., Könecke, V., Osten, L. and Witzgall, R. (2004). PIGEA-14, a novel coiled-coil protein affecting the intracellular distribution of polycystin-2. *J. Biol. Chem.* **279**, 35009–35016.

Hiraki, M., Nakazawa, Y., Kamiya, R. and Hirono, M. (2007). Bld10p constitutes the cartwheel-spoke tip and stabilizes the 9-fold symmetry of the centriole. *Current Biology* **17**, 1778–1783.

Hoeng, J. C., Dawson, S. C., House, S. A., Sagolla, M. S., Pham, J. K., Mancuso, J. J., Löwe, J. and Cande, W. Z. (2008). High-resolution crystal structure and in vivo function of a kinesin-2 homologue in Giardia intestinalis. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 3124–3137.

Hoff, S., Halbritter, J., Epting, D., Frank, V., Nguyen, T.-M. T., van Reeuwijk, J., Boehlke, C., Schell, C., Yasunaga, T., Helmstädter, M., et al. (2013). ANKS6 is a central component of a nephronophthisis module linking NEK8 to INVS and NPHP3. *Nature Publishing Group* **45**, 951–956.

Horani, A., Ferkol, T. W., Dutcher, S. K. and Brody, S. L. (2016). Genetics and biology of primary ciliary dyskinesia. *Paediatric Respiratory Reviews* **18**, 18–24.

Hu, Q., Milenkovic, L., Jin, H., Scott, M. P., Nachury, M. V., Spiliotis, E. T. and Nelson, W. J. (2010). A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. *Science* **329**, 436–439.

Huh, J. R., Vernooy, S. Y., Yu, H., Yan, N., Shi, Y., Guo, M. and Hay, B. A. (2003). Multiple Apoptotic Caspase Cascades Are Required in Nonapoptotic Roles for Drosophila Spermatid Individualization. *PLoS Biol.* **2**, e15.

Humbert, M. C., Weihbrecht, K., Searby, C. C., Li, Y., Pope, R. M., Sheffield, V. C. and Seo, S. (2012). ARL13B, PDE6D, and CEP164 form a functional network for INPP5E ciliary targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 19691–19696.

Hunnicutt, G. R., Kosfiszer, M. G. and Snell, W. J. (1990). Cell body and flagellar agglutinins in Chlamydomonas reinhardtii: the cell body plasma membrane is a reservoir for agglutinins whose migration to the flagella is regulated by a functional barrier. *The Journal of Cell Biology* **111**, 1605–1616.

Hurd, T. W., Fan, S. and Margolis, B. L. (2011). Localization of retinitis pigmentosa 2 to cilia is regulated by Importin beta2. *Journal of Cell Science* **124**, 718–726.

Ihara, M., Kinoshita, A., Yamada, S., Tanaka, H., Tanigaki, A., Kitano, A., Goto, M., Okubo, K., Nishiyama, H., Ogawa, O., et al. (2005). Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. *Developmental Cell* **8**, 343–352.

Ikegami, K., Sato, S., Nakamura, K., Ostrowski, L. E. and Setou, M. (2010). Tubulin polyglutamylation is essential for airway ciliary function through the regulation of beating asymmetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 10490–10495.

Inanç, B., Pütz, M., Lalor, P., Dockery, P., Kuriyama, R., Gergely, F. and Morrison, C. G. (2013). Abnormal centrosomal structure and duplication in Cep135-deficient vertebrate cells. *Molecular Biology of the Cell* **24**, 2645–2654.

Iomini, C., Li, L., Esparza, J. M. and Dutcher, S. K. (2009). Retrograde intraflagellar transport mutants identify complex A proteins with multiple genetic interactions in Chlamydomonas reinhardtii. *Genetics* **183**, 885–896.

Ishikawa, H. and Marshall, W. F. (2011). Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nature Publishing Group* **12**, 222–234.

Ishikawa, H. and Marshall, W. F. (2017). Intraflagellar Transport and Ciliary Dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**, a021998.

Ishikawa, H. and Marshall, W. F. (2015). *Efficient live fluorescence imaging of intraflagellar transport in mammalian primary cilia*. Methods in cell biology **127**, 189-201

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

Janke, C., Rogowski, K., Wloga, D., Regnard, C., Kajava, A. V., Strub, J.-M., Temurak, N., van Dijk, J., Boucher, D., Van Dorsselaer, A., et al. (2005). Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family. *Science* **308**, 1758–1762.

Januschke, J., Reina, J., Llamazares, S., Bertran, T., Rossi, F., Roig, J. and Gonzalez, C. (2013). Centrobin controls mother--daughter centriole asymmetry in Drosophila neuroblasts. *Nat Cell Biol* **15**, 241–248.

Jarman, A. P. (2002). Studies of mechanosensation using the fly. *Human Molecular Genetics* **11**, 1215–1218.

Jauregui, A. R., Nguyen, K. C. Q., Hall, D. H. and Barr, M. M. (2008). The Caenorhabditis elegans nephrocystins act as global modifiers of cilium structure. *The Journal of Cell Biology* **180**, 973–988.

Jensen, V. L., Li, C., Bowie, R. V., Clarke, L., Mohan, S., Blacque, O. E. and Leroux, M. R. (2015). Formation of the transition zone by Mks5/Rpgrip1L establishes a ciliary zone of exclusion (CIZE) that compartmentalises ciliary signalling proteins and controls PIP2 ciliary abundance. *EMBO J.* **34**, 2537–2556.

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

Jékely, G. and Arendt, D. (2006). Evolution of intraflagellar transport from coated vesicles and autogenous origin of the eukaryotic cilium. *Bioessays* **28**, 191–198.

Jiang, S. T., Chiou, Y. Y., Wang, E., Chien, Y. L., Ho, H. H., Tsai, F. J., Lin, C. Y., Tsai, S. P. and Li, H. (2009). Essential role of nephrocystin in photoreceptor intraflagellar transport in mouse. *Human Molecular Genetics* **18**, 1566–1577.

Jiang, S. T., Chiou, Y. Y., Wang, E., Lin, H. K., Lee, S. P., Lu, H. Y., Wang, C. K. L., Tang, M. J. and Li, H. (2008). Targeted disruption of Nphp1 causes male infertility due to defects in the later steps of sperm morphogenesis in mice. *Human Molecular Genetics* **17**, 3368–3379.

Jin, H. and Nachury, M. V. (2009). The BBSome. *Curr. Biol.* **19**, R472–3.

Johnson, K. A. and Rosenbaum, J. L. (1992). Polarity of flagellar assembly in Chlamydomonas. *The Journal of Cell Biology* **119**, 1605–1611.

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

Kalebic, N., Sorrentino, S., Perlas, E., Bolasco, G., Martinez, C. and Heppenstall, P. A. (2013). αTAT1 is the major α-tubulin acetyltransferase in mice. *Nat Comms* **4**, 1962.

Kavlie, R. G., Kernan, M. J. and Eberl, D. F. (2010). Hearing in Drosophila requires TilB, a conserved protein associated with ciliary motility. *Genetics* **185**, 177–188.

Kee, H. L., Dishinger, J. F., Blasius, T. L., Liu, C.-J., Ben Margolis and Verhey, K. J. (2012). A size-exclusion permeability barrier and nucleoporins characterize a ciliary pore complex that regulates transport into cilia. *Nat Cell Biol* **14**, 431–437.

Keil, T. A. (1997). Functional morphology of insect mechanoreceptors. *Microsc. Res. Tech.* **39**, 506–531.

Keil, T. A. (2012). Arthropod Structure & Development. *Arthropod Structure and Development* **41**, 515–534.

Kernan, M. J. (2007). Mechanotransduction and auditory transduction in Drosophila. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* **454**, 703–720.

Kierszenbaum, A. L., Rivkin, E., Tres, L. L., Yoder, B. K., Haycraft, C. J., Bornens, M. and Rios, R. M. (2011). GMAP210 and IFT88 are present in the spermatid golgi apparatus and participate in the development of the acrosome-acroplaxome complex, head-tail coupling apparatus and tail. *Dev. Dyn.* **240**, 723–736.

Killoran, R. C., Sowole, M. A., Halim, M. A., Konermann, L. and Choy, W.-Y. (2016). Conformational characterization of the intrinsically disordered protein Chibby: Interplay between structural elements in target recognition. *Protein Sci.* **25**, 1420–1429.

Kim, J., Chung, Y. D., Park, D.-Y., Choi, S., Shin, D. W., Soh, H., Lee, H. W., Son, W., Yim, J., Park, C.-S., et al. (2003). A TRPV family ion channel required for hearing in Drosophila. *Nature* **424**, 81–84.

Kim, J., Krishnaswami, S. R. and Gleeson, J. G. (2008). CEP290 interacts with the centriolar satellite component PCM-1 and is required for Rab8 localization to the primary cilium. *Human Molecular Genetics* **17**, 3796–3805.

Kitagawa, D., Vakonakis, I., Olieric, N., Hilbert, M., Keller, D., Olieric, V., Bortfeld, M., Erat, M. C., Flückiger, I., Gönczy, P., et al. (2011). Structural Basis of the 9-Fold Symmetry of Centrioles. *Cell* **144**, 364–375.

Knorz, V. J., Spalluto, C., Lessard, M., Purvis, T. L., Adigun, F. F., Collin, G. B., Hanley, N. A., Wilson, D. I.

and Hearn, T. (2010). Centriolar association of ALMS1 and likely centrosomal functions of the ALMS motif-containing proteins C10orf90 and KIAA1731. *Molecular Biology of the Cell* **21**, 3617–3629.

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

Kobayashi, T., Kim, S., Lin, Y.-C., Inoue, T. and Dynlacht, B. D. (2014). The CP110-interacting proteins Talpid3 and Cep290 play overlapping and distinct roles in cilia assembly. *The Journal of Cell Biology* **204**, 215–229.

Kobayashi, T., Tsang, W. Y., Li, J., Lane, W. and Dynlacht, B. D. (2011). Centriolar Kinesin Kif24 Interacts with CP110 to Remodel Microtubules and Regulate Ciliogenesis. *Cell* **145**, 914–925.

Kodani, A., Sirerol-Piquer, M. S. E., Seol, A., García-Verdugo, J. M. and Reiter, J. F. (2013). Kif3a interacts with Dynactin subunit p150Glued to organize centriole subdistal appendages. *EMBO J.* **32**, 597–607.

Kozminski, K. G., Johnson, K. A., Forscher, P. and Rosenbaum, J. L. (1993). A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 5519–5523.

Kracklauer, M. P., Wiora, H. M., Deery, W. J., Chen, X., Bolival, B., Romanowicz, D., Simonette, R. A., Fuller, M. T., Fischer, J. A. and Beckingham, K. M. (2010). The Drosophila SUN protein Spag4 cooperates with the coiled-coil protein Yuri Gagarin to maintain association of the basal body and spermatid nucleus. *Journal of Cell Science* **123**, 2763–2772.

Kubo, T., Yanagisawa, H.-A., Liu, Z., Shibuya, R., Hirono, M. and Kamiya, R. (2014). A conserved flagella-associated protein in Chlamydomonas, FAP234, is essential for axonemal localization of tubulin polyglutamylase TTLL9. *Molecular Biology of the Cell* **25**, 107–117.

Kubo, T., Yanagisawa, H.-A., Yagi, T., Hirono, M. and Kamiya, R. (2010). Tubulin Polyglutamylation Regulates Axonemal Motility by Modulating Activities of Inner-Arm Dyneins. *Current Biology* **20**, 441–445.

Kuhns, S., Schmidt, K. N., Reymann, J., Gilbert, D. F., Neuner, A., Hub, B., Carvalho, R., Wiedemann, P., Zentgraf, H., Erfle, H., et al. (2013). The microtubule affinity regulating kinase MARK4 promotes axoneme extension during early ciliogenesis. *The Journal of Cell Biology* **200**, 505–522.

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

Kwitny, S., Klaus, A. V. and Hunnicutt, G. R. (2010). The Annulus of the Mouse Sperm Tail Is Required to Establish a Membrane Diffusion Barrier That Is Engaged During the Late Steps of Spermiogenesis1. *Biol. Reprod.* **82**, 669–678.

Lambacher, N. J., Bruel, A.-L., van Dam, T. J. P., Szymanska, K., Slaats, G. G., Kuhns, S., McManus, G. J., Kennedy, J. E., Gaff, K., Wu, K. M., et al. (2015). TMEM107 recruits ciliopathy proteins to subdomains of the ciliary transition zone and causes Joubert syndrome. *Nat Cell Biol* **18**, 122–131.

Lechtreck, K.-F., Johnson, E. C., Sakai, T., Cochran, D., Ballif, B. A., Rush, J., Pazour, G. J., Ikebe, M. and Witman, G. B. (2009). The Chlamydomonas reinhardtii BBSome is an IFT cargo required for export of specific signaling proteins from flagella. *The Journal of Cell Biology* **187**, 1117–1132.

Lee, E., Sivan-loukianova, E., Eberl, D. F. and Kernan, M. J. (2008). An IFT-A Protein Is Required to Delimit Functionally Distinct Zones in Mechanosensory Cilia. *Current Biology* **18**, 1899–1906.

Lee, G.-S., He, Y., Dougherty, E. J., Jimenez-Movilla, M., Avella, M., Grullon, S., Sharlin, D. S., Guo, C., Blackford, J. A., Awasthi, S., et al. (2013). Disruption of Ttll5/stamp gene (tubulin tyrosine ligase-

like protein 5/SRC-1 and TIF2-associated modulatory protein gene) in male mice causes sperm malformation and infertility. *J. Biol. Chem.* **288**, 15167–15180.

Lee, J. E., Silhavy, J. L., Zaki, M. S., Schroth, J., Bielas, S. L., Marsh, S. E., Olvera, J., Brancati, F., Iannicelli, M., Ikegami, K., et al. (2012). CEP41 is mutated in Joubert syndrome and is required for tubulin glutamylation at the cilium. *Nature Publishing Group* **44**, 193–199.

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

Lehti, M. S., Kotaja, N. and Sironen, A. (2013). KIF3A is essential for sperm tail formation and manchette function. *Molecular and Cellular Endocrinology* **377**, 44–55.

Li, F.-Q., Mofunanya, A., Harris, K. and Takemaru, K.-I. (2008). Chibby cooperates with 14-3-3 to regulate beta-catenin subcellular distribution and signaling activity. *The Journal of Cell Biology* **181**, 1141–1154.

Li, F.-Q., Mofunanya, A., Fischer, V., Hall, J. and Takemaru, K.-I. (2010). Nuclear-cytoplasmic shuttling of Chibby controls beta-catenin signaling. *Molecular Biology of the Cell* **21**, 311–322.

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

Li, F.-Q., Chen, X., Fisher, C., Siller, S. S., Zelikman, K., Kuriyama, R. and Takemaru, K.-I. (2016b). BAR Domain-Containing FAM92 Proteins Interact with Chibby1 To Facilitate Ciliogenesis. *Molecular and Cellular Biology* **36**, 2668–2680.

Lin, Y.-C., Chang, C.-W., Hsu, W.-B., Tang, C.-J. C., Lin, Y.-N., Chou, E.-J., Wu, C.-T. and Tang, T. K. (2013a). Human microcephaly protein CEP135 binds to hSAS-6 and CPAP, and is required for centriole assembly. *EMBO J.* **32**, 1141–1154.

Lin, Y.-N., Wu, C.-T., Lin, Y.-C., Hsu, W.-B., Tang, C.-J. C., Chang, C.-W. and Tang, T. K. (2013b). CEP120 interacts with CPAP and positively regulates centriole elongation. *The Journal of Cell Biology* **202**, 211–219.

Lo, J. C. Y., Jamsai, D., O'Connor, A. E., Borg, C., Clark, B. J., Whisstock, J. C., Field, M. C., Adams, V., Ishikawa, T., Aitken, R. J., et al. (2012). RAB-Like 2 Has an Essential Role in Male Fertility, Sperm Intra-Flagellar Transport, and Tail Assembly. *PLoS Genet* **8**, e1002969.

Loktev, A. V. and Jackson, P. K. (2013). Neuropeptide Y Family Receptors Traffic via the Bardet-Biedl Syndrome Pathway to Signal in Neuronal Primary Cilia. *Cell Rep* **5**, 1316–1329.

Loktev, A. V., Zhang, Q., Beck, J. S., Searby, C. C., Scheetz, T. E., Bazan, J. F., Slusarski, D. C., Sheffield, V. C., Jackson, P. K. and Nachury, M. V. (2008). A BBSome Subunit Links Ciliogenesis, Microtubule Stability, and Acetylation. *Developmental Cell* **15**, 854–865.

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

Love, D., Li, F.-Q., Burke, M. C., Cyge, B., Ohmitsu, M., Cabello, J., Larson, J. E., Brody, S. L., Cohen, J. C. and Takemaru, K.-I. (2010). Altered Lung Morphogenesis, Epithelial Cell Differentiation and Mechanics in Mice Deficient in the Wnt/β-Catenin Antagonist Chibby. *PLoS ONE* **5**, e13600.

Lu, Q., Insinna, C., Ott, C., Stauffer, J., Pintado, P. A., Rahajeng, J., Baxa, U., Walia, V., Cuenca, A., Hwang, Y.-S., et al. (2015). Early steps in primary cilium assembly require EHD1/EHD3-dependent

ciliary vesicle formation. *Nat Cell Biol* **17**, 228–240.

Lu, H., Galeano, M. C. R., Ott, E., Kaeslin, G., Kausalya, P. J., Kramer, C., Ortiz-Brüchle, N., Hilger, N., Metzis, V., Hiersche, M., et al. (2017). Mutations in DZIP1L, which encodes a ciliary-transition-zone protein, cause autosomal recessive polycystic kidney disease. *Nature Publishing Group* 1–13.

Ma, L. and Jarman, A. P. (2011). Dilatory is a Drosophila protein related to AZI1 (CEP131) that is located at the ciliary base and required for cilium formation. *Journal of Cell Science* **124**, 2622–2630.

Maguire, J. E., Silva, M., Nguyen, K. C. Q., Hellen, E., Kern, A. D., Hall, D. H. and Barr, M. M. (2015). Myristoylated CIL-7 regulates ciliary extracellular vesicle biogenesis. *Molecular Biology of the Cell* **26**, 2823–2832.

Madhivanan, K. and Aguilar, R. C. (2014). Ciliopathies: The Trafficking Connection. *Traffic* **15**, 1031–1056.

Malicki, J. J. and Johnson, C. A. (2017). The Cilium: Cellular Antenna and Central Processing Unit. *Trends in Cell Biology* **27**, 126–140.

Menco, B. and Morrison, E. E. (2003). Morphology of the Mammalian Olfactory Epithelium: Form, Fine Structure, Function, and Pathology, 2nd ed, Handbook of olfaction and gustation.

Mendes Maia, T., Gogendeau, D., Pennetier, C., Janke, C. and Basto, R. (2014). Bug22 influences cilium morphology and the post-translational modification of ciliary microtubules. *Biology Open* **3**, 138–151.

Mick, D. U., Rodrigues, R. B., Leib, R. D., Adams, C. M., Chien, A. S., Gygi, S. P. and Nachury, M. V. (2015). Proteomics of Primary Cilia by Proximity Labeling. *Developmental Cell* **35**, 497–512.

Mohan, S., Timbers, T. A., Kennedy, J., Blacque, O. E. and Leroux, M. R. (2013). Striated Rootlet and Nonfilamentous Forms of Rootletin Maintain Ciliary Function. *Current Biology* **23**, 2016–2022.

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

Moore, F. L., Jaruzelska, J., Dorfman, D. M. and Reijo-Pera, R. A. (2004). Identification of a novel gene, DZIP (DAZ-interacting protein), that encodes a protein that interacts with DAZ (deleted in azoospermia) and is expressed in embryonic stem cells and germ cells. *Genomics* **83**, 834–843.

Morga, B. and Bastin, P. (2013). Getting to the heart of intraflagellar transport using Trypanosoma and Chlamydomonas models: the strength is in their differences. *cilia* **2**, 16.

Moritz, O. L., Tam, B. M., Hurd, L. L., Peränen, J., Deretic, D. and Papermaster, D. S. (2001). Mutant rab8 Impairs docking and fusion of rhodopsin-bearing post-Golgi membranes and causes cell death of transgenic Xenopus rods. *Molecular Biology of the Cell* **12**, 2341–2351.

Mottier-Pavie, V. and Megraw, T. L. (2009). Drosophila bld10 is a centriolar protein that regulates centriole, basal body, and motile cilium assembly. *Molecular Biology of the Cell* **20**, 2605–2614.

Mukhopadhyay, S. and Jackson, P. K. (2011). The tubby family proteins. *Genome Biol* **12**, 225.

Mukhopadhyay, S., Wen, X., Chih, B., Nelson, C. D., Lane, W. S., Scales, S. J. and Jackson, P. K. (2010). TULP3 bridges the IFT-A complex and membrane phosphoinositides to promote trafficking of G protein-coupled receptors into primary cilia. *Genes & Development* **24**, 2180–2193.

Mykytyn, K., Mullins, R. F., Andrews, M., Chiang, A. P., Swiderski, R. E., Yang, B., Braun, T., Casavant, T., Stone, E. M. and Sheffield, V. C. (2004). Bardet-Biedl syndrome type 4 (BBS4)-null mice implicate Bbs4 in flagella formation but not global cilia assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 8664–8669.

Nachury, M. V., Loktev, A. V., Zhang, Q., Westlake, C. J., Peränen, J., Merdes, A., Slusarski, D. C., Scheller, R. H., Bazan, J. F., Sheffield, V. C., et al. (2007). A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell* **129**, 1201–1213.

Nachury, M. V., Seeley, E. S. and Jin, H. (2010). Trafficking to the Ciliary Membrane: How to Get Across the Periciliary Diffusion Barrier? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 59–87.

Nakazawa, Y., Hiraki, M., Kamiya, R. and Hirono, M. (2007). SAS-6 is a cartwheel protein that establishes the 9-fold symmetry of the centriole. *Current Biology* **17**, 2169–2174.

Nigg, E. A. and Stearns, T. (2011). The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nature Publishing Group* **13**, 1154–1160.

Noguchi, T., Koizumi, M. and Hayashi, S. (2011). Sustained Elongation of Sperm Tail Promoted by Local Remodeling of Giant Mitochondria in Drosophila. *Current Biology* **21**, 805–814.

Nohynková, E., Tumová, P. and Kulda, J. (2006). Cell division of Giardia intestinalis: flagellar developmental cycle involves transformation and exchange of flagella between mastigonts of a diplomonad cell. *Eukaryotic Cell* **5**, 753–761.

Olmos, Y. and Carlton, J. G. (2016). The ESCRT machinery: new roles at new holes. *Current Opinion in Cell Biology* **38**, 1–11.

Pan, J. and Snell, W. J. (2002). Kinesin-II is required for flagellar sensory transduction during fertilization in Chlamydomonas. *Molecular Biology of the Cell* **13**, 1417–1426.

Park, J., Lee, J., Shim, J., Han, W., Lee, J., Bae, Y. C., Chung, Y. D., Kim, C. H. and Moon, S. J. (2013). dTULP, the Drosophila melanogaster Homolog of Tubby, Regulates Transient Receptor Potential Channel Localization in Cilia. *PLoS Genet* **9**, e1003814.

Park, J., Lee, N., Kavoussi, A., Seo, J. T., Kim, C. H. and Moon, S. J. (2015). Ciliary Phosphoinositide Regulates Ciliary Protein Trafficking in Drosophila. *Cell Rep* **13**, 2808–2816.

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

Pathak, N., Austin, C. A. and Drummond, I. A. (2011). Tubulin tyrosine ligase-like genes ttll3 and ttll6 maintain zebrafish cilia structure and motility. *J. Biol. Chem.* **286**, 11685–11695.

Paturle-Lafanechère, L., Manier, M., Trigault, N., Pirollet, F., Mazarguil, H. and Job, D. (1994). Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *Journal of Cell Science* **107 (Pt 6)**, 1529–1543.

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. *The Journal of Cell Biology* **151**, 709–718.

Pazour, G. J. and Witman, G. B. (2003). The vertebrate primary cilium is a sensory organelle. *Current Opinion in Cell Biology* **15**, 105–110.

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

Perkins, L. A., Hedgecock, E. M., Thomson, J. N. and Culotti, J. G. (1986). Mutant sensory cilia in the nematode Caenorhabditis elegans. *Developmental Biology* **117**, 456–487.

Piperno, G. and Mead, K. (1997). Transport of a novel complex in the cytoplasmic matrix of Chlamydomonas flagella. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 4457–4462.

Poole, C. A., Zhang, Z. J. and Ross, J. M. (2001). The differential distribution of acetylated and detyrosinated alpha-tubulin in the microtubular cytoskeleton and primary cilia of hyaline cartilage chondrocytes. *J. Anat.* **199**, 393–405.

Pratt, M. B., Titlow, J. S., Davis, I., Barker, A. R., Dawe, H. R., Raff, J. W. and Roque, H. (2016). Drosophila sensory cilia lacking MKS proteins exhibit striking defects in development but only subtle defects in adults. *Journal of Cell Science* **129**, 3732–3743.

Prota, A. E., Magiera, M. M., Kuijpers, M., Bargsten, K., Frey, D., Wieser, M., Jaussi, R., Hoogenraad, C. C., Kammerer, R. A., Janke, C., et al. (2013). Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. *The Journal of Cell Biology* **200**, 259–270.

Quarmby, L. M. (2004). Cellular deflagellation. *Int. Rev. Cytol.* **233**, 47–91.

Quinones, G. B., Danowski, B. A., Devaraj, A., Singh, V. and Ligon, L. A. (2011). The posttranslational modification of tubulin undergoes a switch from detyrosination to acetylation as epithelial cells become polarized. *Molecular Biology of the Cell* **22**, 1045–1057.

Rachel, R. A., Yamamoto, E. A., Dewanjee, M. K., May-Simera, H. L., Sergeev, Y. V., Hackett, A. N., Pohida, K., Munasinghe, J., Gotoh, N., Wickstead, B., et al. (2015). CEP290 alleles in mice disrupt tissue-specific cilia biogenesis and recapitulate features of syndromic ciliopathies. *Human Molecular Genetics*.

Raff, E. C., Hoyle, H. D., Popodi, E. M. and Turner, F. R. (2008). Axoneme beta-tubulin sequence determines attachment of outer dynein arms. *Current Biology* **18**, 911–914.

Rao, V. G., Sarafdar, R. B., Chowdhury, T. S., Sivadas, P., Yang, P., Dongre, P. M. and D'Souza, J. S. (2016). Myc-binding protein orthologue interacts with AKAP240 in the central pair apparatus of the Chlamydomonas flagella. *BMC Cell Biology* 1–10.

Ravi Ram, K. and Wolfner, M. F. (2007). Seminal influences: Drosophila Acps and the molecular interplay between males and females during reproduction. *Integrative and Comparative Biology* **47**, 427–445.

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

Riparbelli, M. G., Cabrera, O. A., Callaini, G. and Megraw, T. L. (2013). Unique properties of Drosophila spermatocyte primary cilia. *Biology Open* **2**, 1137–1147.

Riparbelli, M. G., Dallai, R., Mercati, D., Bu, Y. and Callaini, G. (2009). Centriole symmetry: A big tale from small organisms. *Cell Motil. Cytoskeleton* **66**, 1100–1105.

Rodrigues-Martins, A., Bettencourt-Dias, M., Riparbelli, M., Ferreira, C., Ferreira, I., Callaini, G. and Glover, D. M. (2007). DSAS-6 organizes a tube-like centriole precursor, and its absence suggests modularity in centriole assembly. *Current Biology* **17**, 1465–1472.

Rogowski, K., Juge, F., van Dijk, J., Wloga, D., Strub, J.-M., Levilliers, N., Thomas, D., Bré, M.-H., Van Dorsselaer, A., Gaertig, J., et al. (2009b). Evolutionary divergence of enzymatic mechanisms for posttranslational polyglycylation. *Cell* 137, 1076–1087.

Rohatgi, R. and Snell, W. J. (2010). The ciliary membrane. *Current Opinion in Cell Biology* **22**, 541–546.

Sang, L., Miller, J. J., Corbit, K. C., Giles, R. H., Brauer, M. J., Otto, E. A., Baye, L. M., Wen, X., Scales, S. J., Kwong, M., et al. (2011). Mapping the NPHP-JBTS-MKS Protein Network Reveals Ciliopathy Disease Genes and Pathways. *Cell* **145**, 513–528.

Santagata, S., Boggon, T. J., Baird, C. L., Gomez, C. A., Zhao, J., Shan, W. S., Myszka, D. G. and Shapiro, L. (2001). G-protein signaling through tubby proteins. *Science* **292**, 2041–2050.

Sarpal, R., Todi, S. V., Sivan-loukianova, E., Shirolikar, S., Subramanian, N., Raff, E. C., Erickson, J. W., Ray, K. and Eberl, D. F. (2003). Drosophila KAP Interacts with the Kinesin II Motor Subunit KLP64D to Assemble Chordotonal Sensory Cilia, but Not Sperm Tails. *Current Biology* **13**, 1687–1696.

Sato, T., Iwano, T., Kunii, M., Matsuda, S., Mizuguchi, R., Jung, Y., Hagiwara, H., Yoshihara, Y., Yuzaki, M., Harada, R., et al. (2014). Rab8a and Rab8b are essential for several apical transport pathways but insufficient for ciliogenesis. *Journal of Cell Science* **127**, 422–431.

Schafer, T., Putz, M., Lienkamp, S., Ganner, A., Bergbreiter, A., Ramachandran, H., Gieloff, V., Gerner, M., Mattonet, C., Czarnecki, P. G., et al. (2008). Genetic and physical interaction between the NPHP5 and NPHP6 gene products. *Human Molecular Genetics* **17**, 3655–3662.

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

Schmidt, K. N., Kuhns, S., Neuner, A., Hub, B., Zentgraf, H. and Pereira, G. (2012). Cep164 mediates vesicular docking to the mother centriole during early steps of ciliogenesis. *The Journal of Cell Biology* **199**, 1083–1101.

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

Serwas, D., Su, T. Y., Roessler, M., Wang, S. and Dammermann, A. (2017). Centrioles initiate cilia assembly but are dispensable for maturation and maintenance in C. elegans. *The Journal of Cell Biology* **7**, jcb.201610070.

Shah, A. S., Ben-Shahar, Y., Moninger, T. O., Kline, J. N. and Welsh, M. J. (2009). Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science* **325**, 1131–1134.

Shi, J., Zhao, Y., Galati, D., Winey, M. and Klymkowsky, M. W. (2014). Chibby functions in Xenopus ciliary assembly, embryonic development, and the regulation of gene expression. *Developmental Biology* **395**, 287–298.

Shida, T., Cueva, J. G., Xu, Z., Goodman, M. B. and Nachury, M. V. (2010). The major alpha-tubulin K40 acetyltransferase alphaTAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 21517–21522.

Shylo, N. A., Christopher, K. J., Iglesias, A., Daluiski, A. and Weatherbee, S. D. (2016). TMEM107 Is a Critical Regulator of Ciliary Protein Composition and Is Mutated in Orofaciodigital Syndrome. *Hum. Mutat.* **37**, 155–159.

Siller, S. S., Burke, M. C., Li, F.-Q. and Takemaru, K.-I. (2015). Chibby functions to preserve normal ciliary morphology through the regulation of intraflagellar transport in airway ciliated cells. *Cell Cycle* **14**, 3163–3172.

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

Sinden, R. E., Talman, A., Marques, S. R., Wass, M. N. and Sternberg, M. (2010). The flagellum in malarial parasites. *Current Opinion in Microbiology* **13**, 491–500.

Singhania, A. and Grueber, W. B. (2014). Development of the embryonic and larval peripheral nervous system of Drosophila. *WIREs Dev Biol* **3**, 193–210.

Singla, V. and Reiter, J. F. (2006). The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* **313**, 629–633.

Singla, V., Romaguera-Ros, M., García-Verdugo, J. M. and Reiter, J. F. (2010). Ofd1, a Human Disease

Gene, Regulates the Length and Distal Structure of Centrioles. *Developmental Cell* **18**, 410–424.

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

Sonnen, K. F., Gabryjonczyk, A.-M., Anselm, E., Stierhof, Y.-D. and Nigg, E. A. (2013). Human Cep192 and Cep152 cooperate in Plk4 recruitment and centriole duplication. *Journal of Cell Science* **126**, 3223–3233.

Sonnen, K. F., Schermelleh, L., Leonhardt, H. and Nigg, E. A. (2012). 3D-structured illumination microscopy provides novel insight into architecture of human centrosomes. *Biology Open* **1**, 965–976.

Soppina, V., Herbstman, J. F., Skiniotis, G. and Verhey, K. J. (2012). Luminal Localization of α-tubulin K40 Acetylation by Cryo-EM Analysis of Fab-Labeled Microtubules. *PLoS ONE* **7**, e48204.

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

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

Soulavie, F., Piepenbrock, D., Thomas, J., Vieillard, J., Duteyrat, J.-L., Cortier, E., Laurençon, A., Göpfert, M. C. and Durand, B. (2014). hemingway is required for sperm flagella assembly and ciliary motility in Drosophila. *Molecular Biology of the Cell* **25**, 1276–1286.

Spektor, A., Tsang, W. Y., Khoo, D. and Dynlacht, B. D. (2007). Cep97 and CP110 Suppress a Cilia Assembly Program. *Cell* **130**, 678–690.

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

Steinhauer, J. (2015). Separating from the pack: Molecular mechanisms of Drosophilaspermatid individualization. *Spermatogenesis* **5**, e1041345.

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

Stevens, N. R., Dobbelaere, J., Brunk, K., Franz, A. and Raff, J. W. (2010). Drosophila Ana2 is a conserved centriole duplication factor. *The Journal of Cell Biology* **188**, 313–323.

Sun, X., Haley, J., Bulgakov, O. V., Cai, X., McGinnis, J. and Li, T. (2012). Tubby is required for trafficking G protein-coupled receptors to neuronal cilia. *cilia* **1**, 21.

Sung, C.-H. and Leroux, M. R. (2013). The roles of evolutionarily conserved functional modules in cilia-related trafficking. *Nat Cell Biol* **15**, 1387–1397.

Suryavanshi, S., EddE, B., Fox, L. A., Guerrero, S., Hard, R., Hennessey, T., Kabi, A., Malison, D., Pennock, D., Sale, W. S., et al. (2010). Tubulin Glutamylation Regulates Ciliary Motility by Altering Inner Dynein Arm Activity. *Current Biology* **20**, 435–440.

Takemaru, K.-I., Yamaguchi, S., Lee, Y. S., Zhang, Y., Carthew, R. W. and Moon, R. T. (2003). Chibby, a nuclear beta-catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway. *Nature* **422**, 905–909.

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

Tanos, B. E., Yang, H.-J., Soni, R., Wang, W.-J., Macaluso, F. P., Asara, J. M. and Tsou, M.-F. B. (2013).

Centriole distal appendages promote membrane docking, leading to cilia initiation. *Genes & Development* **27**, 163–168.

Taschner, M. and Lorentzen, E. (2016). The Intraflagellar Transport Machinery. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, a028092.

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

Tates, A. D. (1971). *Cytodifferentiation during spermatogenesis in Drosophila Melanogaster*.

Tay, S. Y., Yu, X., Wong, K. N., Panse, P., Ng, C. P. and Roy, S. (2009). The iguana/DZIP1 protein is a novel component of the ciliogenic pathway essential for axonemal biogenesis. *Dev. Dyn.* **239**, 527–534.

Tembhare, P., Shirke, S., Subramanian, P. G., Sehgal, K. and Gujral, S. (2009). Exflagellated microgametes of Plasmodium vivax in human peripheral blood: a case report and review of the literature. *Indian J Pathol Microbiol* **52**, 252–254.

Texada, M. J., Simonette, R. A., Johnson, C. B., Deery, W. J. and Beckingham, K. M. (2008). Yuri gagarin is required for actin, tubulin and basal body functions in Drosophila spermatogenesis. *Journal of Cell Science* **121**, 1926–1936.

Tokuyasu, K. T. (1975). Dynamics of spermiogenesis in Drosophila melanogaster. VI. Significance of "onion" nebenkern formation. *J. Ultrastruct. Res.* **53**, 93–112.

Toure, A., Rode, B., Hunnicutt, G. R., Escalier, D. and Gacon, G. (2011). Septins at the annulus of mammalian sperm. *Biol. Chem.* **392**, 799–803.

Tran, P. V., Haycraft, C. J., Besschetnova, T. Y., Turbe-Doan, A., Stottmann, R. W., Herron, B. J., Chesebro, A. L., Qiu, H., Scherz, P. J., Shah, J. V., et al. (2008). THM1 negatively modulates mouse sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia. *Nat. Genet.* **40**, 403–410.

Tsang, W. Y. and Dynlacht, B. D. (2013). CP110 and its network of partners coordinately regulate cilia assembly. *cilia* **2**, 1–1.

Tsao, C.-C. and Gorovsky, M. A. (2008). Different effects of Tetrahymena IFT172 domains on anterograde and retrograde intraflagellar transport. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 1450–1461.

Tuthill, J. C. and Wilson, R. I. (2016). Mechanosensation and Adaptive Motor Control in Insects. *Current Biology* **26**, R1022–R1038.

Vandepoele, K., Staes, K., Andries, V. and van Roy, F. (2010). Chibby interacts with NBPF1 and clusterin, two candidate tumor suppressors linked to neuroblastoma. *Experimental Cell Research* 1–9.

Veleri, S., Manjunath, S. H., Fariss, R. N., May-Simera, H., Brooks, M., Foskett, T. A., Gao, C., Longo, T. A., Liu, P., Nagashima, K., et al. (2014). Ciliopathy-associated gene Cc2d2a promotes assembly of subdistal appendages on the mother centriole during cilia biogenesis. *Nat Comms* **5**, 1–12.

Vieillard, J., Jerber, J. and Durand, B. (2014). [Transcriptional control of ciliary genes]. *Med Sci (Paris)* **30**, 968–975.

Vieillard, J., Paschaki, M., Duteyrat, J.-L., Augière, C., Cortier, E., JA, jean andré, Thomas, J. and Durand, B. (2016). Transition zone assembly and its contribution to axoneme formation in Drosophila male germ cells. *The Journal of Cell Biology* **214**, 875–889.

Vincensini, L., Blisnick, T. and Bastin, P. (2012). 1001 model organisms to study cilia and flagella. *Biology of the Cell* **103**, 109–130.

Vogel, P., Hansen, G., Fontenot, G. and Read, R. (2010). Tubulin Tyrosine Ligase–Like 1 Deficiency Results in Chronic Rhinosinusitis and Abnormal Development of Spermatid Flagella in Mice. *Veterinary Pathology* **47**, 703–712.

Voronina, V. A., Takemaru, K.-I., Treuting, P., Love, D., Grubb, B. R., Hajjar, A. M., Adams, A., Li, F.-Q. and Moon, R. T. (2009). Inactivation of Chibby affects function of motile airway cilia. *The Journal of Cell Biology* **185**, 225–233.

Walker, R. G., Willingham, A. T. and Zuker, C. S. (2000). A Drosophila mechanosensory transduction channel. *Science* **287**, 2229–2234.

Wang, C., Low, W.-C., Liu, A. and Wang, B. (2013a). Centrosomal protein DZIP1 regulates Hedgehog signaling by promoting cytoplasmic retention of transcription factor GLI3 and affecting ciliogenesis. *J. Biol. Chem.* **288**, 29518–29529.

Wang, W.-J., Tay, H. G., Soni, R., Perumal, G. S., Goll, M. G., Macaluso, F. P., Asara, J. M., Amack, J. D. and Tsou, M.-F. B. (2013b). CEP162 is an axoneme-recognition protein promoting ciliary transition zone assembly at the cilia base. *Nat Cell Biol* **15**, 591–601.

Weatherbee, S. D., Niswander, L. A. and Anderson, K. V. (2009). A mouse model for Meckel syndrome reveals Mks1 is required for ciliogenesis and Hedgehog signaling. *Human Molecular Genetics* **18**, 4565–4575.

Wei, H.-C., Rollins, J., Fabian, L., Hayes, M., Polevoy, G., Bazinet, C. and Brill, J. A. (2008). Depletion of plasma membrane PtdIns(4,5)P2 reveals essential roles for phosphoinositides in flagellar biogenesis. *Journal of Cell Science* **121**, 1076–1084.

Wei, Q., Ling, K. and Hu, J. (2015). The essential roles of transition fibers in the context of cilia. *Current Opinion in Cell Biology* **35**, 98–105.

Wei, Q., Zhang, Y., Li, Y., Zhang, Q., Ling, K. and Hu, J. (2012). The BBSome controls IFT assembly and turnaround in cilia. *Nat Cell Biol* **14**, 950–957.

Wheway, G., Schmidts, M., Mans, D. A., Szymanska, K., Nguyen, T.-M. T., Racher, H., Phelps, I. G., Toedt, G., Kennedy, J., Wunderlich, K. A., et al. (2015). An siRNA-based functional genomics screen for the identification of regulators of ciliogenesis and ciliopathy genes. *Nat Cell Biol* **17**, 1074–1087.

Williams, C. L., Li, C., Kida, K., Inglis, P. N., Mohan, S., Semenec, L., Bialas, N. J., Stupay, R. M., Chen, N., Blacque, O. E., et al. (2011). MKS and NPHP modules cooperate to establish basal body/transition zone membrane associations and ciliary gate function during ciliogenesis. *The Journal of Cell Biology* **192**, 1023–1041.

Williams, C. L., McIntyre, J. C., Norris, S. R., Jenkins, P. M., Zhang, L., Pei, Q., Verhey, K. and Martens, J. R. (2014). Direct evidence for BBSome-associated intraflagellar transport reveals distinct properties of native mammalian cilia. *Nat Comms* **5**, 5813.

Williams, C. L., Winkelbauer, M. E., Schafer, J. C., Michaud, E. J. and Yoder, B. K. (2008a). Functional redundancy of the B9 proteins and nephrocystins in Caenorhabditis elegans ciliogenesis. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 2154–2168.

Williams, C. L., Winkelbauer, M. E., Schafer, J. C., Michaud, E. J. and Yoder, B. K. (2008b). Functional redundancy of the B9 proteins and nephrocystins in Caenorhabditis elegans ciliogenesis. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 2154–2168.

Winey, M. and O'Toole, E. (2014). Centriole structure. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **369**, 20130457–20130457.

Wolf, N., Hirsh, D. and McIntosh, J. R. (1978). Spermatogenesis in males of the free-living nematode, Caenorhabditis elegans. *J. Ultrastruct. Res.* **63**, 155–169.

Wolff, C., Roy, S., Lewis, K. E., Schauerte, H., Joerg-Rauch, G., Kirn, A., Weiler, C., Geisler, R., Haffter, P. and Ingham, P. W. (2004). iguana encodes a novel zinc-finger protein with coiled-coil domains essential for Hedgehog signal transduction in the zebrafish embryo. *Genes & Development* **18**, 1565–1576.

Won, J., de Evsikova, C. M., Smith, R. S., Hicks, W. L., Edwards, M. M., Longo-Guess, C., Li, T., Naggert, J. K. and Nishina, P. M. (2011). NPHP4 is necessary for normal photoreceptor ribbon synapse maintenance and outer segment formation, and for sperm development. *Human Molecular Genetics* **20**, 482–496.

Wood, C. R., Huang, K., Diener, D. R. and Rosenbaum, J. L. (2013). The Cilium Secretes Bioactive Ectosomes. *Current Biology* **23**, 906–911.

Wright, K. J., Baye, L. M., Olivier-Mason, A., Mukhopadhyay, S., Sang, L., Kwong, M., Wang, W., Pretorius, P. R., Sheffield, V. C., Sengupta, P., et al. (2011). An ARL3-UNC119-RP2 GTPase cycle targets myristoylated NPHP3 to the primary cilium. *Genes & Development* **25**, 2347–2360.

Yadav, S. P., Sharma, N. K., Liu, C., Dong, L., Li, T. and Swaroop, A. (2016). Centrosomal protein CP110 controls maturation of the mother centriole during cilia biogenesis. *Development* **143**, 1491–1501.

Yang, J., Gao, J., Adamian, M., Wen, X.-H., Pawlyk, B., Zhang, L., Sanderson, M. J., Zuo, J., Makino, C. L. and Li, T. (2005). The ciliary rootlet maintains long-term stability of sensory cilia. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 4129–4137.

Yang, J., Liu, X., Yue, G., Adamian, M., Bulgakov, O. and Li, T. (2002). Rootletin, a novel coiled-coil protein, is a structural component of the ciliary rootlet. *The Journal of Cell Biology* **159**, 431–440.

Yang, T. T., Su, J., Wang, W.-J., Craige, B., Witman, G. B., Tsou, M.-F. B. and Liao, J.-C. (2015). Superresolution Pattern Recognition Reveals the Architectural Map of the Ciliary Transition Zone. *Nature Publishing Group* 1–13.

Ye, X., Zeng, H., Ning, G., Reiter, J. F. and Liu, A. (2014). C2cd3 is critical for centriolar distal appendage assembly and ciliary vesicle docking in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 2164–2169.

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

Zhai, G., Gu, Q., He, J., Lou, Q., Chen, X., Jin, X., Bi, E. and Yin, Z. (2014). Sept6 is required for ciliogenesis in Kupffer's vesicle, the pronephros, and the neural tube during early embryonic development. *Molecular and Cellular Biology* **34**, 1310–1321.

Zhang, B., Zhang, T., Wang, G., Wang, G., Chi, W., Jiang, Q. and Zhang, C. (2015a). GSK3β-Dzip1-Rab8 Cascade Regulates Ciliogenesis after Mitosis. *PLoS Biol.* **13**, e1002129.

Zhang, W., Cheng, L. E., Kittelmann, M., Li, J., Petkovic, M., Cheng, T., Jin, P., Guo, Z., Göpfert, M. C., Jan, L. Y., et al. (2015b). Ankyrin Repeats Convey Force to Gate the NOMPC Mechanotransduction Channel. *Cell* **162**, 1391–1403.

Zhao, C. and Malicki, J. (2011). Nephrocystins and MKS proteins interact with IFT particle and facilitate transport of selected ciliary cargos. *EMBO J.* **30**, 2532–2544.

Zou, C., Li, J., Bai, Y., Gunning, W. T., Wazer, D. E., Band, V. and Gao, Q. (2005). Centrobin: a novel daughter centriole-associated protein that is required for centriole duplication. *The Journal of Cell Biology* **171**, 437–445.

CHAPITRE 4 : ANNEXE

Annexe 1 : *Transition zone assembly and its contribution to axoneme formation in Drosophila male germ cells*.

J'ai participé à cet article en réalisant notamment certains marquages d'immunofluorescence.
Comme évoqué dans l'introduction générale, la zone de transition est une structure complexe qui joue un rôle essentiel dans l'assemblage et la fonction des cils. Elle est constituée de trois principaux complexes protéiques appelés MKS/JBTS, NPHP1-4-8 et NPHP5-6 ainsi que d'autres protéines dont les liens avec les trois complexes sont encore mal connus. Nous avons montré que l'absence simultanée de Dila et Cby empêche l'assemblage de la zone de transition dans les neurones sensoriels et les spermatocytes, ce qui inhibe complètement la formation des cils. Ceci est également lié à un défaut d'ancrage du corps basal des spermatocytes à la membrane plasmique, qui entraîne l'assemblage dans le cytoplasme d'axonèmes anormalement longs à partir des centrioles. La déplétion de Klp59D, une kinésine dépolymérisante, présente à proximité de la zone de transition dans les spermatocytes, induit une élongation anormale de l'axonème dans les spermatocytes, un phénotype similaire à celui observé chez les mouches doubles mutantes pour *dila* et *cby*.

Ainsi, l'ensemble de ces travaux démontre que la zone de transition est essentielle à l'ancrage du corps basal mais aussi à la régulation de l'allongement de l'axonème, probablement via le recrutement de Klp59D au centriole.

Published September 19, 2016

Transition zone assembly and its contribution to axoneme formation in *Drosophila* male germ cells

Jennifer Vieillard, Marie Paschaki, Jean-Luc Duteyrat, Céline Augière, Elisabeth Cortier, Jean-André Lapart, Joëlle Thomas,* and Bénédicte Durand*

Université Claude Bernard Lyon 1, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1217, Institut NeuroMyoGène, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 5310, F-69100 Lyon, France

The ciliary transition zone (TZ) is a complex structure found at the cilia base. Defects in TZ assembly are associated with human ciliopathies. In most eukaryotes, three protein complexes (CEP290, NPHP, and MKS) cooperate to build the TZ. We show that in *Drosophila melanogaster*, mild TZ defects are observed in the absence of MKS components. In contrast, Cby and Azi1 cooperate to build the TZ by acting upstream of Cep290 and MKS components. Without Cby and Azi1, centrioles fail to form the TZ, precluding sensory cilia assembly, and no ciliary membrane cap associated with sperm ciliogenesis is made. This ciliary cap is critical to recruit the tubulin-depolymerizing kinesin Klp59D, required for regulation of axonemal growth. Our results show that *Drosophila* TZ assembly in sensory neurons and male germ cells involves cooperative actions of Cby and Dila. They further reveal that temporal control of membrane cap assembly by TZ components and microtubule elongation by kinesin-13 is required for axoneme formation in male germ cells.

Introduction

Cilia and flagella are highly conserved organelles involved in various cellular and physiological processes. Defects in cilia assembly are responsible for many human diseases (Badano et al., 2006; Baker and Beales, 2009; Brown and Witman, 2014). Cilia are built around a microtubule core, the axoneme, which grows from the basal body (BB), itself derived from the mother centriole. At the interface between the BB and the plasma membrane, a particular compartment, the transition zone (TZ), plays both structural and functional roles by regulating the traffic in and out of the cilium and by forming structural links between microtubules and the membrane (Hu and Nelson, 2011; Szymanska and Johnson, 2012). Several ciliopathies, such as the Joubert syndrome and the Meckel syndrome (MKS) or nephronophthisis (NPHP) are caused by defects in TZ components (Czarnecki and Shah, 2012).

TZ assembly is a complex process starting with the docking of the mother centriole to cytoplasmic vesicles and the timely and spatially ordered assembly of multiple proteins. TZ components have been extensively described in several organisms (Szymanska and Johnson, 2012). Genetic approaches in *Caenorhabditis elegans* (Williams et al., 2011) and biochemical approaches in mammalian cells helped to establish a first comprehensive hierarchy of these components (Chih et al., 2011; Garcia-Gonzalo et al., 2011; Sang et al., 2011). They fall into different modules, namely MKS, NPHP, and CEP290. Proteins of the MKS module colocalize and together contribute to the formation of the TZ in various organisms, from *C. elegans* to mammals. In *C. elegans*, MKS, NPHP, and CEP290 cooperate to assemble the TZ (Williams et al., 2011; Jensen et al., 2015; Schouteden et al., 2015; Yee et al., 2015). Upstream, MKS5 (mammalian Rpgrip1L or NPHP8) controls the assembly of the MKS and NPHP complexes on centrioles (Jensen et al., 2015; Schouteden et al., 2015; Li et al., 2016). However, variations exist between model organisms, and all TZ components are not conserved in all ciliated species. For example, MKS5 and several other NPHP proteins are absent from the *Drosophila melanogaster* genome (Barker et al., 2014). Additional components of the TZ have been identified, but their integration in the hierarchy of TZ assembly is not yet clear. For instance, Chibby (Cby) is a component of the TZ in *Drosophila* and vertebrates (Voronina et al., 2009; Enjolras et al., 2012; Lee et al., 2014; Shi et al., 2014), but how Cby contributes to TZ assembly remains to be characterized. Cby is absent from *C. elegans* and protozoa genomes (Enjolras et al., 2012). Dila (Azi1 in mammals) is also not present in *C. elegans* but is required for TZ assembly in *Drosophila* or for ciliogenesis in mammals and is also associated with centriolar satellites in vertebrates (Ma and Jarman, 2011; Hall et al., 2013; Villumsen et al., 2013; Chamling et al., 2014). Therefore, key components of TZ assembly in *C. elegans* or mammals such as MKS5 are missing in

*J. Thomas and B. Durand contributed equally to this paper.

Correspondence to Bénédicte Durand: durand-b@univ-lyon1.fr

Abbreviations used: 3D-SIM, 3D structured-illumination microscopy; BB, basal body; CBY, Chibby; DILA, Dilatory; IF, immunofluorescence; IFT, intraflagellar transport; KD, knockdown; MKS, Meckel syndrome; NPHP, nephronophthisis; TZ, transition zone; UNC, Uncoordinated.

© 2016 Vieilllard et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see http://www.rupress.org/terms). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported license, as described at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/).

Supplemental Material can be found at:
/content/suppl/2016/09/07/jcb.201603086.DC1.html

The Rockefeller University Press $30.00
J. Cell Biol. Vol. 214 No. 7 875–889
www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201603086

THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY

Downloaded from on March 19, 2017

Published September 19, 2016

Drosophila, and the mechanisms of TZ assembly in this organism are largely unknown.

Two main ciliated tissues are found in *Drosophila*: sensory neurons, in which cilia are required for transducing most senses, and sperm germ cells (Gogendeau and Basto, 2010). Sensory cilia assembly relies on intraflagellar transport (IFT) and is hence compartmentalized in *Drosophila* (Han et al., 2003; Sarpal et al., 2003). In contrast, flagella assembly in male germ cells is IFT independent and said to be cytosolic (Han et al., 2003; Sarpal et al., 2003; Basiri et al., 2014; Avidor-Reiss and Leroux, 2015). Such cytosolic mode of assembly is also proposed in mammals for the formation of the sperm midpiece (Avidor-Reiss and Leroux, 2015). In *Drosophila*, cytosolic flagella extension takes place inside a membrane ciliary cap, which requires Cep290 for proper organization and architecture (Basiri et al., 2014). This membrane cap is built in G2 *Drosophila* spermatocytes, when all four replicated centrioles dock to the plasma membrane and grow a primary cilium. During meiosis, the four primary cilia are internalized together with centrioles, maintaining the membrane ciliary cap connected to the plasma membrane (Tates, 1971; Carvalho-Santos et al., 2012; Riparbelli et al., 2012; Jana et al., 2016).

Here, we show that MKS proteins are involved in *Drosophila* TZ assembly, but simultaneous removal of several MKS components only leads to very mild TZ and axonemal defects. Instead, deleting both Cby and Dila, two components of the TZ in *Drosophila*, leads to extremely severe TZ disorganization with complete loss of MKS components and severe reduction of Cep290. In absence of Cby and Dila, BBs fail to dock to the plasma membrane of spermatocytes and assemble the ciliary membrane cap required for sperm flagella elongation. In absence of this ciliary cap, aberrant growth of axonemal microtubules is observed in spermatocytes. We demonstrate that Klp59D, a kinesin-13 family member, is present at the ciliary cap and is required for proper and timely regulated growth of the axoneme. We therefore propose that the ciliary cap is necessary to restrict and timely coordinate ciliary component assembly in *Drosophila* spermatocytes.

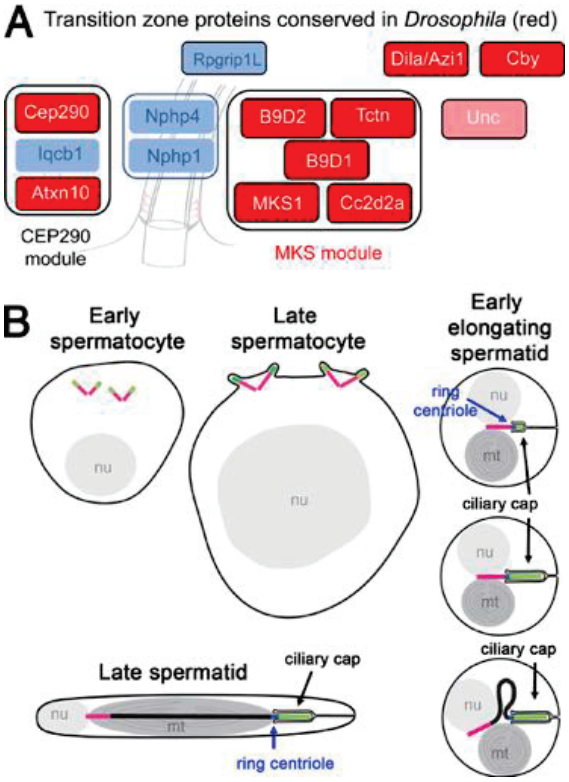


Figure 1. **TZ components in *Drosophila* and scheme of spermatogenesis.** (A) Scheme of TZ components present in mammals assigned in different functional modules. Conserved proteins in *Drosophila* are in red, not conserved in blue. Unc is present in *Drosophila*, not in mammals. (B) Scheme representing centrioles/basal bodies (BBs) at different stages of male germ cells. In early spermatocytes, the two pairs of centrioles (magenta) start to accumulate TZ components (green) at their tips. During spermatocyte maturation, centrioles convert to BBs (magenta), dock to the plasma membrane, and extend cilia/TZ (green). During meiosis, BBs and cilia/TZ are internalized, keeping the ciliary cap connected to the plasma membrane. In round spermatids, the BBs are apposed to the nuclei and extend the ciliary cap (green) connected to the plasma membrane. Ring centriole (blue) connects the base of the ciliary cap to the centriole. Starting axoneme elongation, the ciliary cap is extended, the axoneme grows (black), and the ciliary cap and ring centriole progressively migrate away from the BB.

Results

Organization of TZ components in *Drosophila*

In mammals and *C. elegans*, three protein complexes (MKS, NPHP, and CEP290) have been shown to be key players of TZ assembly. CEP290 and most MKS module proteins are conserved in *Drosophila,* whereas most NPHP components are missing (Fig. 1 A). In addition, Cby and Dila, two proteins conserved in mammals, were shown to be located at the TZ and involved in cilia assembly in *Drosophila* (Ma and Jarman, 2011; Enjolras et al., 2012). To understand more precisely how these components work together, we tagged several MKS proteins and compared their distribution in relation to Cby and Dila. We previously showed that B9d1 colocalizes with Cby in embryonic sensory cilia (Enjolras et al., 2012). Here, we show that the other members of the MKS module, B9d2, Mks1/B9d3, Tectonic (Tctn), and Cc2d2a, are found at the TZ at the base of sensory cilia as illustrated in chordotonal neurons of the antennae (Fig. S1).

In male germ cells, a dynamic behavior of centrioles and cilia takes place (Fig. 1 B). In midstage spermatocytes, all four centrioles dock to the plasma membrane and primary cilia like structures are extended at the surface of late spermatocytes (Tates, 1971; Carvalho-Santos et al., 2012; Riparbelli et al., 2012). Using superresolution 3D structured-illumination microscopy (3D-SIM), we observed that from early to late spermatocytes, Cby completely overlaps with acetylated tubulin (Fig. 2 A). Moreover, Mks1 (Fig. 2 D) colocalizes with Cby at the TZ. Membrane staining also reveals that Cby extends into the entire membrane cap in spermatocytes (Fig. 2 E). These results show that TZ and primary cilia are mingled at this stage, indicating that the primary cilium has a TZ composition.

The centrioles and cilia are next engulfed during meiosis (Tates, 1971; Fabian and Brill, 2012). In round spermatids, the centriole/BB still extends into the internalized ciliary membrane cap that is linked to the plasma membrane (Fig. 1 B). At the onset of flagellar axoneme elongation, the ciliary cap elongates and migrates opposite to the nucleus as a result of flagellum extension (Tates, 1971; Basiri et al., 2014). A particular structure called the ring centriole has been described in spermatids of many insects and corresponds to the base of the ciliary cap in elongating spermatids (Phillips, 1970; Fig. 1 B).

Downloaded from on March 19, 2017

Published September 19, 2016

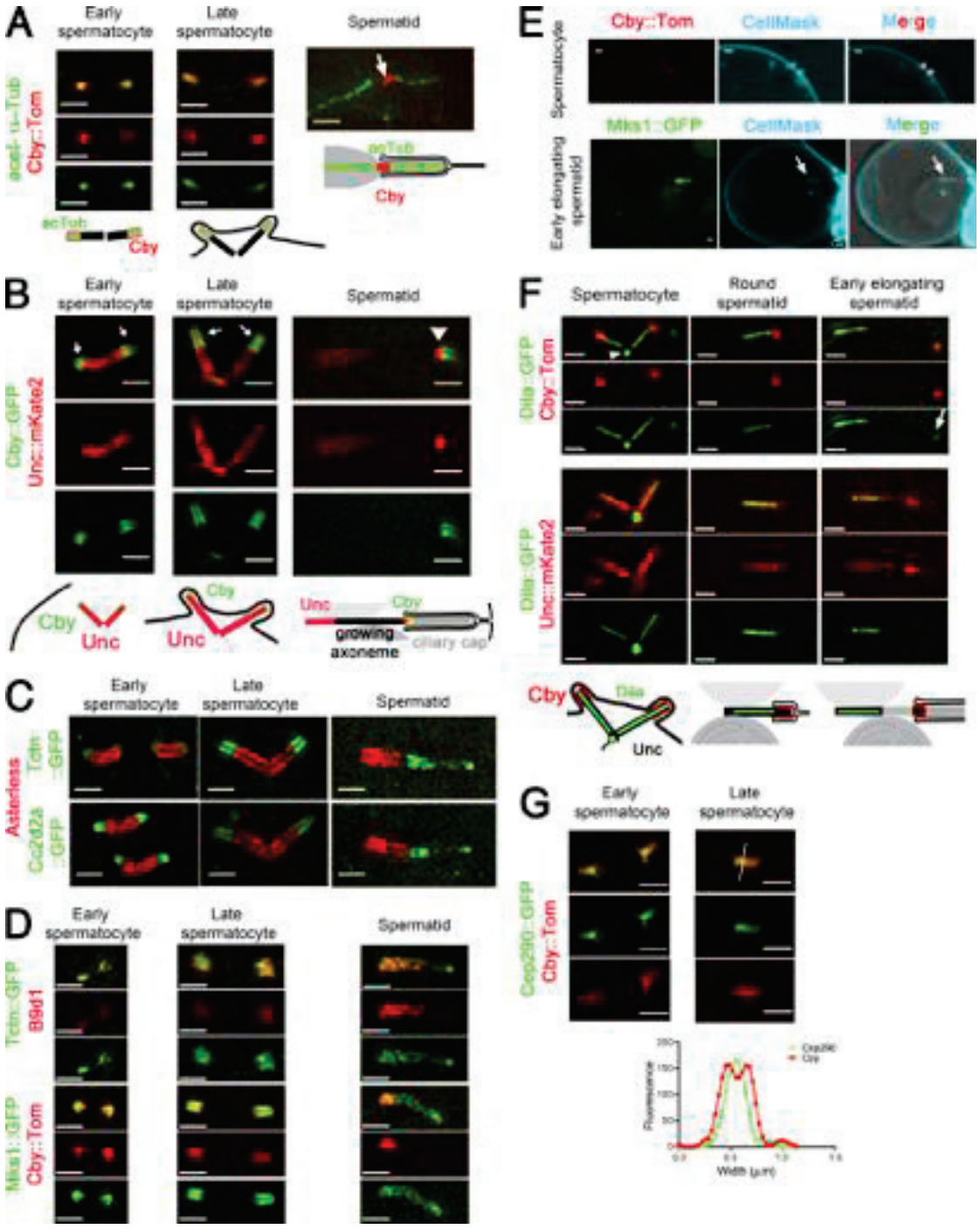


Figure 2. **Localization of TZ components in *Drosophila* male germ cells.** (A–D, F, and G) 3D-SIM imaging of male germ cells. Recapitulating schemes are based on Fig. 1. (A) Acetylated tubulin (acTub) and Cby overlap in spermatocytes. In elongating spermatids, Cby is restricted to the ring centriole (arrow), and acetylated tubulin stains the axoneme proximal and distal to the ring centriole. (B) Unc labels the BB, and Cby and Unc colocalize along the TZ/cilia (arrows). The ring centriole labeled with Unc and Cby (arrowhead) separates from the BB in elongating spermatids. (C and D) Tctn, Cc2d2a, B9d1, and Mks1 colocalize at the tip of the centrioles (Asl, red) and overlap with Cby in spermatocytes. In early elongating spermatids, all MKS components cover the entire ciliary cap, whereas Cby is restricted to the ring centriole. (E) Live confocal imaging of Cby and Mks1. Membranes are labeled with CellMask. Cby labels entirely the cilia/TZ in spermatocytes, and Mks1 labels the entire ciliary cap (arrows) in spermatids. (F) Dila covers the entire lumen of centriole and projects into the TZ/cilia marked by Cby or Unc in spermatocytes and round spermatids. Dila is at the base of centrioles (arrowhead), and a small fraction migrates with the ring centriole in the spermatid (arrow; gamma was adjusted to 1.35 for the green layer). (G) Cby surrounds Cep290 both at the TZ/cilia and at the ring centriole as observed on a scan profile of fluorescence intensity (grayscale units) across (white line) the TZ/ring centriole. Bars, 1 µm.

Downloaded from on March 19, 2017

Published September 19, 2016

Previous observations showed that the ring centriole is marked by Unc and Cby (Baker et al., 2004; Enjolras et al., 2012; Gottardo et al., 2013) and this is confirmed here by comparing Cby to acetylated tubulin staining (Fig. 2 A, spermatid).

To understand more in details the organization of the TZ in spermatocytes and spermatids, we used superresolution 3D-SIM. In spermatocytes, we observed that Unc marks the whole centriole and cilium/TZ. Moreover, Cby and Unc radially overlap in the cilium/TZ (Fig. 2 B, arrows), but Cby extends a little more distally to Unc. MKS components Cc2d2a, Tctn, B9d1, and Mks1 (Fig. 2, C and D) are restricted to the cilium/TZ, distal to the centriole (Asterless [Asl]), where they overlap with Cby. Dila distribution was found to be very different from other TZ components. It is localized inside the centriole and also inside the cilium/TZ lumen and capped by Cby (Fig. 2 F). Dila also strongly stains an unknown round shaped structure (Fig. 2 F, arrowhead) at the base of some centriole pairs. Last, Cby is found more radially to Cep290 (Fig. 2 G).

In spermatids, a dynamic remodeling of TZ components is observed at the onset of flagella elongation: whereas Cby and a ring of Unc separate from the BB (Fig. 2 B, arrowhead) MKS components are redistributed all along the membrane cap that is extended at this stage, as observed both on high-resolution images (Fig. 2, C and D) and by live imaging (Fig. 2 E and Fig. S2). Note that costaining of MKS proteins with Cby showed that these components are enriched at ring centriole but also extend distal to Unc and Cby all along the ciliary cap. Dila is maintained, like Unc, at the BB, and a very small fraction of Dila is sometimes detected at the ring centriole, apposed to Cby (Fig. 2 F). Dila is disassembled from both the BB and the TZ soon after initiation of spermatid elongation. All other ciliary cap and ring centriole components (Cby, Mks1, B9d1-2, Tctn, Cd2d2A, and Unc) are disassembled from flagellar tips at the onset of sperm individualization.

Absence of *Drosophila* MKS module at the TZ only mildly affects cilia assembly

To understand the function of the MKS module, we created by CRISPR-Cas9–mediated homologous recombination a null allele of simultaneously *B9d2* and *tectonic* (*tctn*), as these two genes overlap in the genome (Fig. 3 A). *B9d2, tctn*$^{\Delta}$ flies are viable and do not show sensory behavioral defects. Males produce motile sperm and show only slightly reduced fertility (mean progeny per male: 99 [control] and 84 [*B9d2, tctn*$^{\Delta}$]; Fig. 3 B). In agreement with these observations, ultrastructural analysis of the antennae chordotonal cilia did not reveal structural defects of the axoneme or of the TZ (Fig. 3 C). We still observe transition fibers and Y-like linkers connecting, respectively, the centriole or axoneme to the plasma membrane in both control and *B9d2, tctn*$^{\Delta}$ flies. However, because these structures are difficult to observe in *Drosophila*, we cannot totally exclude that subtle ultrastructural defects could occur in absence of the MKS complex. In contrast, sperm flagella show weakly penetrant but statistically significant ultrastructural defects (Fig. 3 D). Approximately 10% of sperm flagella are broken or disorganized (Fig. 3 E), showing that Tctn and B9d2 are somehow involved in building stable axonemes.

We next analyzed the molecular organization of the TZ in absence of B9d2 and Tctn (Figs. 4 and S1). Cby and Cep290 are still recruited at the TZ (Fig. 4, A and B). We measured both the length of the centriole, labeled for Asl, and the length of the TZ labeled with Cep290 or Cby in absence of B9d2 and Tctn (Fig. 4 C), and we observed a small but significant decrease of TZ length that was correlated with an increase in centriole size. Strikingly, we observed a complete disruption of the MKS complex, as Mks1 and B9d1 are not recruited to the TZ in *B9d2, tctn*$^{\Delta}$ spermatocytes (Fig. 4, D and E). B9d1 localization was rescued by reintroducing both *tctn* and *B9d2* (Fig. 4 F). This shows that B9d2 and Tctn proteins are required to organize the MKS complex and that the absence of several proteins of the MKS complex at the TZ is largely dispensable for cilia assembly (Fig. 4 G). Based on this observation, we conclude that the MKS complex alone has only a subtle role in the organization of the TZ and ciliary cap in *Drosophila* sperm cells.

Cby and Dila cooperate to build the *Drosophila* TZ

In contrast to the weak impact of MKS protein deficiency on TZ assembly, mutations in proteins localized at the ring centriole lead to more severe phenotypes. Mutations in *unc*, *cby*, *dila*, or c*ep290* provoke marked uncoordination phenotypes caused by defects in ciliated neurons of the peripheral nervous system and show severe male infertility (Baker et al., 2004; Ma and Jarman, 2011; Enjolras et al., 2012; Basiri et al., 2014). Defects in Unc, Cby, and Dila lead to marked disorganization of sensory cilia, but BB still dock and build a TZ with only mild (Unc and Cby, showing interrupted distal segment of the TZ) or even no ultrastructural defects (Dila). The ultrastructure of sensory cilia was not investigated in *cep290* mutants. In spermatids, loss of Cep290 modifies the MKS protein distribution at the ciliary cap (Basiri et al., 2014).

Strikingly, when we combined *cby* and *dila* mutations, we observed severe consequences on the function and architecture of sensory neurons. Flies are completely uncoordinated and cilia are absent in chordotonal neurons as observed by immunofluorescence (IF) and EM analyzes (Fig. 5, A and B). Centrioles fail to build a TZ (Fig. 5, B and C), and Cep290 and Mks1 are absent at dendritic tips (Fig. 5 E). In *dila*^{81}*; cby*^{1} double mutants, we did not manage to observe typical features of docked BB such as transition fibers, present both in control or *cby*^{1} mutant flies (Fig. 5 C). However, centrioles are present at the tip of the dendrites and apparently show distal projections but are not connected to the membrane (Fig. 5, C and D). This phenotype differs from observations of mutants of genes encoding centriolar proteins, such as *plp*, for which all BBs fail to reach the distal part of the dendrite (Galletta et al., 2014).

Altogether, these results show that Cby and Dila cooperate to build the TZ and recruit most described TZ components in *Drosophila* sensory neurons (Fig. 5 F).

In double *dila*^{81}*; cby*^{1} mutant flies, in addition to strong sensory defects, males are completely sterile. No mature sperm is produced and examination of testes shows that sperm cysts failed to elongate whereas the overall size of the testes is not reduced (Fig. 6 A). EM examination of testes indicates a severe disorganization of sperm cysts (Fig. S3 A). Most axonemes were absent or completely damaged. Because cysts were severely disorganized, we could only count the number of remaining axonemes relative to the number of major mitochondria derivatives. Out of 442 mitochondria, only 5 intact axonemes (1.2%) and 28 recognizable but destroyed axonemes (6.3%; Fig. S3 A) could be identified. These observations indicate a strong genetic interaction between *cby* and *dila* in flagella formation, as we observed only a small fraction (14%) of defective flagellar axonemes in *cby*^{1} mutants (Enjolras et al.,

Downloaded from on March 19, 2017

Published September 19, 2016

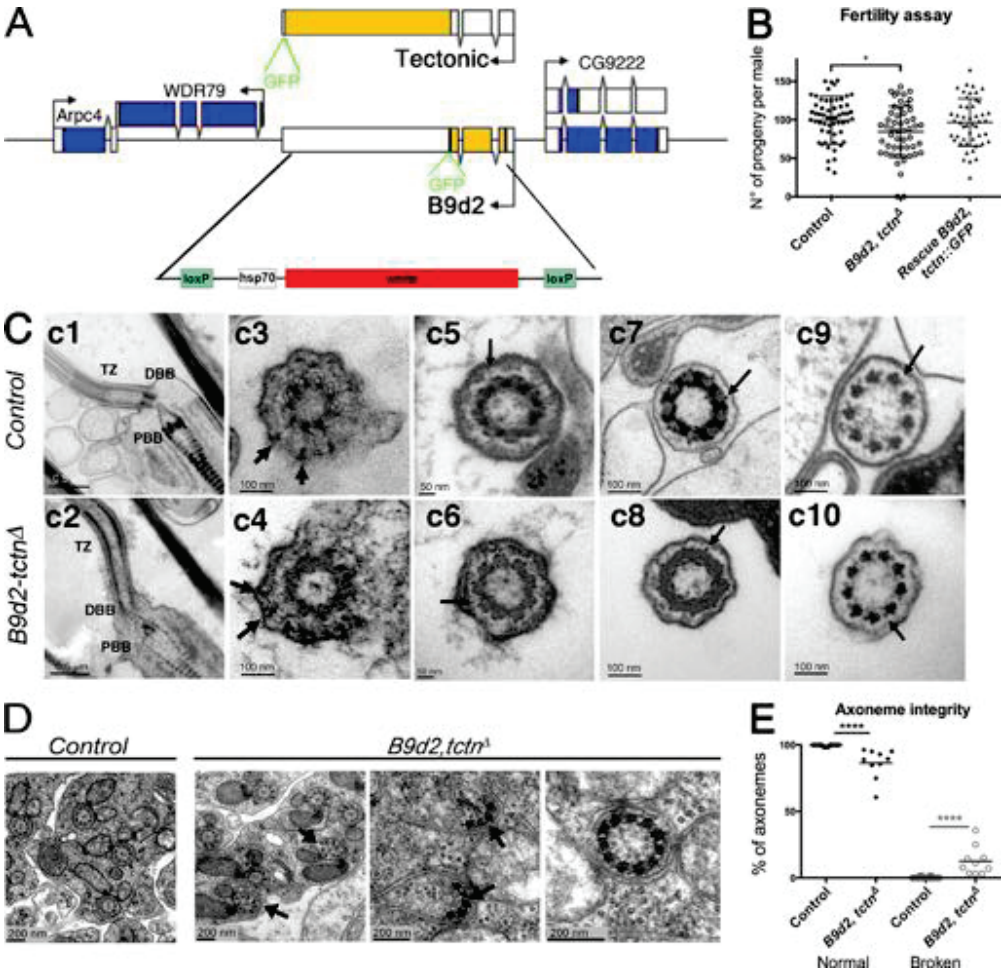


Figure 3. ***B9d2, tctn* mutant flies show only mild fertility defects.** (A) Scheme of the *tctn* and *B9d2* loci. Coding sequences were replaced by the *white* gene using CRISPR/Cas9-induced homologous recombination. (B) Quantification of the number of progeny obtained from individual males (control $n = 58$; *B9d2, tctnΔ* $n = 52$; and rescue $n = 47$) mated with three females. Scattered plot representation with mean and SD; *, $P < 0.05$. (C) Transmission EM analysis of adult antennae chordotonal neurons in control (c1, c3, c5, c7, and c9) or *B9d2, tctnΔ* mutant flies (c2, c4, c6, c8, and c10). (c1 and c2) Longitudinal sections showing no differences in the organization of the BB and TZ region of the cilia. (c3 and c4) Cross sections at the distal part of the BB show transition fibers connecting the BB to the membrane (arrows) in control and *B9d2, tctnΔ* mutant flies. (c5 and c6) Cross sections of the proximal part of the TZ. "Y-like" connectors (arrows) are observed in control and *B9d2, tctnΔ* flies. (c7 and c8) Cross sections of the distal part of the TZ. Small protrusions emanating from the axoneme and directed toward the membrane are observed (arrows) in both control and *B9d2, tctnΔ* flies. (c9 and c10) Cross sections at the proximal part of the sensory cilia show the ninefold symmetry of doublet microtubules and presence of the dynein arms (arrows) in control and *B9d2, tctnΔ* flies. DBB, distal basal body; PBB, proximal basal body; TZ, transition zone. (D) Transmission EM observations of adult testis sections. In mutant testis, a few broken (left and center, black arrows) or odd axonemes (11 doublets on the right) are found compared with control. (E) Quantification of the percentage of abnormal axonemes found per normal ($n = 20$) or mutant ($n = 10$) cysts. Results are presented as a scattered plot with mean and SD; ****, $P < 0.0001$.

2012) and no axonemal defects were described in *dila*^{81} mutants (Ma and Jarman, 2011).

In the absence of both Cby and Dila, we observed that Mks1 and B9d1 (Fig. 6 B) are absent at the tip of BB in *Drosophila* spermatocytes and spermatids. Cep290 was also almost completely lost (Fig. 6 C; greater than sevenfold reduction), whereas no differences in the overall expression levels of Mks1-GFP or Cep290-GFP could be detected in the testes by Western blot (Fig. S3 B). These observations again reveal strong genetic interactions between *dila* and *cby* as MKS proteins and Cep290 are still present in the single *cby* or *dila* mutants and their distribution is only slightly modified (Fig. S4). Only Unc was still present in absence of Cby and Dila (Fig. 6 D). However, Unc distribution was altered, with an expansion of its expression domain, suggesting a defective organization of the ring centriole and membrane cap in the *dila*^{81}*; cby*^{1} double mutant. EM observations of the centrioles in *Drosophila* spermatocytes showed that centrioles did not form a primary cilium-like structure, failed to dock to the plasma membrane, and had an odd orientation inside the cell (Fig. 7 A). No ciliary cap was observed in spermatocytes. Centrioles were apparently normally formed, showing the regular triplet arrangement and the presence of the central tube (Fig. 7 A, a2 and a5, arrow). Strikingly, aberrant microtubule extensions from centrioles were observed (Fig. 7 A, a3, a4, and a6, arrowheads). The absence of docking of the centrioles to the plasma membrane was confirmed by live imaging of centrioles in spermatocytes (Fig. 7 B). In addition, we could confirm the absence of the ciliary cap in spermatids by detecting Rab8, which strongly labels the cap from end of meiosis to late elongation stages (Fig. S3 C). In *dila*^{81}*; cby*^{1} spermatids, Rab8 staining was completely absent from BB distal ends, whereas Rab8 was not affected in *dila*^{81} mutants and present at

Downloaded from on March 19, 2017

Published September 19, 2016

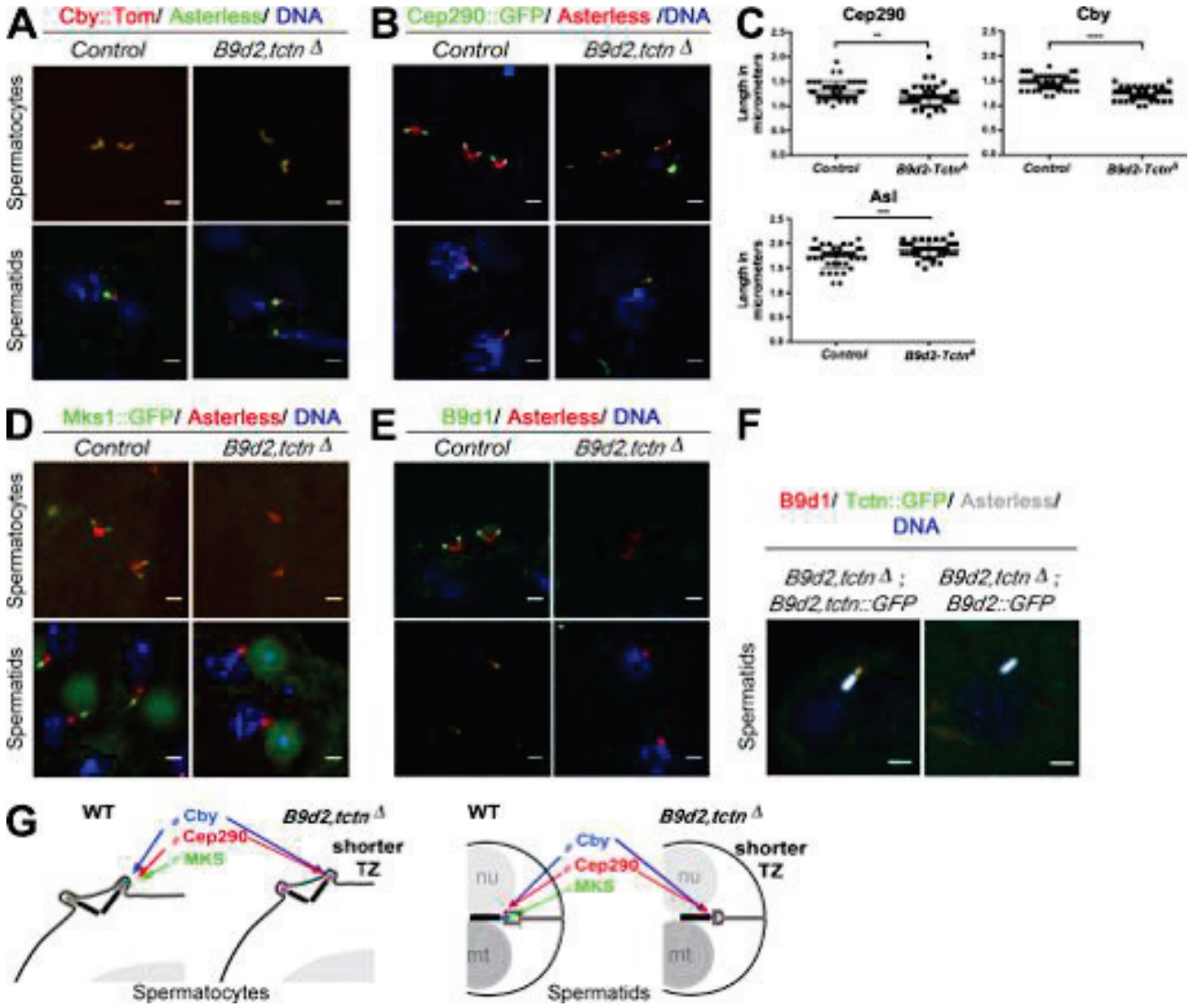


Figure 4. **B9d2 and Tctn are required to assemble the MKS complex and organize the TZ.** (A, B, and D–F). IF analysis of squashed testes. (A and B) Cby and Cep290 localization domains are reduced in length at the TZ of the *B9d2, tctnΔ* mutant spermatocytes or spermatids. (C) Quantification of Cep290, Cby, and centriole lengths in meiosis stage in control or *B9d2, tctnΔ* mutant germ cells. Scattered plots with mean and SD are shown. Cep290 and Asl: control $n = 39$ and *B9d2, tctnΔ* $n = 45$; Cby: control $n = 54$ and *B9d2, tctnΔ* $n = 51$. ****, $P < 0.0001$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. (D and E) Mks1 and B9d1 are absent from the TZ in *B9d2, tctnΔ* mutant germ cells. (F) B9d1 localization (red) is only rescued when introducing both B9d2 and Tctn, the latter being fused to GFP. No rescue is observed when introducing B9d2 alone. (G) Scheme recapitulating the consequences of *B9d2, tctnΔ* deletion. In the absence of B9d2 and Tctn, the TZ is shorter, as revealed by Cep290 or Cby staining, and all other MKS components are missing. WT, wild type. Bars, 2 µm.

the ciliary cap in a significant fraction (~35%) of the spermatids in *cby*^{1} mutants (Fig. S3 C).

To understand the nature of the aberrant microtubule extensions observed in the double mutants, we labeled cells with markers of tubulin posttranslational modifications. We found that microtubule extensions were acetylated and glutamylated (Fig. 7 C). These modifications are hallmarks of stabilized microtubules but are not restricted to the axoneme. We thus used a reporter marker CG6652 tagged with GFP, which specifically labels the spermatid axoneme in *Drosophila* (this study). Strikingly, whereas this marker only labels the primary cilia in spermatocytes and the ciliary cap in round spermatids (Fig. 7 D), huge extensions are visualized on double mutants, both in spermatocytes and in round spermatids. These extensions are not visible in early spermatocytes and only appear at the time of maturation when centrioles should be docking to the plasma membrane. This shows that premature axoneme elongation is observed in spermatocytes when centrioles fail to dock to the plasma membrane. Altogether, our results demonstrate that Cby and Dila cooperate to build the TZ, which is necessary for the formation of the ciliary cap. In the absence of this ciliary cap, premature axoneme elongation takes place (Fig. 7 E).

Klp59D is present at the sperm ciliary cap and controls timely and proper growth of the axoneme

We hypothesized that premature axoneme elongation could be caused by defective microtubule dynamics at the tips of the centrioles and in particular by defective control of the balance between tubulin polymerization and depolymerization. Several proteins play a role in controlling tubulin assembly.

Downloaded from on March 19, 2017

Published September 19, 2016

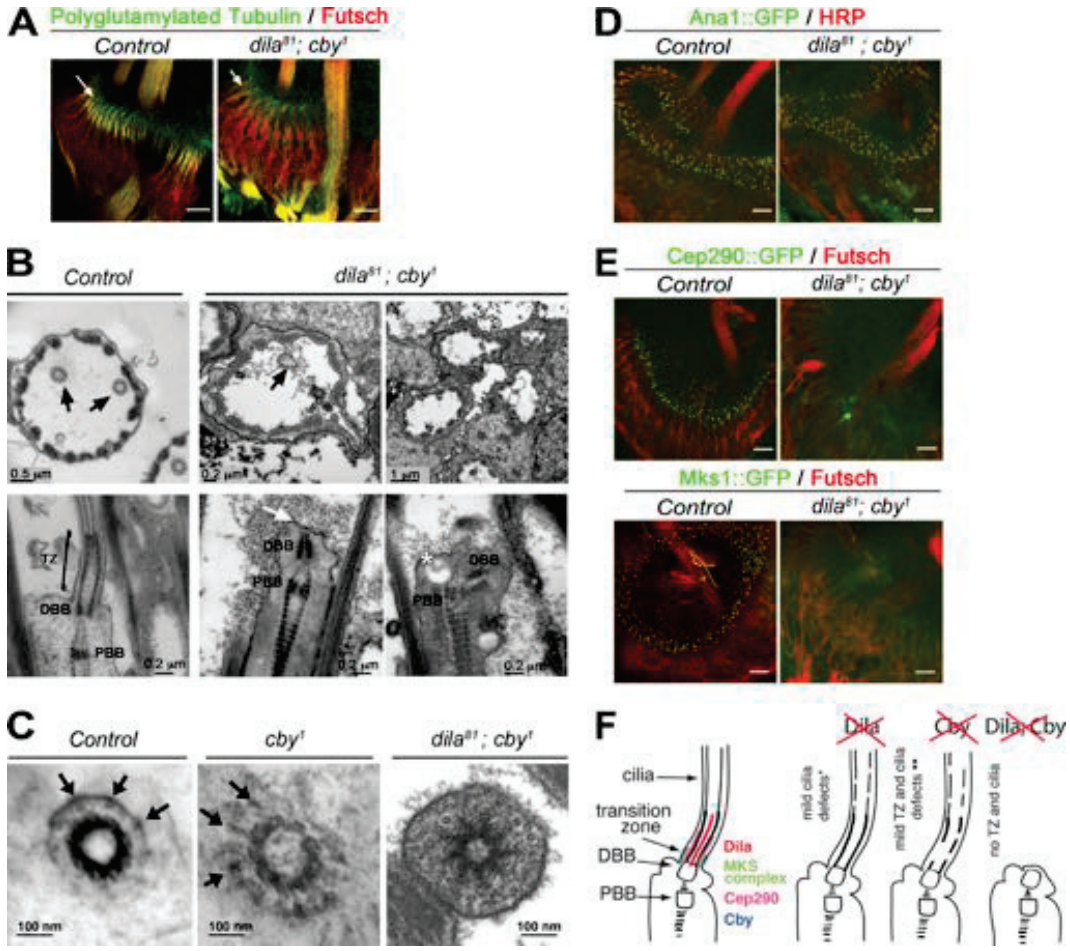


Figure 5. **Cby and Dila cooperate to build the *Drosophila* TZ in sensory cilia.** (A) Whole-mount staining of chordotonal organs of the second antennal segment showing neuronal cell bodies and dendrites (Futsch) and cilia (GT335 antibody). Cilia are missing in *dila*^{81}*; cby*^{1} double mutants. (B) EM analysis of cross section (top) reveals an almost complete absence of cilia, the few remaining ones being severely disorganized compared with control (arrows). On longitudinal sections (bottom), the two BBs (DBB, distal basal body; PBB, proximal basal body) are visible at the tip of the dendrites, but no cilium and TZ are built (white arrow). In some cases, the two BBs are not aligned properly (right), and accumulation of vesicles is seen (asterisk). (C) EM analysis of cross sections at the base of the cilia. Transition fibers (arrows) can be seen connecting the BB to the membrane in control or *cby*^{1} flies. In *dila*^{81}*; cby*^{1}, the BB showed possible distal extensions, but these did not connect the membrane. (D and E) Whole-mount staining of pupae antennae. (D) Centrioles (Ana1::GFP) are still present at the tip of the dendrites (HRP staining) in *dila*^{81}*; cby*^{1} mutants. (E) Cep290 and Mks1 are not recruited at TZ in *dila*^{81}*; cby*^{1} chordotonal organs. (F) Scheme of the defects observed after removing Dila (*, adapted from Ma and Jarman, 2011), Cby (**, adapted from Enjolras et al., 2012), or both (this study). In *dila*^{81} mutant antennae, the TZ is apparently normal by EM. In the *cby*^{1} mutant, the TZ shows incomplete ultrastructural defects. In the double mutant, no TZ is built. Bars, 10 µm (A, D, and E).

In particular, members of the kinesin-13 family of proteins are known to be involved in regulating tubulin depolymerization (Moores and Milligan, 2006). In *Drosophila*, three kinesin-13 family members are present in the genome (Rogers et al., 2004; Hu et al., 2015). Mutations of *Drosophila Klp10A* lead to centriole defects characterized by centriolar fragmentation, increased centriole lengths, and reduced size of primary cilia-like extensions in spermatocytes (Delgehyr et al., 2012; Gottardo et al., 2013), but not to aberrant microtubule extensions. These defects are different from those observed in *dila*^{81}*; cby*^{1} double mutants. Knockdown (KD) of the other two kinesin-13 proteins by RNAi in *Drosophila* showed that only reducing *Klp59D* led to shorten cysts, strikingly similar to cyst phenotypes observed in *dila*^{81}*; cby*^{1} mutant (Noguchi et al., 2011; Fig. S5 A).

We looked for Klp59D distribution using a Klp59D::GFP reporter transgene on live testes cyst preparation. Klp59D::GFP showed a dynamic distribution during germ cell differentiation (Fig. 8 A). In early spermatocytes, Klp59D is present throughout the cytoplasm. During spermatocyte maturation, Klp59D is also enriched at the tips of the centrioles and at their bases in late spermatocytes. Close examination of late spermatocytes show clear enrichment of Klp59D in the ciliary cap protruding from the cell surface (Fig. 8 B). In elongating spermatids, Klp59D is concentrated at the ciliary cap and along the axoneme (Fig. 8 A). We next analyzed the function of *Klp59D* by expressing shRNA in *Drosophila* male germ cells. We observed that the distribution of MKS components, Dila, or Cby was apparently normal in *Klp59D* KD spermatocytes (Fig. 8, C and F), suggesting that Klp59D acts downstream of TZ components. In support of this hypothesis, the amount of Klp59D around centrioles is significantly reduced compared with Asl intensity in the absence of both Dila and Cby (Fig. 8 D). However, Unc distribution was strikingly modified in *Klp59D* KD cells compared with controls (Fig. 8 E). This phenotype is identical to the

Downloaded from on March 19, 2017

Published September 19, 2016

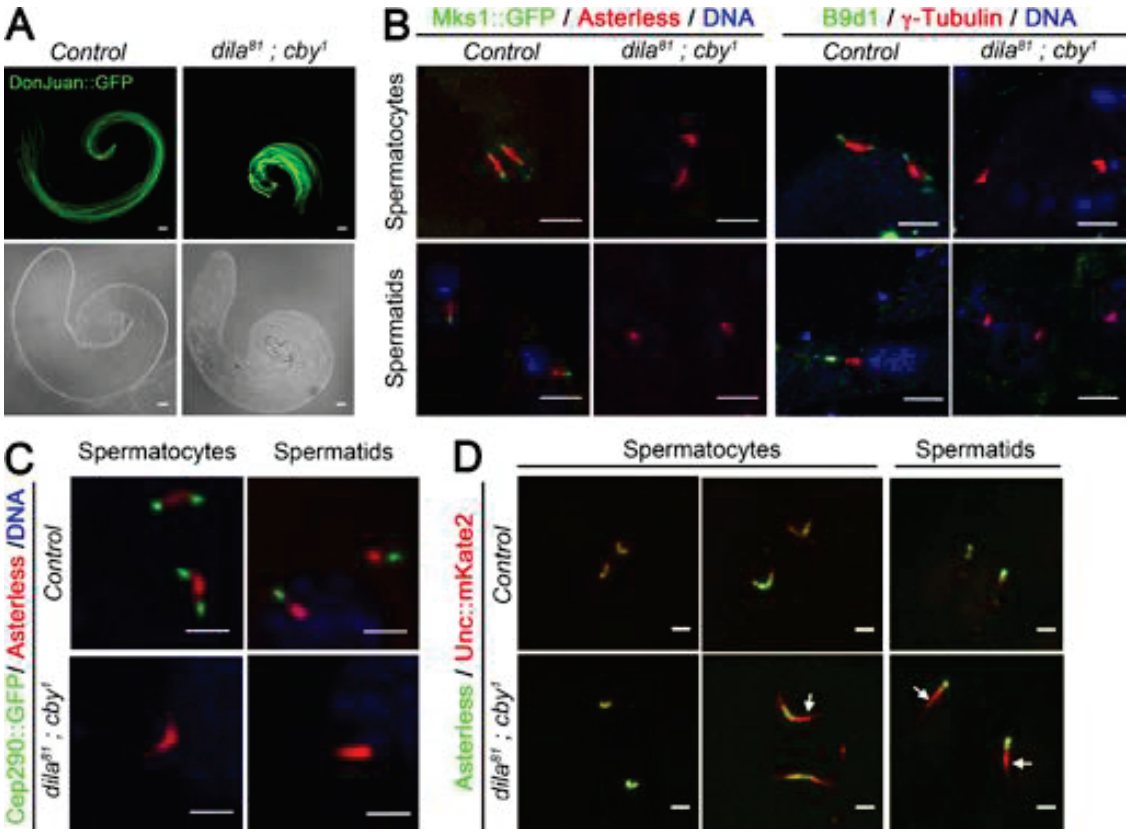


Figure 6. **Cby and Dila cooperate to build the TZ and ciliary cap in male germ cells.** (A) Whole-mount *Drosophila* testis expressing the tagged mitochondria protein DonJuan::GFP observed by bright-field and confocal microscopy. The cysts fail to elongate in *dila*^{81}*; cby*^{1} mutants. (B–D) Confocal imaging of centrioles/BB of squashed testes. (B) Detection of Mks1::GFP or B9d1 (green) and Asterless or γ-tubulin (red), respectively. Mks1 and B9d1 are absent from the tip of the centrioles in spermatocytes and from the tip of BB in spermatids of *dila*^{81}*; cby*^{1} mutants. (C) Cep290::GFP (green) and Asterless (red) staining. Cep290 localization at the tip of the centrioles in spermatocytes and at the tip of BB in spermatids is almost completely lost in *dila*^{81}*; cby*^{1} mutants. (D) No significant differences in Unc::mkate2 localization is observed at early spermatocyte stages. Unc::mKate2 localization is expanded in *dila*^{81}*; cby*^{1} mutants from midspermatocyte stage and in spermatids (arrows). Bars: (A) 50 µm; (B) 5 µm; (C and D) 2 µm.

one observed in *dila*^{81}*; cby*^{1} double mutants and was confirmed with CG6652::GFP labeling, showing huge axonemal extensions on many centrioles in *Klp59D* KD cells (Fig. 8 F). Using a cell membrane marker, we observed that the aberrant axoneme elongation was associated with impaired membrane cap formation in male germ cells (Fig. 8 G). Furthermore, EM observations of spermatocytes showed part of the centrioles with aberrant microtubule elongation and disrupted ciliary cap (Fig. S5 D). These observations indicate that membrane cap formation requires strict control of microtubule elongation. Additionally, EM analysis showed a severe disorganization of spermatid axonemes similar to defects observed in *dila*^{81}*; cby*^{1} mutants. Very few axonemes were apparently normal, and most were missing or broken (Fig. S5, B and C). Altogether, our results show that Klp59D is required for timely control of axonemal growth during male germ cell differentiation. Removal of this protein leads to premature microtubule elongation, axonemal structural defects, and defective ciliary cap formation.

Discussion

Here, we show that TZ assembly in *Drosophila* involves cooperative actions of Cby and Dila, both in sensory neurons and male germ cells. More importantly, we reveal that a timely control of the balance between membrane cap assembly by TZ components and microtubule elongation by kinesin-13 microtubule remodeling is required for proper axoneme formation in *Drosophila* male germ cells.

Flagella assembly in *Drosophila* male germ cells does not rely on IFT, as null mutations in IFT components have no consequences on flagella formation (Han et al., 2003; Sarpal et al., 2003). It is thus considered to be cytosolic, in contrast to the more widely conserved IFT-dependent ciliogenesis, which is said to be compartmentalized (Avidor-Reiss and Leroux, 2015). However, proteins of the ring centriole/TZ such as Unc, Cby, or Cep290 are required to compartmentalize the flagellar growing end in *Drosophila* through the formation of a ciliary cap (Baker et al., 2004; Enjolras et al., 2012; Basiri et al., 2014). The exact function of this ciliary cap is not clear (Avidor-Reiss and Leroux, 2015). It was proposed that the formation of the ciliary cap is associated with the formation of a diffusion barrier, which protects the ciliary end from cytoplasmic proteins (Basiri et al., 2014; Avidor-Reiss et al., 2015). Our results are in agreement with this hypothesis and suggest that the ciliary cap is required to create a specific environment that restricts axonemal growth, as precluding ciliary cap formation in *dila*^{81}*; cby*^{1} mutants leads to aberrant microtubule extensions and unstable axonemes. On the other hand, our results show that unbalanced microtubule growth prevents ciliary cap formation. In agreement with this

Downloaded from on March 19, 2017

Published September 19, 2016

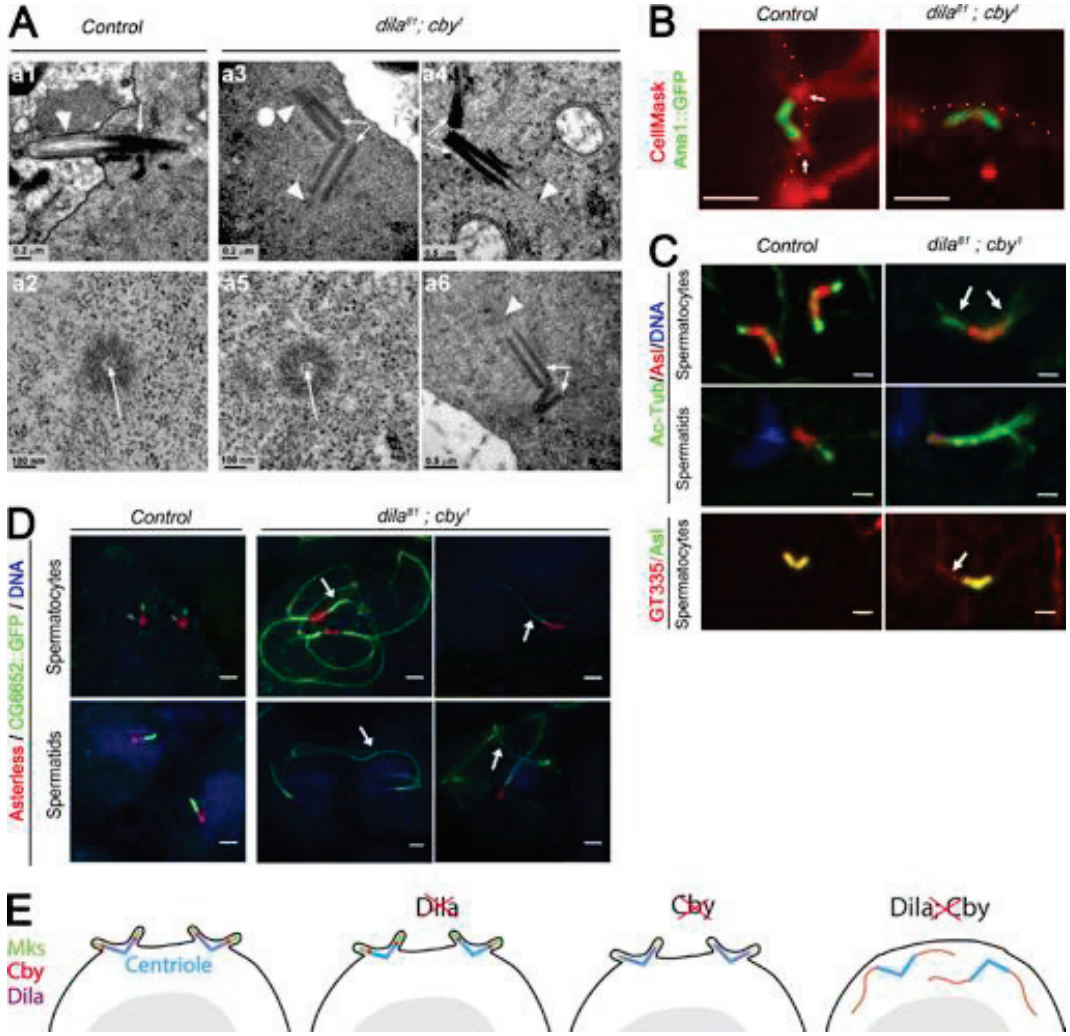


Figure 7. **Aberrant centriolar extension is observed in male germ cells in the absence of the ciliary cap.** (A) Transmission EM analysis of spermatocyte cilia. In control late spermatocytes, centrioles (arrow) are docked to the membrane and cilia (arrowhead) extend at the cell surface. In *dila*^{81}*; cby*^{1} mutants, centrioles (arrows) do not dock to the membrane (a3, a4, and a6) and microtubules extend from the centrioles (arrowheads). The centrioles are apparently unaffected and show the central tubule (a2 and a5, arrows). (B) Live imaging of *Drosophila* spermatocytes labeled with CellMask showing the centrioles (Ana1::GFP) docked to the plasma membrane protruding at the ciliary cap (white arrows) in control cells. The centrioles are present in an inverted orientation under the plasma membrane (dashed line) and not extending a ciliary cap. (C) Squashed spermatocytes and spermatids showing acetylated-tubulin extension (arrows) of the centrioles in double mutants compared with control. Aberrant microtubule extensions are also glutamylated (arrow, GT335 antibody). (D) Confocal imaging of squashed testes showing aberrant extensions of centrioles (arrows) in spermatocytes and spermatids. CG6652::GFP only labels the axoneme and no other microtubules in testes. (E) Scheme summarizing the roles of Cby and Dila in TZ and cilia assembly in *Drosophila* spermatocytes. Removal of Dila does not affect TZ components (see Fig. S3). The absence of Cby mildly affects MKS protein recruitment. Removal of both completely disorganizes TZ assembly and ciliary cap formation. The absence of ciliary cap is associated with aberrant and premature axonemal extension in spermatocytes. Bars, 2 µm (B–D).

conclusion, previous work showed that treatment of spermatocytes with Taxol leads to Unc domain extension, associated with aberrant axoneme elongation and defective ciliary cap formation, when treatment was applied on spermatocytes before BB docking, but not when applied after BB docking (Riparbelli et al., 2013). Therefore, cytosolic ciliogenesis in *Drosophila* is regulated by a precise balance between microtubule extension from the centriole distal end and membrane cap formation.

This mechanism is apparently specific to cytosolic ciliogenesis. In *dila*^{81}*; cby*^{1} sensory cilia, the total absence of the TZ is not associated with aberrant axoneme elongation. This also indicates that centriole docking in this tissue is a prerequisite to elongate the axoneme. Klp59D is not expressed in sensory neurons, and driving Klp59D shRNA expression in sensory neurons did not reveal any sensory defects. These differences could reflect particular properties of centrioles in *Drosophila* spermatocytes. Indeed, all four centrioles convert to BB in spermatocytes, whereas only the mother centriole does so in sensory neurons (Tates, 1971). Therefore, different sets of proteins should be involved in centriole maturation in spermatocytes compared with sensory neurons. Further work will be required to understand molecular differences between sperm and sensory basal bodies.

Another set of observations highlights the particular behavior of spermatocyte centrioles. Mutations in TZ proteins have shown that reducing the length of primary cilia-like/TZ in spermatocytes is associated with an increase in length of the centrioles. This was observed when removing Cep290 (Basiri et al.,

Downloaded from on March 19, 2017

Published September 19, 2016

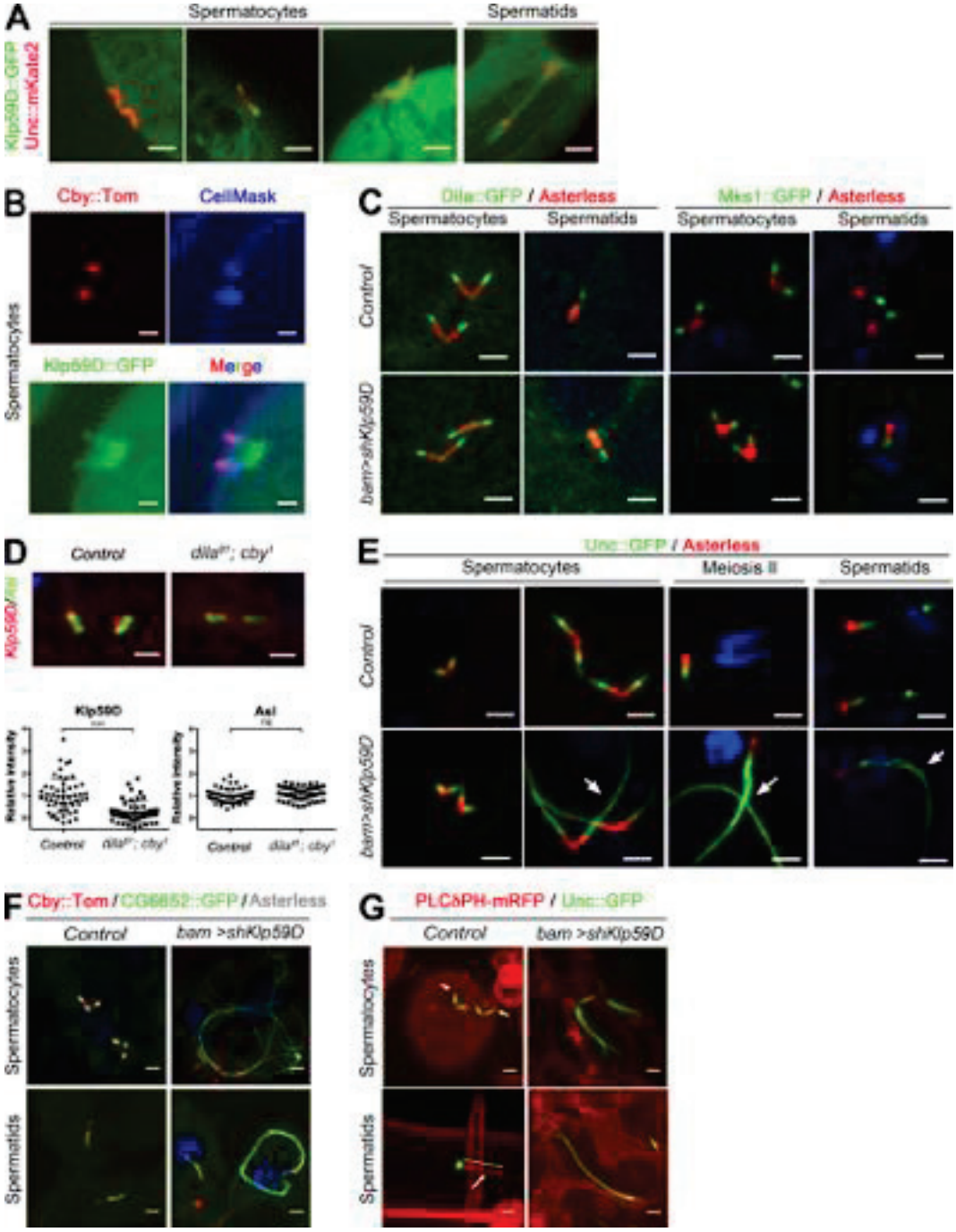


Figure 8. **Klp59D acts downstream of TZ components to regulate axonemal assembly in spermatogenesis.** (A) Live observation of Klp59D::GFP distribution. In spermatocytes, Klp59D is first cytoplasmic and next recruited at centrioles. In elongating spermatids, Klp59D::GFP is present at the tip of the BB and along the axoneme and ciliary cap. (B) Magnification of centrioles and primary cilia in late spermatocytes, showing the localization of Klp59D::GFP in the cilia/TZ extension (labeled with Cby::Tomato) and at the base of the centrioles. (C–E) Confocal imaging of squashed testes. (C) TZ components Dila and Mks1 are recruited normally at centriole tips (Asl antibody) in spermatocytes and spermatids in *Klp59D* KD compared with control testes. (D) Quantification of Klp59D and Asl relative intensities in control or $dila^{81}$; cby^{1} spermatocytes. Significant differences are observed for Klp59D. Scattered plots with mean and SD are shown (control $n = 52$; $dila^{81}$; cby^{1} $n = 46$). (E) Unc::GFP expression domain is extended in late spermatocytes and spermatids (arrows) in *Klp59D* KD compared with controls. (F) Cby is still present at the tip of centrioles, but huge axonemal extensions are labeled by CG6652::GFP in *Klp59D* KD testes. (G) Live cyst imaging using the membrane PLCδPH-mRFP and Unc::GFP reporters. In control cysts, a membrane cap (arrows, straight line indicating the range of the cap) is present at the tip of centrioles and BBs. In *Klp59D* KD, the membrane cap is absent when aberrant microtubule extensions are observed, as revealed by the extended expression domain of Unc. Bars: (B and D) 1 µm; (A, C, and E–G) 2 µm.

Downloaded from on March 19, 2017

Published September 19, 2016

2014), and we made identical observations on *B9d2, tctn*$^{\Delta}$ mutant testes. Thus, reducing ciliary cap extension allows centriole elongation, suggesting a balance in centriolar extension controlled by the TZ. Such a balance was also revealed by removal of Klp10A, which leads to an increase in centriole elongation and in a simultaneous reduction of primary cilia/TZ extension (Gottardo et al., 2013). Hence, the kinesin-13 proteins Klp10A and Klp59D likely play complementary functions at the spermatocyte TZ by restricting, respectively, centriole elongation or TZ elongation.

The function of kinesin-13 family members in ciliogenesis is still unclear and sometimes contradictory. In protozoa, such as *Giardia intestinalis*, *Leishmania*, or *Trypanosoma,* removal of kinesin-13 leads to longer flagella (Blaineau et al., 2007; Dawson et al., 2007; Chan and Ersfeld, 2010) in agreement with a tubulin-depolymerizing function of these proteins. It has also been proposed that kinesin-13 proteins play a role in maintaining a free tubulin pool to promote axoneme assembly (Wang et al., 2013). However, recent studies suggest more complex roles of kinesin-13 members in cilia assembly. In mammals, Kif24 is required to regulate centriole length by interacting with CP110 (Kobayashi et al., 2011). Such a function is also true for Klp10A in *Drosophila* (Delgehyr et al., 2012; Franz et al., 2013). Thus, one possible explanation for the observed phenotype in the *dila*^{81}*; cby*^{1} double mutant would be that CP110 is prematurely removed from centrioles, as Dila and CP110 have strikingly similar localization inside the TZ lumen (this study and Franz et al., 2013, respectively). However, complete removal or overexpression of CP110 in *Drosophila* did not lead to measurable ciliary defects and obviously did not lead to aberrant centriolar extensions in male germ cells (Franz et al., 2013). Therefore, modulation of CP110 activity cannot explain the aberrant axonemal growth observed in the testes in both *dila*^{81}*; cby*^{1} mutants and *Klp59D* KD.

In *Tetrahymena,* kinesin-13 protein was shown to act as an axoneme assembly factor by regulating the levels of tubulin modification and in particular tubulin acetylation inside the cilia (Vasudevan et al., 2015). It is tempting to speculate that Klp59D could play such a function in the ciliary cap of the sperm germ cell. However, it is difficult to test this hypothesis, as quantifications of differences in tubulin modifications inside the ciliary cap by IF are difficult and biochemical quantification of tubulin modifications is limited by the huge amount of nonaxonemal (cytoplasmic) modified microtubules in male germ cells.

Our study reveals both analogies and differences in TZ assembly between *Drosophila* and other organisms. In mammals, MKS proteins play a critical function on TZ assembly and subsequently cilia function as revealed by human ciliopathies, in which these proteins are mutated (Garcia-Gonzalo et al., 2011; Czarnecki and Shah, 2012; Reiter et al., 2012). In *C. elegans*, mutations in the five core members of the MKS complex (Tctn, MKSR-1 [B9d1], MKSR-2 [B9d2], MKS1 [B9d3], and MKS6 [Cc2d2A]; Bialas et al., 2009; Williams et al., 2011; Yee et al., 2015) have no effect on cilia architecture and sensory function. However, functional interactions were revealed between them, as their localization at the TZ is interdependent. In addition, whereas no genetic interactions are revealed when looking at sensory functions, combining mutations in several of these genes led to modified lifespan, suggesting that MKS components cooperate in specific ciliary signaling functions in *C. elegans*. (Bialas et al., 2009). In *Drosophila*, our results indicate that, like in nematodes, the MKS complex has only subtle functions on TZ and cilia assembly and that MKS components exhibit functional interactions, as removing B9d2 and Tctn is sufficient to completely alter the recruitment of the other MKS members. In this context, we do not expect to reveal genetic interactions by combining other mutations in MKS components together with our *B9d2, tctn* mutant. Our observations therefore suggest that the hierarchy and function of MKS components are likely conserved between *C. elegans* and *Drosophila*.

In contrast, strong genetic interactions have been described between MKS and NPHP components in *C. elegans*. In particular, MKS5 (Rpgrip1L or NPHP8 in mammals) acts upstream of all other components to build the TZ (Fig. 1 A), and NPHP4 and 1 interact with MKS complex proteins to organize the TZ (Williams et al., 2011; Sung and Leroux, 2013; Yee et al., 2015). These NPHP members are not conserved in *Drosophila*. Therefore, other proteins should be required to organize the ciliary TZ upstream of the MKS complex in *Drosophila*. Among conserved candidates in other organisms, Cep290 is required to build the TZ in *Drosophila,* but MKS components are still assembled at the TZ in Cep290 mutants (Basiri et al., 2014), thus suggesting that other TZ components act upstream of MKS. Here, we demonstrate that *cby* and *dila* show strong genetic interaction in TZ assembly, whereas mutating each separately only shows moderate effects. These results highlight for the first time the synergistic roles of Cby and Dila in building the TZ.

Cby and Dila are not present in *C. elegans* but are conserved in mammals. In mouse, Cby plays an important role in motile ciliated epithelia, as demonstrated by the severe airway ciliogenesis defects observed in *Cby* knockout mice (Voronina et al., 2009; Burke et al., 2014). In mammalian cells, Cby is also required for primary cilia assembly (Lee et al., 2014). Interestingly, mammalian Cby is required to dock centrioles to the plasma membrane (Voronina et al., 2009; Burke et al., 2014), a function that is only revealed in *Drosophila* by removing both Cby and Dila (Enjolras et al., 2012; this study). Mammalian Cby is required for Rab8-mediated ciliary vesicle assembly (Burke et al., 2014), and we show here that Rab8 recruitment at the ciliary cap is also partially affected in *cby*^{1} mutant flies and strikingly completely abolished in *dila*^{81}*; cby*^{1} double mutants. This suggests a conserved role of Cby in Rab8-associated membrane cap assembly from *Drosophila* to mammals and highlights that Dila is also required for this process in *Drosophila*. In mammals, Azi1 (Dila in *Drosophila*) is a centriolar satellite component required for centriole duplication, but it is also localized at centrioles and is required for cilia assembly (Hall et al., 2013; Villumsen et al., 2013; Chamling et al., 2014). However, its function in TZ assembly has not been investigated. In *Drosophila*, Dila is found restricted to the BB and TZ and is required for cilia assembly, but no specific defects of the TZ were detected in mutant flies (Ma and Jarman, 2011). Thus, our study in *Drosophila* reveals that Dila is also involved in building the TZ but that alternative pathways can compensate for Dila deficiency in TZ assembly. Such compensation mechanisms have also been proposed for Azi1 in mammals (Hall et al., 2013).

In conclusion, our study reveals critical genetic interactions between two yet-unrelated TZ proteins, Cby and Dila. Future work will be required to understand if such interactions are also conserved in mammals. This work also demonstrates that the formation of a ciliary cap is essential to coordinate ciliary assembly during cytosolic ciliogenesis by creating a biochemical environment that controls axonemal microtubule growth.

Downloaded from on March 19, 2017

Published September 19, 2016

Materials and methods

Fly stocks and maintenance

The following lines were obtained from Bloomington *Drosophila* Stock Center: vasa::Cas9 (Bl#51323), UAS-Dcr2 (Bl#24648), and Don-Juan::GFP (Bl#5417). The shRNA against Klp59D (v100530) was obtained from the Vienna *Drosophila* Stock Center. The Rab8::YFP strain was described previously (Dunst et al., 2015). The *cby*^{1} mutant and Cby::GFP and Cby::Tomato transgenes were also previously described (Enjolras et al., 2012). The bam-GAL4::VP16 construct was described previously (Chen and McKearin, 2003). The Unc::GFP transgene was a gift from M. Kernan (State University of New York, Stony Brook, NY; Baker et al., 2004) and Ana1::GFP and Cep290::GFP were gifts from T. Avidor-Reiss (University of Toledo, Toledo, OH; Blachon et al., 2009; Basiri et al., 2014). PLCδPH-mRFP stock was a gift from J. Brill (SickKids, Toronto, Canada; Wei et al., 2008). The *dila*^{81} mutant was provided by A. Jarman (University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland, UK; Ma and Jarman, 2011). The flies were raised on standard media between 21°C and 25°C.

Drosophila reporter gene constructs

pJT61. 6xMycTag-SV40polyA fragment was amplified from pCS2+ nlsMT plasmid (a gift from R. Rupp, Adolf-Buteland Institute, Munich, Germany) and cloned in the XbaI site of the pattB vector (Bischof et al., 2013). EGFP sequence was amplified from pEGFP-N1 plasmid (Takara Bio Inc.) and cloned in the KpnI site of the previous construct, in frame with the 6xMycTag sequence.

pJT108. The Tomato sequence was obtained by PCR on the Zeo-TomatoNT-2 (a gift from R. Basto, Institut Curie, Paris, France) and further cloned in the KpnI site of the pattB plasmid. SV40polyA was amplified from pEGFP-N1 plasmid (Takara Bio Inc.) and cloned in the XbaI site of the previous plasmid.

pJT82. mKate2 and SV40polyA fragments were amplified from pmKate2-N plasmid (Evrogen). The two fragments were further cloned in the XbaI site of the pattB vector.

For each gene, the entire coding and at least 1 kb of upstream regulatory sequences were cloned in frame with GFP in the pJT61 vector or in frame with mKate2 in the pJT82 vector. Integration platforms and primers used were *Mks1::GFP* (89E11 [III]): forward (F)-1, 5′-TAATTCGCGGCCGCCTCTTCGACTTTCTGCTGCA-3′ and reverse (R)-2, 5′-TAATTCGTCGACAAACTCAGCCTGGTAGTATGC-3′; *B9d2::GFP* (68D2 [II]): F-3, 5′-TAATTCGCGGCCGCCAGCTGC ATTATCAAGTACACC-3′ and R-4, 5′-TAATTCCTCGAGCTTGAA CTCCACGCCGTATTC-3′; *tectonic::GFP* (68D2 [II]): F-3 and R-5, 5′-TAATTCCTCGAGGAGGCAAAGTTGCATGGATC-3′; *dila::GFP* (89E11 [III]): F-6, 5′-TAATTCGAATTCCAGCATACCCACTCCGGA TC-3′ and R-7, 5′-TAATTCCTCGAGTTTAACACAATAATCCTT GCG-3′; *Klp59D::GFP* (22A3 [II]): F-8, 5′-TAATTCAGATCTTGT GACTGACATCTCGGTG-3′ and R-9, 5′-TAATTCGCGGCCGCA GCTCGGATTCATCCAGCTCG-3′; *cc2d2a::GFP* (65B2 [III]): F-10, 5′-TAATTCCGGCCGGCCCTGCGAGAATTACCTAG-3′ and R-11, 5′-GAATTACGGCCGCTCCACCAATGGCACCATG-3′; *unc::mKate2* (59D3 [II]): F-12, 5′-TAATTCGCGGCCGCGGAGTACTTC TGCGCCAGG-3′ and R-13, 5′-TAATTCGTCGACCAGGTTTAT GCGTTTCCAG-3′; *CG6652::GFP* (53B2 [II]): F-14, 5′-TAATTC GGATCCAAGCTTGAAGCCCAATTCAA-3′ and R-15, 5′-TAATTC GCGGCCGCAGGTCCTGGCTCTTGTTGTCGT-3′.

For B9d1::Tomato (CG14870), the 2.9 kb BamHI–NotI fragment from the CG14870-6xMycTag reporter plasmid (Enjolras et al., 2012) was subcloned in pJT108 in frame with Tomato and integrated in platform 59D3 (II). All transgenic lines were obtained from BestGene Inc.

Generation of *B9d2, tctn* mutant

The mutant for *B9d2, tctn* (CG42730 and CG42731) was generated by CRISPR/Cas9 catalyzed homologous directed repair (Gratz et al., 2014). Two gRNA were selected using the http://tools.flycrispr.molbio.wisc.edu/targetFinder/ website: 5′-CCACGCAGCAGATACACCTGT CC-3′ and 5′-GTTGCGAGTTGCATAGATGATGG-3′ (protospacer adjacent motifs are underlined). Oligos were phosphorylated by T4PNK (New England Biolabs, Inc.) and annealed. Double-stranded 5′gRNA and 3′gRNA were cloned in the BbsI site of pBFv-U6.2 or pBFv-U6.2B vectors, respectively (Kondo and Ueda, 2013). 5′gRNA was further subcloned in the EcoRI–NotI sites of pBFv-U6.2B to express the two gRNAs from one vector.

The 5′ and 3′ homology arms were amplified by PCR and cloned, respectively, into the EcoRI–NdeI and SpeI–XhoI sites of pRK2 plasmid (Huang et al., 2008). The two vectors (gRNAs and homology arms) were injected into Vasa::Cas9 embryos. Flies were crossed to w; Bl/CyO virgin females and the offspring were screened for red-eyed flies. Homologous recombination was checked by PCR.

Immunofluorescence

***Drosophila* testes squashes.** For PFA fixation, testes from young adult flies or pupae were dissected in 1× PBS, fixed for 15 min in 1× PBS/4% PFA, squashed between the coverslip and slide, and frozen in liquid nitrogen. The coverslip was removed, and the slide was soaked for a few seconds in ethanol 100% at −20°C. Testes were permeabilized for 25 min in 1× PBS/0.1% Triton X-100 (PBT) and blocked for 1 h in PBT/3% BSA/5% NGS. Primary antibodies were incubated in blocking solution overnight at 4°C or 1 h at RT. For Klp59D staining, testes were first kept in 1× PBS for 1 h at 4°C to depolymerize cytoplasmic microtubules, followed by fixation.

Methanol fixation. Testes from young adult flies or pupae were dissected in PBS, opened with a tungsten needle on a slide, and squashed. Slide was frozen in liquid nitrogen and coverslip removed. Samples were fixed 10 min in methanol 100% at −20°C, washed in PBS and blocked for 1 h in PBS/0.1% BSA. Primary antibodies were incubated in blocking solution overnight at 4°C or 1 h at RT (4 h for acetylated tubulin). For acetylated tubulin, testes were kept in PBS for 1 h at 4°C to depolymerize cytoplasmic microtubules before fixation.

For both fixations, fixed testes were washed in PBS and incubated for 1 h in secondary antibodies diluted in PBS. Slides were washed in PBS, incubated in Hoechst 1/1,000 for 15 min at RT, washed in PBS, and rinsed in ultrapure water. Slides were mounted using Dako or Vectashield.

Antennae were processed as previously described (Vieillard et al., 2015). In brief, *Drosophila* heads from 38- to 45-h pupae were dissected in PBS, fixed for 1 h in PBS/4% PFA, and washed in PBS. Antennae were blocked for 1 h in PBS/0.3% Triton X-100/3% BSA/5% NGS and incubated in primary antibodies diluted in blocking solution for 48 h at 4°C. Samples were washed three times in PBS and incubated in secondary antibodies diluted in PBS for 48 h at 4°C. Antennae were washed three times in PBS and mounted in Vectashield.

Antibodies

The antibodies used were the following: mouse anti-Futsch (1/1,000 DSHB = 22c10), mouse anti–acetylated tubulin (1/100, clone 6-11B-1; Sigma-Aldrich), mouse anti–γ-tubulin (1/500; Sigma-Aldrich), mouse anti–polyglutamylated tubulin antibody (1/500, GT335; Enzo Life Sciences), rabbit anti-HRP (1/500; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), rabbit anti-GFP (1/1,000; Abcam), rabbit anti-DsRed (1/2,500; Takara Bio Inc.), guinea pig anti-Asterless (1/45,000; gift from G. Rogers, University of Arizona, Tuscon, AZ; Klebba et al., 2013), rabbit anti-plp (1/1,000; provided by R. Basto, Insitut Curie, Paris, France; Martinez-Campos et al., 2004), mouse anti-Rab8 (1/500;

Downloaded from on March 19, 2017

Published September 19, 2016

BD), and rabbit anti-Klp59D (1/1,000; provided by O. Blard and K. Rogowski, Institut de Géntétique Humaine, Montpellier, France). Generation of B9d1 (CG14870) antibody was performed by Eurogentec by immunization of guinea pigs with the following two peptides: PGNEETTPPHEKHKQ and SAKESVPNAMDAKAT. Crude serum was used at 1/2,500 dilution.

The following secondary antibodies were used (all at 1/1,000 dilution): goat anti–mouse Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594, goat anti–rabbit Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 647, donkey anti–rabbit Alexa Fluor 568, goat anti–guinea pig Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 (Invitrogen), and donkey anti–guinea pig Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.).

Confocal microscopy

All acquisitions were performed at RT. Most slides were imaged using an IX83 microscope (Olympus) equipped with an iXon Ultra 888 EMC DD camera (Andor Technology) and IQ3 software (Andor Technology). A Plan-Apochromat N 60× 1.42 NA objective (Olympus) was used for all acquisitions. Some slides were imaged using an SP5X confocal laser scanning microscope (Leica Biosystems) equipped with the Application Suite software (Leica Biosystems). An HCX Plan-Apochromat CS 63× 1.4 NA objective (Leica Biosystems) was used for all acquisitions. Acquisition of Klp59D KD whole-mount testes slides was made using an epifluorescence axioscope Z1 imager (ZEISS) with an EC Plan-Neofluar 10×/0.3 Ph1 objective (ZEISS), photometrics CoolSNAP MYO camera (Photometrics), and Metavue 7.8.0.0 software. All images were processed with ImageJ. Figures were created with Adobe Photoshop CS5. Unless stated in the figure legends, only contrasts and offset were adjusted.

3D-SIM

Squashes were performed on a 12-mm-diameter round coverslip with a 44 × 60-mm overlaying coverslip. Immunofluorescence protocols were the same as in the Immunofluorescence section using either PFA or methanol fixation. Images were acquired using an Elyra PS.1 system (ZEISS) equipped with a PCO edge 5.5 camera and ZEN 2012 SP2 software (black edition). The objective used for all acquisitions is a Plan-Apochromat 63× 1.4 NA.

Live imaging

Testes of young adults or pupae were dissected in PBS at room temperature, placed in a drop of PBS or PBS/0.5% FCS on glass-bottom poly-lysine–coated (Sigma-Aldrich) Petri dishes (Will-Co). Cells were pulled out of the testes using thinned capillaries and left to attach for 5–15 min. For some experiments, membranes were labeled using CellMask Deep Red Plasma membrane stain (Invitrogen) diluted at 1/50 in a drop of Sang and Shields M3 Insect Medium (Sigma-Aldrich).

EM

Samples were processed as previously described (Enjolras et al., 2012; Vieillard et al., 2015). Antennae or testes were collected in PBS and fixed in 2% glutaraldehyde, 0.5% PFA, and 0.1 M sodium cacodylate, pH 7.4, for 48 h at 4°C. Samples were rinsed in 0.15 M sodium cacodylate, pH 7.4, and postfixed in 1% OsO4 (4 h for antennae and 1 h for testes). Samples were dehydrated through ethanol series and propylene oxide. Samples were substituted in 3 vol propylene oxide/1 vol resin (2 × 30 min), 1 vol propylene oxide/1 vol resin (2 × 30 min), and then 1 vol propylene oxide/3 vol resin (2 × 30 min) and finally embedded in epon medium (Fluka). Ultrathin sections were cut on an ultramicrotome (UC7; Leica Biosystems) and contrasted manually in methanol/uranyl acetate 7% and aqueous lead citrate. Contrasted sections were observed on a transmission EM (CM120; Philips) at 120 kV. Images were acquired with a 2k × 2k digital camera (ORIUS 200; Gatan) and digital micrograph software and processed with Photoshop CS5.

IF quantification

Quantifications of centriole and TZ lengths were performed on sum projections of confocal stacks made with identical settings in control or mutant situation, such to avoid saturated signal. The intensity profile along the centriole or TZ was plotted. Length was measured between the first pixel and the last pixel above the background threshold. Quantification of Klp59D and Cep290 intensities was performed using ImageJ and by measuring the sum of pixel intensity in a defined region encompassing the centrioles. Background intensity was subtracted by measuring the sum of pixel intensity in an adjacent region of the same area next to centrioles. Statistical analyses and graphs were made using Prism 7 software.

Statistics

Quantification results are represented as scatter plots with the mean and SD on all figures. Statistical significance was determined by a two-tailed unpaired Student's *t* test (Prism 6 software; ns, $P > 0.05$; *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$; ****, $P \leq 0.0001$).

Fertility test

1- or 2-d-old males were crossed individually with three w^{1118} virgin females. After 5 d, crosses with at least one dead fly were eliminated from the test. Mated flies were discarded from conserved crosses. All flies that hatched out from the crosses were counted.

Western blot

Proteins were extracted from 48-h pupae (15) testes. Fusion proteins were revealed using a rabbit anti-GFP antibody (1/2,500; Abcam).

Online supplemental material

Fig. S1 shows the localization of MKS components in wild-type or *B9d2, tctnΔ* mutant *Drosophila* antennae. Fig. S2 shows the dynamics of TZ components in the male germ cells. Fig. S3 completes the phenotypic description of $dila^{81}$; cby^{1} mutant germ cells, including transmission EM analysis, Rab8 expression, and MKS1 or Cep290 expression levels. Fig. S4 shows IF analysis and quantification of MKS and Cep290 components in cby^{1} or $dila^{81}$ mutant male germ cells. Fig. S5 completes the phenotypic description of Klp59D KD testes, including EM observations. Online supplemental material is available at http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201603086/DC1.

Acknowledgments

We thank R. Basto and M. Delattre for helpful discussions. We are grateful to A. Jarman for sharing the $dila^{81}$ mutant. We thank J. Brill for the PLCδPH-mRFP *Drosophila* stock, T. Avidor-Reiss for the Ana1::GFP and Cep290::GFP *Drosophila* stocks, and K. Rogowski and O. Blard for the unpublished Klp59D antibody. Many thanks to T. Noguchi for training M. Paschaki in germ cyst cultures and to P. Thérond for sharing unpublished observations. We thank C. Maire for her excellent technical support and I. Kimura for help with the *Drosophila* husbandry. We thank C. Chamot, C. Lyonnet (PLATIM), C. Vanbelle, and A. Bouchardon (Ciqle) for help in imaging acquisition. EM observations were performed at the CTμ (University Lyon 1).

This work was supported by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20131029168) and the Agence National de la Recherche (Obeli-X). J. Vieillard and C. Augière are supported by a PhD fellowship from the University of Lyon 1. M. Paschaki was

Downloaded from on March 19, 2017

Published September 19, 2016

supported by a fellowship from the groupements de recherche Centre National de la Recherche Scientifique "cil" and by the Bonus Qualité Recherche from the University of Lyon 1.

The authors declare no competing financial interests.

Submitted: 24 March 2016
Accepted: 26 August 2016

References

Avidor-Reiss, T., and M.R. Leroux. 2015. Shared and distinct mechanisms of compartmentalized and cytosolic ciliogenesis. *Curr. Biol.* 25:R1143–R1150. http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.001

Avidor-Reiss, T., A. Khire, E.L. Fishman, and K.H. Jo. 2015. Atypical centrioles during sexual reproduction. *Front. Cell Dev. Biol.* 3:21. http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2015.00021

Badano, J.L., N. Mitsuma, P.L. Beales, and N. Katsanis. 2006. The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 7:125–148. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genom.7.080505.115610

Baker, K., and P.L. Beales. 2009. Making sense of cilia in disease: the human ciliopathies. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 151C:281–295. http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.c.30231

Baker, J.D., S. Adhikarakunnathu, and M.J. Kernan. 2004. Mechanosensory-defective, male-sterile unc mutants identify a novel basal body protein required for ciliogenesis in *Drosophila*. *Development.* 131:3411–3422. http://dx.doi.org/10.1242/dev.01229

Barker, A.R., K.S. Renzaglia, K. Fry, and H.R. Dawe. 2014. Bioinformatic analysis of ciliary transition zone proteins reveals insights into the evolution of ciliopathy networks. *BMC Genomics.* 15:531. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-531

Basiri, M.L., A. Ha, A. Chadha, N.M. Clark, A. Polyanovsky, B. Cook, and T. Avidor-Reiss. 2014. A migrating ciliary gate compartmentalizes the site of axoneme assembly in *Drosophila* spermatids. *Curr. Biol.* 24:2622–2631. http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.047

Bialas, N.J., P.N. Inglis, C. Li, J.F. Robinson, J.D.K. Parker, M.P. Healey, E.E. Davis, C.D. Inglis, T. Toivonen, D.C. Cottell, et al. 2009. Functional interactions between the ciliopathy-associated Meckel syndrome 1 (MKS1) protein and two novel MKS1-related (MKSR) proteins. *J. Cell Sci.* 122:611–624. http://dx.doi.org/10.1242/jcs.028621

Bischof, J., M. Björklund, E. Furger, C. Schertel, J. Taipale, and K. Basler. 2013. A versatile platform for creating a comprehensive UAS-ORFeome library in *Drosophila*. *Development.* 140:2434–2442. http://dx.doi.org/10.1242/dev.088757

Blachon, S., X. Cai, K.A. Roberts, K. Yang, A. Polyanovsky, A. Church, and T. Avidor-Reiss. 2009. A proximal centriole-like structure is present in *Drosophila* spermatids and can serve as a model to study centriole duplication. *Genetics.* 182:133–144. http://dx.doi.org/10.1534/genetics.109.101709

Blaineau, C., M. Tessier, P. Dubessay, L. Tasse, L. Crobu, M. Pagès, and P. Bastien. 2007. A novel microtubule-depolymerizing kinesin involved in length control of a eukaryotic flagellum. *Curr. Biol.* 17:778–782. http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2007.03.048

Brown, J.M., and G.B. Witman. 2014. Cilia and diseases. *Bioscience.* 64:1126–1137. http://dx.doi.org/10.1093/biosci/biu174

Burke, M.C., F.-Q. Li, B. Cyge, T. Arashiro, H.M. Brechbuhl, X. Chen, S.S. Siller, M.A. Weiss, C.B. O'Connell, D. Love, et al. 2014. Chibby promotes ciliary vesicle formation and basal body docking during airway cell differentiation. *J. Cell Biol.* 207:123–137. http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201406140

Carvalho-Santos, Z., P. Machado, I. Alvarez-Martins, S.M. Gouveia, S.C. Jana, P. Duarte, T. Amado, P. Branco, M.C. Freitas, S.T.N. Silva, et al. 2012. BLD10/CEP135 is a microtubule-associated protein that controls the formation of the flagellum central microtubule pair. *Dev. Cell.* 23:412–424. http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2012.06.001

Chamling, X., S. Seo, C.C. Searby, G. Kim, D.C. Slusarski, and V.C. Sheffield. 2014. The centriolar satellite protein AZI1 interacts with BBS4 and regulates ciliary trafficking of the BBSome. *PLoS Genet.* 10:e1004083. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004083

Chan, K.Y., and K. Ersfeld. 2010. The role of the Kinesin-13 family protein TbKif13-2 in flagellar length control of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 174:137–140. http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.08.001

Chen, D., and D.M. McKearin. 2003. A discrete transcriptional silencer in the bam gene determines asymmetric division of the *Drosophila* germline stem cell. *Development.* 130:1159–1170. http://dx.doi.org/10.1242/dev.00325

Chih, B., P. Liu, Y. Chinn, C. Chalouni, L.G. Komuves, P.E. Hass, W. Sandoval, and A.S. Peterson. 2011. A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain. *Nat. Cell Biol.* 14:61–72. http://dx.doi.org/10.1038/ncb2410

Czarnecki, P.G., and J.V. Shah. 2012. The ciliary transition zone: from morphology and molecules to medicine. *Trends Cell Biol.* 22:201–210. http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2012.02.001

Dawson, S.C., M.S. Sagolla, J.J. Mancuso, D.J. Woessner, S.A. House, L. Fritz-Laylin, and W.Z. Cande. 2007. Kinesin-13 regulates flagellar, interphase, and mitotic microtubule dynamics in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot. Cell.* 6:2354–2364. http://dx.doi.org/10.1128/EC.00128-07

Delgehyr, N., H. Rangone, J. Fu, G. Mao, B. Tom, M.G. Riparbelli, G. Callaini, and D.M. Glover. 2012. Klp10A, a microtubule-depolymerizing kinesin-13, cooperates with CP110 to control *Drosophila* centriole length. *Curr. Biol.* 22:502–509. http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.046

Dunst, S., T. Kazimiers, F. von Zadow, H. Jambor, A. Sagner, B. Brankatschk, A. Mahmoud, S. Spannl, P. Tomancak, S. Eaton, and M. Brankatschk. 2015. Endogenously tagged rab proteins: a resource to study membrane trafficking in *Drosophila*. *Dev. Cell.* 33:351–365. http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2015.03.022

Enjolras, C., J. Thomas, B. Chhin, E. Cortier, J.L. Duteyrat, F. Soulavie, M.J. Kernan, A. Laurençon, and B. Durand. 2012. *Drosophila* chibby is required for basal body formation and ciliogenesis but not for Wg signaling. *J. Cell Biol.* 197:313–325. http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201109148

Fabian, L., and J.A. Brill. 2012. *Drosophila* spermiogenesis: big things come from little packages. *Spermatogenesis.* 2:197–212. http://dx.doi.org/10.4161/spmg.21798

Franz, A., H. Roque, S. Saurya, J. Dobbelaere, and J.W. Raff. 2013. CP110 exhibits novel regulatory activities during centriole assembly in Drosophila. *J. Cell Biol.* 203:785–799. http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201305109

Galletta, B.J., R.X. Guillen, C.J. Fagerstrom, C.W. Brownlee, D.A. Lerit, T.L. Megraw, G.C. Rogers, and N.M. Rusan. 2014. *Drosophila* pericentrin requires interaction with calmodulin for its function at centrosomes and neuronal basal bodies but not at sperm basal bodies. *Mol. Biol. Cell.* 25:2682–2694. http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E13-10-0617

Garcia-Gonzalo, F.R., K.C. Corbit, M.S. Sirerol-Piquer, G. Ramaswami, E.A. Otto, T.R. Noriega, A.D. Seol, J.F. Robinson, C.L. Bennett, D.J. Josifova, et al. 2011. A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nat. Genet.* 43:776–784. http://dx.doi.org/10.1038/ng.891

Gogendeau, D., and R. Basto. 2010. Centrioles in flies: the exception to the rule? *Semin. Cell Dev. Biol.* 21:163–173. http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.07.001

Gottardo, M., G. Callaini, and M.G. Riparbelli. 2013. The cilium-like region of the *Drosophila* spermatocyte: an emerging flagellum? *J. Cell Sci.* 126:5441–5452. http://dx.doi.org/10.1242/jcs.136523

Gratz, S.J., F.P. Ukken, C.D. Rubinstein, G. Thiede, L.K. Donohue, A.M. Cummings, and K.M. O'Connor-Giles. 2014. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. *Genetics.* 196:961–971. http://dx.doi.org/10.1534/genetics.113.160713

Hall, E.A., M. Keighren, M.J. Ford, T. Davey, A.P. Jarman, L.B. Smith, I.J. Jackson, and P. Mill. 2013. Acute versus chronic loss of mammalian Azi1/Cep131 results in distinct ciliary phenotypes. *PLoS Genet.* 9:e1003928. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1003928

Han, Y.-G., B.H. Kwok, and M.J. Kernan. 2003. Intraflagellar transport is required in *Drosophila* to differentiate sensory cilia but not sperm. *Curr. Biol.* 13:1679–1686. http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2003.08.034

Hu, Q., and W.J. Nelson. 2011. Ciliary diffusion barrier: the gatekeeper for the primary cilium compartment. *Cytoskeleton (Hoboken).* 68:313–324. http://dx.doi.org/10.1002/cm.20514

Hu, Z., Y. Liang, D. Meng, L. Wang, and J. Pan. 2015. Microtubule-depolymerizing kinesins in the regulation of assembly, disassembly, and length of cilia and flagella. *In* International Review of Cell and Molecular Biology. K.W. Jeon, editor. Elsevier, New York. 241–265.

Huang, J., W. Zhou, A.M. Watson, Y.-N. Jan, and Y. Hong. 2008. Efficient ends-out gene targeting in *Drosophila*. *Genetics.* 180:703–707. http://dx.doi.org/10.1534/genetics.108.090563

Jana, S.C., M. Bettencourt-Dias, B. Durand, and T.L. Megraw. 2016. *Drosophila melanogaster* as a model for basal body research. *Cilia.* 5:22. PudbMedhttp://dx.doi.org/10.1186/s13630-016-0041-5

Downloaded from on March 19, 2017

Published September 19, 2016

Jensen, V.L., C. Li, R.V. Bowie, L. Clarke, S. Mohan, O.E. Blacque, and M.R. Leroux. 2015. Formation of the transition zone by Mks5/Rpgrip1L establishes a ciliary zone of exclusion (CIZE) that compartmentalises ciliary signalling proteins and controls PIP2 ciliary abundance. *EMBO J.* 34:2537–2556. http://dx.doi.org/10.15252/embj.201488044

Klebba, J.E., D.W. Buster, A.L. Nguyen, S. Swatkoski, M. Gucek, N.M. Rusan, and G.C. Rogers. 2013. Polo-like kinase 4 autodestructs by generating its Slimb-binding phosphodegron. *Curr. Biol.* 23:2255–2261. http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.019

Kobayashi, T., W.Y. Tsang, J. Li, W. Lane, and B.D. Dynlacht. 2011. Centriolar kinesin Kif24 interacts with CP110 to remodel microtubules and regulate ciliogenesis. *Cell.* 145:914–925. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.028

Kondo, S., and R. Ueda. 2013. Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics.* 195:715–721. http://dx.doi.org/10.1534/genetics.113.156737

Lee, Y.L., J. Santé, C.J. Comerci, B. Cyge, L.F. Menezes, F.-Q. Li, G.G. Germino, W.E. Moerner, K. Takemaru, and T. Stearns. 2014. Cby1 promotes Ahi1 recruitment to a ring-shaped domain at the centriole-cilium interface and facilitates proper cilium formation and function. *Mol. Biol. Cell.* 25:2919–2933. http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E14-02-0735

Li, C., V.L. Jensen, K. Park, J. Kennedy, F.R. Garcia-Gonzalo, M. Romani, R. De Mori, A.-L. Bruel, D. Gaillard, B. Doray, et al. 2016. MKS5 and CEP290 dependent assembly pathway of the ciliary transition zone. *PLoS Biol.* 14:e1002416. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1002416

Ma, L., and A.P. Jarman. 2011. Dilatory is a *Drosophila* protein related to AZI1 (CEP131) that is located at the ciliary base and required for cilium formation. *J. Cell Sci.* 124:2622–2630. http://dx.doi.org/10.1242/jcs.084798

Martinez-Campos, M., R. Basto, J. Baker, M. Kernan, and J.W. Raff. 2004. The *Drosophila* pericentrin-like protein is essential for cilia/flagella function, but appears to be dispensable for mitosis. *J. Cell Biol.* 165:673–683. http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200402130

Moores, C.A., and R.A. Milligan. 2006. Lucky 13-microtubule depolymerisation by kinesin-13 motors. *J. Cell Sci.* 119:3905–3913. http://dx.doi.org/10.1242/jcs.03224

Noguchi, T., M. Koizumi, and S. Hayashi. 2011. Sustained elongation of sperm tail promoted by local remodeling of giant mitochondria in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 21:805–814. http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2011.04.016

Phillips, D.M. 1970. Insect sperm: their structure and morphogenesis. *J. Cell Biol.* 44:243–277. http://dx.doi.org/10.1083/jcb.44.2.243

Reiter, J.F., O.E. Blacque, and M.R. Leroux. 2012. The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO Rep.* 13:608–618. http://dx.doi.org/10.1038/embor.2012.73

Riparbelli, M.G., G. Callaini, and T.L. Megraw. 2012. Assembly and persistence of primary cilia in dividing *Drosophila* spermatocytes. *Dev. Cell.* 23:425–432. http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2012.05.024

Riparbelli, M.G., O.A. Cabrera, G. Callaini, and T.L. Megraw. 2013. Unique properties of *Drosophila* spermatocyte primary cilia. *Biol. Open.* 2:1137–1147. http://dx.doi.org/10.1242/bio.20135355

Rogers, G.C., S.L. Rogers, T.A. Schwimmer, S.C. Ems-McClung, C.E. Walczak, R.D. Vale, J.M. Scholey, and D.J. Sharp. 2004. Two mitotic kinesins cooperate to drive sister chromatid separation during anaphase. *Nature.* 427:364–370. http://dx.doi.org/10.1038/nature02256

Sang, L., J.J. Miller, K.C. Corbit, R.H. Giles, M.J. Brauer, E.A. Otto, L.M. Baye, X. Wen, S.J. Scales, M. Kwong, et al. 2011. Mapping the NPHP-JBTS-MKS protein network reveals ciliopathy disease genes and pathways. *Cell.* 145:513–528. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.019

Sarpal, R., S.V. Todi, E. Sivan-Loukianova, S. Shirolikar, N. Subramanian, E.C. Raff, J.W. Erickson, K. Ray, and D.F. Eberl. 2003. *Drosophila* KAP interacts with the kinesin II motor subunit KLP64D to assemble chordotonal sensory cilia, but not sperm tails. *Curr. Biol.* 13:1687–1696. http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2003.09.025

Schouteden, C., D. Serwas, M. Palfy, and A. Dammermann. 2015. The ciliary transition zone functions in cell adhesion but is dispensable for axoneme assembly in *C. elegans*. *J. Cell Biol.* 210:35–44. http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201501013

Shi, J., Y. Zhao, D. Galati, M. Winey, and M.W. Klymkowsky. 2014. Chibby functions in Xenopus ciliary assembly, embryonic development, and the regulation of gene expression. *Dev. Biol.* 395:287–298. http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.09.008

Sung, C.-H., and M.R. Leroux. 2013. The roles of evolutionarily conserved functional modules in cilia-related trafficking. *Nat. Cell Biol.* 15:1387–1397. http://dx.doi.org/10.1038/ncb2888

Szymanska, K., and C.A. Johnson. 2012. The transition zone: an essential functional compartment of cilia. *Cilia.* 1:10. http://dx.doi.org/10.1186/2046-2530-1-10

Tates, A.1971. Cytodifferentiation during spermatogenesis in Drosophila melanogaster: an electron microscope study. PhD thesis. Rijksuniversiteit Leiden. 1–162.

Vasudevan, K.K., Y.-Y. Jiang, K.F. Lechtreck, Y. Kushida, L.M. Alford, W.S. Sale, T. Hennessey, and J. Gaertig. 2015. Kinesin-13 regulates the quantity and quality of tubulin inside cilia. *Mol. Biol. Cell.* 26:478–494. http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E14-09-1354

Vieillard, J., J.-L. Duteyrat, E. Cortier, and B. Durand. 2015. Imaging cilia in Drosophila melanogaster. *Methods Cell Biol.* 127:279–302. http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2014.12.009

Villumsen, B.H., J.R. Danielsen, L. Povlsen, K.B. Sylvestersen, A. Merdes, P. Beli, Y.G. Yang, C. Choudhary, M.L. Nielsen, N. Mailand, and S. Bekker-Jensen. 2013. A new cellular stress response that triggers centriolar satellite reorganization and ciliogenesis. *EMBO J.* 32:3029–3040. http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2013.223

Voronina, V.A., K. Takemaru, P. Treuting, D. Love, B.R. Grubb, A.M. Hajjar, A. Adams, F.-Q. Li, and R.T. Moon. 2009. Inactivation of Chibby affects function of motile airway cilia. *J. Cell Biol.* 185:225–233. http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200809144

Wang, L., T. Piao, M. Cao, T. Qin, L. Huang, H. Deng, T. Mao, and J. Pan. 2013. Flagellar regeneration requires cytoplasmic microtubule depolymerization and kinesin-13. *J. Cell Sci.* 126:1531–1540. http://dx.doi.org/10.1242/jcs.124255

Wei, H.-C., J. Rollins, L. Fabian, M. Hayes, G. Polevoy, C. Bazinet, and J.A. Brill. 2008. Depletion of plasma membrane PtdIns(4,5)P2 reveals essential roles for phosphoinositides in flagellar biogenesis. *J. Cell Sci.* 121:1076–1084. http://dx.doi.org/10.1242/jcs.024927

Williams, C.L., C. Li, K. Kida, P.N. Inglis, S. Mohan, L. Semenec, N.J. Bialas, R.M. Stupay, N. Chen, O.E. Blacque, et al. 2011. MKS and NPHP modules cooperate to establish basal body/transition zone membrane associations and ciliary gate function during ciliogenesis. *J. Cell Biol.* 192:1023–1041. http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201012116

Yee, L.E., F.R. Garcia-Gonzalo, R.V. Bowie, C. Li, J.K. Kennedy, K. Ashrafi, O.E. Blacque, M.R. Leroux, and J.F. Reiter. 2015. Conserved genetic interactions between ciliopathy complexes cooperatively support ciliogenesis and ciliary signaling. *PLoS Genet.* 11:e1005627. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1005627

Downloaded from on March 19, 2017