N°d'ordre NNT : 2017LYSE1202

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 29/09/2017, par :
Céline Augière

Caractérisation fonctionnelle des protéines des appendices du corps basal et de la zone de transition

---

Devant le jury composé de :

Mme TOURE, Aminata	Directrice de recherche	CNRS	Rapporteure
Mme TASSIN, Anne-Marie	Directrice de recherche	CNRS	Rapporteure
Mr BASTIN, Philippe	Directeur de recherche	INSERM	Rapporteur
Mr MOLLEREAU, Bertrand	Professeur des universités	ENS de Lyon	Examinateur
Mme DURAND, Bénédicte	Professeure des universités	UCBL	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 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Ce manuscrit représente trois années de thèse passées dans un laboratoire où rien n'aurait été possible sans toutes les personnes qui le compose. Je souhaite donc dresser un certain nombre de remerciements à toutes les personnes que j'ai côtoyées de près ou de loin.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de l'Université Lyon 1 et de l'école doctorale BMIC, qui m'ont permis, grâce à une bourse d'allocation doctorale de recherches de me consacrer sereinement à l'élaboration de ma thèse.

Dans un premier temps, je souhaiterais remercier mes 3 rapporteurs qui ont acceptés d'évaluer mon travail Aminata Touré, Anne-Marie Tassin, Philippe Bastin (un merci particulier à Philippe pour sa reactivité). Je remercie également Bertrand Mollereau qui a accepté d'être examinateur.
Je souhaite également remercier Vincent Gache et Philippe Bastin, membres de mon comité de suivi de thèse pour leur discussion efficace sur mon projet de thèse.

Je tiens ensuite à adresser mes remerciements à Bénédicte, ma directrice de thèse, qui m'a fait confiance pour mener à bien ce projet et qui m'a permis d'en arriver là, en me poussant pour toujours aller au-delà de mes limites.

Tous les membres de l'équipe passés et présents avec qui, forcément, j'ai partagé beaucoup de choses ; un grand merci à mon « binôme » de thèse Jean André pour ta sympathie, ton amitié, ton soutien, tes blagues, tes goûts musicaux, tes histoires enfantines, bref pour ton âme d'enfant ! Je me souviendrais toujours de ton tapis roulant, où tout se retrouve sur ta paillasse ! Merci pour ta bonne humeur et ta convivialité.
Je voudrais remercier Amélie B., qui a été ma première stagiaire et qui a maintenant bien grandi, petit oisillon est prêt à prendre son envol, je te souhaite toute la chance et le bonheur du monde pour le début de ta thèse !
Je souhaite remercier Elisabeth qui est la personne la plus bienveillante du monde (après ma maman bien sur !) qui a toujours une phrase gentille pour remonter le moral, merci pour tout ce que tu fais, tu es extraordinaire. Je te remercie Marie pour ta bienveillance surtout dans les derniers moments difficiles. Je te remercie Dominique pour tes conseils avisés dans le début de l'écriture de cette thèse, et aussi pour toutes les choses non scientifiques que nous avons échangé pendant ces 3 années, reste comme tu es dynamique et efficace, et surtout continue les petits gâteaux de Noël, c'est toujours un plaisir ! Je voudrais également remercier Jean Luc pour les bons moments passés ensemble autour d'une table ainsi que pour ton aide précieuse en microscopie. Un merci à Joëlle pour ton aide précieuse et tes connaissances en Bio mol, je n'aurais pas pu aimer autant le clonage sans toi c'est certain ; le puzzle, ça détend !
Je remercie également Elisabeth R. et Jéjé pour leur contribution totale à une humeur détendue lors des repas.
Je remercie également les membres de l'équipe passés, Amélie AR., Matthieu, Jennifer avec qui j'ai également beaucoup partagé, scientifiquement ou non. Je souhaite remercier particulièrement Julie, avec qui tout cela a commencé, pour mon premier grand plongeon, avec les poissons zèbres, dans le monde de la recherche.

Je tiens à vous dire que j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler au quotidien avec vous tous.

J'adresse de chaleureux remerciements à tous les membres de l'INMG et l'ancien CGphiMC que j'ai pu côtoyer au cours de ces années ainsi qu'aux membres de l'équipe pédagogique de génétique avec lesquels j'ai eu la chance d'enseigner pendant 3 ans et qui a été une expérience fort enrichissante qui a confirmé le plaisir que j'ai toujours eu à enseigner, guider et pousser étudiants et jeunes, à donner le meilleur d'eux même.
Enfin, je remercie toutes les petites drosophiles qui m'ont gracieusement offert leur testis et sont mortes pour la science pendant ces 3 années et demie passées au laboratoire !

Je souhaite adresser ma plus grande gratitude à Charline, qui a toujours été là pour moi, merci à toi d'être comme tu es, géniale. Je tiens à te remercier du fond du cœur pour tous les moments partagés et à venir, ta présence me manque profondément !
Merci à toi, Iliana, qui me manque énormément, avec qui j'ai partagé tant de choses, depuis le master, on a un peu fait les 400 coups ensemble, avec Diane, nous formions un trio de choc et c'est sans aucun doute les meilleurs souvenirs de toute ma scolarité ! Merci d'être toujours là pour moi.

Un grand merci à ma tatie, mon tonton, mes cousins et cousines, ma mamie, ma marraine et aussi Joël, Sylvie qui m'ont toujours écouté et ont toujours été intéressé par mon sujet de recherche.
Je te remercie chaleureusement Fadéla pour toutes ces années passées ensemble, tu m'as toujours appris depuis mon plus jeune âge la rigueur dans le sport et dans la vie.
Merci également à mes beaux-parents et Marie Eloïse qui m'ont toujours écouté avec attention parler de mon projet de thèse !

Le plus grand merci revient à mes parents sans qui je ne serais pas là aujourd'hui, qui m'ont toujours soutenu et porté pour que je puisse toujours donner le meilleur de moi-même dans quoi que je fasse dans la vie. Merci également à toi Vincent, mon petit frère pour tous ces moments passés ensemble.
Je souhaite remercier ma mémé Simone, qui serait très fière de moi j'en suis sûre ; tu me manques tellement, j'aurais aimé que tu sois là aujourd'hui.

Tim, tu es peut-être celui qui a suivi de plus près mon écriture, merci pour ton amour absolu et tes ronrons affectueux qui permettent, on ne le dira jamais assez, d'avoir une pensée réfléchie et productive.

Enfin, un grand MERCI à Aurélien, mon futur mari pour ton amour inconditionnel et ton véritable soutien au cours de ces années. Merci de m'avoir aidé à affronter les moments difficiles (et je sais que tu as été compréhensif ces derniers temps !) et d'avoir savouré avec moi les bons moments. Ce n'est que le début…

J'oublie certainement des personnes à remercier et j'en suis désolée.
Encore un grand merci à tous pour m'avoir conduit jusqu'à ce jour mémorable !

Table des matières

Remerciements **5**

Liste des Figures **9**

Liste des abréviations **11**

Résumé **12**

Summary **12**

Chapitre 1 : Introduction **13**

I. EVOLUTION : Le cil, un organite conservé chez les eucaryotes *13*

1. Histoire et découverte 13
2. Organisation des composants ciliaires 15
3. Le cil ancestral chez LECA 16
4. Fonctions des cils 18

4.1-Les cils motiles 18

4.2-Les cils primaires ou non motiles 18

5. Les ciliopathies 19

II. STRUCTURE : Ultrastructure des cils *21*

1. Les corps basaux, centrioles modifiés 21

1.1- Les appendices subdistaux /pied basal 23

1.1.1- Composition et assemblage 23

1.1.2- Conservation des composants 24

1.2- Les appendices distaux /fibres de transition 24

1.2.1- Composition et assemblage 24

1.2.2- Conservation des composants 27

2. La racine ciliaire 28
3. La zone de transition (ZT) 29

3.1- Architecture et composition des complexes protéiques 29

4. La poche ciliaire 30
5. Le compartiment ciliaire, axonème et membrane ciliaire 30

5.1- Le compartiment de l'Inversine 30

5.2- La membrane ciliaire 30

5.3- Composition de l'axonème et protéines accessoires 30

5.3.1- Axonème des cils immotiles 30

5.3.2- Axonème des cils motiles 31

5.3.3 Modifications post traductionnelles des tubulines 33

5.4- Zone des singlets 34

5.5- La partie distale du cil, l'extrémité ciliaire et la couronne ciliaire 35

III. GENESE : La ciliogenèse *36*

1. Réplication des centrioles 36
2. Réplication des centrioles dans le cas des cellules multiciliées 37
3. Différents types de ciliogenèse 38

3.1-La maturation du centriole père en corps basal 39

3.2-Les appendices subdistaux jouent un rôle dans l'ancrage du centriole au cytosquelette 41

3.3- Ciliogenèse intracellulaire 42

3.3.1-Rôle des fibres de transition dans l'initiation de la ciliogenèse 42

3.3.2- Formation de la vésicule ciliaire primitive : rôle clé de Rab-8 43

3.3.2- Retrait des protéines « inhibitrices » de la ciliogenèse 44

CP110 et son partenaire CEP97 44

Trichopléine 45

OFD1 45

Autres protéines impliquées dans la ciliogenèse précoce 45

3.3.3-Formation de la zone de transition 47

Les protéines du module CEP290 47

Les protéines du module NPHP 47

Les protéines du module MKS ... 48
Autres protéines de la zone de transition ... 49
Fonctions de la zone de transition ... 51
3.3.4- Migration à la membrane plasmique ... 53
3.3.5- IFT et transport des protéines ... 53
3.3.6- Le BBSome ... 55
3.3.7- Adressage des constituants ciliaires vers le cil. ... 55
Constituants du cytosol ... 55
Constituants membranaires ... 56
3.4- Ciliogenèse extracellulaire ... 57
3.5- Ciliogenèse cytosolique ... 57
3.5.1- Ciliogenèse cytosolique primaire ... 58
Formation de l'axonème au cours de la spermatogenèse des mammifères ... 59
Formation de l'axonème au cours de la spermatogenèse de Giardia ... 60
3.5.2- Ciliogenèse cytosolique secondaire : Allongement du flagelle de spermatozoïde de drosophile ... 61
3.5.3- Ciliogenèse cytosolique tertiaire : Allongement du flagelle de spermatozoïde de *Plasmodium* ... 61
3.5.4- Un autre type de ciliogenèse cytosolique ... 61
IV. La DROSOPHILE : un modèle efficace pour l'étude des cils ... 62
1. Structure des centrioles chez la drosophile et organes ciliés ... 62
1.1- Indifférence structurelle des centrioles pères et fils chez la drosophile ... 63
Appendices distaux et subdistaux chez la drosophile : conservation protéique ... 63
1.2- Organes ciliés ... 65
1.2.1- Les organes sensoriels externes ... 66
1.2.2- Les organes chordotonaux ... 67
1.2.3- Au cours de la spermatogenèse, la formation du flagelle motile ... 69
Aspects généraux de la spermatogenèse chez la drosophile (structure polarisée du testicule) ... 69
Division asymétrique des cellules souches : initiation de la spermatogenèse ... 70
Formation des corps basaux à partir de tous les centrioles sans distinction structurale entre les centrioles pères et fils ... 71
Ancrage du corps basal à la membrane plasmique et au noyau pendant la méiose ... 72
Croissance de l'axonème et la zone de transition : la ciliogénèse cytosolique secondaire ... 73
Modifications post traductionnelles des microtubules ... 76
Morphogenèse du noyau ... 76
*Condensation de la chromatine ... 76
*Morphogenèse du noyau ... 78
Individualisation des spermatides : Production des spermatozoïdes matures ... 79
*La progression des complexes d'individualisation ... 80
*Remodelage des protéines membranaires ... 82
*Voie des caspases non apoptotiques ... 83
Enroulement des spermatozoïdes et transport dans la vésicule séminale ... 85
V. Objectifs de la Thèse ... 85

Chapitre 2 Résultats ... 88
1. Caractérisation fonctionnelle des protéines orthologues des appendices distaux chez la drosophile ... 88
Introduction ... 88
Résultats ... 91
Localisation des protéines orthologues des fibres de transition dans les tissus ciliés de la drosophile ... 91
La protéine CEP162 est présente à la ZT dans les cellules ciliées chez la drosophile ... 91
La protéine CEP89 est présente à la base des cils dans le système nerveux périphérique ... 95
La protéine FBF1 est localisée à la base des cils dans le système nerveux périphérique ... 97
Les orthologues de ODF2 ont une localisation particulière dans les tissus ciliés ... 101
Caractérisation fonctionnelle des protéines orthologues des protéines des appendices distaux 107
CEP162 est impliquée dans l'ancrage du corps basal et dans la formation de la ZT au cours de la spermatogenèse chez la *Drosophile* ... 108

Les autres protéines orthologues des protéines des fibres de transition jouent un rôle tardif dans la ciliogenèse 110
Le double mutant CG8851-CG3213 ne présente pas de défaut de la ciliogenèse au cours de la spermatogenèse 111
Discussion 115
2. Article : Caractérisation de Salto, un gène essentiel pour la spermatogenèse 125
3. Crible protéomique : FAM92, une protéine interagissant avec Chibby chez les mammifères et chez la drosophile 150
Discussion générale et perspectives 191
Conclusion 197
Références bibliographiques 198

Liste des Figures

Figure 1 Images de microscopie électronique à balayage illustrant différents types de cellules ciliées et flagellées 14
Figure 2 Organisation des composants ciliaires 16
Figure 3 Le cil ancestral chez LECA 17
Figure 4 Schéma représentant la diversité des organes atteints par un dysfonctionnement du cil primaire ou motile conduisant à une ciliopathie. 20
Figure 5 Structure du centrosome 22
Figure 6 Organisation protéique des appendices subdistaux 24
Figure 7 Organisation des appendices distaux 27
Figure 8 Axonème des cils non motiles 31
Figure 9 Structures additionnelles des axonèmes motiles 33
Figure 10 Représentation schématique des dimères de tubuline α et β et leurs modifications post traductionnelles 34
Figure 11 La partie distale du cil, la couronne ciliaire 35
Figure 12 Schéma illustrant le processus de réplication des centrioles ainsi que les acteurs impliqués 37
Figure 13 Schéma illustrant les deux voies de ciliogenèse compartimentalisée : la voie extracellulaire et intracellulaire 39
Figure 14 La maturation du centriole père en corps basal et la fonction des protéines des appendices subdistaux 41
Figure 15 Schéma du processus de ciliogénèse ainsi que les acteurs impliqués 46
Figure 16 Organisation des complexes protéiques de la zone de transition des cils 48
Figure 17 La barrière de diffusion des cils 52
Figure 18 Organisation de l'IFT 54
Figure 19 Modèle du trafic à la membrane ciliaire par les protéines Tubby 57
Figure 20 Schéma illustrant les différents modes de ciliogenèse cytosolique. 58
Figure 21 Assemblage du flagelle au cours de la spermatogenèse chez les mammifères 60
Figure 22 Structure du centrosome avec les protéines conservées chez la drosophile 62
Figure 23 Conservation des protéines des appendices du centriole chez la drosophile 64
Figure 24 Localisation des neurones du système nerveux périphériques chez la drosophile 65
Figure 25 Un type de cil chez la drosophile, les neurones sensoriels externes, un rôle mécano sensoriel 67
Figure 26 Un second type de cil, les neurones chordotonaux, un rôle dans l'audition 69
Figure 27 Appareil reproducteur mâle chez la drosophile 70
Figure 28 Structure et voies de signalisation impliquées dans le hub des testis de drosophile 71
Figure 29 La spermatogenèse chez la drosophile 74
Figure 30 Evènements clés du remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse 77
Figure 31 Morphogenèse du noyau 78
Figure 32 Individualisation des spermatides 80
Figure 33 Organisation protéique du cône d'actine 81

Figure 34 Voies des caspases non apoptotiques 84
Figure 35 Illustration des orthologues étudiés 89
Figure 36 Comparaison des séquences protéiques de CEP162 92
Figure 37 La protéine CEP162 est localisée à la ZT des cils dans le système nerveux périphérique 93
Figure 38 Localisation en 3D SIM de CEP162 par rapport à Chibby au cours de la spermatogenèse 93
Figure 39 CEP162 possède des localisations supplémentaires dans des stades tardifs de la spermatogenèse 94
Figure 40 Comparaison des séquences protéiques de CEP89 96
Figure 41 CEP89 est localisée à la base des cils dans le système nerveux périphérique 97
Figure 42 Comparaison des séquences protéiques de FBF1 98
Figure 43 FBF1 est localisée à la base des cils dans le système nerveux periphérique 99
Figure 44 FBF1 est une protéine vésiculaire localisée à proximité des vésicules de l'appareil de Golgi 100
Figure 45 Comparaison des séquences protéiques ODF2 102
Figure 46 Bilan des constructions réalisées et testées pour CG8851 et CG3213 104
Figure 47 Les orthologues de ODF2, CG3213 et CG8851 ne sont pas détectables dans les neurones sensoriels de type 1 105
Figure 48 CG8851 est localisée dans les spermatides allongées en amont de la ZT 106
Figure 49 Schéma bilan sur la localisation des protéines orthologues des protéines des fibres de transition dans les tissus ciliés de la drosophile 107
Figure 50 Perte quasi totale de la protéine CEP162 ::GFP après expression d'un shARN dirigé contre CEP162 108
Figure 51 La perte de CEP162 conduit à des défauts d'ancrage des corps basaux et de formation de la ZT au cours de la spermatogenèse 109
Figure 52 Les protéines FBF1, CEP89, C2CD3 et SDCCAG8 sont nécessaires pour la ciliogenèse 110
Figure 53 Le simple mutant CG8851 présente une ciliogenèse normale 111
Figure 54 Représentation schématique de la délétion réalisée par l'excision de l'élément transposable de type Minos 112
Figure 55 Le double mutant ODF2 est stérile et présente des défauts au cours de l'individualisation 113
Figure 56 La myosine VI est bien localisée à la base des cônes d'actine dans le double mutant ODF2 114
Figure 57 La protéine CEP162 est bien localisée à la base des cônes d'actine dans le double mutant ODF2 115
Figure 58 Images illustrant la localisation de TTLL13::TdTom dans les spermatides au cours de la spermatogenèse 122
Figure 59 L'absence de l'orthologue TTLL13 chez la drosophile conduit à une stérilité des males associés à des défauts dans les spermatides tardives 123

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
APEX : Engineered ascorbate peroxidase
ARNi : ARN interférence
BAR : Bin/amphiphysin/Rvs
BBS : Syndrome de Bardet Biedl
CEP : Protéine centriolaire
CLS : Signal de localisation ciliaire
COMT : Centre organisateur des microtubules
CRL3 : Complexe Cullin ring 3
DAV : Vésicule des appendices distaux
FGF : Fibroblast Growth Factor
GDP : Guanosine diphosphate
GTP : Guanosine triphosphate
hTERT-RPE1 : Cellules épithéliales pigmentaires de la rétine immortalisées par hTERT
IFT : Transport intraflagellaire
IMCD3 : Cellules du canal collecteur médullaire interne des reins
JBTS : Syndrome de Joubert
LECA : Dernier ancêtre commun eucaryote
MEF : Fibroblaste embryonnaire de souris
MKS : Syndrome de Meckel
NLS : Signal de localisation nucléaire
NPHP : Néphronopthise
OFD : Oro-facial-digital
PC1 : Polycystine 1
PCM : Matrice péricentriolaire
PCV : Vésicule cilaire primaire
PDGFR : Platelet derived growth factor
PNS : Système nerveux périphérique
SHH/Hh : Sonic HedgeHog
SILAC : Stable isotope labeling with amino acid in cell culture
SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor
SNBP : Protéines basiques nucléaires
TGN : Réseau trans du Golgi
TMEM : Transmembranaire
TTL : Tubuline Tyrosine Ligase
TTLL : Tubuline Tyrosine Ligase Like
Wnt : Voie de signalisation Wnt
ZT : Zone de transition

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 l'assemblage du cil 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. La zone de transition comprend les fibres de transition qui font le lien entre le centriole et la membrane plasmique, puis les liens Y avec une composition protéique complexe organisée en 3 complexes, 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 leurs interconnections ne sont pas connues.

Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé fonctionnellement les orthologues des protéines des fibres de transition et analysé la fonction de nouvelles protéines de la zone de transition en utilisant le modèle de la drosophile. La localisation et le rôle de certaines protéines sont similaires aux mammifères alors que d'autres révèlent une localisation et un rôle inattendu. J'ai également caractérisé, Salto, une protéine impliquée dans la spermatogenèse qui est essentielle pour la morphologie des noyaux et l'individualisation des spermatides ainsi que la fertilité des mâles. L'étude de cette protéine amène à une meilleure compréhension de la spermatogenèse chez la drosophile.

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

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. Transition zone is a complex structure located at the ciliary base and is required for proper cilia assembly. 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.

First, I functionally characterized transition fiber proteins and transition zone proteins in *Drosophila*. I identified unexpected role of some of them revealing potential new functions during spermatogenesis. I also characterized Salto, identified as a potential chibby interactor, and showed that it is required for properly shaping the spermatid head during spermatogenesis and hence for spermatid individualisation and male fertility.

To conclude this work brings new insights into the understanding of transition zone assembly and of the mechanisms that control ciliogenesis. It also brings new players involved in *Drosophila* spermiogenesis.

Chapitre 1 : Introduction

I. EVOLUTION : Le cil, un organite conservé chez les eucaryotes

Avant de rentrer dans le vif du sujet de cette thèse ; une brève clarification sur la thématique s'impose. Ici nous ne parlerons pas des cils comme on l'entend en anatomie, des phanères filiformes qui sont des poils poussant à l'extrémité des paupières et ayant pour premier intérêt de limiter l'entrée de corps étrangers dans les yeux et qui pour l'Homme sont aussi devenus une arme indéniable de séduction. Bien que portant le même nom, nous parlerons ici de cils cellulaires ; un cil, en biologie, est une « extension microscopique » de la cellule.

1. Histoire et découverte

Cette première partie décrit la découverte d'un des organites les plus caractéristiques de la cellule eucaryote, le cil.
Nous devons la toute première observation des organismes ciliés à Antoni van Leeuwenhoek, un commerçant et savant néerlandais connu surtout pour les évolutions qu'il a apportées aux lentilles des microscopes à partir de 1671.
C'est ainsi que capable de voir plus et mieux que les autres avec son microscope amélioré, il s'est intéressé au monde qui l'entourait. On retiendra notamment qu'il a été le premier à découvrir les spermatozoïdes et contribua ainsi à s'opposer à la théorie de la génération spontanée puisque ceux-ci sont présents chez toutes les espèces animales et qu'ils sont indispensables à la reproduction (Karamanou et al. 2010). Il évoque pour la première fois des formes de vie minuscules qu'il a observées dans l'eau en Hollande entre 1674 et 1676 (Leewenhoeck 1677; Satir 1999). Il a ainsi découvert ce que nous appelons aujourd'hui les protozoaires ciliés (Yaeger 1996). Antoni van Leeuwenhoek a stimulé le début de la fascination du fonctionnement des cils pour générer des courants et le déplacement des organismes dans un environnement liquide.

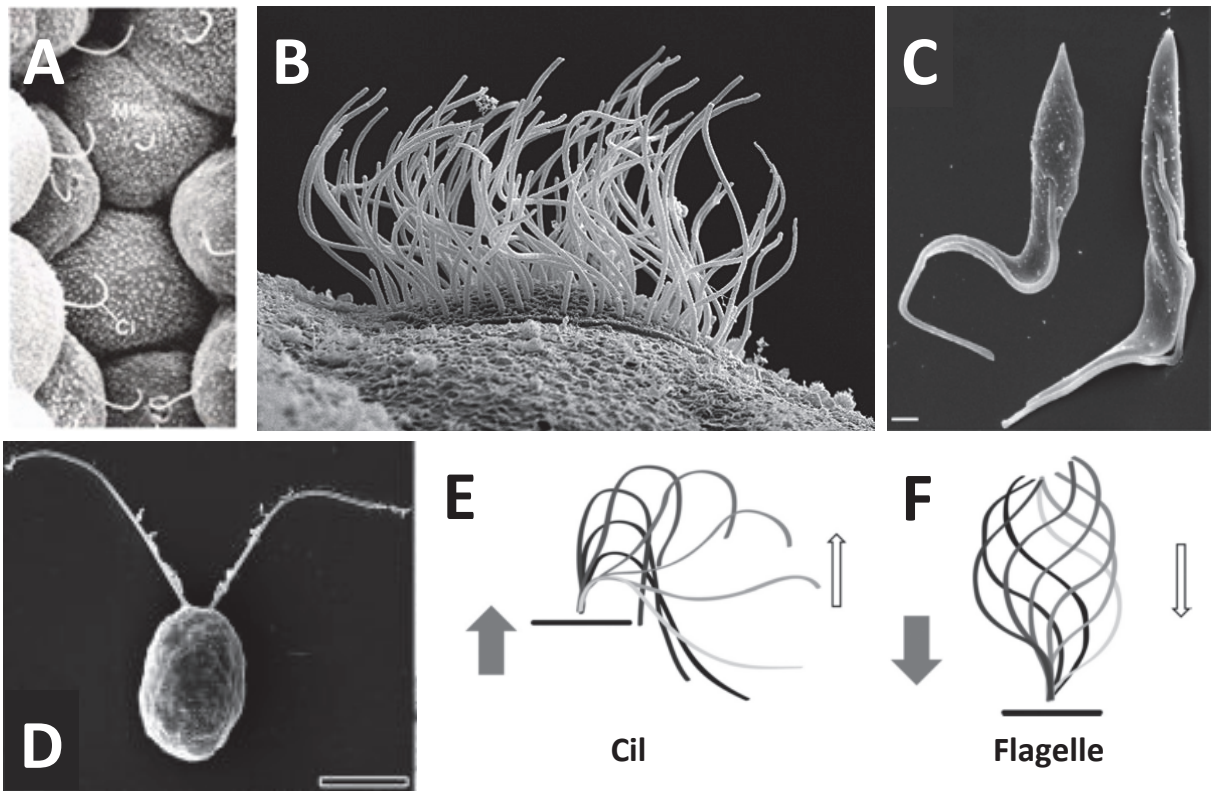


Figure 1 Images de microscopie électronique à balayage illustrant différents types de cellules ciliées et flagellées

A) Cil primaire de cellules épithéliales du tubule rénal, d'après (Kessel and Kardon 1979). B) Cellule multiciliée de peau de xénope, d'après (Hayes et al. 2007). C) *Trypanosoma brucei*, un protiste cilié mono flagellé dans sa forme procyclique, d'après (Vincensini, Blisnick, and Bastin 2011). Barre d'échelle=1 µm. D) L'algue verte biflagellée *Chlamydomonas reinhardtii,* d'après (Morga and Bastin 2013). Barre d'échelle=5µm. E) Profil de mouvement des cils formant un mouvement de va et vient. F) Le flagelle produit un mouvement ondulatoire (Satir, Heuser, and Sale 2014). La flèche grise indique la direction de la cellule en mouvement. La flèche blanche indique la courbure du cil. La barre noire mesure 5µm et représente le point d'attachement du cil à la cellule.

Les cils et les flagelles sont très conservés chez les eucaryotes, des protozoaires au phyllum des métazoaires. Les flagelles des bactéries sont différents d'un point de vue évolutif, et de par leur structure et leur composition ; ils ne seront pas abordés dans cette thèse.

Les cils et les flagelles eucaryotes sont parfois des termes employés indifféremment l'un de l'autre puisqu'ils ont une architecture et une composition relativement similaires mais on les distingue la plupart du temps par leur taille, leur nombre et leur type de mouvement. Les cils ont généralement une taille entre 1 et 10 μm alors que les flagelles oscillent entre 12 μm pour le flagelle de *Chlamydomonas reinhardtii* jusqu'à 5 cm chez *Drosophila bifurca*. En fonction des organismes et des types cellulaires, les cils peuvent être présents comme cil unique ou par dizaines ou centaines (cellules multiciliées) à la surface des cellules (Figure 1 A et B). Alors que les flagelles, eux, sont souvent peu nombreux, un ou deux flagelles par cellule (Figure 1C et D). Les cils et les flagelles ont un battement périodique différent. Bien qu'il puisse parfois être très variable, même sur la même cellule, le battement de cils typique produit un mouvement de va-et-vient alors que les flagelles ont plutôt un battement ondulatoire (Figure 1 E et F) (Satir et al. 2014). Toutefois la frontière entre cil et flagelle s'amincit et la classification entre cil et flagelle n'est pas toujours nette. Des cils sont parfois plus longs que ce qui est couramment observé et le nombre de flagelles peut être relativement élevé, comme

à titre d'exemple chez *Giardia intestinalis* qui possède huit flagelles (Dawson and House 2010).

On distingue deux grands types de cils, les cils motiles et les cils immotiles ayant un rôle sensoriel. Ces deux types de cils ont une structure légèrement différente qui sera détaillée plus tard.
Les cils ont été longtemps définis uniquement par leurs fonctions motiles jusqu'à ce que Zimmerman décrive, à la fin du XIX siècle, un flagelle central dans des cellules de mammifères et leur associe un rôle sensoriel (Beales and Jackson 2012; Zimmerman 1898).
Cette organelle a été renommée cil primaire (Sorokin 1962), mais ce n'est qu'à partir des années 1990 que le nombre de recherches a explosé sur cette thématique. Il est désormais clairement établi que le cil est étroitement lié aux autres organites de la cellule et participe à de nombreux processus cellulaires essentiels (Bloodgood 2009; Singla and Reiter 2006). Ce n'est donc que depuis quelques décennies et grâce aux avancées technologiques que la recherche sur les cils s'est développée d'une manière exponentielle.

2. Organisation des composants ciliaires

Brièvement, les cils sont formés à la base de la cellule et protrudent à la surface de celle-ci (Figure 2A). Le centre nucléateur de cette structure est un centriole modifié, que l'on appelle un corps basal. Celui-ci subit de nombreuses modifications moléculaires et structurelles pour initier la formation d'un cil (Kobayashi and Dynlacht 2011). Il est formé de microtubules assemblés en triplets au nombre de 9. La zone de transition est disposée au-dessus du corps basal et forme une barrière de diffusion entre le cytoplasme et le compartiment ciliaire (Figure 2B). Enfin, l'axonème est un prolongement microtubulaire émergeant du corps basal. Le cil est entouré d'une membrane ciliaire qui est continue avec la membrane plasmique mais dont la composition diffère. La taille et le nombre de cils sont variables d'un organisme à l'autre et d'un type cellulaire à l'autre au sein d'un même organisme. L'architecture microtubulaire des cils motiles possède des éléments supplémentaires nécessaires à leur mobilité comparée aux cils primaires. Il existe, dans la plupart des cas, un transport des protéines du cytoplasme dans le compartiment ciliaire que l'on appelle transport intraflagellaire (IFT) (Figure 2B). La structure des différents compartiments ciliaires sera détaillée plus tard.

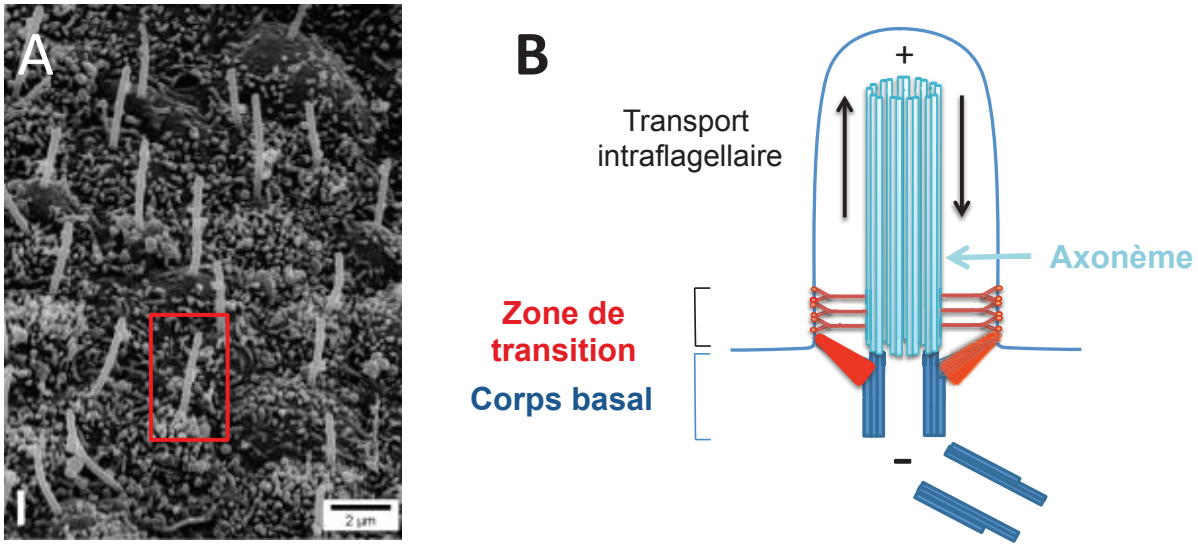


Figure 2 Organisation des composants ciliaires

A) Image d'un cil en microscopie électronique à balayage de cellules monociliées du nœud embryonnaire de souris, d'après (Bonnafe et al. 2004). B) Schéma montrant les différentes parties du cil et l'orientation de la croissance du cil du - vers le +. En bleu est représenté le corps basal, en rouge la zone de transition, en bleu ciel l'axonème, en noir le transport intraflagellaire avec les flèches montrant l'orientation bidirectionnelle de ce transport. Le cil est entouré d'une membrane ciliaire en bleu.

3. Le cil ancestral chez LECA

Les eucaryotes ont évolué depuis plus de deux milliards d'années, mais nous ne disposons pas de fossiles à partir desquels nous pouvons suivre l'évolution de la structure et de la fonction des organites subcellulaires (Cavalier-Smith 2002). Les caractéristiques de l'ancêtre commun eucaryote ne sont déduites que par l'observation faite des organismes existants aujourd'hui. Pour relier phylogénétiquement les informations, le principe de parcimonie est utilisé puisqu'il correspond au scénario d'évolution le plus probable car il nécessite le moins d'événements. La présence d'une structure ou d'un gène donné dans plusieurs groupes eucaryotes, permet de supposer une apparition avant leur divergence, dans le dernier ancêtre commun eucaryote (LECA), et donc de rejeter un scénario d'évolution convergente (Carvalho-Santos et al. 2011).

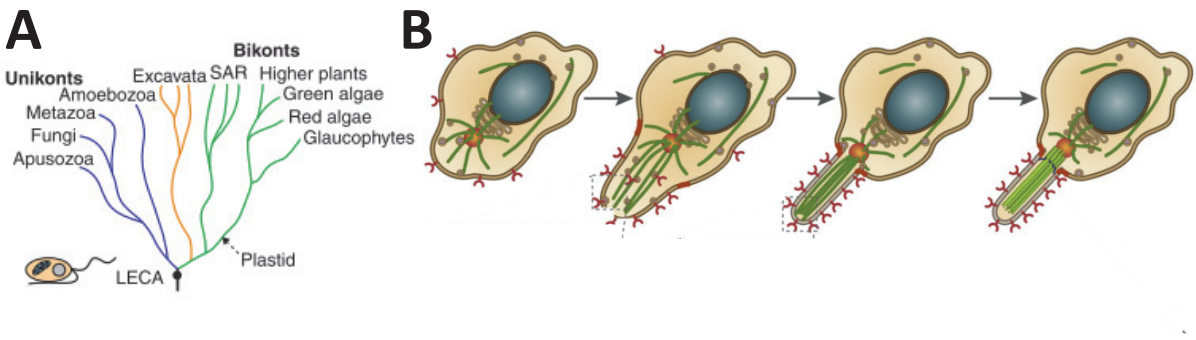


Figure 3 Le cil ancestral chez LECA

A) Schéma des clades eucaryotes majeurs divergeant du dernier ancêtre commun eucaryote (LECA), avec la racine placée entre les superclades unicontes et bicontes. Le LECA est dessiné comme une cellule unique avec un noyau, une mitochondrie et deux flagelles, d'après (Mitchell 2016). B) Théorie autogène pour l'origine du cil sensoriel/motile. La cellule eucaryote où le proto-cil a évolué avait probablement un cytosquelette composé d'actine et de microtubules qui convergeaient au niveau du centre organisateur de microtubules, un noyau et un système endomembranaire. Une protrusion évoluerait pour devenir une structure spécialisée avec une composition spécifique de membrane maintenue par des barrières de diffusion. Le faisceau de microtubules évoluerait afin de créer un arrangement spécialisé de microtubules formant une structure symétrique en neuf doublets périphériques, d'après (Carvalho-Santos et al. 2011).

Les cils et les flagelles sont des organites très conservés chez un grand nombre d'organismes eucaryotes, le dernier ancêtre commun eucaryote (LECA) aurait donc été flagellé et les cils et flagelles auraient ensuite été perdus dans certaines branches au cours de l'évolution (Figure 3 A) (Satir, Mitchell, and Jékely 2008). En particulier, certains champignons tels que les levures et les microsporidies ainsi que certaines plantes, notamment les angiospermes, sont dépourvus de cils (Azimzadeh and Marshall 2010; Carvalho-Santos et al. 2011).

En utilisant des approches phylogénétiques, il a été possible d'affirmer, indépendamment des points de branchement et des groupes spécifiques, que toutes les branches principales identifiées des eucaryotes comprennent des organismes avec des cils motiles identiques et ont donc évolué avant la divergence de LECA (Cavalier-Smith 2002).

Trois hypothèses sur l'origine et l'évolution du centriole et du cil ont été proposées. La première correspond à un modèle symbiotique, duquel les cils dériveraient d'une bactérie spirochète et une archaebactérie (Margulis, To, and Chase 1981; Sagan 1967). Cependant, aucune preuve issue de la génomique comparative n'a été trouvée pour étayer une ascendance spirochète du protéome ciliaire. Cette hypothèse reste donc pour l'instant largement discutable. La deuxième hypothèse supporte l'idée que le cil viendrait d'une infection virale qui aurait permis de donner la structure du cil que l'on connaît aujourd'hui (Satir and Christensen 2007; Satir et al. 2008). La troisième hypothèse est une origine autogène du centriole et du cil dans le cytoplasme eucaryote chez LECA (Cavalier-Smith 2002; Mitchell 2004). La cellule eucaryote où le cil a évolué avait vraisemblablement un cytosquelette composé d'actine et de microtubules qui convergeaient au niveau du centre organisateur des microtubules, un noyau et un système d'endomembrane. Un trafic spécifique de composants de membrane cellulaire a commencé à créer une force produite par le centre organisateur des microtubules composé notamment des centrioles. Enfin, cette protrusion aurait évolué afin de

devenir une structure spécialisée avec une composition de membrane spécifique maintenue par des barrières de diffusion (Figure 2B) (Carvalho-Santos et al. 2011; Satir et al. 2008).

4. Fonctions des cils

Chez les mammifères, les cils et les flagelles sont présents à la surface de pratiquement toutes les cellules à l'exception du lignage lymphoide / myeloide, des hépatocytes et des cellules musculaires différenciées et sont indispensables au développement ainsi qu'à la régulation de multiples processus physiologiques.

4.1-Les cils motiles

Les cils et les flagelles assurent des fonctions essentielles chez un grand nombre d'organismes unicellulaires. La fonction la plus ancestrale des cils et qui est également attribuée à LECA est la motilité (Mitchell 2016).
La paramécie et le trypanosome se servent de leurs cils motiles pour se déplacer dans leur environnement. L'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* possède deux flagelles nécessaires à son déplacement et son accouplement. En effet, les gamètes de *Chlamydomonas* de type opposé adhèrent d'abord les uns aux autres par leurs flagelles, des signaux sont envoyés des flagelles au corps cellulaire pour déclencher « l'activation des gamètes» puis une série d'événements mènent à la fusion cellulaire et à la formation de zygotes (Rosenbaum and Witman 2002). La paramécie utilise également ses cils lors de la conjugaison pour réaliser la reproduction sexuée entre deux types opposés (Watanabe 1990).
Chez les mammifères, les cils motiles sont impliqués dans le mouvement cellulaire ou dans la création de flux grâce auquel ils assurent des fonctions physiologiques essentielles. La fonction la plus connue est sûrement la motilité des spermatozoïdes, qui grâce à leur flagelle, peuvent se déplacer pour aller féconder l'ovule dans le tractus féminin. D'autres cellules ciliées comme les cellules multiciliées tapissant les trompes de Fallope sont nécessaires au transport de l'ovule de l'ovaire jusqu'à l'utérus.
Les multicils présents sur l'épithélium de la trachée produisent un battement coordonné qui permet l'écoulement du mucus hors des poumons. De la même manière, les cellules épendymaires multiciliées du cerveau facilitent l'écoulement du liquide céphalorachidien. Enfin les cils motiles sont également impliqués au cours de l'embryogenèse, dans le nœud embryonnaire pour permettre l'établissement de l'asymétrie gauche-droite des organes (Blum et al. 2015).

4.2-Les cils primaires ou non motiles

Au cours du développement des mammifères, les cils primaires possèdent un rôle dans la transduction de certaines voies de signalisation grâce à une composition distincte de la membrane ciliaire. Les cils primaires sont capables de détecter les signaux mécaniques, lumineux et chimiques et contribuent au développement et à la fonction de presque tous les organes (Fry, Leaper, and Bayliss 2014). Le compartiment ciliaire est ainsi un régulateur clé des voies de signalisation telles que Hedgehog (Hh), platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), ou Wingless (Wnt) puisque de nombreux récepteurs, canaux ioniques et

transporteurs sont concentrés au niveau du cil (Nachury 2014; Singla and Reiter 2006). Les cils primaires ont aussi un rôle de mécano-senseurs comme dans les tubules rénaux par exemple. Au cours du fonctionnement normal du rein, le flux d'urine est déversé sur les cellules épithéliales rénales, les cils primaires se plient et cela résulte en une activation de la Polycystine 1 et 2 générant un influx calcique et l'inhibition de la protéolyse intramembranaire (RIP) régulée de PC1 (Chauvet et al. 2004; Singla and Reiter 2006).
Certains cils primaires comme les cils des photorécepteurs de la rétine sont des cils connecteurs qui permettent de relier les deux segments interne et externe pour assurer le transport de protéines d'opsine. Ce transport a lieu grâce à des protéines impliquées dans le transport intraflagellaire (IFT) (Bujakowska, Liu, and Pierce 2017).
Ce paragraphe non exhaustif illustre la diversité de la fonction des cils et des flagelles chez les eucaryotes ciliés.

5. Les ciliopathies

Les cils jouent ainsi de nombreux rôles essentiels au cours du développement chez les mammifères. Tous dysfonctionnements des cils, dans l'assemblage des constituants et dans leurs fonctions, conduisent à des maladies génétiques chez l'Homme qui sont regroupées sous le terme de ciliopathies (Hildebrandt, Benzing, and Katsanis 2011).
Dans ce chapitre, une brève définition des différents types de ciliopathies est décrite mais leurs implications chez l'homme ne seront pas plus détaillées dans ce manuscrit.
Les «ciliopathies» sont des maladies complexes qui peuvent parfois être multi systémiques avec une implication de tous les organes qui possèdent des cellules ciliées comme le rein, le cerveau, les yeux, les voies respiratoires et les membres (Figure 4) (Goetz and Anderson 2010).

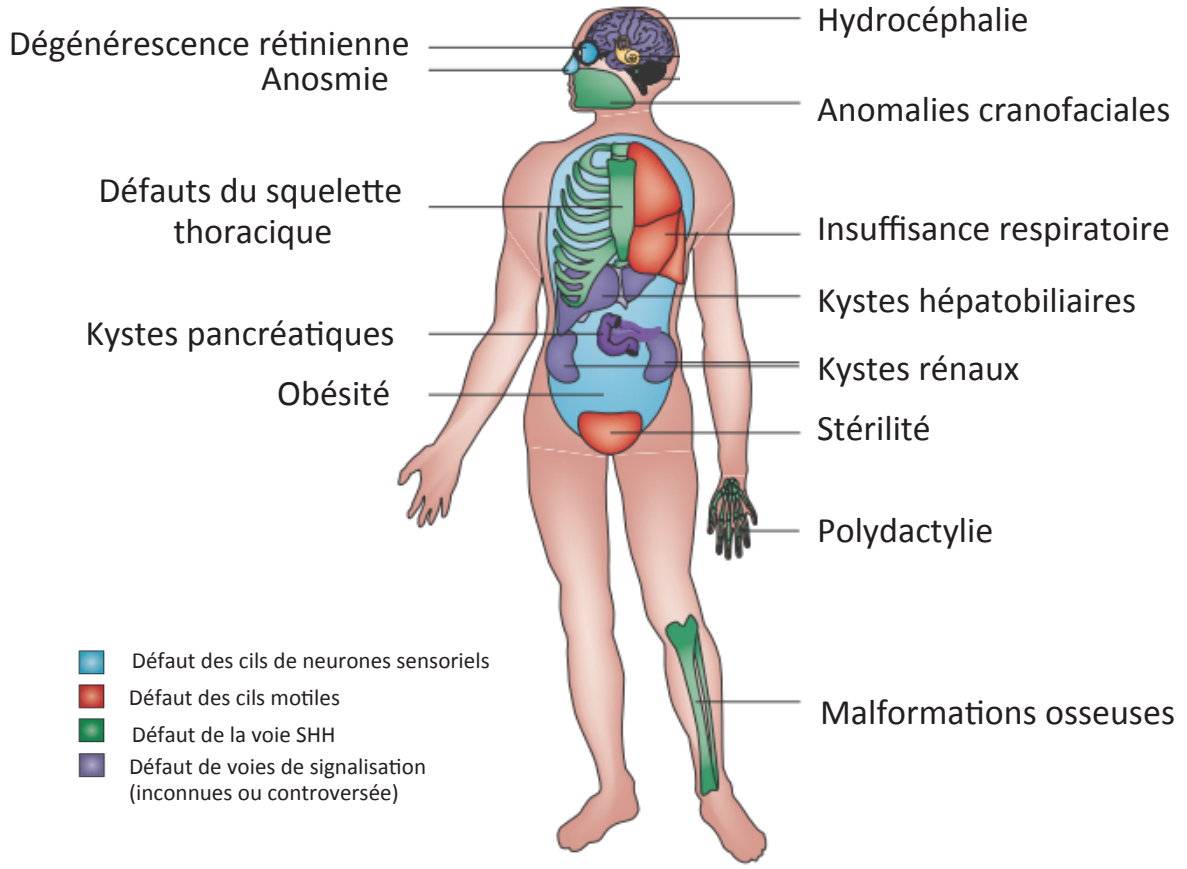


Figure 4 Schéma représentant la diversité des organes atteints par un dysfonctionnement du cil primaire ou motile conduisant à une ciliopathie.

Les différents organes touchés sont classés en fonction du type de défauts, du cil primaire (bleu), des cils motiles (rouge), de la voie de signalisation sonic hedgehog (vert) ou encore les voies de signalisation inconnues (violet), d'après (Goetz and Anderson 2010).

On peut distinguer les ciliopathies en les classant par sous type en fonction du type de cils affectés : les ciliopathies dites « motiles » et les ciliopathies dites « non motiles » (Reiter and Leroux 2017). En revanche, certaines ciliopathies dites « motiles » et « immotiles » peuvent conduire à des défauts de la détermination de l'axe gauche droite au cours de l'embryogenèse (Mitchison and Valente 2017).

Les **ciliopathies dites « motiles »** sont caractérisées par un dysfonctionnement des cils dans les organes qui génèrent un écoulement ou un mouvement de fluide. Un dysfonctionnement de ces cils compromet l'évacuation du mucus, provoquant des maladies chroniques des voies respiratoires et souvent associées à des défauts de latéralité, de fertilité et au développement du cerveau. La maladie caractéristique des cils motiles est la dyskinésie ciliaire primitive.
Elle se caractérise par des infections respiratoires, un *situs inversus* pouvant affecter des organes comme le cœur, la rate, le foie ou l'estomac, une stérilité masculine et plus rarement de l'hydrocéphalie (Braun and Hildebrandt 2017; Knowles, Zariwala, and Leigh 2016). Les défauts observés par microscopie électronique sont extrêmement variables et affectent les composants motiles de l'axonème.

Les **ciliopathies dites « non-motiles »** ou sensorielles causées par des défauts d'assemblage ou de fonctionnement du cil primaire forment un groupe très hétérogène. Une grande variété phénotypique est notable parmi les ciliopathies dites « non motiles » par rapport aux ciliopathies dites « motiles » illustrant la complexité moléculaire de ces pathologies. En effet, les cils primaires sont plus omniprésents que les cils motiles, fonctionnant comme capteurs clés de molécules extracellulaires qui contrôlent de nombreuses cascades de transduction de signaux. Grâce à la signalisation, les cils primaires activent un large éventail de réponses, comme la modulation des voies clés du développement, le contrôle de la polarité cellulaire dans les tissus épithéliaux, la transduction des stimuli sensoriels et la régulation de la prolifération et de la maintenance des cellules souches (Mitchison and Valente 2017).

La **détermination de l'axe gauche-droite** au cours du développement dans le nœud embryonnaire, implique à la fois les cils motiles et immotiles. Le flux de fluide à travers le nœud embryonnaire est la première étape cruciale qui permet de briser la symétrie embryonnaire bilatérale. Les cils immotiles périphériques détectent le flux et transmettent des signaux qui activent une cascade d'expression de gènes asymétriques comme Nodal (Blum et al. 2014; Dasgupta and Amack 2016). L'asymétrie gauche-droite est également gérée par la voie de signalisation de FGF et SHH (Tanaka, Okada, and Hirokawa 2005). La polydactylie ainsi que des défauts du développement du système nerveux central impliquent également des défauts de la voie SHH (Lee and Gleeson 2011).

Les ciliopathies sont donc des groupes de maladies très variables, les gènes peuvent être impliqués dans différents syndromes : des mutations différentes dans un même gène pouvant conduire à des manifestations cliniques diverses. Cela révèle la complexité moléculaire et la diversité des composants ciliaires entre les organes. C'est le cas, par exemple, de CEP290 qui est une protéine de la zone de transition qui est impliquée dans la maladie létale de Meckel Gruber (MKS) ou des nephronophtises (NPHP) (Coppieters et al. 2010).

II. STRUCTURE : Ultrastructure des cils

1. Les corps basaux, centrioles modifiés

Les centrosomes sont les centres d'organisation des microtubules (COMT) des cellules animales et jouent un rôle essentiel dans la formation et l'orientation du fuseau mitotique. Le COMT se compose d'une paire de centrioles : les centrioles père et fils, intégrés dans la matrice péri-centriolaire (PCM) (Fujita, Yoshino, and Chiba 2016) (figure 5A). La matrice péri-centriolaire (PCM) contient les protéines nécessaires à la nucléation et jouent un rôle important dans l'ancrage des microtubules du cytosquelette cellulaire (Azimzadeh and Bornens 2007). Chez les vertébrés, les centrioles mesurent généralement 500 nm de long et 250 nm de diamètre (Winey and O'Toole 2014).

Dans la plupart des cellules animales, le centriole est une structure cylindrique composée de 9 triplets de microtubules appelés tubules A, B et C enchâssés l'un dans l'autre (Figure 5A). Le tubule A d'un triplet est connecté au tubule C du triplet suivant formant le lien A-C (Figure 5A) (Gönczy 2012). Le centriole a une symétrie 9 qui est mise en place grâce au « cartwheel », une structure en forme de roue formée notamment grâce à la protéine SAS-6 (Figure 5A). Les tubules A, B et C sont respectivement composés de 13 et de 10 protofilaments numérotés par convention (Figure 8A). Chaque protofilament est formé par des hétérodimères de l'α- et β-tubuline comme les microtubules cellulaires (Gibbons and Grimstone 1960; Tilney et al. 1973) (pour revue Linck, Chemes, and Albertini 2016). Enfin, les microtubules sont polarisés, la sous-unité α-tubuline d'un dimère est orientée vers le coté moins et la sous unité β-tubuline est quant à elle localisée vers l'extrémité plus (Figure 5B) (Fan et al. 1996).

La paire de centriole possède une asymétrie structurelle et fonctionnelle due à une différence d'âge entre les deux. En effet au cours du cycle cellulaire, le centriole père sert de matrice pour former le centriole fils. Dans les cellules ciliées et non ciliées, le centriole père se distingue du centriole fils par la présence des appendices subdistaux et distaux. Ces appendices sont nécessaires notamment pour ancrer les microtubules de la cellule et pour s'ancrer à la membrane plasmique pour nucléer un cil (Bornens 2012; Kobayashi and Dynlacht 2011) (Figure 5B et C). Au niveau des appendices subdistaux, on observe une transition de triplets à doublets de microtubules. Ces appendices distaux et subdistaux, qui sont assemblés au bout d'un cycle cellulaire et demi après l'initiation de la formation du procentriole fils, sont caractérisés par une symétrie radiaire d'ordre neuf puisqu'ils sont associés à chacun des doublets de microtubules de la partie distale du centriole père. Au cours de la transition du centriole père en corps basal, ces appendices sont maintenus. D'un point de vue moléculaire et structurel, les appendices distaux et les fibres de transition partagent des similarités et le terme « fibres de transition » est utilisé lorsque le cil est nucléé. En revanche les appendices subdistaux peuvent parfois devenir des pieds basaux mais leur composition moléculaire et structurelle peut diverger.

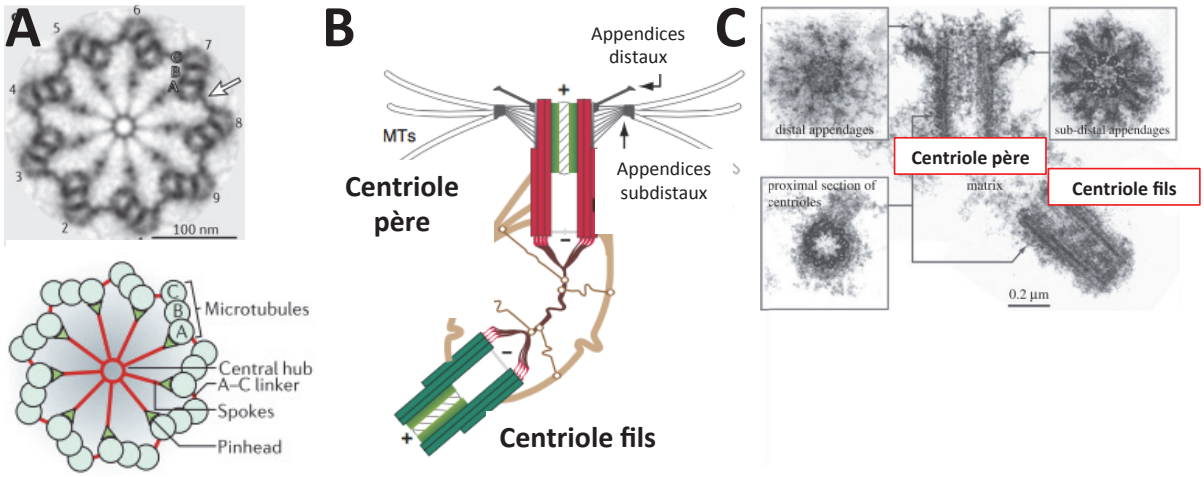


Figure 5 Structure du centrosome

A) Coupe transversale et schéma de la partie proximale du centriole de *C. reinhardtii* montrant la symétrie en 9 et l'assemblage des tubules A, B et C (D'après Gönczy *et al,* 2012). B) Schéma du centriole père (rouge) et du centriole fils (vert) indiquant les appendices distaux requit au cours de la ciliogenèse et les appendices subdistaux permettant de relier le centriole aux microtubules de la cellule. La matrice péricentriolaire est indiquée en marron (D'après Bornens 2012). C) Centrioles observés en microscopie électronique à transmission révélant les appendices distaux et subdistaux (Images originales Paintrand et al. 1992)(D'après Winey and O'Toole 2014).

1.1- Les appendices subdistaux /pied basal

1.1.1- Composition et assemblage

Les appendices subdistaux des centrioles peuvent parfois devenir les pieds basaux du corps basal, dans ce cas, leur nombre change généralement de 9 appendices à un seul pied basal.
Parmi les protéines qui ont été identifiées comme nécessaires à la formation des appendices subdistaux, deux protéines ont été identifiées, dans un premier temps, comme des protéines localisées aux appendices subdistaux, il s'agit de ODF2 et Ninéine. ODF2 est localisée à la base des appendices subdistaux (Ishikawa et al. 2005). La protéine Ninéine quant à elle se localise d'une manière distale à ODF2 aux appendices subdistaux et à l'extrémité proximale des centrioles père et fils (Ou et al. 2002).

Les travaux de Mazo et al. (2016) ont permis d'identifier et de caractériser les protéines requises à l'assemblage des appendices subdistaux. Ces protéines ont été subdivisées en deux groupes sur la base de leur localisation par immunofluorescence, les protéines similaires à la localisation de ODF2 ou à celle de la Ninéine (Figure 6A). Les protéines possédant une localisation similaire à ODF2 et classées dans le sous-groupe de **ODF2** sont **CC2D2A**, **CEP128** et la **Centrioline**. Les protéines regroupées dans le sous-groupe de **Ninéine** sont **CEP170**, **Kif3a**, **ε-Tubuline** et **p150glued** (Mazo et al. 2016). Cette étude a permis de hiérarchiser certaines protéines des appendices subdistaux par l'analyse de mutants réalisés par CRISPR. La localisation des différentes protéines en contexte des différents mutants montre que ODF2 est la protéine la plus en amont suivie par CEP128 et la Centrioline suivies du reste des protéines du groupe de Ninéine (Mazo et al. 2016) (Figure 6B).

Les protéines appartenant au groupe de ODF2 semblent jouer un rôle dans la **formation des appendices subdistaux** alors que les protéines du groupe de la Ninéine jouent plutôt **un rôle fonctionnel dans l'ancrage des microtubules aux appendices subdistaux**.
En effet, parmi les protéines localisées comme la Ninéine, la déplétion de la protéine Kif3a dans des cellules de mammifères engendre des défauts de ciliogenèse, dus principalement à des défauts de fonctionnement du transport intraflagellaire, mais aussi à un défaut d'ancrage des microtubules aux appendices subdistaux (Kodani et al. 2013). La protéine Kif3a permet le recrutement de p150Glued aux appendices subdistaux, qui, à son tour, va recruter la Ninéine. La protéine Centrioline, renommée ainsi suite à sa localisation aux niveaux des appendices subdistaux, a également un rôle dans l'attachement des microtubules aux centrioles (Gromley et al. 2003). Le recrutement de ces protéines aux appendices subdistaux permet ainsi **l'ancrage des microtubules** (Mazo et al. 2016; Kodani et al. 2013).

Enfin, il a été montré que la protéine CC2D2A qui se localise comme les autres protéines du groupe ODF2 aux appendices subdistaux dans des cellules IMCD3, joue un rôle dans l'assemblage des appendices subdistaux en recrutant à la fois les protéines ODF2 et Ninéine (Veleri et al. 2014). La protéine CC2D2A semble donc être la première protéine nécessaire au recrutement des protéines des appendices subdistaux afin d'initier **la formation des appendices subdistaux**.

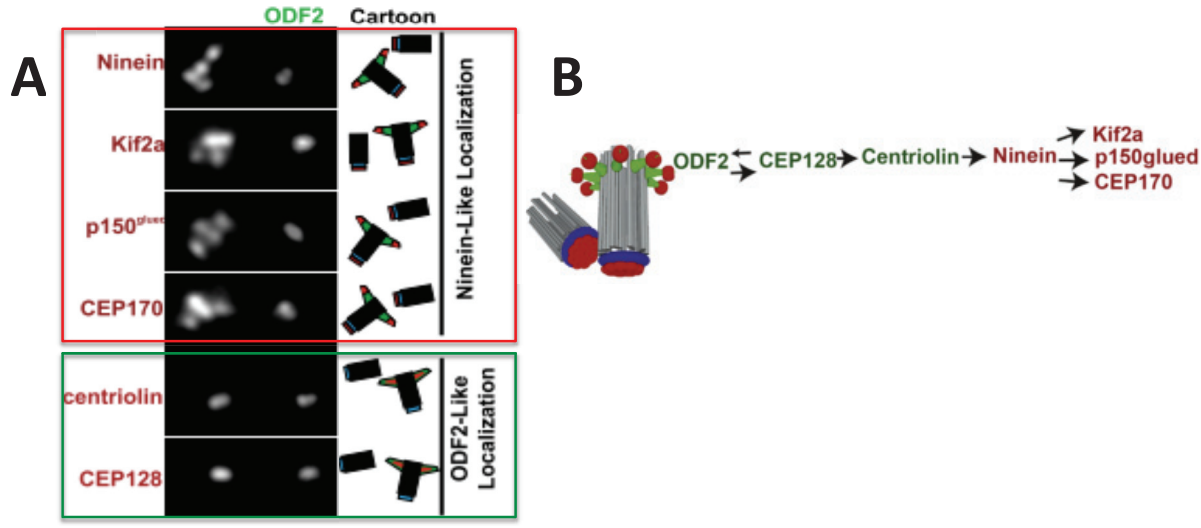


Figure 6 Organisation protéique des appendices subdistaux

A) Profil de localisation des protéines associées aux appendices subdistaux. La localisation des protéines est indiquée par rapport au marqueur des appendices subdistaux (ODF2 en vert). Les deux groupes de localisation sont encadrés en rouge pour Ninéine et vert pour ODF2 (d'après Mazo *et al,* 2016). B) Schéma de l'assemblage hiérarchique des protéines des appendices subdistaux des deux groupes ODF2 (vert) et Ninéine (rouge) (d'après Mazo *et al,* 2016).

1.1.2- Conservation des composants

La présence des appendices subdistaux/pied basal n'a pas été mise en évidence chez *C. elegans* et la drosophile, malgré la conservation de certaines protéines. ODF2 n'est pas conservée chez *C. elegans*, alors que la plupart des composants du groupe de Ninéine le sont, tout comme chez la drosophile. La protéine ODF2 a trois orthologues chez la drosophile qui sont CG8851, CG3213 et CG13405. Une partie de cette thèse porte sur le rôle de ces protéines au cours de la ciliogenèse chez la drosophile et sera détaillée plus tard dans le manuscrit.

1.2- Les appendices distaux /fibres de transition

1.2.1- Composition et assemblage

Les appendices distaux sont présents à l'extrémité distale du centriole père et jouent un rôle essentiel dans **l'initiation de la ciliogenèse**, notamment pour ancrer les cils à la membrane plasmique, mais leur composition moléculaire et leur assemblage restent mal compris. Anciennement nommés « alar sheet », ces appendices distaux sont également appelés fibres de transition pour leur localisation proche de la zone de transition dans des cellules ciliées

(Hagiwara, Ohwada, and Aoki 2008). Les fibres de transition permettent de relier physiquement le centriole/corps basal et la membrane plasmique au cours de la formation du cil.

De nombreuses études ont permis d'identifier les protéines localisées aux appendices distaux chez les mammifères. Certaines protéines sont présentes à la base des appendices distaux, d'autres sont présentes tout au long des appendices distaux et enfin certaines sont à l'interface entre les fibres de transition et la future zone de transition. Chez les mammifères, au cours de la ciliogenèse, certaines protéines sont nécessaires à la **formation des appendices distaux** alors que d'autres jouent un **rôle fonctionnel dans l'ancrage** des appendices distaux avec les vésicules ciliaires et la membrane plasmique.

Parmi les protéines des appendices distaux, il y a la protéine **ODF2** qui est présente au niveau des appendices subdistaux et également présente à la base des appendices distaux dans des cellules de mammifères (Ishikawa et al. 2005). D'autres protéines comme **DZIP1** ou encore **C2CD3** sont localisées à la base des appendices distaux (C. Wang et al. 2013 ; Ye et al. 2014). La perte de l'une de ces protéines empêche la formation des appendices distaux dans des cellules de mammifères (Ishikawa et al. 2005 ; Ye et al. 2014). Ces protéines sont donc requises pour la **formation des appendices distaux**.

Le travail de l'équipe de Meng-Fu Bryan Tsou a permis d'identifier des protéines présentes aux appendices distaux dans des cellules de mammifères. Pour cela ils ont utilisés la surexpression de PLK4 pour produire des centrioles fils surnuméraires (Habedanck et al. 2005; Nigg 2007). Comme le centriole père est le seul à posséder des appendices distaux, une augmentation du nombre de centrioles fils dans un centrosome ne change pas la quantité totale de protéines d'appendices dans ce centrosome, alors que les protéines centriolaires sont sujettes à une augmentation proportionnelle au nombre de centrioles. Ces différences ont été détectées et analysées en utilisant une approche SILAC (Stable isotope labeling with amino acid in cell culture) suivie de spectrométrie de masse (Ong et al. 2002) et ont été utilisées pour différencier quantitativement les protéines des appendices des autres composants centriolaires. Pour éviter le bruit de fond associé à cette technique, uniquement les protéines présentes dans le protéome du centrosome réalisé dans des cellules en culture par l'équipe de Andersen JS. ont été incluses dans l'étude (Jakobsen et al. 2011). La localisation des protéines ainsi identifiées aux appendices distaux a ensuite été confirmée par microscopie confocale et 3D-SIM. Grâce à cette étude, 5 protéines des appendices distaux ont été identifiées parmi lesquelles 2 avaient déjà été caractérisées : **CEP164** (Graser et al. 2007) et **CEP89** (CCDC123 /CEP123) (Sillibourne et al. 2013) et 3 autres qui n'avaient jamais été associés aux appendices distaux **CEP83** (CCDC41), **SCLT1** et **FBF1** (Figure 7A et B) (Tanos et al. 2013). En analysant la perte de ces différentes protéines par ARNi, la hiérarchie entre ces protéines a pu être établie et montre que CEP83 agit sur la localisation des 4 autres protéines mais que chacune est essentielle pour la formation du cil (Tanos et al. 2013). Ces protéines seront ainsi appelées au cours de ce manuscrit les protéines « cœurs » des appendices distaux (Figure 7). Ces protéines ont ainsi un **rôle fonctionnel** en permettant le

recrutement des autres protéines, en revanche la présence des appendices distaux en microscopie électronique n'a pas été étudiée.

Enfin, certaines protéines ont été identifiées et localisées à l'interface entre les fibres de transition et la zone de transition (Figure 7C). C'est le cas de **Chibby** (Cby1) et **TTBK2** (Tau tubulin kinase 2) qui sont 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 (Cajánek and Nigg 2014; Burke et al. 2014) (Figure 7A). Des analyses en microscopie haute résolution en cellules de mammifères ont permis d'identifier Chibby à l'intérieur du marquage de CEP164 (Burke et al. 2014). Observé d'une manière transversale, le marquage de Chibby forme un cercle qui est plus petit que CEP164 et localisé d'une manière plus apicale. La protéine **CEP162** est également présente à l'interface entre les fibres de transition et la zone de transition et centrale par rapport à CEP164, sa localisation par rapport à Chibby n'a cependant jamais été étudiée (C. Wang et al. 2013).

Ces protéines peuvent donc être organisées selon leur localisation entre les protéines localisées à la base des appendices distaux, celles qui sont présentes le long de ces appendices et encore les protéines localisées à l'extrémité distale du centriole. Le rôle de ces protéines dans la formation ou la fonction des appendices distaux au cours de la ciliogenèse sera détaillé plus tard.

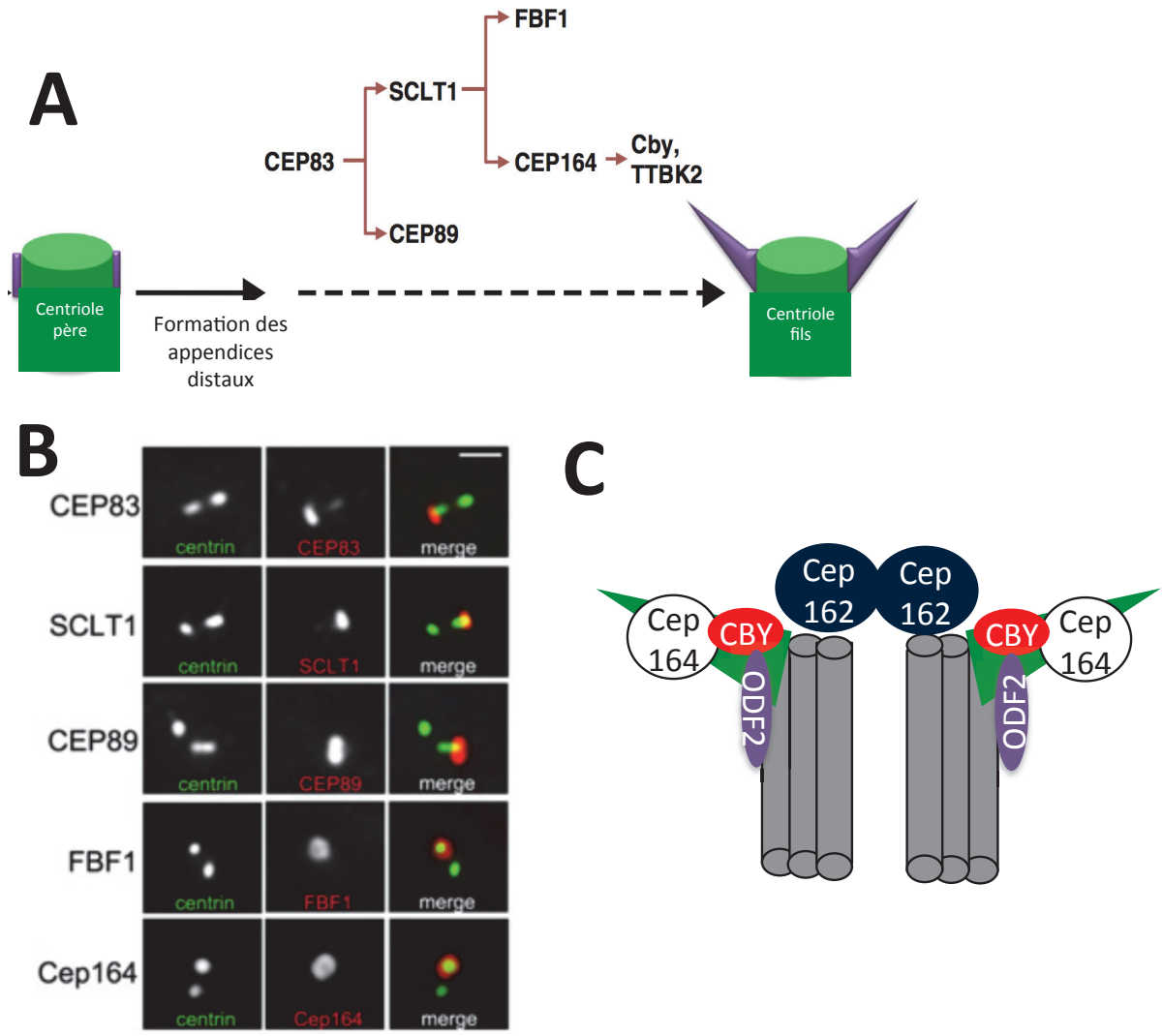


Figure 7 Organisation des appendices distaux

A) Hiérarchie des protéines impliquées dans la formation des appendices distaux (d'après Wei *et al*, 2015). La protéine CEP83 permet la localisation des autres protéines nécessaires à la formation des appendices distaux. B) Profil d'expression de certaines protéines des appendices distaux en rouge montrant une localisation asymétrique grâce au marquage centriolaire de la Centrine dans des cellules épithéliales de rétine (Tanos *et al*, 2013). C) Schéma récapitulatif de la localisation des protéines des appendices distaux en vert, ODF2 à la base (violet), les protéines présentes le long des appendices distaux comme Cep164 (cercle noir) et les protéines localisées à l'extrémité distale du centriole comme Chibby et CEP162 toutes les deux centrales par rapport à Cep164 (C. Wang et al. 2013 ; Burke et al. 2014 ; Chang et al. 2013).

1.2.2- Conservation des composants

Malgré l'importance des fibres de transition dans la formation d'un cil, ces structures ne semblent pas être présentes chez tous les organismes ciliés (Carvalho-Santos et al. 2011). Le doute subsiste parfois selon les modèles, où il apparaît que certains composants cœurs ne sont pas conservés alors que des observations en microscopie électronique révèlent la présence d'appendices denses aux électrons.

Chez *Chlamydomonas* alors que les fibres de transition sont visibles en microscopie électronique à transmission, il n'y a que CEP164, une composante cœur des appendices

distaux, et OFD1, une protéine nécessaire à la formation des appendices distaux qui sont conservées (Dutcher and O'Toole 2016; Wei, Ling, and Hu 2015).
La paramécie possède des fibres de transition visibles en microscopie électronique (Dute and Kung 1978). Différentes protéines ont été identifiées comme nécessaire à l'ancrage du corps basal et sont localisées au niveau de la ZT ou du corps basal. Chez la paramécie, les protéines PtFOR20p, PtCen2p et PtCen3p sont impliquées dans l'ancrage du corps basal (Aubusson-Fleury et al. 2012). L'absence de PtFOR20p et PtCen2p conduit à des défauts de structure de la ZT et l'absence de PtCen2p conduit également à la formation de centrioles plus longs. Enfin la protéine OFD1 est également nécessaire dans l'ancrage du corps basal chez la paramécie. Les protéines PtFOR20p, PtCen2p et OFD1 sont donc requises pour l'assemblage de la partie distale du centriole (Aubusson-Fleury et al. 2012; Bengueddach et al. 2017).

Un autre cas est *C. elegans* qui ne possède pas de fibres de transition mais des structures qui semblent équivalentes (Blacque and Sanders 2014) et dont la seule protéine cœur conservée est FBF1 (DYF-19) (Carvalho-Santos et al. 2011). Cette protéine joue un rôle dans l'entrée des protéines de l'IFT en interagissant directement avec la protéine IFT54 (DYF-11), cela montre que DYF-19 est un composant fonctionnel essentiel qui fait des fibres de transition un site clé pour réguler l'entrée des composants de l'IFT (Wei et al. 2014). Chez *C. elegans*, la protéine TTBK2 est aussi conservée (Wei et al. 2015).
En revanche, chez la drosophile, la présence des appendices distaux reste discutée bien que certaines observations faites dans les neurones sensoriels ciliés laisse percevoir la présence de structures évoquant les fibres de transition (Enjolras et al. 2012; Ma and Jarman 2011; Vieillard et al. 2016). De plus, 3 des cinq protéines cœurs des appendices distaux sont conservées, il s'agit de FBF1 (CG5964), CEP164 (CG9170) et CEP89 (CG8214). Cby et TTBK2 sont également conservées. Un chapitre de cette thèse aborde le rôle des protéines des fibres de transition chez la drosophile.

L'étude de ces protéines suggère que les acteurs identifiés ne sont peut-être que des composants fonctionnels des fibres de transition qui peuvent être différents en fonction des organismes, et que les composants structurels des fibres de transition restent encore à être découverts. L'identification et la hiérarchie des protéines des appendices distaux sont donc cruciales pour comprendre l'implication de ces protéines dans leur rôle précoce dans la ciliogenèse.

2. La racine ciliaire

La racine ciliaire est une structure filamenteuse cytosquelettique qui relie la partie proximale du corps basal au noyau cellulaire. La racine ciliaire n'est pas toujours présente en fonction des types cellulaires. La Rootletine en est le composant majoritaire (Yang et al. 2002) et les souris mutantes pour ce gène ne possèdent pas de racine ciliaire dans les cellules des photorécepteurs (Yang et al. 2005). Les souris mutantes ne montrent pas de défauts ciliaires majeurs mais développent tardivement une dégénérescence rétinienne progressive associée à la désorganisation et la perte des segments externes de la rétine et des défauts de localisation des opsines dans le segment interne. Cette structure ne semble donc pas requise

pour la ciliogenèse mais plutôt dans le maintien des cils (Yang et al. 2005).
Il a été montré chez la drosophile, que la perte de la Rootletine conduit à des défauts au niveau sensoriel mais en revanche la structure des cils ne semble pas affectée (Chen et al. 2015; Styczynska-Soczka and Jarman 2015).

3. La zone de transition (ZT)

3.1- Architecture et composition des complexes protéiques

La zone de transition est un compartiment ciliaire localisé au-dessus du corps basal. La formation de la zone de transition correspond aux premières étapes de la ciliogenèse avant la formation de l'axonème. La première observation de cette structure a été faite par Gilula et Satir en 1972 sur des cryofractures d'un organisme lamellibranche, la moule, cette zone de transition avait pour nom le « collier ciliaire » dû à l'observation caractéristique d'aspérités visibles à la base des cils (Figure 16). En réalisant des coupes transversales dans la région du collier ciliaire, ils ont découvert la présence de « coupes de champagne » qui relie la membrane aux microtubules (Figure 16) (Gilula and Satir 1972). Ces structures sont désormais appelées les liens Y et renforcent physiquement le lien entre la base du cil et la cellule plus précisément entre la membrane ciliaire et les microtubules A et B de chaque doublet provenant du corps basal (Williams et al. 2011). En trois dimensions, des reconstructions tomographiques électroniques des liens Y chez *C. elegans* indiquent qu'ils forment des feuillets continus couvrant toute la longueur de la zone de transition (Lambacher et al. 2016; Schouteden et al. 2015). Le collier ciliaire a une taille variable en fonction du type de cil et peut se présenter en plusieurs couches, les fibroblastes n'ont qu'une seule couche alors que dans les cellules rétiniennes, où le cil connecteur est constitué d'une ZT étendue, il y a environ 40 couches du collier ciliaire (Fisch and Dupuis-Williams 2011; Horst, Johnson, and Besharse 1990). L'épaisseur du collier ciliaire semble corrélée avec l'étendue des liens Y suggérant qu'il existe une connexion étroite entre les deux (Gilula and Satir 1972 ; Fisch et Dupuis-Williams 2011, Lambacher et al., 2016).

La découverte des protéines impliquées dans des ciliopathies a permis de donner leurs noms aux protéines en fonction du syndrôme des patients. Ensuite, en termes de composition protéique, des études biochimiques dans des cellules de mammifères et des études d'interactions génétiques chez *C. elegans* ont permis d'organiser trois principaux modules protéiques localisés à la zone de transition, MKS, NPHP et CEP290 (Figure 8). Chacun de ces complexes est composé de multiples protéines qui peuvent être co-purifiées et sont interdépendantes pour leur localisation à la ZT (Chih et al. 2012; Huang et al. 2011; Sang et al. 2011)(Pour revue Gonçalves and Pelletier 2017).
L'organisation en 3 complexes est encore discutée. Certains auteurs n'en considèrent que 2, les complexes NPHP et MKS, en regroupant le complexe CEP290 précédemment cité comme appartenant au complexe MKS (Garcia-Gonzalo and Reiter 2016).
De nombreuses ciliopathies sont causées par des défauts dans des protéines des complexes de la ZT, par exemple le syndrome de Meckel (MKS), le syndrome de Joubert (JBTS), le syndrome de Bardet-Biedl (BBS) ainsi que le syndrome de Senior Loken (SLS) ou encore les

nephronophtises (NPHP) (Hildebrandt, Benzing, and Katsanis 2013; Szymanska and Johnson 2012).

4. La poche ciliaire

Un domaine de la membrane forme une invagination appelée la «poche ciliaire», qui est localisée à la base des cils immotiles et également trouvée à la base de certains cils motiles à proximité des fibres de transition (Molla-Herman et al. 2010). Le rôle de la poche ciliaire n'est pas encore clairement déterminé mais elle pourrait être une plateforme facilitant le trafic vésiculaire associé aux cils et faire l'intermédiaire avec le cytosquelette d'actine (Benmerah 2013). Des vésicules de Clathrine bourgeonnent à partir de cette poche ciliaire, suggérant que cette structure peut jouer un rôle dans l'endocytose ; bien que l'endocytose médiée par la Clathrine ne soit pas requise pour la ciliogenèse (Benmerah 2013; Ghossoub et al. 2011).

5. Le compartiment ciliaire, axonème et membrane ciliaire

5.1- Le compartiment de l'Inversine

Un autre compartiment localisé juste au-dessus de la zone de transition uniquement dans les cils primaires est l'inversine. La protéine Inversine est localisée d'une manière inégale dans le cil, elle est concentrée proche de la zone de transition dans le compartiment de l'inversine mais n'est pas présente dans le reste du cil chez la souris (Shiba et al. 2009).
Des études suggèrent que la localisation de cette protéine dépend des 60 derniers acides aminés et que ce compartiment jouerait un rôle dans le maintien des cils (Shiba et al. 2009; Watanabe et al. 2003). Une autre étude montre que NEK8, NPHP3 et l'Inversine sont des protéines localisées spécifiquement au compartiment de l'inversine (Sang et al. 2011).

5.2- La membrane ciliaire

L'axonème est entouré d'une membrane ciliaire dont la composition protéique et lipidique est différente de celle de la membrane plasmique. Le cil est donc un compartiment à part entière. D'autres protéines pourraient coopérer avec la ZT comme la Septine 2 et 7 qui forment un anneau qui régulerait l'entrée des protéines dans le cil (Garcia-Gonzalo and Reiter 2016). Certains récepteurs de voies de signalisation sont spécifiquement recrutés à la membrane ciliaire comme SMO le récepteur de la voie SHH (Berbari et al. 2010; Rohatgi and Snell 2010). De plus, une étude a ainsi montré que la composition lipidique de la membrane ciliaire est enrichie en PI4P tandis que la localisation du PI(4,5)P2 est restreinte à la membrane périciliaire (Chávez et al. 2015).

5.3- Composition de l'axonème et protéines accessoires

5.3.1- Axonème des cils immotiles

L'axonème est une structure microtubulaire. Des observations en microscopie électronique à transmission ont permis de montrer que les tubules A et B du corps basal sont les seuls

tubules qui se prolongent dans le cil ; le tubule C s'arrêtant au niveau des fibres de transition (Figure 8A). L'axonème est dans la continuité du corps basal composé de 9 doublets de microtubules, il est ainsi appelé axonème en 9+0 pour un cil immotile (Figure 8B).

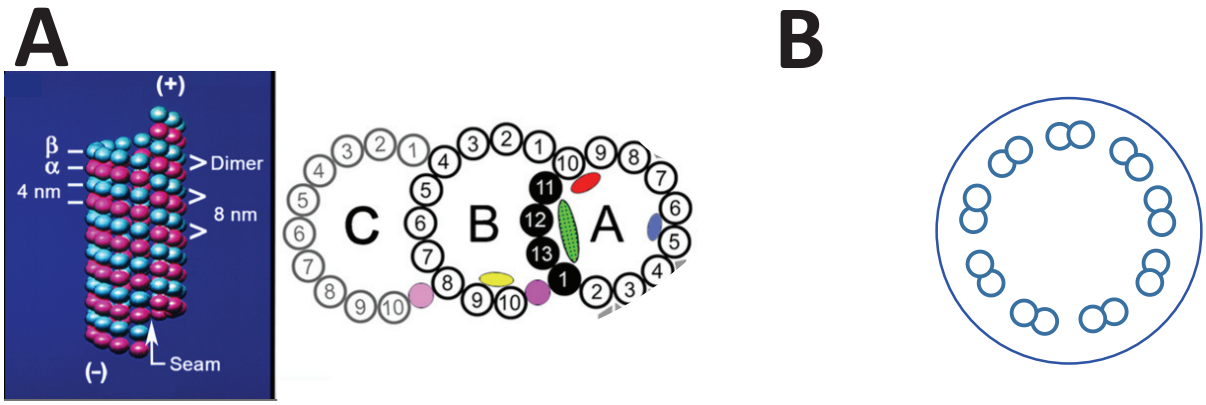


Figure 8 Axonème des cils non motiles

A) Illustration de l'arrangement spatial des tubulines α et β formant des dimères de l'extrémité moins vers l'extrémité plus. Schéma montrant la structure des doublets et triplets de microtubules (le tubule C est grisé car non présent dans le cil). Les protofilaments ont des numéros attribués par convention (adapté de Linck *et al,* 2016). B) Représentation schématique d'un axonème immotile en coupe transversale en 9+0.

5.3.2- Axonème des cils motiles

Les axonèmes des cils motiles possèdent d'une manière générale les 9 doublets de microtubules auxquels se rajoutent des composants structurels additionnels. La structure des axonèmes des cils motiles peut être variable, les différents composants de la mobilité ne sont pas toujours tous présents dans tous les cils motiles.
Les cils motiles sont souvent appelés axonème en 9+2 pour la présence d'une paire centrale de microtubules et comportent alors des fibres radiaires. Il existe des variabilités de structure comme par exemple le protozoaire *Diplauxis hatti* qui présente un axonème en 3+0 (Prensier et al. 1980). Il existe également des cils motiles en 14+0, 9+0 ou 6+0, cela montre que la paire centrale de microtubules n'est pas essentielle à la motilité (Dallai et al. 2010). En revanche, les dynéines axonémales internes et externes ainsi que les complexes régulateurs des dynéines et fibres radiaires (N-DRC) aussi appelés les liens de nexine sont les structures responsables de la motilité (Figure 9A).

L'appareil central est un ensemble de protéines assemblées autour d'une paire de microtubules centraux très conservés chez les eucaryotes depuis LECA (Mitchell 2004). A la différence des 9 doublets de microtubules, les microtubules de l'appareil central ne sont pas une continuité du corps basal ; en effet, ils s'étendent à proximité de la zone de transition jusqu'à l'extrémité du cil (Dentler 1984; Dentler and Rosenbaum 1977). L'assemblage de la paire centrale est initiée par la tubuline γ chez *Trypanosoma brucei* (McKean et al. 2003).
La paire centrale est composée de deux tubules qui sont biochimiquement différents appelés C1 et C2. Chacun est associé à un nombre différent de protéines internes microtubulaires et des études de tomographie ont permis de révéler une structure complexe de l'appareil central

qui forme une gaine autour des deux microtubules centraux (Figure 9B) (Carbajal-González et al. 2013; Loreng and Smith 2017).
Les composants protéiques de ce complexe central sont indispensables pour un battement ciliaire effectif puisque toute mutation ou perte de fonction d'un de ces composants conduit à la paralysie quasi totale du cil ou du flagelle (Carbajal-González et al. 2013; Mitchell and Sale 1999).

Les fibres radiaires ont une structure en forme de « T », la base appelée « tige » est ancrée aux doublets de microtubule A et la « tête » se projette au niveau des protéines de la paire centrale composés des fibres radiaires 1, 2 et 3 (Figure 9C) (Zhu, Liu, and Yang 2017). Les fibres radiaires sont composées de 17 protéines chez *Chlamydomonas* réparties entre la tête, le cou et la tige (Zhu et al. 2017). Une observation latérale des fibres radiaires révèle une forme en Y des fibres radiaires qui sont au nombre de 3 espacées de 96nm (Zhu et al. 2017). Les fibres radiaires sont nécessaires pour maintenir le complexe de la paire centrale à sa localisation centrale et permettent la stabilité des microtubules des doublets et de la paire centrale (Kott et al. 2013). Les fibres radiaires sont ainsi impliquées dans la mobilité des cils et flagelles. De plus, elles permettent notamment de générer un mouvement planaire grâce à une action coordonnée avec les dynéines par le complexe régulateur fibres radiaires/dynéines (N-DRC) (Urbanska et al. 2015; Zhu et al. 2017).

Enfin les dynéines axonémales internes et externes sont composées de complexes multi-protéiques organisés en chaînes lourdes, intermédiaires et légères et avec les complexes de régulation de dynéines sont organisés le long des microtubules (Oda et al. 2016). Les bras de dynéines externes et internes sont ancrés au tubule A des doublets externes en position proximale vis à vis de la membrane plasmique et sont nécessaires pour générer un battement ciliaire de haute fréquence.
Les dynéines axonémales sont des enzymes qui convertissent l'énergie chimique libérée de l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) en force mécanique en faisant glisser les doublets les uns par rapport aux autres. Ce sont ainsi les générateurs de la motilité ciliaire qui sont convertis en flexion par des structures supplémentaires comme le N-DRC (King 2016).
Des mutations dans des gènes codant des protéines des bras de dynéines internes ou externes résultent en une réduction du battement ciliaire et causent des ciliopathies chez l'Homme comme la dyskinésie ciliaire primitive (Lai et al. 2016; Olcese et al. 2017).

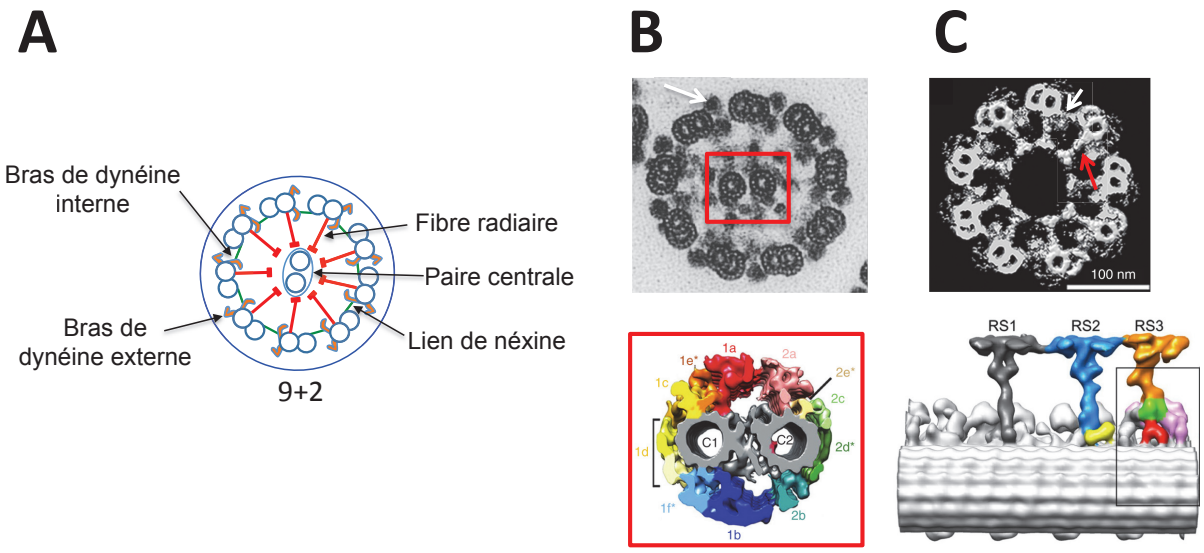


Figure 9 Structures additionnelles des axonèmes motiles

A) Structure typique d'un axonème motile B) Coupe transversale en microscopie électronique à transmission d'un cil motile contenant une paire centrale (encadré rouge), les dynéines axonémales externes sont indiquées par la flèche blanche (Linck *et al*, 2016). En dessous, schéma de la structure protéique de la paire centrale montrant les connexions entre les tubules C1 et C2 (en gris) chez *Chlamydomonas*, ainsi que les projections permettant de faire la liaison avec les fibres radiaires (en couleur) (Carbajal-González et al. 2013). C) Vue transversale en tomographie du flagelle de *T.brucei* ne contenant pas de paire centrale mais dont les fibres radiaires sont bien visualisées par la flèche rouge et les liens de nexine par la flèche blanche (Adapté de Koyfman et al. 2011). En dessous, représentation en tomographie des 3 fibres radiaires, RS1, RS2 et RS3 ainsi que leurs points d'ancrage en vue longitudinale (Urbanska *et al*, 2015).

5.3.3 Modifications post traductionnelles des tubulines

L'axonème va subir des modifications post traductionnelles au cours de son allongement qui sont très importantes pour la maturation des cils. L'assemblage et la fonction de l'axonème dépendent de modifications post traductionnelles comme l'acétylation, la glutamylation, la glycylation et la tyrosination (Yu, Garnham, and Roll-Mecak 2015). Les modifications post traductionnelles participent au maintien ainsi qu'à l'assemblage et le désassemblage des cils (Janke 2014). La majorité des modifications a lieu sur le tubule B de l'axonème car il est plus accessible pour ces changements, en revanche elles affectent les résidus des tubulines α et β. L'acétylation de la tubuline a lieu sur le résidu lysine 40 de l'α-tubuline et de toutes les tubulines α et pas spécifiquement celle de l'axonème (Figure 10).

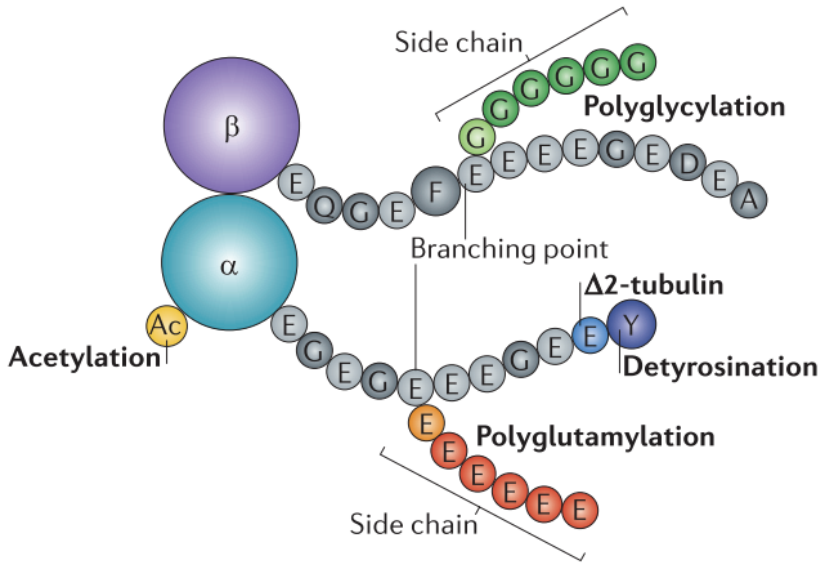


Figure 10 Représentation schématique des dimères de tubuline α et β et leurs modifications post traductionnelles

Les extrémités Cter des tubulines α et β sont représentées avec les différents acides aminés modifiés. La tubuline α est acétylée sur la lysine 40 (Ac en jaune). La détyrosination correspond à la suppression de la tyrosine en C terminal de la tubuline α. La glutamylation (en rouge) ainsi que la glycylation (en vert), mono et poly addition de groupements glutamyles, se fait sur différents acides glutamiques. (Image extraite de Janke, Bulinski, and Chloë Bulinski 2011).

La tubuline contient comme dernier acide aminé en C-ter une tyrosine qui peut être enlevée par détyrosination et ajoutée par tyrosination, l'enzyme catalysant la détyrosination n'est pas encore connue, en revanche, la tyrosination a lieu par TTL (tubulin tyrosine ligase) (Gadadhar et al. 2017). Il existe des isoformes différentes en C-ter de la tubuline alpha, la Δ2 tubuline et la Δ3 tubuline qui ne contiennent pas le dernier ou les deux derniers acides aminés glutamylés, dans ces isoformes la détyrosination est une modification irréversible (Gadadhar et al. 2017). De nombreuses enzymes sont responsables des modifications des tubulines. L'acétylation est catalysée par la tubuline acétyl transférase αTAT1 (Shida et al. 2010) et éliminée par l'Histone Deacétylase 6 ou Sirtuin 2 (Hubbert et al. 2002; North et al. 2003).
Les glutamylations et glycylations ont lieu sur des acides glutamiques de la chaine C-ter des tubulines α et β. Les glutamylases et glycylases sont des membres de la famille TTLL (tubuline tyrosine ligase like) et chaque enzyme a une réaction avec un substrat de référence pour initier et allonger la chaine des résidus polypeptidiques (Janke 2014).

5.4- Zone des singlets

L'extrémité du cil est partagée en deux zones : une zone composée de doublets de microtubules périphériques et une zone, à l'extrémité distale du cil, où il n'y a plus que des singlets de microtubules périphériques. Bien que cette région varie en taille, il semble que cette zone soit conservée à la fois dans les cils motiles et immotiles (Bertelli and Regoli 1994; Sale and Satir 1976; Satir 1968; Woolley and Nickels 1985), l'exception étant la famille des trypanosomes (Woolley, Gadelha, and Gull 2006).

La partie distale du cil là où les singlets de microtubules sont uniquement présents, aurait un rôle sensoriel associé à une localisation de nombreux récepteurs comme CAV2, un canal impliqué dans l'influx calcique requis pour la réponse photophobique de *Chlamydomonas* (Fujiu et al. 2009).
Dans certains types cellulaires, la partie distale du cil est associée à une fonction motile. Dans les cils de l'oviducte et du système respiratoire, la zone des singlets est maintenue par des liens entre le tubule A et la membrane plasmique afin de favoriser la propulsion du mucus dans la trachée et le mouvement de l'ovule le long de l'oviducte. La protéine Sentan fait partie des protéines qui font le lien entre le tubule A et la membrane plasmique, et pourrait ainsi fournir un support pour permettre la motilité des cils dans la zone des singlets dans ces types d'épithéliums (Kubo et al. 2008).
La zone des singlets aurait donc, à la fois, un rôle sensoriel et un rôle dans la motilité des cils mais l'identification et la caractérisation des nouveaux composants permettraient d'identifier précisément les fonctions de cette zone.

5.5- La partie distale du cil, l'extrémité ciliaire et la couronne ciliaire

L'extrémité ciliaire est le lieu de la croissance et résorption de l'axonème, ainsi que le remodelage des particules IFT pour permettre la transition entre le transport antérograde en rétrograde.
D'un point de vue structurel, des études chez *Chlamydomonas* et *Tetrahymena* ont révélé un lien entre les microtubules et la membrane. Lorsque les singlets sont seuls, dans les cils primaires par exemple, des terminaisons irrégulières des microtubules ont été observées (Bertelli and Regoli 1994; Wilsman, Farnum, and Reed-Aksamit 1980). Alors que dans les cils motiles, la paire centrale est reliée à une coiffe centrale composée de filaments liant la paire centrale à un pont central qui est lui même accroché à une bille (Figure 11A).

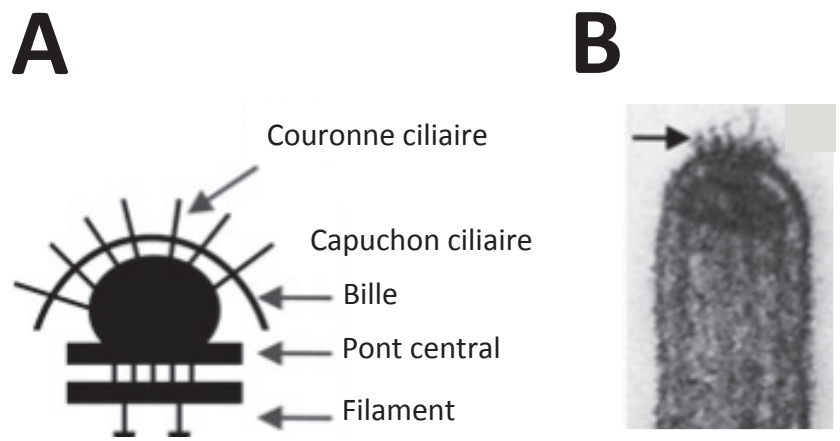


Figure 11 La partie distale du cil, la couronne ciliaire

A) La partie distale du cil peut parfois présenter une couronne ciliaire appelée ainsi suite à l'observation en microscopie électronique de filaments projetant dans le milieu extracellulaire (D'après Fisch et al, 2011). B) Couronne ciliaire (flèche) d'un cil de l'oviducte de lapin (Anderson and Hein 1977).

La coiffe ciliaire correspond à la protection distale du cil qui joue un rôle dans le maintien des structures du cil et serait impliquée dans la régulation de la croissance des microtubules. Une étude *in vitro* a d'ailleurs montré que la coiffe ciliaire bloque l'assemblage des

microtubules (Dentler and Rosenbaum 1977). EB1 est une protéine se localisant à l'extrémité distale du cil au niveau de la coiffe ciliaire chez *Chlamydomonas* et pourrait jouer un rôle dans la transition entre le transport antérograde et rétrograde en interagissant avec IFT172 (Pedersen et al. 2003; Sloboda and Howard 2007; Tsao Che-Chia and Gorovsky Martin A 2008).
La couronne ciliaire correspond à des filaments visibles émanant de l'extrémité ciliaire (Figure 11B). Cette structure possède une charge négative mais les composants moléculaires ainsi que leurs fonctions restent inconnus. Cependant la couronne ciliaire semble faire partie d'exceptions de l'extrémité ciliaire observable dans certains types cellulaires comme l'épithélium des voies aériennes supérieures ou encore de l'oviducte chez les mammifères (Anderson and Hein 1977).

III. GENESE : La ciliogenèse

1. Réplication des centrioles

La réplication des centrioles a lieu lors de la division cellulaire et peut être divisée en 4 grandes étapes, chaque centriole préexistant est capable de former un nouveau centriole (Figure 12).
Au cours du cycle cellulaire, la ciliogenèse a lieu en phase G0/G1. Le cil est ensuite désassemblé pour permettre au centriole d'être répliqué. Les deux centrioles père et fils vont se séparer tout en restant connectés par un lien fibreux pour que chacun initie la formation de procentrioles qui seront perpendiculaires à leur base au cours de la phase S (Figure 12). La duplication des centrioles a ainsi lieu au même moment que la réplication de l'ADN. C'est notamment grâce à la protéine SAS-6 que les centrioles nouvellement formés ont une symétrie 9, SAS-6 organise une structure en forme de roue appelée le « cartwheel » (Kitagawa et al. 2011). Ce sont les protéines SAS-4/CPAP et CEP120 qui régulent l'élongation des centrioles pendant la phase G2 en se liant directement à SAS-6 pour polymériser les microtubules (Comartin et al. 2013; Lin et al. 2013). En effet la perte de l'une de ces protéines inhibe l'élongation du centriole, et leur surexpression entraine l'assemblage de centrioles très longs (Comartin et al. 2013; Lin et al. 2013).
Les procentrioles vont s'allonger jusqu'à atteindre la même taille que le centriole d'origine en phase G2. Le centriole fils va ainsi devenir à son tour un nouveau centriole père, il va donc acquérir les appendices appropriés. Au cours de la phase G2/M les 2 paires de centrioles vont perdre le lien qui les unissait pour ségréger dans chaque future cellule fille au cours de la mitose.
De nombreuses protéines ont été impliquées dans les étapes de séparation, duplication, élongation et maturation des centrioles (Figure 12) (Pour revue Fu, Hagan, and Glover 2015; Meunier and Spassky 2016).

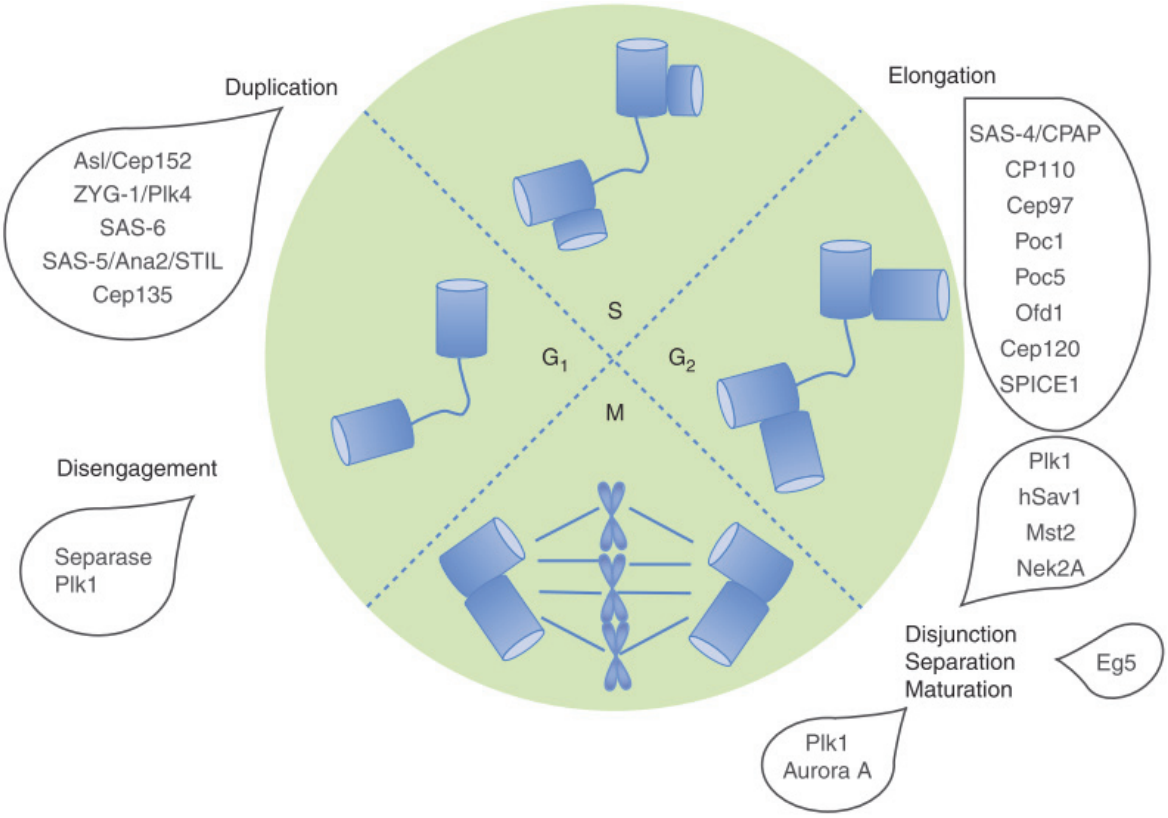


Figure 12 Schéma illustrant le processus de réplication des centrioles ainsi que les acteurs impliqués

La réplication des centrioles débute en phase S du cycle cellulaire où de nouveaux procentrioles sont nucléés perpendiculairement à partir des deux centrioles parentaux préexistants. Les acteurs protéiques impliqués dans chaque procédé sont indiqués dans les bulles. En phase G2, les procentrioles croissent jusqu'à leur taille définitive et sont reliés à leur centriole père. Au cours de la mitose, chaque centrosome est dispersé dans chaque cellule. Le centriole le plus ancien va ensuite acquérir les appendices du corps basal nécessaires à la formation du cil (Fu *et al*, 2015).

2. Réplication des centrioles dans le cas des cellules multiciliées

L'amplification des centrioles dans les cellules multiciliées requiert l'accumulation des protéines Deup1 (paralogue de CEP63) et Ccdc78 au centriole. Les protéines CEP152 et Plk4 sont ensuite recrutées pour permettre la formation du premier procentriole (Zhao et al. 2013). Mais la formation du centriole ne s'arrête pas, un deuxième procentriole est formé ainsi qu'un troisième, ainsi de suite jusqu'à former une rosace de centrioles à partir du centriole fils d'origine autour du deutérosome (Al Jord et al. 2014). Le centriole fils semble jouer un rôle très important dans la formation du deutérosome, une structure observable en microscopie électronique (Al Jord et al. 2014; Klos Dehring et al. 2013).

Au début de leur formation, les procentrioles ont une organisation immature en singlet de tubule du cartwheel et sont formés par le centriole fils uniquement. Le centriole père forme également des procentrioles mais en moindre quantité comparé aux deutérosomes (Al Jord et al. 2014). Lorsque tous les procentrioles se sont détachés de leur centriole d'origine, leur élongation et leur croissance sont synchrones. Il y a ensuite migration et ancrage à la membrane plasmique afin de nucléer les cils. C'est certainement la forte accumulation de la protéine Deup1 au niveau du centriole fils qui joue un rôle essentiel dans la formation des

deutérosomes et l'amplification des centrioles dans les cellules multiciliées (Zhao et al. 2013).
Cependant peu d'études montrent la maturation des centrioles en corps basal pour former un cil dans les cellules multiciliées. Alors que seul le centriole père est, dans les autres types cellulaires, capable de former un cil, il apparaît que dans les cellules multiciliées chaque centriole est capable de former un cil indépendamment de son « âge cellulaire ». Cela pose donc des questions quant à la maturation du centriole en corps basal et la formation des appendices distaux et subdistaux. Il est probable qu'il existe un mécanisme différent qui permettrait une ciliogenèse plus efficace et plus rapide.

Le centrosome permet ainsi la biogenèse des centrioles au cours du cycle cellulaire et dans les cellules multiciliées (Meunier and Spassky 2016). Cependant, il existe dans certains cas, comme les étapes précoces de l'embryogenèse murine ou encore la formation des cils chez l'amibe *Naegleria*, une formation de centriole *de novo* sans centriole matrice préalable (Fritz-Laylin and Fulton 2016).

3. Différents types de ciliogenèse

Il existe deux grands types de ciliogenèse différentes, la ciliogenèse compartimentalisée et la ciliogenèse cytosolique. La ciliogenèse compartimentalisée est divisée en 2 modes d'assemblage, la voie extracellulaire et intracellulaire. La différence entre intracellulaire et extracellulaire réside dans l'ancrage du corps basal qui se fait soit directement à la membrane plasmique soit par l'implication des vésicules ciliaires (Figure 13) (Benmerah 2014; Sorokin 1962). Une autre différence entre ces deux types de ciliogenèse est la présence de poche ciliaire lorsque le cil est formé par la voie intracellulaire ; cette poche étant très transitoire voire absente dans le cas extracellulaire (Ghossoub et al. 2011).

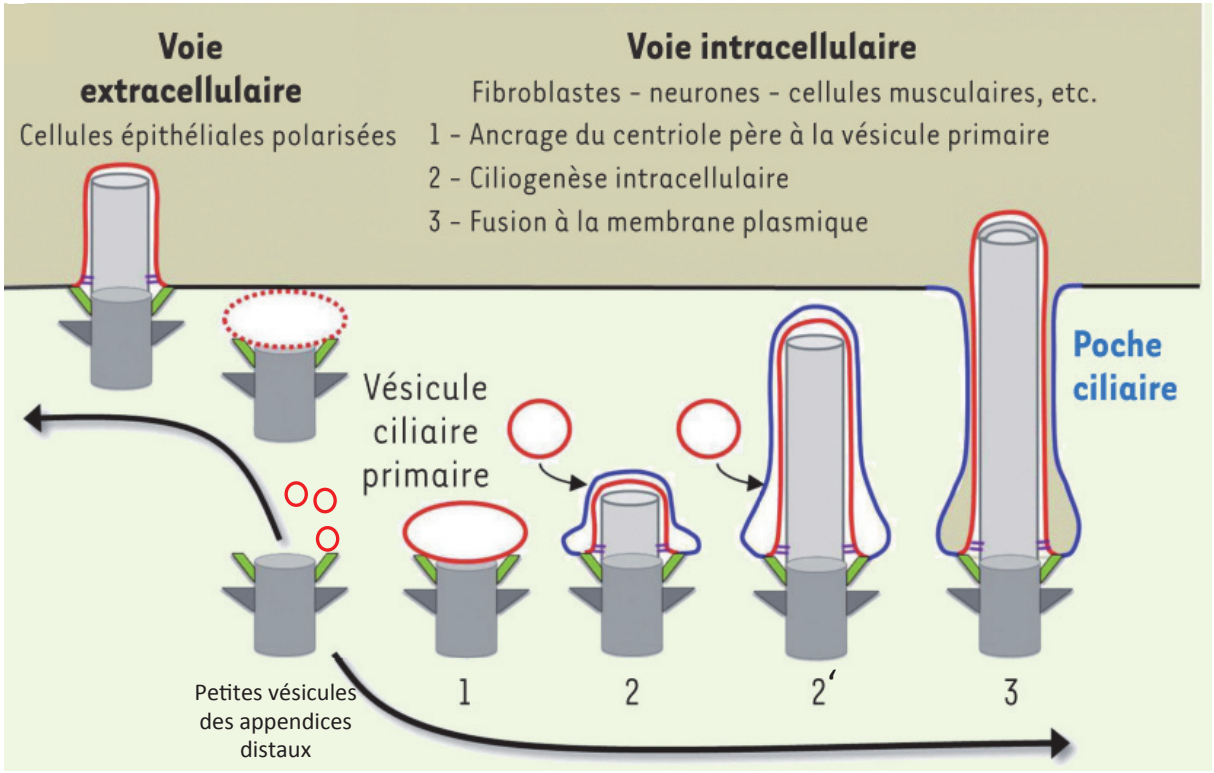


Figure 13 Schéma illustrant les deux voies de ciliogenèse compartimentalisée : la voie extracellulaire et intracellulaire

Les 2 voies de ciliogenèse compartimentalisées sont illustrées, à gauche, la voie extracellulaire dont le corps basal s'ancre directement à la membrane plasmique. La présence potentielle très transitoire d'une vésicule dans cette voie extracellulaire, est illustrée par la vésicule en pointillé. La ciliogenèse intracellulaire à droite implique l'ancrage de petites vésicules des appendices distaux provenant de l'appareil de Golgi, ces vésicules fusionnent pour former la vésicule ciliaire primaire. La zone de transition commence à se former (2), l'ancrage au niveau de la membrane plasmique permet ensuite la croissance du cil (3) (D'après Benmerah, 2014).

3.1-La maturation du centriole père en corps basal

Avant l'initiation de la ciliogenèse, le centriole père acquiert des appendices distaux et subdistaux qui jouent des rôles essentiels pour initier la ciliogenèse. Les protéines identifiées dans la formation des appendices des centrioles père sont **OFD1** (oro facial digital syndrome 1) (Singla et al. 2010), **C2CD3** (C2 calcium-dependent domain containing 3) (Thauvin-Robinet et al. 2014), **ODF2/Cenexine1** (Outer Dense Fiber 2) (Ishikawa et al. 2005) et **DZIP1** (DAZ interacting zinc finger protein) (C. Wang et al. 2013) (Figure 14A). La perte de ces protéines conduit à un défaut de formation des appendices distaux et/ou subdistaux et des défauts de ciliogenèse.

DZIP1, C2CD3 et ODF2/Cenexine1 sont requises à la fois pour l'assemblage des appendices distaux et subdistaux (Ishikawa et al. 2005; Thauvin-Robinet et al. 2014; C. Wang et al. 2013; Ye et al. 2014). L'absence d'une de ces 3 protéines conduit à des défauts de recrutement des protéines des appendices distaux, comme c'est le cas par exemple pour l'absence de CEP164 en condition DZIP1 mutant (C. Wang et al. 2013). De la même façon, l'absence de C2CD3 empêche le recrutement des protéines cœurs impliquées dans la formation des appendices distaux comme CEP83, CEP89, SCLT1 et FBF1 (Ye et al. 2014).

Cependant, le rôle de ODF2 dans la formation des appendices distaux est controversé puisqu'une étude a montré que ODF2 est nécessaire à l'assemblage des appendices distaux dans les cellules murines F9 (Ishikawa et al. 2005). D'autre part, la protéine ODF2/Cenexine1 est nécessaire au recrutement de Chibby à la zone de transition dans des cellules de mammifères (Chang et al. 2013). Mais une autre étude montre que l'absence de ODF2 dans les cellules épithéliales pigmentaires immortalisées de la rétine (hTERT-RPE1) ne perturbe pas le recrutement des 5 protéines cœurs des appendices distaux (Tanos et al. 2013). Au moment de l'écriture de cette thèse, nous ignorons si cette différence était due à une différence entre les types cellulaires ou à une efficacité variable de l'ARNi. Ces deux études sont à analyser et comparer avec attention, puisque dans un cas, une lignée stable de cellules murines délétée des exons 7 à 10 de ODF2 est étudiée alors que la déplétion de ODF2 a été réalisé par l'utilisation d'un shARN dans l'étude réalisée par Tanos et al. 2013.

De plus, la localisation de ODF2 a fait également l'objet de controverse, certains la localisant à la fois aux appendices distaux et subdistaux (Chang et al. 2013; Ishikawa et al. 2005; Rosales, Rattner, and Lee 2010; Tateishi et al. 2013) alors que d'autres affirment que cette protéine est uniquement localisée aux appendices subdistaux (Failler et al. 2014; Mazo et al. 2016). Nous ne pouvons pas trancher concernant la localisation de la protéine ODF2 aux appendices distaux et subdistaux ou uniquement aux appendices distaux puisque chacune de ces études a utilisé des anticorps différents, polyclonaux ou monoclonaux dans des cultures de cellules différentes. En revanche, on peut expliquer ces observations différentes par le fait que la conformation de la protéine puisse être différente entre les appendices distaux et subdistaux et que les anticorps utilisés ne permettent pas de visualiser la protéine ODF2 à la fois aux appendices distaux et subdistaux. L'utilisation d'anticorps réalisé avec différentes régions de la protéine ou la création d'une protéine fusion avec la GFP pourrait être des solutions envisageables pour trancher sur la localisation de ODF2.
En revanche, la partie C terminale de cette protéine semble jouer un rôle important dans la formation à la fois des appendices distaux et subdistaux.

Parmi les protéines importantes dans la maturation du centriole père, OFD1 est requise uniquement pour la formation des appendices distaux mais n'est pas impliquée dans la formation des appendices subdistaux. En effet, après la perte de OFD1 dans des cellules de mammifères, seul les appendices subdistaux sont présents. De plus, la protéine CEP164 n'est pas recrutée aux appendices distaux en l'absence de OFD1, alors que, Nineine, une protéine des appendices subdistaux est quant à elle bien présente (Singla et al. 2010).

Les protéines DZIP1, C2CD3, ODF2 et OFD1 jouent donc un rôle fonctionnel dans la maturation du centriole en corps basal en recrutant les protéines nécessaires à la fonction des appendices distaux et sont nécessaires pour permettre l'initiation de la ciliogenèse.

3.2-Les appendices subdistaux jouent un rôle dans l'ancrage du centriole au cytosquelette

Les appendices subdistaux ont pour rôle de relier le réseau microtubulaire du centriole père au reste de la cellule (Chang et al. 2003; Delgehyr, Sillibourne, and Bornens 2005; Mogensen et al. 2000). Les différences fonctionnelles entre les appendices subdistaux et les pieds basaux restent partiellement décrites et les signaux permettant la formation des appendices subdistaux versus les pieds basaux dans certains types cellulaires sont méconnus.

Le rôle des appendices subdistaux dans la ciliogenèse est contesté en fonction des différents types cellulaires, on ne retrouve pas toujours une implication dans la formation des cils. En effet, dans des cellules rétiniennes RPE1, l'absence de ODF2, CEP128 ou encore Centrioline et Nineine n'empêche pas la formation d'un cil (Mazo et al. 2016). L'implication de ODF2 à la fois aux appendices distaux et subdistaux laisse le doute quant au rôle de cette protéine au niveau des appendices subdistaux dans la ciliogenèse (Figure 14B).

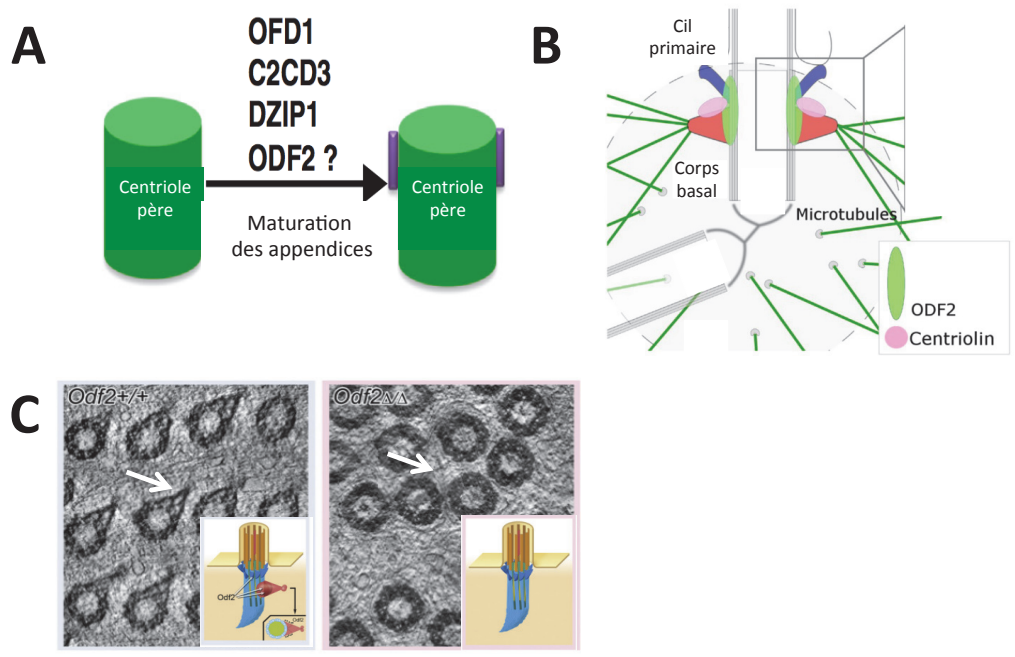


Figure 14 La maturation du centriole père en corps basal et la fonction des protéines des appendices subdistaux

A) Schéma illustrant la hiérarchie et l'assemblage protéique pour la formation des appendices du centriole père. Les protéines OFD1, C2CD3, DZIP1 et possiblement ODF2 jouent un rôle dans le conditionnement du centriole père pour la formation des appendices (Wei *et al*, 2015). B) Modèle proposant le rôle de ODF2 pour la formation des appendices distaux et subdistaux. La centrioline s'associe à ODF2 à la base des appendices. Le pied basal en rouge a pour rôle la stabilisation des microtubules tandis que les appendices distaux (bleu) sont essentiels pour la ciliogenèse. MC: centriole père; DC: centriole fils (Tateishi *et al*, 2013). C) Coupe tomographique d'épithélium de trachée de souris normale ou délétée de 2 exons d'ODF2 montrant l'absence du pied basal (flèche). Un schéma est associé respectivement montrant le positionnement d'ODF2 aux appendices distaux et subdistaux (fibres de transition en bleu et pied basal en rouge) ou montrant l'absence du pied basal mais pas du cil chez ce mutant *ODF2* (Kunimoto *et al*, 2012).

Le mutant de la *Galectin-3*, une protéine se liant à la β-galactoside, donne des cils irréguliers et plus longs dans les cellules de rein de souris comparé au contrôle (Koch et al. 2010). Une autre étude sur la Galectin-3 montre que cette protéine est localisée au niveau du pied basal et

le phénotype des souris mutantes pour ce gène montre que cette protéine est essentielle à l'orientation coordonnée et à la stabilisation des cils motiles (Clare et al. 2014).

Dans les cellules multiciliées de la trachée, l'unique pied basal est associé à certains triplets de microtubules et est orienté dans le sens du battement du cil. La délétion partielle du gène *ODF2* chez la souris entraine l'absence de pied basal dans les cellules multiciliées de la trachée mais n'affecte pas la formation du cil (Figure 14C) (Kunimoto et al. 2012). L'absence du pied basal affecte fortement la coordination du battement des cils et est à l'origine d'une dyskinésie ciliaire primitive chez la souris (Kunimoto et al. 2012).

Le pied basal a donc aussi un rôle de stabilisateur du cil en permettant un battement efficace des cils motiles. Les différences observées en fonction des protéines étudiées montrent donc qu'en fonction des types cellulaires, l'implication des appendices subdistaux ne semble pas être la même dans la formation du cil.

3.3- Ciliogenèse intracellulaire

La ciliogenèse intracellulaire constitue le mécanisme d'assemblage de la plus grande majorité des cils. La ciliogenèse intracellulaire implique le rôle de vésicules primaires ciliaires qui s'ancrent au niveau des appendices distaux pour créer un environnement compatible avec le début de la croissance de la zone de transition puis de l'allongement du cil. Cet ensemble migre ensuite jusqu'à la membrane plasmique pour poursuivre la formation du cil (Figure 15). Les fibres de transition jouent notamment un rôle essentiel dans l'initiation de la ciliogenèse.

3.3.1-Rôle des fibres de transition dans l'initiation de la ciliogenèse

Avant de rentrer dans les mécanismes d'initiation de la ciliogenèse par les protéines des appendices distaux, une étude récente a décrit le rôle de ces protéines dans des types cellulaires non ciliés. La polarisation des centrioles à la membrane des synapses immunologiques est similaire à l'ancrage des centrioles au cours de l'initiation de la ciliogenèse. L'ancrage des centrioles à la membrane plasmique, sans former un cil, à la synapse immunologique serait essentiel afin de permettre une élimination efficace par les lymphocytes T cytotoxiques. En réalisant la perte de CEP83 par ARNi, l'équipe de Gillian M. Griffith a montré que la sécrétion des lymphocytes T cytotoxiques était altérée. Dans ces cellules, les protéines « inhibitrices de la ciliogénèse » CP110 et CEP97 restent en place et le centriole père ne forme pas de cil (Stinchcombe et al. 2015). Ce résultat montre que les protéines des appendices distaux sont nécessaires à l'ancrage du centriole à la membrane dans un contexte non ciliaire.

Pendant les premiers évènements de la ciliogenèse, des petites vésicules des appendices distaux (DAV) vont être recrutées au niveau des fibres de transition, puis ces vésicules vont fusionner afin d'élargir la zone jusqu'à recouvrir et rejoindre l'ensemble des appendices distaux pour former la vésicule ciliaire primaire (PCV) (Figure 13 et 15).

L'ensemble des mécanismes moléculaires qui coordonne la formation et l'ancrage des vésicules ciliaires reste méconnu bien que différents acteurs aient été identifiés comme essentiels (Figure 15). Après la différenciation du centriole père en corps basal, des vésicules des appendices distaux qui proviennent probablement de l'appareil de Golgi viennent s'ancrer au centriole.
La perte d'un des composants cœur comme CEP164, CEP83 ou CEP89 conduit à un défaut d'ancrage de la vésicule ou à un défaut de la formation de la vésicule ciliaire primitive (Joo et al. 2013; Tanos et al. 2013). En plus de leur rôle essentiel dans l'ancrage du centriole à la membrane plasmique, il y a aussi une relation étroite entre les protéines des appendices distaux et l'initiation de la ciliogenèse. Les protéines qui ont un rôle fonctionnel et qui sont recrutées par ces protéines cœurs sont, de plus, essentielles pour la ciliogenèse, comme c'est le cas de Chibby (Burke et al. 2014).
Les fibres de transition sont essentielles pour l'ancrage des vésicules afin d'initier la ciliogenèse, ainsi en accord avec ce rôle, de nombreuses mutations dans des gènes codant pour des protéines des appendices distaux ont été identifiées comme causales de ciliopathies variées. En revanche aucune ciliopathie n'a pour l'instant été associée à des mutations dans des protéines assimilées aux appendices distaux comme FBF1, CBY ou ODF2 (Garcia-Gonzalo and Reiter 2016).

La composition protéique précise des vésicules ciliaires reste méconnue cependant il est possible que ces vésicules soient enrichies en un type de sphingolipide : la céramide et en petite GTPase Rab-11. Une hypothèse est que ce compartiment enrichi en céramide jouerait un rôle essentiel dans la formation d'un complexe protéines-lipides afin de promouvoir la ciliogenèse en évitant la dé-acétylation des microtubules (He et al. 2012).
Quelles sont les vésicules recyclées d'endosome qui ont un devenir de vésicules ciliaires ? Qu'est ce qui détermine le devenir d'une vésicule en vésicule ciliaire ? Aucune protéine ne permet d'identifier spécifiquement les vésicules ciliaires à ce jour. Des études supplémentaires sur ces vésicules devraient permettre de discriminer celles au devenir de vésicules ciliaires primitives des autres vésicules cellulaires.

3.3.2- Formation de la vésicule ciliaire primitive : rôle clé de Rab-8

Les petites vésicules des appendices distaux vont ensuite fusionner jusqu'à former la PCV grâce aux protéines EHD1 et SNAP29 (Lu et al. 2015) (Figure 15). EHD1 est une protéine avec un domaine homologue à Eps15 qui est associée aux protéines membranaires comme la petite GTPase Rab8, et Rab11 qui régule le trafic des endosomes (Zhang, Naslavsky, and Caplan 2012). EHD1 interagit et s'associe avec une protéine SNAP29 qui est un régulateur de fusion membranaire (Rotem-Yehudar, Galperin, and Horowitz 2001). EHD1 et EHD3 ont un rôle essentiel dans la formation des vésicules ciliaires pour orchestrer les évènements ciliaires et notamment l'extension de la vésicule par Rab-8. En revanche, la protéine SNAP29 jouerait plutôt un rôle dans la régulation de l'assemblage de la vésicule au niveau de la fusion des petites vésicules des appendices distaux pour former une vésicule ciliaire primitive plus large (Lu et al. 2015; Wei et al. 2015).

Après la formation de la PCV, la cascade protéique des régulateurs de trafic de membrane Rab-11 et Rab-8 est requise pour la formation de la membrane ciliaire. Rabin-8, le facteur d'échange de nucléotide GTP/GDP de Rab-8 se lie à Rab11 et est libéré dans les vésicules pour activer Rab-8 afin de promouvoir l'assemblage de la membrane ciliaire. Le complexe Cby-CEP164 et la machinerie Rabin8-Rab8 recrutent des vésicules ciliaires, contenant Rab-8, au niveau des fibres de transition pour permettre l'extension de la vésicule ciliaire et l'élongation de l'axonème (Burke et al. 2014; Schmidt et al. 2012). En plus de la famille des Rab, ODF2 interagit avec Rab-8 et fait le lien entre l'ancrage des vésicules, le trafic membranaire et la fonction des microtubules (Yoshimura et al. 2007).

Quelles sont les protéines permettant le recrutement et l'ancrage de nouvelles vésicules ciliaires ?
De nombreuses protéines sont impliquées dans la régulation du trafic vésiculaire au niveau des vésicules Rab-8 positives comme les protéines du complexe BBS, PCM-1 et l'IFT. Les deux protéines CEP290 et PCM-1 sont nécessaires au recrutement efficace de Rab-8 au niveau du corps basal et pourraient jouer le lien avec les protéines du BBS (Kim, Krishnaswami, and Gleeson 2008). Un autre interacteur de CEP164, CCDC141/CEP83 recrute la protéine IFT20 et permet l'ancrage de la vésicule ciliaire au début de la ciliogenèse (Joo et al. 2013). DZIP1 joue un rôle dans la dissociation de l'inhibiteur du GDP de Rab-8 en étant phosphorylé par la kinase Gsk3β. La perte de DZIP1 conduit à un défaut de localisation de Rab-8 au niveau du corps basal (B. Zhang et al. 2015). Les fibres de transition sont ainsi impliquées dans le recrutement des protéines de la zone de transition et dans le stockage des protéines du transport intraflagellaire (Cajánek and Nigg 2014; Goetz, Liem, and Anderson 2012).

En revanche, les signaux permettant l'initiation du recrutement des protéines de la zone de transition sont méconnus. Est-ce que ces protéines sont contenues dans les vésicules ciliaires à destination du corps basal, ou sont-elles recrutées indépendamment lors du recrutement des vésicules ?

3.3.2- Retrait des protéines « inhibitrices » de la ciliogenèse

CP110 et son partenaire CEP97

En même temps que de nouvelles vésicules Rab-8 positives sont recrutées pour allonger la PCV, il y a le retrait des protéines dites « inhibitrices » de la ciliogenèse : CP110 et CEP97 (Figure 15). CP110 a été initialement identifiée comme un composant du centrosome régulant la duplication des centrosomes au cours du cycle cellulaire (Chen et al. 2002). CP110 et sa partenaire CEP97 ont été identifiées comme des inhibiteurs dont le retrait était requis pour initier la ciliogenèse, ces protéines formeraient un chapeau au-dessus du corps basal empêchant la formation de l'axonème (Spektor et al. 2007). La protéine TTBK2 est nécessaire pour enlever la protéine CP110. En absence de TTBK2, la protéine CP110 est présente aux deux centrioles alors qu'elle est présente uniquement au niveau du centriole fils

dans les cellules contrôles de fibroblastes embryonnaires de souris (Goetz et al. 2012). Une autre étude montre que la perte de CP110 réduit la formation des cils chez la souris dans des fibroblastes embryonnaires et qu'il y a un défaut de localisation des protéines des appendices subdistaux comme CC2D2A, ODF2 ou Ninéine (Yadav et al. 2016).
Une nouvelle étude chez le xénope montre également qu'un niveau optimal de CP110 est nécessaire au corps basal pour promouvoir la ciliogenèse alors que CP110 inhibe la ciliogenèse à des taux plus élevés (Walentek et al. 2016). Les rôles opposés de CP110 dans la formation du cil seraient en partie générés par les domaines coil coiled qui favorisent la liaison aux centrioles. Cette étude fournit de nouvelles données sur la façon dont CP110 et sa régulation contribuent au développement et à la fonction cellulaire.
La protéine CP110 a donc été découverte comme une protéine inhibitrice de la ciliogénèse mais des nouvelles études montrent que cette protéine pourrait également promouvoir la ciliogénèse.

Trichopléine

Hormis CP110 et CEP97, il existe d'autres régulateurs de la ciliogenèse, c'est par exemple le cas de la Trichopléine qui est localisée aux appendices subdistaux et qui disparaît des centrioles père au cours de la ciliogenèse (Inoko et al. 2012). La surexpression de la Trichopléine bloque la ciliogenèse, c'est donc un autre régulateur négatif de la ciliogenèse (Keeling, Tsiokas, and Maskey 2016).

OFD1

La protéine OFD1 a des rôles multiples essentiels pour la ciliogenèse. Elle est localisée au niveau de la partie distale des centrioles, et régule à la fois la taille des centrioles et la formation des fibres de transition, elle stabilise les microtubules centriolaires à une longueur définie, et permet le recrutement de IFT 88. Cette protéine est aussi requise pour la formation des cils primaires puisqu'un mutant murin de OFD1 conduit à une absence de cil dans le nœud embryonnaire (Singla et al. 2010).
OFD1 est également localisée aux satellites centriolaires, où elle interagit avec PCM1, CEP290 et la protéine BBS4 (Lopes et al. 2011). Les satellites centriolaires sont des structures qui gravitent autour du centrosome et des mutations dans des gènes codant des protéines localisées au satellites centriolaires comme CEP290 peuvent conduire à des ciliopathies (Tollenaere, Mailand, and Bekker-Jensen 2015). OFD1 est retiré des satellites centriolaires par une autophagie sélective qui est induite au cours de la privation de sérum, processus induisant la ciliogenèse dans des cellules en culture. Par conséquent, OFD1 aux satellites centriolaires a un rôle crucial pour la suppression de la ciliogenèse tandis que OFD1 aux centrioles est nécessaire pour la ciliogenèse (Tang et al. 2013).

Autres protéines impliquées dans la ciliogenèse précoce

Talpid3 est une protéine impliquée dans l'interaction entre les appendices distaux et les vésicules ciliaires. La perte de cette protéine est suffisante pour arrêter le développement du

cil mais il n'est pas clairement montré que cette protéine facilite l'ancrage des vésicules au niveau des appendices distaux. Il se pourrait donc que ce soit par un mécanisme parallèle de la ciliogenèse (Keeling et al. 2016; Yin et al. 2009).

La machinerie ESCRT impliquée dans la fission des membranes pourrait jouer un rôle dans la dynamique des membranes ciliaires. Comme le trafic membranaire est important pour les étapes de la ciliogenèse, les protéines ESCRT pourraient être des composants impliqués mais qui n'ont pas encore été identifiés, comme nécessaire à la ciliogenèse (Olmos and Carlton 2016).

Le centriole fils semble également jouer un rôle essentiel pour initier la ciliogenèse. Une expérience dans des cellules rétiniennes devenues monocentriolaires grâce à la suppression d'un facteur de duplication a montré qu'en supprimant un centriole et en ne laissant que le centriole père, il n'est pas capable de former un cil. La protéine associée au centriole fils, NeurI-4, est impliquée dans le retrait de la protéine CP110 au niveau du centriole père grâce à la proximité entre les deux centrioles (Loukil, Tormanen, and Sütterlin 2017).

Les mécanismes d'initiation de la ciliogenèse sont encore mal connus bien que divers acteurs aient été identifiés. Des études complémentaires seront nécessaires afin d'identifier les acteurs et de proposer un modèle concernant les premiers signaux adressant les vésicules DAV au niveau des appendices distaux pour mieux comprendre l'initiation de la ciliogenèse.

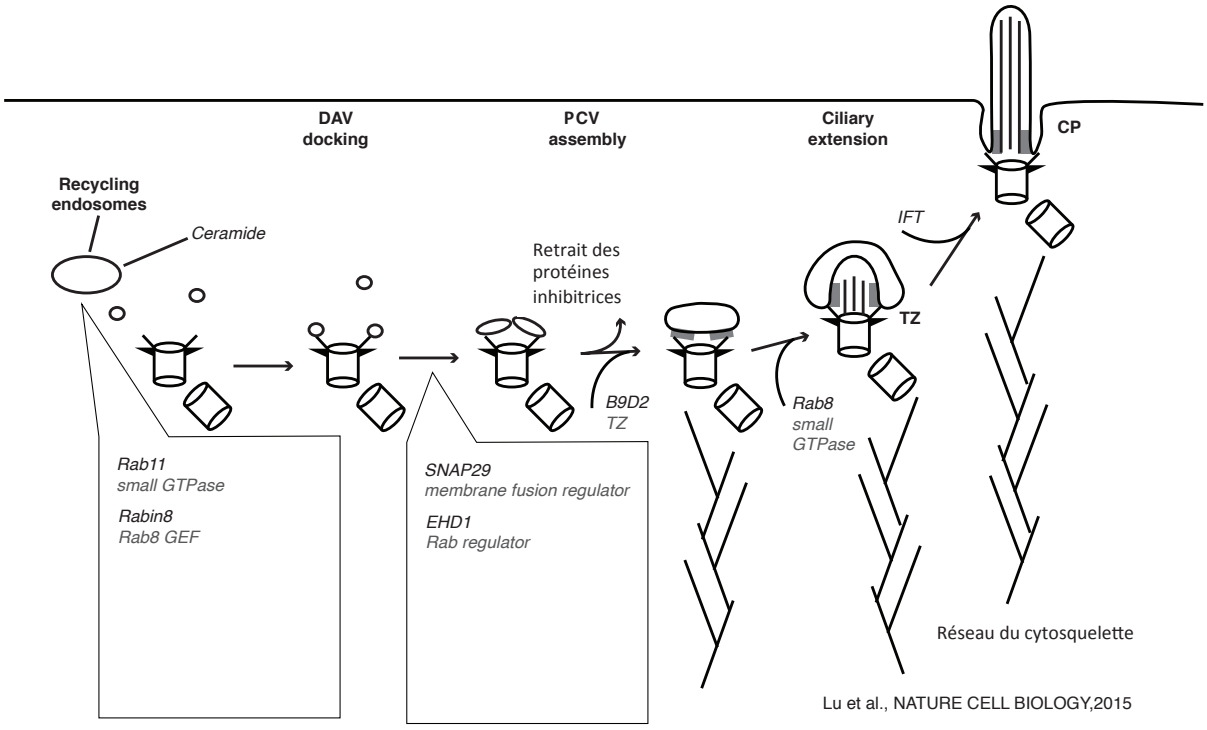


Figure 15 Schéma du processus de ciliogénèse ainsi que les acteurs impliqués

Dès que le centriole père acquiert des appendices, l'ancrage de petites vésicules (DAV) formées de céramide et composées de Rab11 et Rabin8 se fait au niveau des appendices distaux. Les protéines SNAP29 ainsi que EHD1 sont ensuite impliquées dans la croissance de la vésicule ciliaire primitive. Après le retrait des protéines inhibitrices de la

ciliogénèse comme CP110, les protéines de la zone de transition et Rab8 sont recrutées afin de commencer la croissance de la zone de transition. Le cytosquelette probablement impliqué dans la migration du centriole vers la membrane plasmique permet l'ancrage du corps basal à la membrane plasmique. La croissance de l'axonème peut ensuite se poursuivre dans l'espace extracellulaire (Image adaptée de Keeling et al, 2016 et Lu et al, 2015).

3.3.3-Formation de la zone de transition

La zone de transition est le compartiment ciliaire localisé au-dessus du corps basal qui commence à se former après le retrait des protéines inhibitrices. Cette zone de transition est formée de 3 complexes protéiques : CEP290, NPHP et MKS (Figure 16).

Les protéines du module CEP290

Le module CEP290 est composé de CEP290/NPHP6 et NPHP5/IQCB1 (Figure 16). L'équipe de Craige et al. a montré la localisation par immunogold de CEP290 (NPHP6) chez *Chlamydomonas* au niveau des liens Y et sa diminution d'expression inhibe fortement la formation des flagelles et des liens Y de la ZT (Craige et al. 2010). Cela démontre que CEP290 est essentielle à la formation des liens Y qui sont eux-mêmes indispensables à l'assemblage des flagelles (Craige et al. 2010). En revanche, il a été montré dans des cellules rétiniennes RPE1 en culture que CEP290 forme la base de la ZT sur laquelle TCTN2, TMEM67, MKS1 et RPGRIP1L s'assemblent et s'organisent pour créer une partie de la barrière de diffusion des cils (Yang et al. 2015). Plus précisément, CEP290 est localisée entre le corps basal et la zone de transition et permet l'assemblage de la zone de transition (C. Li et al. 2016; Shiba and Yokoyama 2012). Cela est en concordance avec l'observation chez *C. elegans* de CEP290 au niveau du cylindre central (Schouteden et al. 2015). Dans le mutant *ccep290* chez *C. elegans*, le cylindre central est absent et l'assemblage des liens Y est fortement perturbé (Li *et al*., 2016 ; Schouteden *et al*., 2015).

NPHP5/IQCB1 est localisée à la ZT et impliquée dans des nephronophtises chez l'Homme, les souris mutantes pour le gène *NPHP5* ont des défauts d'ultrastructure de la ZT des cils des photorécepteurs mais ne présentent pas de défauts des cils du rein et des fibroblastes embryonnaires (Ronquillo et al. 2016; Sang et al. 2011).
De plus, le complexe NPHP5-NPHP6/CEP290 est nécessaire à l'intégrité du BBSome puisque la suppression de NPHP5 ou de CEP290 entraîne la dissociation respective de BBS2-5 et de BBS8 et ces trois protéines ne sont plus localisées dans le cil (Barbelanne et al. 2015).

Les protéines du module NPHP

Ce module est composé des protéines NPHP1, NPHP4 et NPHP8/RPGRIP1L (Figure 16). Ces trois protéines organisant ce complexe sont localisées à la ZT (Sang et al. 2011).
Des souris mutantes pour le gène *NPHP1* présentent une dégénérescence de la rétine. *NPHP1* interagit génétiquement avec un autre gène codant pour une protéine de la ZT mais qui ne fait pas partie des complexes précédemment décrit : AHI1 (Louie et al. 2010).
Chez *Chlamydomonas*, le mutant nul *NPHP4* forme des flagelles avec une longueur, une ultrastructure et un transport intraflagellaire normal. Cependant, il a été observé que NPHP4 joue un rôle essentiel de barrière à la ZT en régulant la composition protéique soluble et

membranaire (Awata et al. 2014). Des souris déficientes pour le gène *NPHP4* présentent des défauts modérés de développement de la rétine ainsi qu'une altération de la différenciation des spermatides comme c'est également le cas chez les souris déficientes pour *NPHP1* (Jiang et al. 2008). *NPHP4* et *BBS5* interagissent génétiquement, et le double mutant présente des défauts structurels sévères comme une réduction du nombre de liaison Y (Yee et al. 2015).
Les souris mutantes pour *NPHP8/RPGRIP1L* présentent des phénotypes relativement sévères comparés aux mutants *NPHP1* et *NPHP4*, tels que de la microphtalmie, de la polydactylie et des défauts de mise en place de l'asymétrie droite-gauche (Vierkotten et al. 2007). Chez le poisson zèbre, NPHP8/RPGRIP1L est essentielle au recrutement de Dishevelled, un composant de la voie Wnt, au niveau des corps basaux du plancher du tube neural chez le poisson zèbre (Mahuzier et al. 2012).
Des mutations dans les gènes du module NPHP chez la souris ne présentent que des défauts ciliaires légers affectant deux types de cils hautement spécialisés, les cils des photorécepteurs et les flagelles des spermatozoïdes (Jiang et al. 2008; Won et al. 2011).

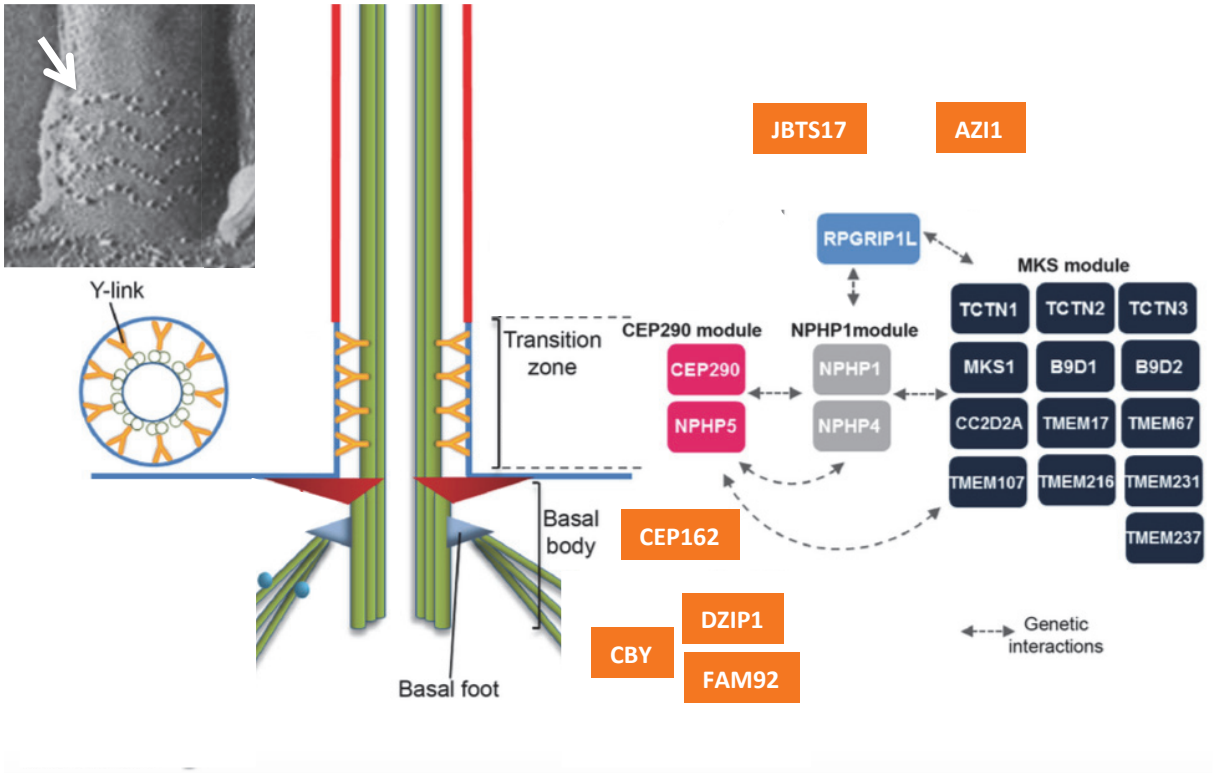


Figure 16 Organisation des complexes protéiques de la zone de transition des cils

En haut de la figure, une image de microscopie à cryo fracture révélant le collier ciliaire à la base des cils de la moule. La présence d'aspérités appelées les colliers de perle, le long du cil est indiquée par la flèche (Gilula Satir 1972). La zone de transition est représentée en coupe transversale avec les liens Y (« coupes de champagnes ») en orange. Trois principaux complexes protéiques ont été identifiés à la ZT : le complexe MKS (bleu marine), le complexe NPHP (gris) comprenant RPGRIP1L (bleu), et le complexe CEP290 (rose). Les protéines de ces complexes interagissent génétiquement. D'autres protéines de la zone de transition ont été identifiées mais ne semblent pas appartenir aux complexes déjà existants, ces protéines sont représentées en orange (adapté de Gonçalves 2017).

Les protéines du module MKS

Ce complexe est composé de 13 protéines, MKS1, B9D1, B9D2, TCTN1, TCTN2, TCTN3,

CC2D2A, TMEM17, TMEM67, TMEM107, TMEM216, TMEM231 et TMEM237 localisées à la zone de transition (Figure 16) (Chih et al. 2011; Garcia-gonzalo et al. 2012; Lambacher et al. 2016).
Des mutations dans des gènes codant pour les protéines de la ZT ont été associées chez l'homme à des ciliopathies. Le complexe MKS tire son nom du syndrome de Meckel-Gruber (MKS), qui peut résulter de mutations dans MKS1, TMEM216, TMEM67, CEP290, RPGRIP1L, CC2D2A, NPHP3, TCTN2, B9D1, B9D2, TMEM231, KIF14, TCTN3 et TMEM107 (Szymanska and Johnson 2012). Parmi celles-ci, toutes sauf RPGRIP1L, NPHP3 et KIF14 codent les composants identifiés du complexe MKS (Mahuzier et al. 2012; Sang et al. 2011). Certains de ces gènes comme TMEM216, TMEM67, CEP290, RPGRIP1L, CC2D2A, TCTN2, TCTN3 et TMEM231 sont également mutés dans une ciliopathie moins sévère, le syndrome de Joubert (JBTS) (Szymanska and Johnson 2012).

Dans les cellules humaines, TCTN1 et ses interacteurs TCTN2, TCTN3, MKS1, TMEM67, CEP290, CC2D2A et B9D1 sont localisées à la ZT (Garcia-gonzalo et al. 2012). TCTN1 est nécessaire à la localisation de MKS1 et TMEM67 à la zone de transition dans des fibroblastes de souris mais n'est pas requise pour le recrutement des autres interacteurs (Garcia-gonzalo et al. 2012). Les souris déficientes pour *TCTN1* présentent une réduction drastique du nombre de cils au niveau de leur tube neural tandis que la formation des cils de la notochorde et des bourgeons des membres est peu affectée (Garcia-gonzalo et al. 2012). Les protéines du complexe MKS-JBTS assurent des fonctions importantes dans l'assemblage des cils. La suppression de la plupart de ces protéines entraîne une réduction du nombre de cils de façon tissu spécifique.

Chez la souris, la délétion de gènes codant des protéines du complexe MKS/JBTS conduit à des phénotypes plus sévères que ceux observés pour les complexes CEP290 et NPHP. Ainsi, l'absence de B9D1, MKS1 ou TCTN1 induit soit une létalité embryonnaire soit la mort très rapide des souriceaux après la naissance (Dowdle et al. 2011; Garcia-gonzalo et al. 2012; Weatherbee, Niswander, and Anderson 2009). Ces souris présentent des phénotypes de polydactylie et d'altérations du développement du système nerveux central et ceci peut s'expliquer par le rôle essentiel de la ZT dans la signalisation SHH médiée par le cil.
De nombreuses mutations dans les gènes codant pour les composants du complexe de MKS et CEP290 provoquent des défauts de ciliogenèse sévères chez les souris, conduisant généralement à une létalité embryonnaire (Chih et al. 2011; Dowdle et al. 2011; Garcia-gonzalo et al. 2012; Sang et al. 2011; Weatherbee et al. 2009). La microscopie électronique en transmission, dans des doubles mutants MKS et NPHP révèle l'absence de fibres de transition et de liens Y, ce qui conduit à un détachement de la membrane et de l'axonème (Huang et al. 2011; Williams et al. 2011; Yee et al. 2015).

Autres protéines de la zone de transition

Du fait de la proximité entre la ZT et les fibres de transition, la localisation précise des protéines est parfois délicate. En effet, la protéine Chibby est localisée aux niveaux des appendices distaux ou à la ZT en fonction des observations (Figure 16). Des études de

microscopie à haute résolution ont permis de montrer que Cby est retrouvée à la base des cils, à l'extrémité distale des centrioles avec une localisation en forme d'anneau, légèrement plus petit et positionné de façon plus apicale que les anneaux de la protéine des appendices distaux CEP164 (Lee et al. 2014; Wei et al. 2015). D'autres études montrent que Chibby est une protéine de la ZT chez la drosophile et les vertébrés (Enjolras et al. 2012; Voronina et al. 2009). Ces différences d'observation peuvent être commentées en fonction des approches utilisées ; la microscopie à haute résolution donne une information plus résolutive que la microscopie classique. Les observations ont toutes été faites avec des anticorps différents hormis chez la drosophile où la localisation d'une protéine de fusion à une protéine fluorescente a été étudiée. Ces approches différentes peuvent, en partie, expliquer les diverses observations. Enfin comme des tissus différents ont été analysés dans ces études il est difficile de faire prévaloir un résultat par rapport à un autre.

Chibby a été identifiée pour la première fois comme un interacteur de la β-caténine chez l'homme ; des expériences de perte conditionnelle de Chibby ont montré qu'elle régule négativement la signalisation Wnt dans des cellules de mammifères (Takemaru et al. 2003). Les souris mutantes pour *Chibby* ont une fonction respiratoire défectueuse associée à un défaut d'ancrage du corps basal ainsi qu'un nombre de cils motiles réduit (Love et al. 2010; Voronina et al. 2009). Chez la drosophile, Chibby est une protéine localisée à la zone de transition et est nécessaire pour la formation de la ZT mais n'est pas impliquée dans la signalisation Wnt (Enjolras et al. 2012).

La localisation de Chibby à proximité du corps basal dans des cellules de mammifères est dépendante de OFD1 et de Cenexine, une isoforme de *ODF2*, protéine des appendices sub-distaux (Chang et al. 2013; Steere et al. 2012; Tateishi et al. 2013).

Aucune mutation de *chibby* chez l'Homme n'a, pour l'instant, été reliée à des ciliopathies. Cependant une étude a tenté de trouver un lien entre l'inhibition de la voie canonique de wnt et le développement de nouvelles cellules adipeuses et donc l'obésité. Mais il a été montré que des variations génétiques rares de *Cby* ne sont pas la cause de l'obésité dans cette étude de cas (VanCamp et al. 2013).

Dila, orthologue de AZI1/CEP131 chez les vertébrés a été identifiée comme une nouvelle protéine de la ZT chez la drosophile (Figure 16) (Ma and Jarman 2011). Cette protéine joue un rôle dans la ciliogenèse chez la drosophile et le poisson zèbre, et en particulier en régulant le transport intraflagellaire dans les cils sensoriels chez la drosophile (Ma and Jarman 2011; Wilkinson, Carl, and Harris 2009). JBTS17/C5orf42 est une autre protéine localisée à la ZT qui est responsable du syndrome de Joubert (Damerla et al. 2015).

Une autre protéine identifiée par protéomique quantitative est CEP162 qui est une protéine associée à l'axonème, recrutée au niveau des appendices distaux pour faciliter l'assemblage de la ZT (Figure 16) (W. Wang et al. 2013). Cette protéine interagit de plus avec des constituants de la ZT comme CEP290 et interagit avec les microtubules ciliaires (W. Wang et al. 2013). Cependant la localisation de cette protéine ne semble pas clairement appartenir ni aux appendices distaux ni à la ZT ; cette protéine pourrait jouer le rôle d'adaptateur entre ces deux structures.

Un interacteur de Chibby a été identifié, il s'agit de FAM92A qui colocalise avec Chibby à la base des cils au niveau de la ZT des cellules multiciliées (Figure 16) (F.-Q. Li et al. 2016). Des analyses bio-informatiques prédisent que cette protéine possède un domaine BAR (Bin/amphiphysin/Rvs), domaine permettant à la fois l'interaction des 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 (McMahon and Boucrot 2015). La perte conditionnelle de FAM92A en cellules RPE1 inhibe la ciliogenèse (F.-Q. Li et al. 2016).
Un autre interacteur de Chibby apparaît dans un crible protéomique mais n'a pas été confirmé, il s'agit de DZIP1 (Figure 16) (F.-Q. Li et al. 2016). DZIP1 semble jouer un rôle dans la ciliogenèse, à la fois chez le poisson-zèbre dans les cellules de Kupffer et en culture de cellules de mammifères (C. Wang et al. 2013; B. Zhang et al. 2015). DZIP1L a été très récemment identifié comme une protéine de la ZT impliquée dans une maladie polykystique rénale qui est nécessaire pour la ciliogénèse et joue un rôle à la barrière de diffusion de la ZT (Lu et al. 2017).

Tout comme les protéines impliquées dans la formation des appendices distaux, les protéines de la ZT ne sont pas encore toutes connues et de nouvelles approches permettront d'identifier de nouveaux partenaires ayant un rôle à la zone de transition. De plus la proximité entre la zone de transition et les fibres de transition induit parfois la confusion sur la localisation des protéines comme des protéines de la ZT ou des fibres de transition.

Fonctions de la zone de transition

De nombreuses études ont montré le rôle des composants de la ZT dans la ciliogenèse et le contrôle de la composition ciliaire (Garcia-gonzalo et al. 2012; Garcia-Gonzalo and Reiter 2016). Des mutations dans des gènes codant pour des protéines impliquées à la zone de transition résultent en ciliopathies plus ou moins sévères et l'analyse des phénotypes a permis d'identifier les conséquences associées à des défauts d'assemblages de la ZT (Czarnecki and Shah 2012).

Les protéines de la zone de transition ainsi que les fibres de transition sont impliquées dans la sélection des composants ciliaires comme des récepteurs membranaires ciliaires. La zone de transition agit comme une barrière de sélection des composants ciliaires (Figure 17).
Les protéines de la zone de transition ainsi que les fibres de transition sont impliquées dans la sélection des composants ciliaires comme des récepteurs membranaires ciliaires. La restriction de taille des protéines ne permet pas une diffusion passive des protéines dans le cil et des études mettent en évidence, le rôle des protéines de la ZT comme barrière de diffusion protéique.
Les fibres de transition ont un premier rôle mécanique de filtres, comme une barrière de diffusion, entre le compartiment ciliaire et le cytoplasme. En effet les fibres de transition sont accrochées au tubule C du centriole et ont une symétrie en 9 qui forme un écartement de 60nm de diamètre (Figure 17A). Elles forment une première barrière de diffusion ne permettant pas la libre diffusion des protéines. En effet, des protéines de plus de 60kDa ne

peuvent pas traverser les fibres de transition sans un transport actif (Figure 17A) (Nachury 2011). Les fibres de transition jouent donc aussi un rôle de première barrière de diffusion à l'entrée du cil. L'anneau de septine joue un second rôle de filtre (Figure 17B).
Le module MKS possède un rôle important dans la fonction de barrière sélective. En effet, la localisation à la membrane ciliaire de deux récepteurs, SST3 et HTR6, est réduite en absence de B9D1, TMEM231, TMEM17 ou CC2D2A, des composants du module MKS, dans des cellules de mammifères (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, une enzyme responsable de la déphosphorylation du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PI(4,5)P2) en phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) dans le cil (Figure 17B) (Garcia-gonzalo et al. 2012).

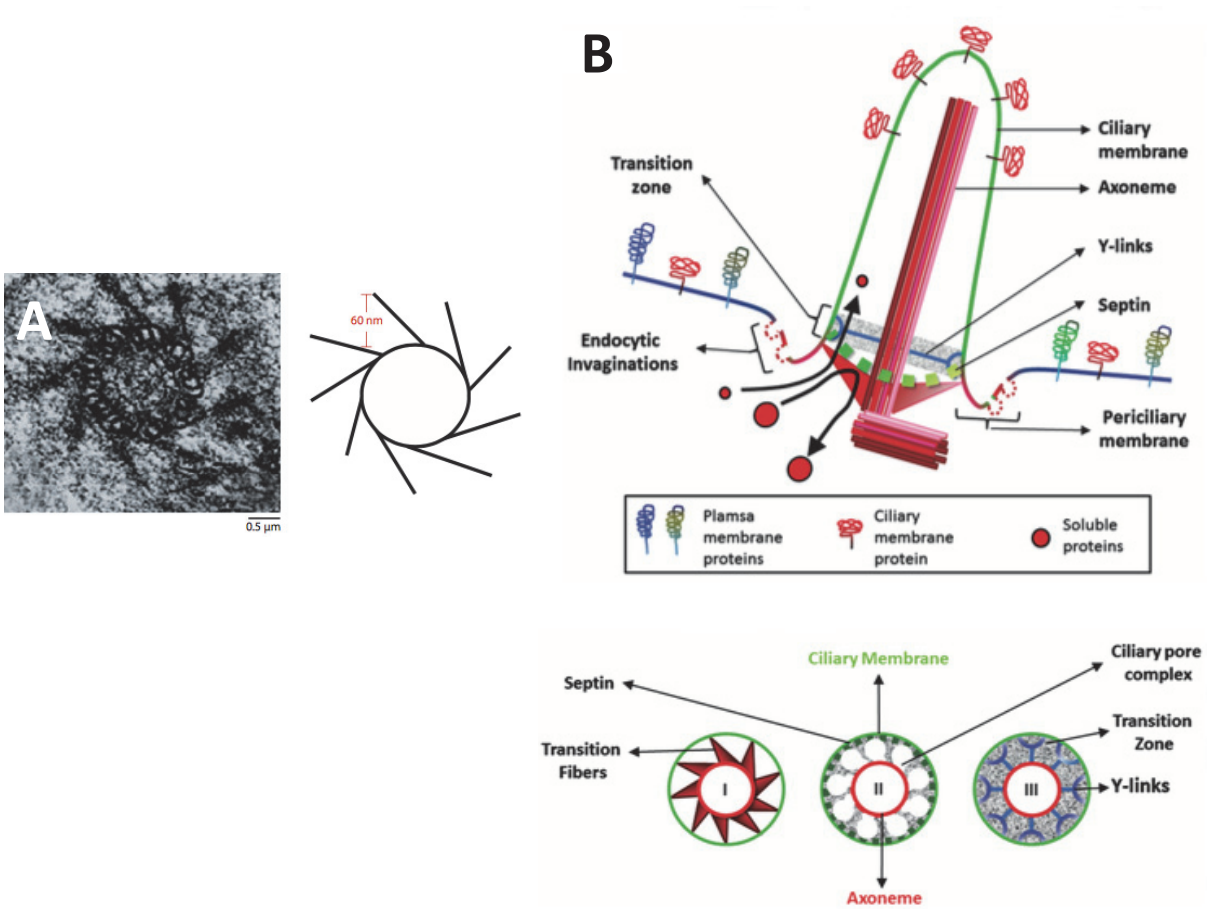


Figure 17 La barrière de diffusion des cils

A) Coupe transversale en microscopique électronique montrant que les fibres de transition ont un rôle de filtre protéique et un schéma montrant que l'espace entre chaque fibre est de 60nm et ne laisse pas passer des protéines supérieures à cette taille sans un transport actif (D'après Nachury et al, 2011). B) Le cil est un organite isolé du reste de la cellule, la membrane ciliaire 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, des septines ainsi que des pores ciliaires et de la zone de transition, (Figure extraite de Madhivanan and Aguilar, 2014)

Le module NPHP participe également au bon fonctionnement de cette sélectivité du contenu ciliaire, puisque la perte de 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.

La base du cil fonctionne comme une barrière de diffusion en régulant l'entrée des protéines dans le cil. Le fonctionnement de cette barrière a été apparenté aux pores nucléaires, les fibres de transition et la zone de transition formeraient ensemble un pore ciliaire à l'instar des protéines des pores nucléaires. La kinésine Kif17, contient des séquences de localisation ciliaire (CLS) (Dishinger et al. 2010) et la délétion de ces motifs empêche sa localisation au cil. De plus, alors que de nombreux composants nucléaires requièrent les Importines afin de pénétrer dans le noyau, la liaison de Kif17 avec l'Importine β2 est nécessaire à sa bonne localisation au cil (Hurd, Fan, and Margolis 2011). Enfin, d'autres composants du pore nucléaire comme les nucléoporines (NUP37, NUP35, NUP62, NUP93, NUP133, NUP214) sont retrouvées au cil où elles co-localisent avec la protéine de la zone de transition CEP290 (Kee et al. 2012). Cependant une étude in vitro dans des cellules IMCD3 détaille un mécanisme de diffusion différent des pores nucléaires ne nécessitant pas les protéines NUP (Breslow et al. 2013). L'hypothèse d'un mécanisme de pore ciliaire comme un pore nucléaire reste donc controversée par le biais de ces deux études, l'une montrant une colocalisation protéique entre les protéines de la ZT et les protéines des pores nucléaires alors que l'autre utilise un modèle mathématique de diffusion et des systèmes cellulaires perméabilisés permettant une analyse quantitative des protéines entrants dans le cil.

3.3.4- Migration à la membrane plasmique

Alors que la ZT a commencé à se former, le complexe corps basal-vésicule ciliaire-ZT va migrer à la membrane plasmique (Figure 15). La vésicule va donc fusionner avec la membrane plasmique pour laisser croitre le cil protégé par la membrane ciliaire. Dans des cellules épendymaires, la migration du corps basal à la membrane apicale au cours de la différenciation de ces cellules est également dépendante de la Myosine II (Hirota et al. 2010; Lemullois et al. 1988). La chaine lourde de la Myosine 10 est également requise pour la migration du corps basal à la membrane plasmique apicale (Hong, Kiim, and Kim 2015). Une étude sur des cellules en culture a montré que les cellules qui sont très étalées, formant ainsi une grande densité de faisceaux contractiles de F-actine sont beaucoup moins susceptibles de former un cil primaire (Pitaval et al. 2010). Contrairement à cette constatation, dans des cultures d'oviductes de caille, un traitement avec l'inhibiteur de l'actine F (Cytochalasin D) a inhibé la ciliogenèse en empêchant l'ancrage du corps basal avec la membrane plasmique (Boisvieux-Ulrich, Lainé, and Sandoz 1990).
Le cytosquelette joue donc un rôle clé dans la migration du corps basal à la membrane plasmique.

3.3.5- IFT et transport des protéines

Comme nous avons vu avec la barrière de diffusion des cils, le cil est un compartiment isolé du reste de la cellule. La synthèse protéique se réalise dans le cytoplasme de la cellule mais n'a pas lieu dans le cil. Il existe ainsi un mécanisme de transport actif appelé le transport intraflagellaire (IFT) qui est nécessaire pour la formation et la maintenance du cil (Figure 18A). Il existe de rares exceptions où l'IFT n'est pas requis et dans ce cas la ciliogenèse est

cytosolique, c'est le cas de l'allongement du flagelle de *Plasmodium falciparum* ou encore de l'allongement du flagelle de spermatozoïde chez la drosophile que nous aborderons plus tard.

Le transport des protéines ciliaires est un transport bi directionnel qui est visualisé sous forme de trains d'IFT qui vont et viennent le long de l'axonème visualisé en microscopie à contraste interférentiel. Il y a un transport antérograde et rétrograde qui permettent l'acheminement des protéines du cytoplasme dans le cil (Fort and Bastin 2014). Les nombreuses protéines de l'IFT ont été classées en deux complexes, IFT-A et IFT-B (Figure 18B) (Pour revue sur les composants Taschner, Bhogaraju, and Lorentzen 2012). Les protéines de l'IFT B sont plutôt impliquées dans le transport antérograde et des défauts dans ces protéines du transport antérograde conduisent à une réduction de la taille des cils (Absalon et al. 2008; Tsao Che-Chia and Gorovsky Martin A 2008). Des mutations affectant les protéines de l'IFT A sont caractérisées par une activité réduite du transport rétrograde et une accumulation des protéines de l'IFT B à l'extrémité du cil (Absalon et al. 2008). La Kinésine-2 est le moteur du transport antérograde alors que les dynéines sont nécessaires au transport rétrograde (Figure 18). Chez *Chlamydomonas*, les trains d'IFT se déplacent le long du cil en étant en lien avec le tubule B et plus précisément au niveau du proto filament 7 (Vannuccini et al. 2016).

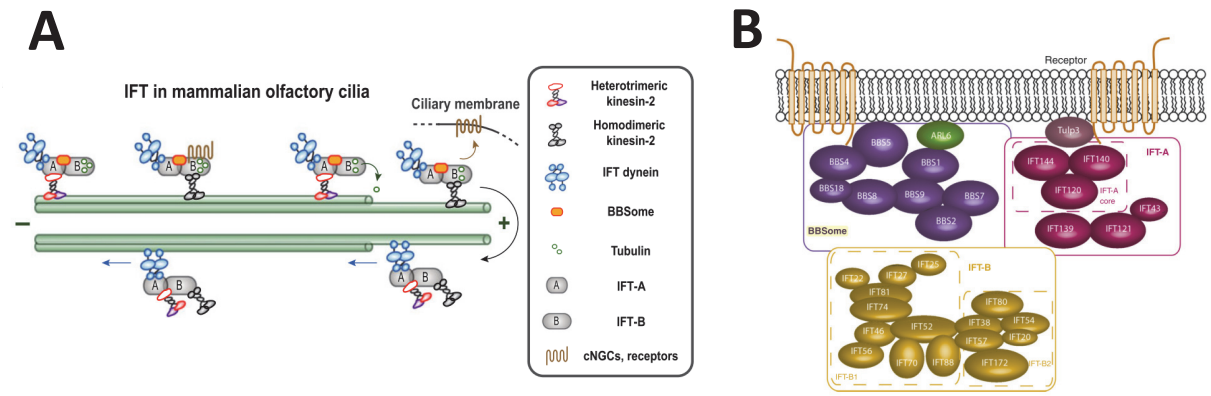


Figure 18 Organisation de l'IFT

A) Trafic de l'IFT pour construire l'axonème, le trafic antérograde implique les kinésines 2 hétérotrimériques et le trafic rétrograde implique les dynéines (Adapté de Prevo, Scholey, and Peterman 2017). B) Architecture du complexe de l'IFT A et B et du BBSome. Le complexe octamérique BBSome joue également un rôle dans le transport comme un adaptateur protéique (Adapté de Mourao *et al*, 2016)

Le transport intraflagellaire a un rôle dans la délivrance des différents composants ciliaires, de la base du cil à son extrémité, qui sont regroupés sous le terme « cargo » comme les composants de l'axonème, de la membrane ciliaire ou encore les protéines impliquées dans des voies de signalisation. Plus précisément, le processus de l'IFT peut être divisé en plusieurs phases distinctes. Premièrement, les particules IFT, les moteurs et les précurseurs axonémaux sont recrutés à la base du cil. Ensuite l'assemblage des particules IFT et le chargement des précurseurs axonémaux a lieu au niveau des fibres de transition. L'organisation des protéines est ensuite modifiée à l'extrémité distale. La dynéine et le complexe IFT-A sont nécessaires pour le recyclage des protéines et le transport rétrograde (Fort and Bastin 2014)

Il a été observé deux types structurellement différents de trains d'IFT chez Chlamydomonas, des « longs » et des « courts ». Les trains d'IFT longs sont plus abondants au début de l'allongement du cil alors que les trains d'IFT courts augmentent plus le cil s'allonge (Pigino et al. 2009). Chaque train dispose d'une ultrastructure spécifique qui est étroitement liée à leur fonction au cours de la genèse d'un cil. Il a été montré que les trains longs prédominent au début de la croissance du cil alors que les courts sont plutôt présents pour le maintien du cil, une fois qu'il a atteint la bonne longueur (Vannuccini et al. 2016). L'IFT joue également un rôle dans le contrôle de la longueur des cils (Fort and Bastin 2014).

Il a été découvert très récemment l'existence d'un transport intraflagellaire spécifique pour les lipides qui consiste à conduire dans le cil des protéines qui ne sont pas solubles comme NPHP3 ou INPP5E. Ce transport a été appelés LIFT (lipidated protein intraflagellar targeting) et permettrait de livrer les protéines à la membrane ciliaire grâce à UNC119B ou PDE6D, mais serait également en interaction fonctionnelle avec l'IFT (Jensen and Leroux 2017).

3.3.6- Le BBSome

Le BBSome est un complexe hétéro-octamérique qui s'associe avec l'IFT (Mourão, Christensen, and Lorentzen 2016). Les gènes initialement découverts dans le syndrome Bardet-Biedl chez l'Homme ont donné le nom aux protéines BBS qui font partie du BBSome. Le transport réalisé par l'IFT requiert le BBSome qui est relié à la membrane par une petite protéine GTPase, ARL6/BBS-3 (Figure 18B). Cependant ce complexe est traité indépendamment des deux complexes de l'IFT car il serait un adaptateur impliqué dans l'export des protéines dans le cil plutôt qu'un composant intégral des complexes IFT puisque chez *Chlamydomonas,* le BBSome n'est pas toujours présent avec les trains d'IFT (Lechtreck 2009). En fonction des organismes et des type cellulaires, les protéines BBS sont donc considérées comme un régulateur des complexes IFT, un composant des particules IFT ou un adaptateur de cargo (Lechtreck et al. 2009; Williams et al. 2014). Les complexes IFT et le BBSome permettent donc un transport bidirectionnel essentiel pour déplacer les cargos à l'intérieur et à l'extérieur du cil (Jensen and Leroux 2017; Taschner et al. 2012).

3.3.7- Adressage des constituants ciliaires vers le cil.

Constituants du cytosol

La prise en charge et l'acheminement des protéines localisées dans le réseau trans-golgien (TGN = Trans Golgi Network) à destination du cil sont permis via l'identification de séquences de ciblage ciliaire (CLS = « Ciliary Localization Sequence ») dans la séquence de certaines protéines dont les récepteurs ciliaires. Il existe des séquences qui déterminent la localisation ciliaire comme par exemple le motif VXPX or RVXP dans le N ter de polycystine 2 (PC2) (Geng et al. 2006). 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). Pour l'instant il n'y a donc pas de séquence consensus clairement déterminée qui ciblerait les protéines au niveau du cil, et la machinerie cellulaire qui les détecterait reste à déterminer.

Outre la prise en charge des composants ciliaire à la base du cil vers le cil, des composants du transport intraflagellaire tel que IFT20, un membre du complexe B de l'IFT semble faciliter le transport vers le cil, de protéines cytoplasmiques. En effet, sa diminution d'expression n'influe pas sur la longueur du cil mais affecte la localisation de la Polycystine 2. 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 caractéristique à IFT20 puisque la suppression d'IFT88 ne reproduit pas de phénotype similaire (Follit et al. 2006).

Constituants membranaires

Bien que la plupart des mécanismes de ciblage au cil implique la distribution de protéines cytoplasmiques via une voie vésiculaire, une importante alternative implique la translocation de protéines transmembranaires provenant de la membrane plasmique qui entoure le cil. Le récepteur Smoothened (Smo), est transloqué dans le cil par diffusion latérale dans la membrane ciliaire, après stimulation de la voie Hedghog. Ce type de transport en provenance de la membrane plasmique vers la membrane ciliaire a été rapporté chez *Chlamydomonas* pour le transport des agglutinines (Hunnicutt, Kosfiszer, and Snell 1990).

Enfin, il existe un mécanisme de transport vers la membrane ciliaire, de protéines ayant subi une modification lipidique. Ces protéines sont solubilisées dans le cytoplasme via leurs interactions avec des polypeptides. Ces modifications lipidiques sont principalement des myristoylations, un ajout de groupement myristoyle sur un résidu glycine dans la région N-Terminale du peptide. L'acteur clé dans le transport de ces protéines ciliaires solubilisées est la protéine UNC119. Celle-ci interagit avec NPHP3 et la transducine, ce qui permet la solubilisation de protéines dans le cytoplasme et leurs diffusions simples, tout en étant associées à UNC119 durant la traversée de la barrière de diffusion (Wright et al. 2011; Zhang et al. 2011).

Un autre groupe de gènes qui semble jouer un rôle clé dans le trafic de protéines vers le cil est la famille de gène *Tubby* (Figure 19) (Badgandi et al. 2017). Elle est constituée de *Tubby* et de plusieurs gènes *Tubby-like* (TULP = Tubby-Like Protein). La famille de protéines Tubby fonctionne comme un adaptateur général du trafic ciliaire des récepteurs membranaires (Figure 18). D'autres protéines membranaires, telles que la famille de canaux TRP polycystines PC1 et PC2 nécessitent également TULP3 pour le trafic ciliaire. Bien que TULP3 permette le transport de protéines membranaires, PDE6D et UNC119 déterminent le trafic des protéines prénylées (Humbert et al. 2012) et de cargaison myristoylée associée à la membrane (Wright et al. 2011) en se liant aux fractions lipidiques respectives. En revanche, TULP3 ne gère pas le trafic d'Arl13b, une protéine palmitoylée associée à la membrane des cils (Badgandi et al. 2017).

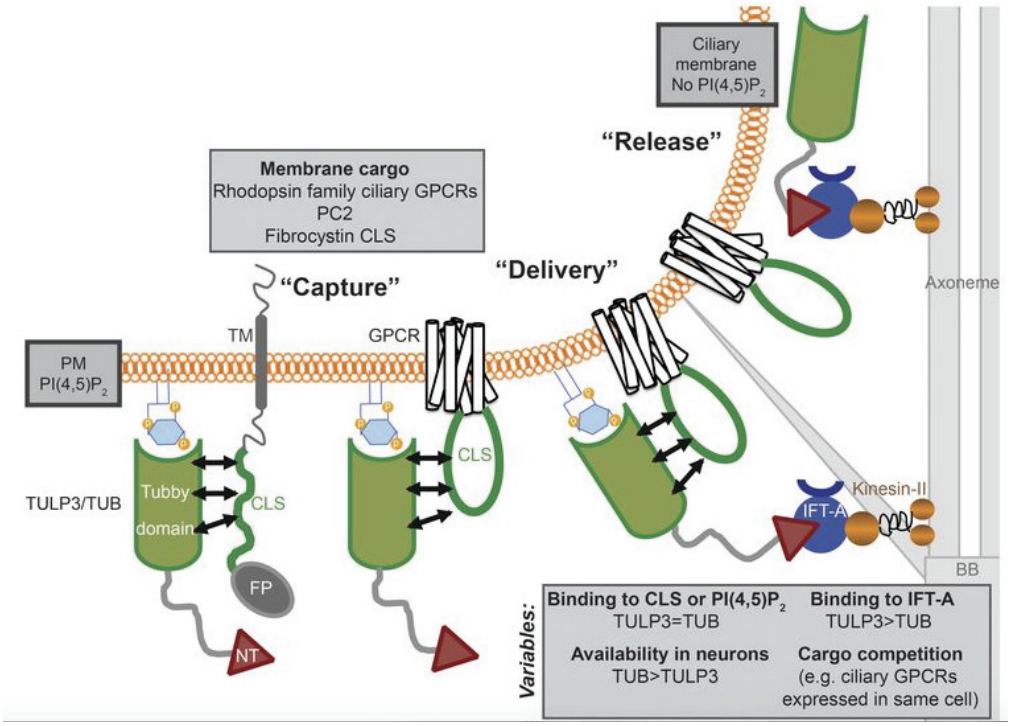


Figure 19 Modèle du trafic à la membrane ciliaire par les protéines Tubby

Les protéines Tubby sont des adaptateurs qui reconnaissent les protéines contenant la séquence CLS, séquence ciblant les protéines au compartiment ciliaire. Le complexe formé entre les protéines et le complexe TULP3 est ensuite pris en charge par l'IFT A afin de traverser la barrière de diffusion (D'après Badgandi et al, 2017).

3.4- Ciliogenèse extracellulaire

La ciliogenèse extracellulaire se réalise directement par l'ancrage du centriole père à la membrane plasmique et la croissance du cil se fait immédiatement à la surface de la cellule.
La ciliogenèse extracellulaire aurait lieu principalement dans les cellules polarisées comme les cellules épithéliales des reins et des poumons par exemple (Dalen 1983; Latta, Maunsbach, and Madden 1961). Cependant une étude plus récente sur des cellules épithéliales de l'épiderme de xénope montre la liaison avec une vésicule avant de s'ancrer à la membrane plasmique (Park et al. 2008). C'est le cas aussi dans les cellules épithéliales de la trachée de souris, où il a été montré que Chibby est nécessaire pour le recrutement de vésicules ciliaires au niveau des corps basaux avant l'ancrage à la membrane plasmique (Burke et al. 2014).
Une question se pose donc sur l'existence réelle d'une ciliogenèse extracellulaire ou s'il y aurait simplement l'ancrage d'une vésicule très transitoire juste avant la fusion avec la membrane plasmique.

3.5- Ciliogenèse cytosolique

Le processus de ciliogenèse cytosolique implique une exposition de tout ou partie de l'axonème au contact du cytoplasme. La ciliogenèse cytosolique est un type de ciliogenèse où l'allongement de l'axonème, se fait en partie ou en totalité dans le cytoplasme de la cellule et n'est donc pas isolé du reste de la cellule par une membrane (Figure 20).

Ce type de ciliogenèse a été partagé en 3 modes d'assemblage différents par Tomer Avidor Reiss pour différencier les organismes, l'implication des protéines de l'IFT et des protéines de la zone de transition qui toutes deux permettent de délimiter le compartiment ciliaire dans la ciliogenèse compartimentée. Bien que ces protéines ne devraient pas jouer un rôle dans la ciliogenèse cytosolique, certains assemblages les requièrent c'est la raison pour laquelle 3 modes de ciliogenèse cytosolique ont été décrits. Quatre types cellulaires utilisent ce mode d'assemblage non compartimenté : les flagelles des gamètes de *Plasmodium*, de *Giardia intestinalis*, de *Drosophila melanogaster* et des mammifères présentent une ciliogenèse cytosolique (Figure 20) (Avidor-Reiss and Leroux 2015).

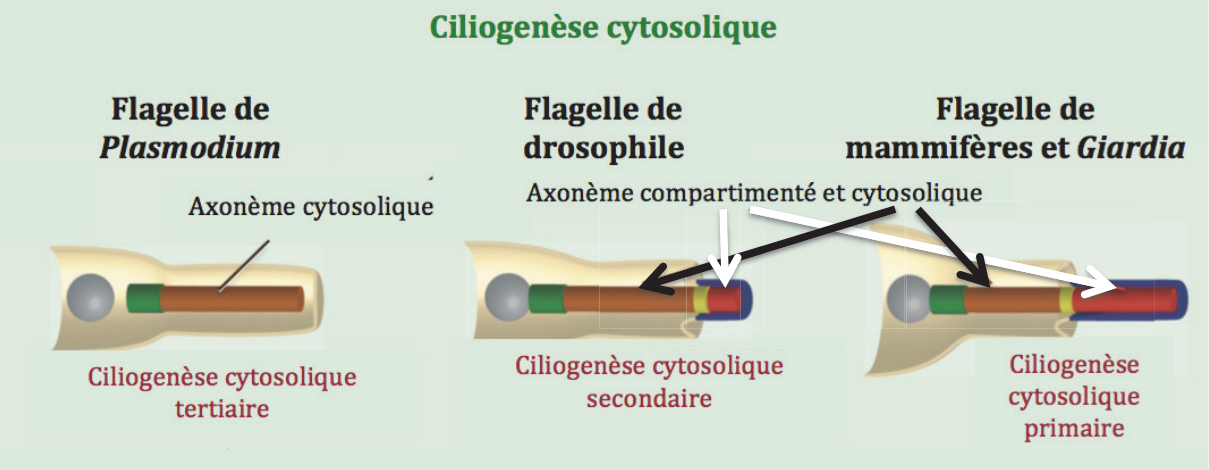


Figure 20 Schéma illustrant les différents modes de ciliogenèse cytosolique.

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 mammifères et de *Giardia intestinalis* possèdent également une région non compartimentée ainsi qu'une région compartimentée. Le centriole est représenté en vert, l'axonème cytosolique en marron, l'axonème compartimenté en rouge et le ring centriole ou l'annulus en jaune qui permettent de faire le lien entre les 2 types d'axonèmes (d'après Avidor-Reiss and Leroux, 2015).

Les hypothèses qui sont données pour ses modes d'assemblage sont spécifiques pour chaque organisme. La ciliogenèse cytosolique présente des avantages concernant la rapidité d'assemblage puisque tous les composants sont présents dans le cytoplasme pour *Plasmodium* (Sinden et al. 2010). Chez la drosophile, cela permet de former un cil extrêmement long jusqu'à 5 cm chez *Drosophila bifurca* (Joly et al. 2003). Et encore chez l'Homme, cela pourrait permettre d'assurer une meilleure production d'énergie (Toure et al. 2011).

3.5.1- Ciliogenèse cytosolique primaire

La ciliogenèse cytosolique primaire est caractérisée par une exposition de l'axonème mature dans le cytoplasme uniquement après avoir terminé son élongation complète par ciliogenèse compartimentalisée (Figure 21A).

Formation de l'axonème au cours de la spermatogenèse des mammifères

La formation du flagelle du spermatozoïde des mammifères suit les mêmes étapes que la ciliogenèse intracellulaire, à la différence qu'au cours de l'allongement du flagelle, le corps basal vient s'ancrer au niveau du noyau (Figure 21A) (Leblond and Clermont 1952). La croissance de l'axonème débute et lorsque il est complètement allongé, l'annulus (anciennement appelé l'anneau de Jensen), une structure qui relie l'axonème à la membrane ciliaire va migrer le long de l'axonème et s'éloigner du corps basal, en laissant l'axonème mobile et mature, exposé au cytoplasme (Kwitny, Klaus, and Hunnicutt 2010; Toure et al. 2011). L'annulus est une structure dense aux électrons connectant la partie cytoplasmique et compartimentalisée du flagelle qui est enrichi en protéines de la famille des septines qui forment des hétéropolymères de septines 1, 4, 6, 7 et 12. Avant de commencer sa migration, l'annulus est associé avec le corps chromatoide dont la composition et la fonction restent, pour l'instant, inconnues (Fawcett, Eddy, and Phillips 1970; Paniagua et al. 1987).

A la fois la machinerie IFT-BBSome et les protéines de la ZT sont requises pour la formation du flagelle des mammifères. Chez la souris, les protéines IFT88 et Kif3a de la machinerie IFT jouent un rôle indispensable à la formation du flagelle (San Agustin et al. 2015). Ces protéines sont présentes le long du flagelle au cours de son élongation par ciliogenèse compartimentée mais ne sont plus présentes dans les spermatozoïdes matures. Les mâles mutants pour *Ift88* sont stériles et ont des défauts d'ultrastructure des flagelles. Il semble donc que l'IFT joue un rôle uniquement pour la formation du flagelle mais pas dans son maintien. La formation du flagelle des mammifères est donc compartimentée et nécessite l'IFT mais le déplacement de l'annulus lorsque le flagelle est allongé le rend en partie cytosolique.
Quand l'annulus se retrouve à sa position finale dans les spermatozoïdes matures (Figure 21B), d'autres protéines lui sont associées comme DNAJB13 et Tat1 qui interagissent avec Sept4 (Guan, Kinoshita, and Yuan 2009; Toure et al. 2007). Certaines protéines de la zone de transition comme MKS1 ou CEP290 ont également été identifiées au niveau de l'annulus mais leurs rôles restent à être identifiés (Basiri et al. 2014). Il n'est donc pas exclu que les protéines de la ZT pourraient jouer un rôle pendant la ciliogenèse cytosolique.

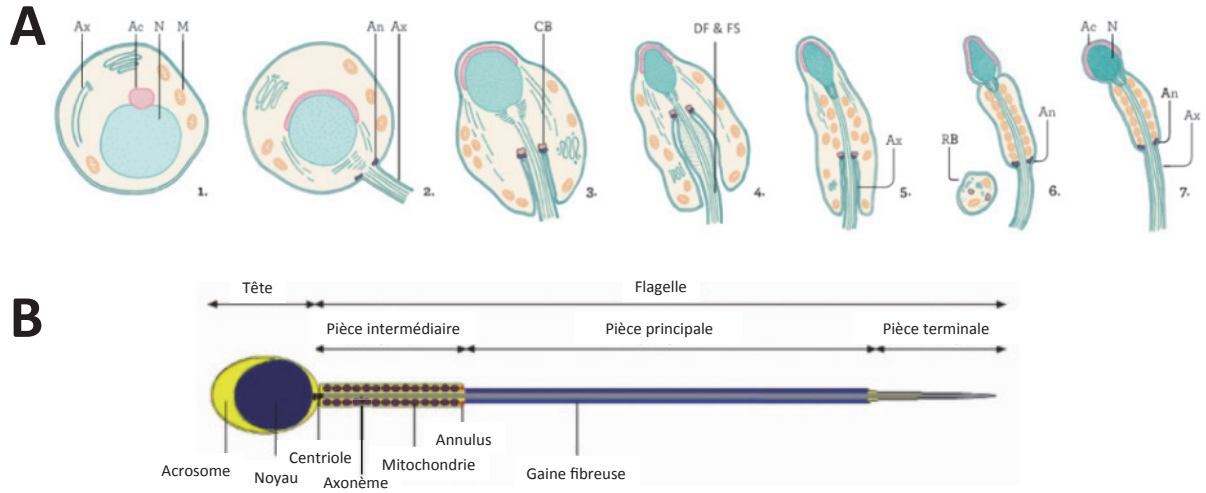


Figure 21 Assemblage du flagelle au cours de la spermatogenèse chez les mammifères

A) À la suite de la méiose, les spermatides vont changer morphologiquement. L'acrosome (Ac) est formé par la fusion de vésicules du Golgi, et le noyau (N) devient très condensé avec l'accumulation d'histones et de protamines spécifiques (étape 1 à 3). L'ensemble corps basal-axonème s'ancre à la membrane plasmique, l'annulus (An) est formé très tôt dans le cytoplasme. Au cours de l'élongation du flagelle, la mitochondrie s'aligne le long de l'axonème (Ax) et l'excès de cytoplasme est enlevé sous la forme de corps résiduel (RB). L'axonème est entouré par des fibres denses (DF) et des gaines denses (FS). L'annulus migre ensuite à sa position terminale entre la jonction de la pièce intermédiaire et principale (étape 4 à 7). Les mitochondries (M) se réorganisent autour de l'axonème cytoplasmique. (Dirami *et al*, 2015). B) Schéma d'un spermatozoïde mature avec les différentes parties qui le constituent (Image adaptée de Toure *et al*, 2011)

D'autres processus sont nécessaires pour permettre la formation d'un spermatozoïde mature (Figure 21A) comme par exemple la morphogenèse du noyau. Des dérégulations peuvent conduire à des stérilités humaines comme la globozoospermie qui est caractérisée par une morphogenèse du noyau anormale qui est souvent la cause d'un défaut de l'acrosome, une structure localisée à l'extrémité du noyau ou des protéines se localisant autour de la membrane nucléaire (Ray et al. 2017). Les protéines de l'IFT jouent aussi un rôle important dans la morphogenèse du noyau par le biais de la manchette, une structure microtubulaire gainant le noyau pour lui donner sa forme définitive ainsi que l'acrosome. Chez la souris mutante pour la protéine IFT88, en plus de présenter des défauts d'ultrastructure des flagelles, le noyau est malformé ainsi que l'acrosome et la manchette (San Agustin et al. 2015).

Formation de l'axonème au cours de la spermatogenèse de Giardia

Le flagelle de spermatozoïde de *Giardia* s'assemble d'une manière similaire à ceux des mammifères, mais les protéines de la ZT ne sont pas présentes chez cet organisme, cela suggère donc un mécanisme un peu différent des mammifères (Avidor-Reiss and Leroux 2015).

3.5.2- Ciliogenèse cytosolique secondaire : Allongement du flagelle de spermatozoïde de drosophile

La ciliogenèse cytosolique secondaire a lieu pour allonger le flagelle de spermatozoïde de drosophile et implique les protéines de la ZT mais pas le transport intraflagellaire. Dans ce cas, c'est la ZT qui va migrer le long de l'axonème au cours de son élongation (Figure 20). Le détail de l'assemblage sera décrit un peu plus tard dans ce manuscrit.

3.5.3- Ciliogenèse cytosolique tertiaire : Allongement du flagelle de spermatozoïde de *Plasmodium*

Les flagelles de *Plasmodium* se forment selon le mécanisme de ciliogenèse cytosolique de type tertiaire comme le considère Tomer Avidor-Reiss (Figure 20). La structure des flagelles de Plasmodium est organisée en 9+2 mais diffère de la structure classique puisqu'il y a très peu de protéines des composants des bras de dynéines internes. Cet organisme ne possède ni les protéines essentielles à l'IFT ni les protéines de la ZT (Francia, Dubremetz, and Morrissette 2015). Dans la cellule mature, les corps basaux et les axonèmes sont assemblés très rapidement dans le cytoplasme de la cellule par une structure amorphe assimilée à un centre organisateur des microtubules localisée à proximité du noyau au niveau d'un pore nucléaire. Lorsque les conditions environnementales sont réunies, dans l'estomac d'un moustique qui a ingéré du sang infecté, la gamétogenèse se termine, un processus appelé exflagellation caractérise la libération de 8 gamètes en 15 minutes seulement (Sinden et al. 2010). Ce type de ciliogenèse est très efficace pour réaliser la croissance de l'axonème rapidement.

3.5.4- Un autre type de ciliogenèse cytosolique

Les gamètes mâles de *Toxoplasma gondii* appelés microgamètes ont des flagelles dont la formation est en partie cytosolique mais cet organisme possède des orthologues uniquement des protéines de l'IFT et pas de la ZT ni du BBSome (Avidor-Reiss and Leroux 2015). Peu d'études sont faites sur les microgamètes de *Toxoplasma* qui se développent uniquement dans l'intestin des chats, la structure du corps basal est ambiguë et la ciliogenèse qui conduit à la formation des deux flagelles qui protrudent à la surface n'est pas définie. Cela pourrait être une ciliogenèse cytosolique primaire ou secondaire mais comme cet organisme ne possède pas les protéines de la ZT, il se peut que le mécanisme soit différent de ceux décrits ici (Francia et al. 2015).
Thalassiosira pseudonana est une diatomée qui possède des cils motiles qui ne contient des orthologues que pour les protéines de l'IFT et de la ZT mais pas du BBSome. Aucune étude ne montre la ciliogenèse détaillée chez ce phytoplancton, mais ces données suggèrent un type de ciliogenèse différent (Hodges et al. 2010; Kumar et al. 2016).

IV. La DROSOPHILE : un modèle efficace pour l'étude des cils

1. Structure des centrioles chez la drosophile et organes ciliés

La drosophile est un modèle idéal pour l'étude du centrosome et des cils, car toutes les protéines cœurs du centrosome sont conservées et les mutants des protéines du centriole ou des cils sont viables (à la différence des mammifères) car les cils sont non essentiels au développement (Basto et al. 2006).
Chez la drosophile, les centrioles dans les embryons ainsi que les cellules somatiques sont formés d'un cartwheel et sont composés de neuf **doublets** périphériques de microtubules (Figure 22 A) (Gottardo, Callaini, and Riparbelli 2015; Moritz et al. 1995). Les centrioles sont un peu plus petits que ceux des vertébrés, et mesurent 200 nm de long et de diamètre (Lattao, Kovács, and Glover 2017). En revanche dans certains tissus particuliers comme les cellules épidermiques des ailes ou encore les cellules germinales mâles et femelles, les centrioles sont formés de neuf triplets de microtubules (Debec et al. 1999; Mahowald and Strassheim 1970). Dans les spermatocytes, les centrioles sont extrêmement longs et font environ 1,3 μm de long (Jana et al. 2016). Au cours de la spermatogenèse, ces centrioles nucléent un cil primaire et sont appelés centrioles géants. Le centriole au cours de la spermiogenèse va subir de nombreuses modifications et perdre sa structure microtubulaire grâce à l'enrichissement de Poc1 (Khire et al. 2016).

Au cours de la réplication des centrioles, la formation des procentrioles démarre avant le début de phase G1 et seront finalisés avant le début de la mitose en phase G2 (Lattao et al. 2017).

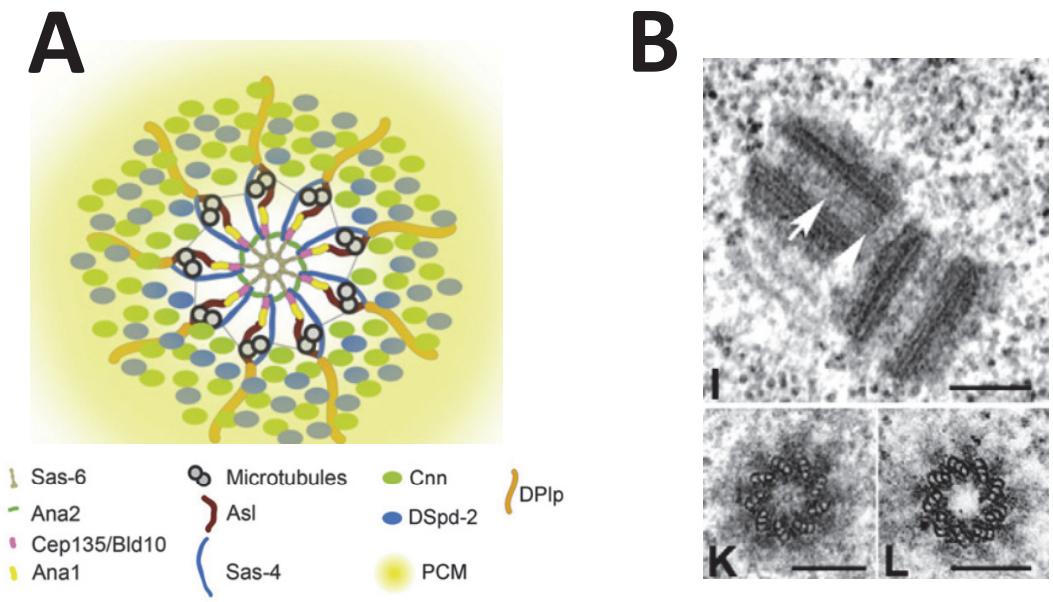


Figure 22 Structure du centrosome avec les protéines conservées chez la drosophile

A) Schéma représentant la structure du centriole en neuf doublets de microtubules chez la drosophile avec une partie des protéines conservées dans l'architecture du centriole (Lattao et al, 2017). B) Images en microscopie électronique des centrioles dans les spermatocytes composés de 9 triplets de microtubules. On remarque l'absence de différences

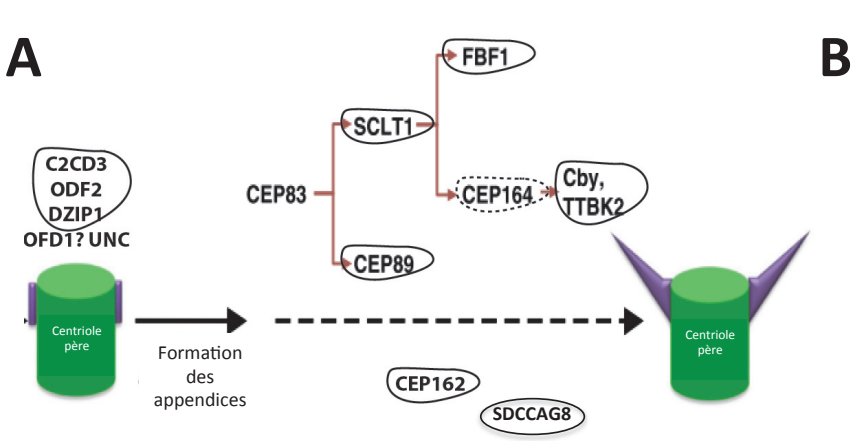
structurelles entre les 2 centrioles père et fils. Les flèches blanches montrent l'extension du tubule central dans le centriole. Le centriole fils est positionné orthogonalement par rapport au centriole père. Barre d'échelle : 100nm (Riparbelli, Colozza, and Callaini 2009).

1.1- Indifférence structurelle des centrioles pères et fils chez la drosophile

Une particularité de la structure des centrioles chez la drosophile est l'indifférence structurelle entre les centrioles fils et pères. Les centrioles pères de drosophile ne présentent ni les appendices distaux ni les subdistaux, et, par conséquent, en ce qui concerne ces caractéristiques ultrastructurales, ils ne se distinguent pas des centrioles fils (Figure 22 B). Cependant, en fonction des types cellulaires, la présence des appendices du centriole père n'est pas claire chez la drosophile. En effet, des structures denses aux électrons ressemblant à des fibres de transition ont été visualisées dans les neurones sensoriels ciliés (Enjolras et al. 2012; Ma and Jarman 2011; Vieillard et al. 2016).

Appendices distaux et subdistaux chez la drosophile : conservation protéique

Chez la drosophile de nombreuses protéines des appendices distaux et subdistaux sont conservées dont 3 protéines cœurs des appendices distaux : FBF1 (CG5964), CEP164 (CG9170), CEP89 (CG8214) ainsi que des protéines assimilées aux appendices distaux, comme Chibby, Asator (TTBK2), SDCCAG8 et CEP162 (Figure 23A et B). La protéine CEP164 est conservée chez la drosophile mais n'est pas exprimée au cours de la spermatogenèse. Concernant les appendices subdistaux, les constituants conservés appartiennent surtout au groupe Ninéine bien que la protéine ODF2 soit conservée. On retrouve plusieurs paralogues différents de ODF2 chez la drosophile (Figure 23B). Les protéines impliquées dans la maturation du centriole père sont également conservées, C2CD3 et DZIP1. La protéine OFD1 pourrait posséder comme orthologue la protéine Unc qui possède un arrangement similaire des motifs protéiques LisH et coil coiled et semble avoir un rôle similaire au corps basal (Baker 2004).



B

Protéines mammifère	Orthologues Drosophile
C2CD3	CG32425
ODF2	CG8851, CG3213, CG13405
DZIP1	CG13617
OFD1	Unc?
SCLT1	CG31291
CEP89	CG8214
FBF1	CG5964
CEP164	CG9170
CBY	Cby
TTBK2	Asator
CEP162	CG42699
SDCCAG8	CG31291,CG45105

Figure 23 Conservation des protéines des appendices du centriole chez la drosophile

A) Les protéines impliquées dans le conditionnement du centriole père pour la formation des appendices distaux et subdistaux du centriole père comme C2CD3, ODF2 et DZIP1 sont conservées. L'orthologue de OFD1 pourrait être Unc. Les protéines entourées sont des protéines impliquées dans la formation des appendices distaux conservées chez la drosophile par rapport aux mammifères. CEP164 est entouré par une ligne discontinue car cette protéine est conservée chez la drosophile mais n'est pas exprimée au cours de la spermatogenèse (image adaptée de wei 2015). B) Tableau des protéines conservées et leurs orthologues chez la drosophile. Figure réalisée à partir de Wei *et al*, 2015; Tanos *et al*, 2013; Ye *et al*,2014; Lee *et al*, 2014.

Quels sont les rôles des protéines des appendices qui sont conservées chez la drosophile ? Mes travaux de thèse, dans la première partie des résultats, permettent de répondre à certaines de ces questions.

1.2- Organes ciliés

Chez la drosophile, les cils sont présents chez un nombre réduit de types cellulaires. En effet, il y a deux types d'organes ciliés chez la drosophile : les neurones sensoriels de type 1 et les cellules germinales mâles. Il y a ensuite deux types d'organes sensoriels ciliés, les organes sensoriels externes qui sont responsables de la mécano-, chémo-sensation et de l'olfaction ; et les organes chordotonaux responsables de la proprioception et de l'audition (Lattao et al. 2017). Les organes externes sensoriels sont eux même subdivisés en deux types ciliés, les cils des soies et les sensilles ou mécanorécepteurs campaniformes qui sont également impliqués dans la proprioception (Figure 24) (Bechstedt et al. 2010).

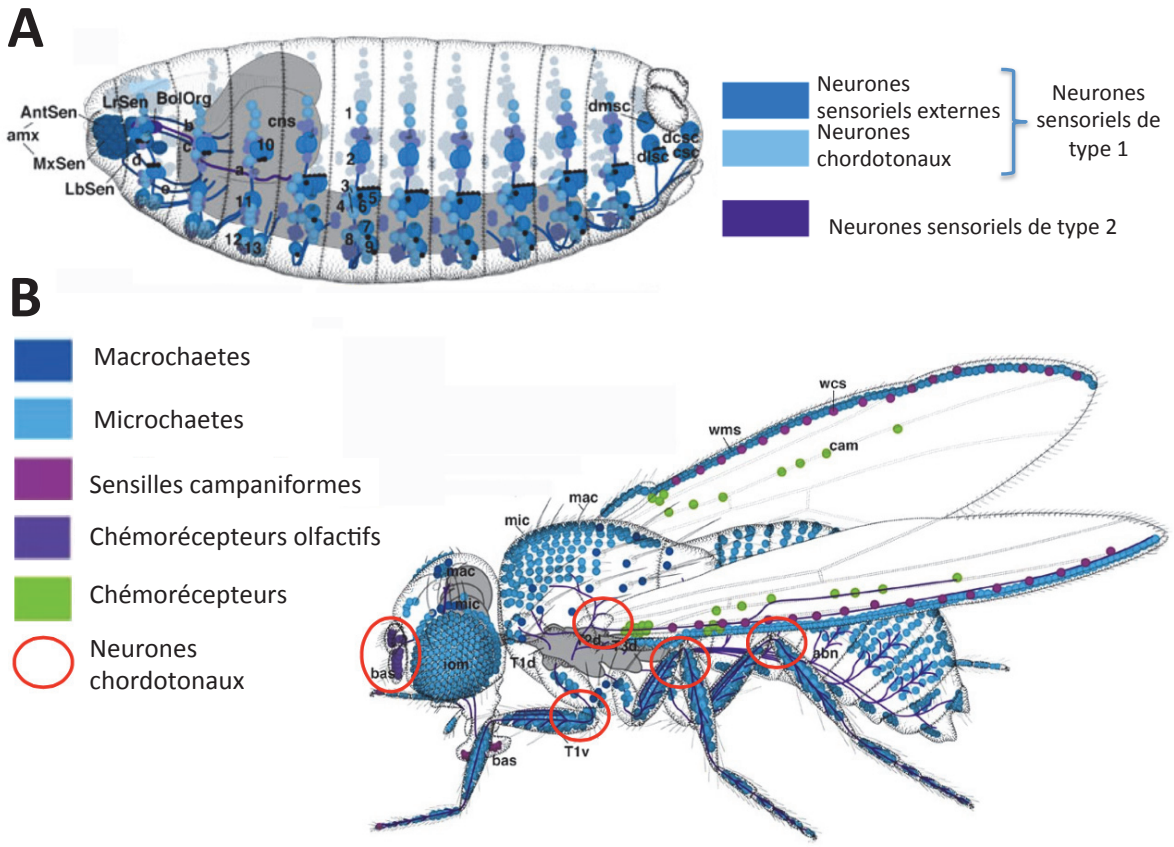


Figure 24 Localisation des neurones du système nerveux périphériques chez la drosophile

A) Schéma illustrant ces neurones chez la larve dans la paroi de chaque segment. 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. Des sensilles campaniformes et des chémorécepteurs sont situés sur la partie externe des ailes. Des chémorécepteurs olfactifs sont présents dans l'antenne. Les neurones chordotonaux sont localisés à la jonction des pattes, à la jonction entre l'aile et le thorax et dans l'organe de Johnston's de l'antenne qui est impliqué dans l'audition. (Schémas adaptés de Hartenstein 1993).

Les neurones sensoriels de type I sont présents tout au long de la vie de la drosophile, de la larve à l'adulte et permettent d'assurer des fonctions essentielles à sa survie à l'état adulte comme le déplacement dans son environnement, ainsi que la régulation de la physiologie adulte (Figure 24A et B) (Kernan 2007). Les organes externes sensoriels, qui sont aussi appelés sensilles, sont les organes sensoriels les plus abondants chez *Drosophila*

melanogaster. Dans les larves, les neurones sensoriels sont localisés à la surface de chaque segment (Figure 24A). Chez l'adulte, ces organes sont situés à la surface du corps, et dans les antennes, chaque soie ou chaete est un système indépendant innervé entièrement (Figure 24B).
Un avantage de l'étude de la ciliogenèse chez la drosophile est qu'elle n'est pas essentielle au développement comme chez les mammifères. Bien que le centrosome ait un rôle essentiel dans les divisions cellulaires chez les vertébrés, la perte des centrioles induit par la perte de SAS-4 ne conduit pas à des défauts de ce type chez la drosophile. En effet, celles-ci meurent une fois adulte de défauts de non coordination due à l'absence de cils dans les organes chordotonaux mais le développement a lieu normalement (Basto et al. 2006).
Les cils chez la drosophile résument les structures et les modes d'assemblage que l'on retrouve chez les vertébrés. Les cils des neurones sensoriels sont motiles en 9+0 dans les organes chordotonaux et immotiles en 9+0 dans les neurones sensoriels externes et sont formés par la ciliogénèse compartimentée. Au cours de la spermatogenèse, un cil motile en 9+2 est formé par une ciliogénèse cytosolique de type secondaire (Avidor-Reiss and Leroux 2015).
Dans les neurones sensoriels, le centriole fils est relié à la cellule neuronale par la racine ciliaire et le centriole père nuclée le cil qui se prolonge jusqu'à la coiffe dendritique. Alors qu'au cours de la spermatogenèse, les 2 centrioles père et fils sont capables de nucléer un cil.

1.2.1- Les organes sensoriels externes

Les organes sensoriels externes sont situés sur la tête, le thorax, les pattes et les ailes et appelés machrochaetes et microchaetes (Figure 24B). Les sensilles campaniformes sont principalement localisées au niveau des ailes et des haltères. Ces 2 types d'organes sensoriels externes sont principalement impliqués dans des fonctions mécano-sensorielles telles que le toucher et la variation de pression qui sont nécessaires à la locomotion et au vol.
D'autres organes sensoriels externes sont présents et exercent des fonctions chémo-sensorielles chez la drosophile 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 dans les palpes labiaux de la trompe, du pharynx, des pattes, des ailes et des organes génitaux (Jarman 2002; Kernan 2007; Tuthill and Wilson 2016).

D'un point de vue structurel, l'architecture de ces différents organes sensoriels externes, mécanosensoriels, chémosensoriels est très similaire (Figure 25A) (Ghysen and Dambly-Chaudière 1995). En effet, ils sont composés d'un (ou plusieurs) neurones au contact de 3 cellules de soutien. La première, la cellule **thécogène**, est celle se trouvant le plus proche du neurone, l'entoure et sécrète la gaine de la dendrite. La seconde, la cellule **trichogène** sécrète la cuticule entourant la structure externe de l'organe sensoriel : une soie ou un dôme dans le cas de sensilles campaniforme. Enfin, la troisième cellule est la cellule **tormogène** (ou cellule coiffe), cellule la plus externe, qui sécrète la cloison de la cavité lymphatique du récepteur où la dendrite du neurone s'y projette. Ce neurone des organes sensoriels externes est donc composé d'une dendrite qui se projette dans cette cavité lymphatique et s'arrête à la structure

sensorielle, ainsi que d'un axone qui est connecté au système nerveux central. Enfin, la partie visible est la plupart du temps une soie qui est produite par une cellule médiane (Figure 25B) (Kernan 2007).

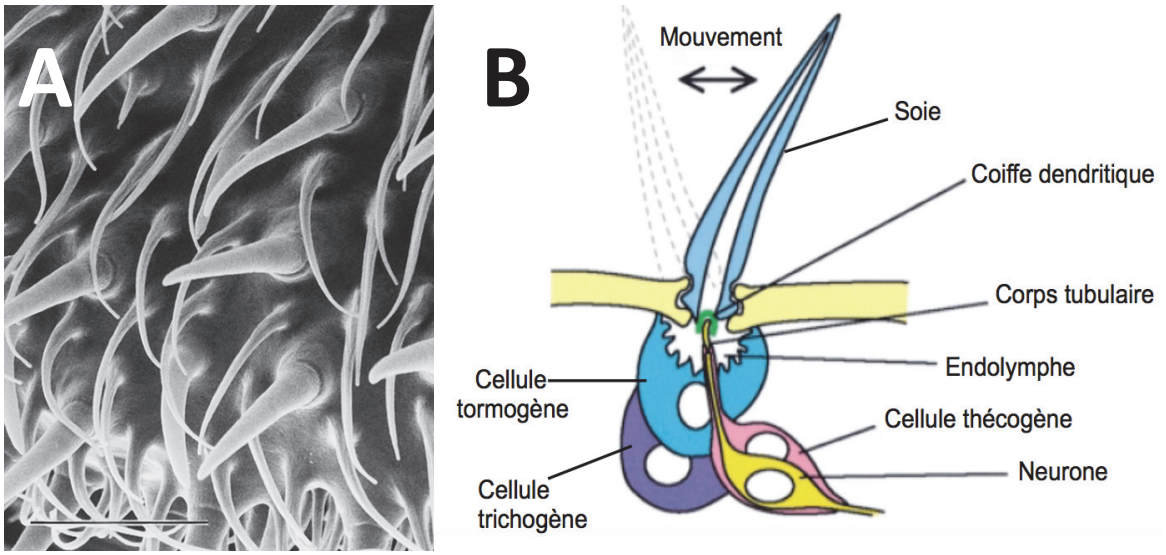


Figure 25 Un type de cil chez la drosophile, les neurones sensoriels externes, un rôle mécano sensoriel

A) Image en microscopie électronique à balayage du segment a3 de l'antenne avec des sensilles olfactives (Image adaptée de Shanbhag, Muller, and Steinbrecht 1999). B) 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.

Un cil modifié est présent à l'extrémité de la dendrite et possède une conformation en 9+0. Ce cil possède dans sa partie proximale, une structure appelée cil connecteur, de petite taille comparée à sa partie distale composée d'un réseau dense de microtubules formant le corps tubulaire. Ce dernier est rattaché à la structure externe sensorielle par la coiffe dendritique qui encapsule donc le corps tubulaire et crée donc le lien entre le neurone et l'organe externe. Lorsque la soie est stimulée, elle va effectuer un mouvement de flexion conduisant à une torsion du corps tubulaire de la dendrite qui va provoquer l'ouverture des canaux ioniques membranaires, dont NompC, pour permettre une réponse appropriée (W. Zhang et al. 2015).

1.2.2- Les organes chordotonaux

Les neurones chordotonaux sont présents dans chaque segment chez l'embryon et persistent à l'état adulte. Les organes chordotonaux, dont l'unité sensorielle est appelée scolopidie, sont des mécanorécepteurs internes qui ne possèdent pas de structures externes.

L'organe chordotonal est relié de part et d'autre à la cuticule. Les cellules neuronales peuvent être de 1 à 3 pour un organe chordotonal et produisent chacune un cil. Le cil est séparé en deux parties par la dilatation ciliaire, le cil proximal et le cil distal. Ces cellules ciliées sont entourées de cellules accessoires, la cellule **scolopale** qui forme une cavité autour des cils, la

cellule de la **coiffe** qui relie les cellules épithéliales avec la cellule scolopale, puis la cellule **ligament** qui fait le lien entre les neurones et la cellule scolopale (Figure 26 A) (Boekhoff-falk and Eberl 2014; Halachmi, Nachman, and Salzberg 2016).

Les cils des neurones chordotonaux ont un rôle essentiel dans la proprioception et la géotaxie mais la fonction la mieux étudiée est l'audition (Figure 26B). L'étude de l'audition permet d'identifier des défauts plus subtils des cils lorsque la non coordination des drosophiles n'est pas évidente (Gopfert and Robert 2001; Soulavie et al. 2014). Les deux antennes de la drosophile sont localisées sur sa tête et sont formées d'une arista et de trois segments appelés a1, a2 et a3 (Figure 26B). Des vibrations de l'air vont provoquer un mouvement de l'arista, entrainant une rotation du segment a3, qui créer une torsion du lien entre le segment a3 et a2, et une amplification mécanique par les cils des neurones chordotonaux de l'organe de Johnston va transduire un signal auditif (Figure 26B). La torsion des cils va augmenter leur capacité motile et permettre l'ouverture des canaux ioniques (Albert and Göpfert 2015).

Les cils des neurones chordotonaux ont une configuration en 9+0 et possèdent des bras de dynéines externes. Les orthologues d'une chaine lourde et une chaine intermédiaire de dynéines, DNAH3 et DNAI2 sont présentes dans la partie proximale du cil uniquement. La motilité permise grâce à ces dynéines externes est essentielle pour l'amplification du signal lors de l'audition. On retrouve également une différence dans la composition de la membrane ciliaire, le récepteur ionique NompC n'est présent que dans la partie distale du cil, alors que les récepteurs membranaires Nan-Iav sont présents dans la partie proximale du cil (Figure 26A) (Boekhoff-falk and Eberl 2014; Karak et al. 2015). Enfin, la protéine RempA, orthologue de IFT140 est localisée dans la dilatation ciliaire et est essentielle à la formation de cette dilatation ainsi qu'à la localisation du canal ionique ciliaire Nan-Iav dans la partie distale (Figure 26A) (E. Lee et al. 2008). On retrouve donc une différence de composition entre le cil proximal et distal.

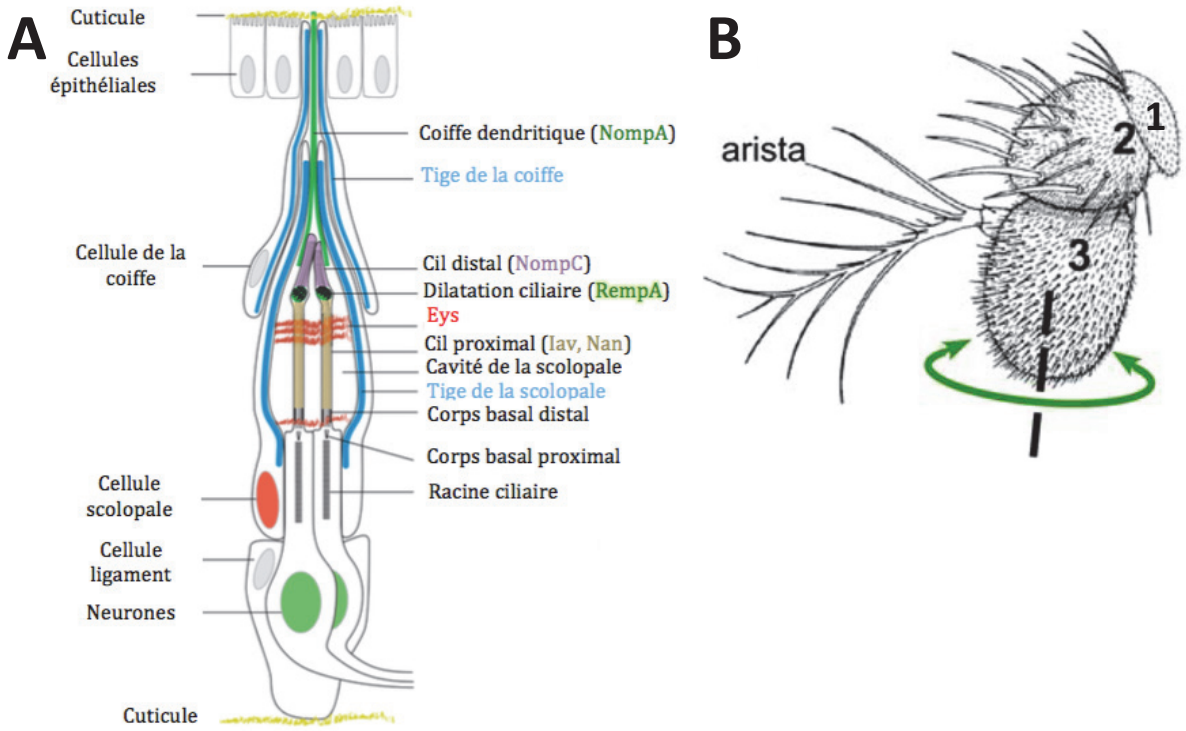


Figure 26 Un second type de cil, les neurones chordotonaux, un rôle dans l'audition

A) L'organe chordotonal est relié de part et d'autre à la cuticule. Le neurone 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. Les localisations des différents récepteurs impliqués dans la mécano-sensation sont indiquées (Schéma adapté de Boekhoff-Falk and Eberl, 2014). B) Les vibrations du son captées par l'arista vont entrainer la rotation du segment a3 puis l'amplification du signal va se faire dans les neurones chordotonaux qui sont à la jonction entre le segment a3 et a2 (Kernan 2007).

1.2.3- Au cours de la spermatogenèse, la formation du flagelle motile

Aspects généraux de la spermatogenèse chez la drosophile (structure polarisée du testicule)

Les testicules sont des organes polarisés où les différents stades cellulaires occupent une place précise. A leur extrémité, chaque testicule se termine par une vésicule séminale qui permet le stockage des spermatozoïdes matures (Figure 27A et B).

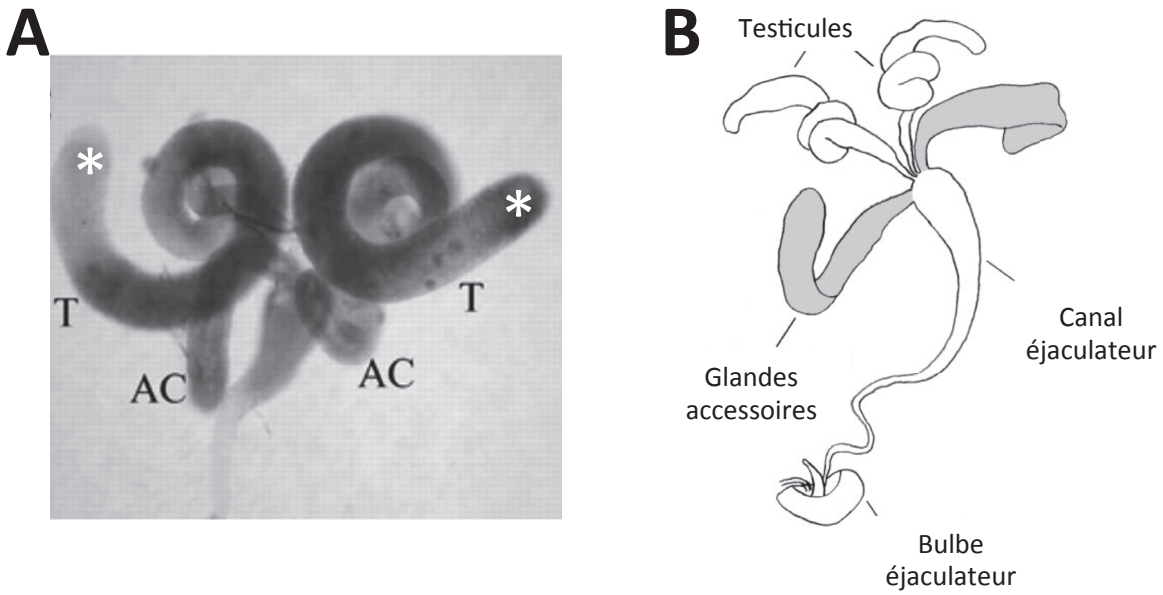


Figure 27 Appareil reproducteur mâle chez la drosophile

A) Image d'un testis de mâle de drosophile, les 2 glandes accessoires (AC) sont accrochées à chaque testicule (T). Les cellules souches sont présentes dans le hub (étoile blanche) de chaque testis. Le développement des spermatides se fait du hub vers la vésicule séminale, les spermatozoïdes sont ensuite transportés dans les vésicules séminales (Ting et al. 2004). B) Schéma représentant l'appareil reproducteur male avec les testicules associés aux vésicules séminales accrochées à leur partie distale. Le canal éjaculateur est relié au bulbe éjaculateur permettant la copulation (Adapté de Ram and Wolfner, 2007).

Division asymétrique des cellules souches : initiation de la spermatogenèse

Chez la drosophile, la niche de cellules souches est localisée à l'apex du testicule appelé le hub (Figure 28A). Le centre de prolifération germinal est composé de 3 types cellulaires : les **cellules apicales du hub**, les **cellules souches germinales** et les **cellules progénitrices du cyste** qui sont en contact avec les cellules du hub (Figure 28A). Les cellules apicales du hub et les cellules progénitrices du cyste sont des cellules somatiques. Les testicules sont entourés d'une paroi formée d'une couche externe de cellules pigmentées et d'une couche interne de muscles (Bate and Martinez Arias 1993; Lindsey and Tokuyasu 1980). Le hub est composé de 8 à 15 cellules apicales somatiques qui régulent la lignée de cellules souches germinales et la lignée de cellules souches somatiques du cyste (Fairchild, Smendziuk, and Tanentzapf 2014). Les cellules souches de la lignée germinale vont subir des divisions asymétriques pour permettre l'auto renouvellement des cellules souches et la production de spermatogonie ou gonioblaste. La division asymétrique de ces cellules est hautement régulée par de nombreuses cascades et inhibitions réciproques impliquant la voie JAK-STAT et BMP (Figure 28B) (Xie 2008).

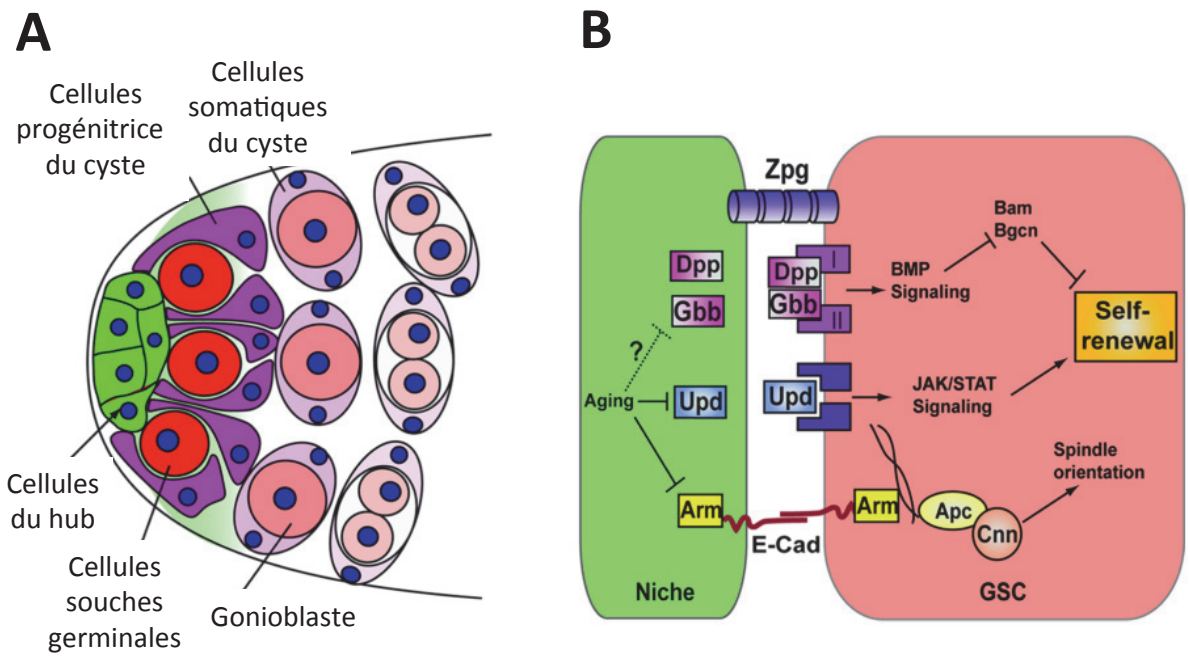


Figure 28 Structure et voies de signalisation impliquées dans le hub des testis de drosophile

A) Schéma représentant les cellules présentes dans le hub du testis de drosophile. Les cellules du hub (en vert) et les cellules progénitrices du cyste fonctionnent comme une niche pour maintenir les cellules souches germinales (rouge). B) Les voies impliquées pour maintenir le renouvellement des cellules souches sont la voie JAK/STAT et BMP. (Images de Xie et al, 2008).

A chaque division de cellules souches germinales, les cellules souches des progéniteurs du cyste vont produire 2 cellules cystes qui vont englober le gonioblaste (Figure 28) (Xie 2008). Ces deux cellules cystes vont englober l'ensemble des cellules au cours de la différenciation en spermatozoïdes matures, les deux cellules sont morphologiquement différentes, une cellule cyste appelée cellule de la tête est relativement petite et englobe les noyaux des spermatides. Alors que la cellule cyste de la queue est très fine et entoure la totalité des flagelles allongés (Lindsey and Tokuyasu 1980).

Formation des corps basaux à partir de tous les centrioles sans distinction structurale entre les centrioles pères et fils

Chaque spermatogonie va suivre quatre divisions mitotiques et sera à l'origine de 16 spermatocytes primaires. La cytokinèse est incomplète et les cellules partagent donc leur cytoplasme par des ponts cytoplasmiques. Les spermatocytes vont ensuite entrer dans une phase de croissance avant d'entrer en méiose, qui dure 90 heures. Pendant ce temps les cellules grandissent 25 fois en termes de volume et transcrivent la plupart des gènes nécessaires pour les évènements de différenciation cellulaire qui suivent la méiose (Bate and Martinez Arias 1993; Lindsey and Tokuyasu 1980). Au cours de cette maturation le noyau va changer de forme pour devenir un noyau trilobé et les mitochondries vont se condenser. Les spermatocytes possèdent 2 paires de centrioles proches du noyau qui vont migrer à la membrane plasmique dans les spermatocytes polaires jeunes au cours de leur maturation en spermatocytes apolaires (Figure 29). Dans les spermatocytes, une ciliogenèse

compartimentée mais indépendante de l' IFT initie la formation d'un petit cil au niveau de la membrane plasmique des spermatocytes tardifs (Han, Kwok, and Kernan 2003; Sarpal et al. 2003). En effet, les mutants pour *nompB* ou *klp64D* orthologues respectifs de IFT88 et Kif3a forment des flagelles fonctionnels (Han et al. 2003; Sarpal et al. 2003).
Les centrioles grandissent en taille dans les spermatocytes apolaires et sont formés de 9 triplets de microtubules à leur base, puis les tubules A et B sont conservés mais le tubule C est déformé formant une structure analogue aux liens Y retrouvés à la ZT des vertébrés (Riparbelli, Callaini, and Megraw 2012).
Un singlet central a également été observé au niveau du corps basal jusqu'au début du cil (Carvalho-Santos et al. 2012). Cependant cette ciliogenèse compartimentalisée est un peu particulière puisqu'elle ne requiert pas les protéines de l'IFT. Il est important de noter qu'au stade spermatocyte, ce n'est pas clair pour l'instant si les centrioles forment un cil ou une zone de transition car les protéines de la zone de transition sont présentes dans la totalité du cil (Enjolras et al. 2012; Vieillard et al. 2016). Comme le cil formé par les spermatocytes est composé majoritairement des protéines de la ZT, ce cil semble ainsi être assimilé à une ZT.
Bien que nous avons vu que les deux centrioles sont indistinguables structurellement, il est possible de distinguer le centriole fils du père en se basant sur leur position respective, le centriole fils étant positionné orthogonalement à la base de la paroi du centriole père (Gottardo, Callaini, and Riparbelli 2016). Et une distinction moléculaire commence à être démontrée, la protéine Ana2 se localise préférentiellement au niveau du centriole fils au stade spermatocyte (Stevens et al. 2010). *Klp10A*, une kinésine dépolymérisant les microtubules, a un rôle différent sur la structure des deux centrioles : l'inactivation de *Klp10A* entraine un allongement du centriole père comparé au centriole fils (Gottardo et al. 2016). Ceci démontre qu'une asymétrie moléculaire des centrioles père et fils est maintenue au cours de la maturation des spermatocytes indépendamment de leur capacité à former un cil.
Chaque centriole est donc capable de former un cil/ZT sans distinction, il n'y a pas de différence structurelle entre les centrioles mais de nouvelles études commencent à montrer une asymétrie fonctionnelle entre ces 2 centrioles.

Ancrage du corps basal à la membrane plasmique et au noyau pendant la méiose

Ces spermatocytes vont ensuite entrer en méiose, les deux paires de centrioles vont être internalisées dans le cytoplasme, en invaginant la membrane plasmique et ainsi maintenir un capuchon ciliaire autour de la partie distale de chaque cil. Les spermatocytes vont subir la méiose mais chacun des centrioles et des cils reste intact et connecté à la membrane plasmique. A la fin des divisions méiotiques, il y 64 spermatides rondes, dont la cytokinèse est incomplète, connectées par une structure appelée « ring canal » riche en Septines (Field et al. 2005). Les spermatides rondes sont appelées ainsi car les mitochondries sont agglomérées en une seule mitochondrie de forme sphérique, appelée Nebenkern. Chaque spermatide dispose d'un seul corps basal qui vient s'ancrer à l'enveloppe nucléaire (Figure 29). Le corps basal s'associe avec des microtubules cytoplasmiques au cours de sa migration vers le noyau et devient entouré par le centriolar adjunct, une structure dense aux électrons similaire au matériel péricentriolaire des centrosomes. De nombreuses protéines sont impliquées dans l'attachement du centriole au noyau et des mutants des protéines Yuri et Spag4 montrent une

déconnexion entre le noyau et les centrioles qui semble être délétère pour la suite de la spermatogenèse (Kracklauer et al. 2010; Texada et al. 2008). Une autre structure particulière commence à se former, l'acroblaste qui est un dérivé de l'appareil de Golgi et qui formera l'acrosome, élément essentiel pour la fécondation.

Croissance de l'axonème et la zone de transition : la ciliogénèse cytosolique secondaire

Au cours de l'extension de l'axonème, la ZT migre distalement le long de l'axonème et reste toujours disposée au bout apical tout au long de la croissance, cela laisse un axonème cytosolique très long (Figure 29). L'addition des composants motiles tels que les bras de dynéines sont ajoutés directement à partir du cytoplasme (Avidor-Reiss and Leroux 2015). En même temps que l'axonème s'allonge, les mitochondries vont s'allonger et changer de morphologie ainsi que les noyaux. Les cellules cystes vont également suivre cet allongement et s'adapter à l'allongement. Tout cela est concomitant mais semble indépendant puisque lorsque l'axonème ne s'allonge pas dans un mutant *sas4* par exemple, un allongement a quand même lieu avec les mitochondries et les cellules cystes (Basto et al. 2006).

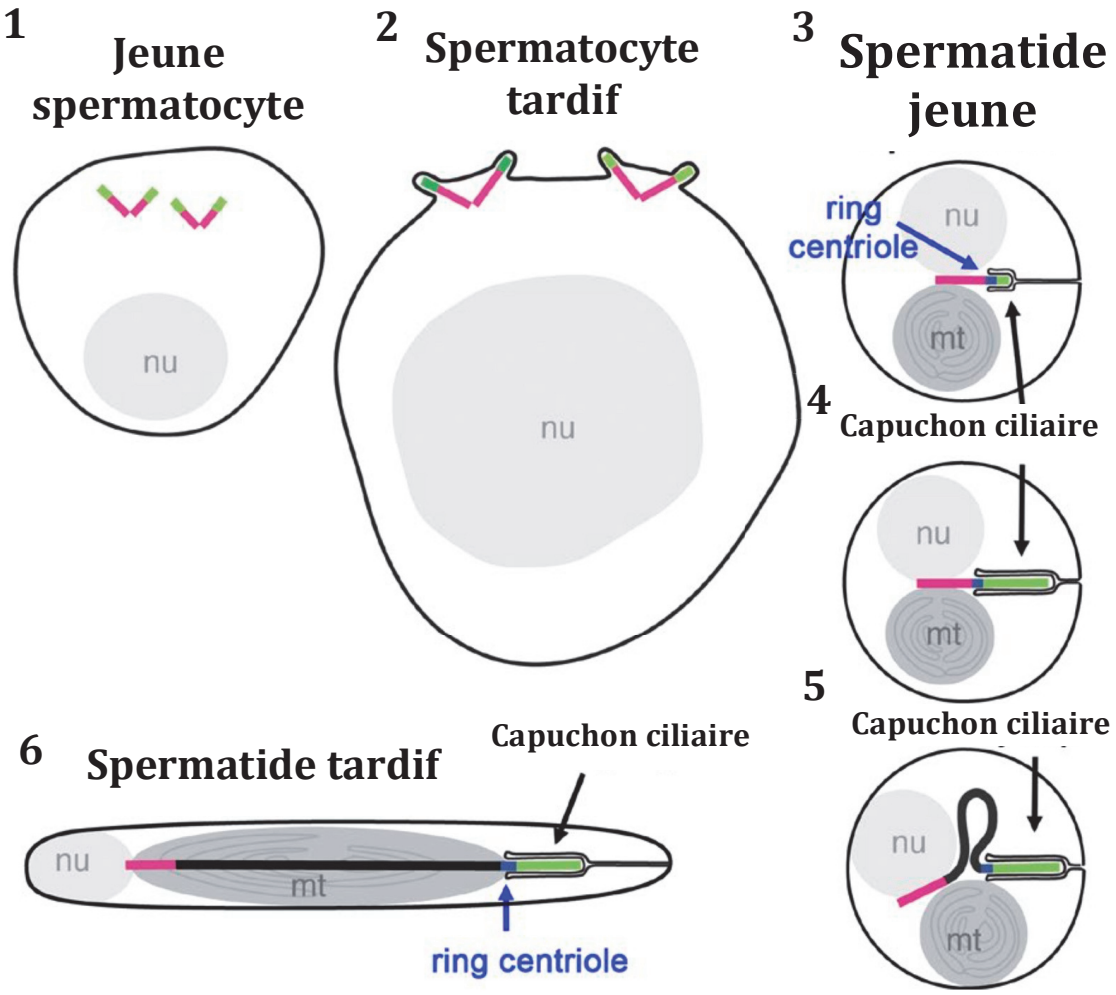


Figure 29 La spermatogenèse chez la drosophile

Les spermatogonies ayant subies les mitoses successives donnent naissance à des cystes de 16 spermatocytes possédant 2 paires de centrioles qui nucléent un ZT/cil. La maturation des spermatocytes s'accompagne d'un changement de taille de la cellule et implique la migration et l'ancrage des centrioles à la membrane plasmique où la zone de transition/cil est encapuchonnée dans une membrane. Au cours de la méiose afin de donner des spermatides rondes, le centriole s'ancre au niveau du noyau et invagine la membrane autour du capuchon ciliaire. L'extrémité distale du centriole contenant la ZT/cil primaire devient le capuchon ciliaire, toujours associé à la membrane plasmique, avec à sa base le ring centriole. Le capuchon ciliaire s'allonge et l'élongation de l'axonème débute. 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. Le centriole est représenté en rose, le ring centriole en bleu, l'axonème cytoplasmique en noir, et le capuchon ciliaire en vert. Schéma adapté de Vieillard et al. 2016.

Le **capuchon ciliaire** et la zone de transition sont des structures présentes à l'extrémité distale du corps basal qui vont être remodelées pour permettre l'élongation de l'axonème. A la base de ce capuchon, le **ring centriole** connecte la membrane ciliaire à l'axonème (Figure 29) (Basiri et al., 2014; Vieillard et al., 2016). 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 (Figure 29). Les protéines de l'IFT ne sont pas nécessaires pour l'allongement du flagelle de spermatozoïde chez la drosophile. En revanche, les protéines de la zone de transition sont

requises pour l'assemblage de l'axonème du flagelle de spermatozoïde (Enjolras et al., 2012, Vieillard et al., 2016). Les protéines de la ZT des mammifères sont conservées chez la drosophile ; le module MKS, la protéine CEP290, ainsi que d'autres protéines. En revanche, les protéines NPHP ne sont pas conservées.

On peut ainsi distinguer deux sortes de protéines de la ZT chez la drosophile, celles qui sont localisées à la base de la ZT, le **ring centriole**, et celles qui sont localisées **le long du capuchon ciliaire**. Des défauts des protéines de la ZT conduisent à des défauts plus ou moins sévères de la formation de l'axonème. L'absence des protéines du module MKS comme MKS1, B9D2 et TCTN conduit à des défauts légers d'ultrastructure et provoque peu de défauts de spermatogenèse (Pratt et al. 2016; Vieillard et al. 2016). En revanche, les protéines UNC, CBY, CEP290 et Dila/AZI1 localisées à la base de la zone de transition, au ring centriole semblent être plus importantes pour la formation de l'axonème. Les mâles mutants pour *cep290* montrent de gros défauts d'ultrastructure de l'axonème, manquant ou défectueux et une altération des protéines de la ZT. En effet CEP290 est essentiel au recrutement des protéines MKS au capuchon ciliaire et est essentiel à l'assemblage de l'axonème (Basiri et al. 2014). Le simple mutant *chibby* montre des défauts plus légers d'ultrastructure de l'axonème comme l'absence de certains doublets de microtubules mais le double mutant *chibby* et *dila* ne forme aucun axonème intact et révèle un phénotype très fort où la ZT et l'axonème sont complétement déstructurés (Enjolras et al., 2012, Vieillard et al., 2016). Comme le double mutant *chibby* et *dila*, les mâles mutants pour *unc* sont stériles et présentent des défauts d'ultrastructure de l'axonème (Baker, Adhikarakunnathu, and Kernan 2004).

Ces résultats indiquent que l'absence de protéines localisées à la ZT à l'intérieur 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, à la base du capuchon ciliaire (CBY, UNC, DILA, CEP290).
L'assemblage de la paire centrale du cil se fait 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). L'assemblage précis de cette paire centrale n'est pas connu, cependant la protéine centriolaire Bld10 semble essentielle à la formation de ce singlet. Chez le mutant *Bld10*, la paire centrale n'est pas assemblée, rendant le flagelle immotile et rendant les males stériles (Carvalho-Santos et al. 2012; Mottier-Pavie and Megraw 2009).

Le capuchon ciliaire ainsi que le ring centriole sont donc des structures composées des protéines de la ZT qui sont essentielles pour la croissance de l'axonème. L'assemblage des protéines de la ZT commence à être caractérisé mais l'utilisation de nouvelles techniques de protéomiques permettront d'identifier des acteurs impliqués dans ce processus. Les mécanismes de recrutement des protéines de la ZT restent, cependant, méconnus au stade précoce spermatocyte.

Modifications post traductionnelles des microtubules

L'axonème va subir des modifications post traductionnelles au cours de son allongement qui sont très importantes pour la maturation du cil. L'acétylation des microtubules se fait sur tous les microtubules. Au cours de l'allongement du flagelle, la détyrosination a lieu dans des flagelles qui sont probablement en fin d'allongement. La glutamylation précède et est requise pour la glycylation des flagelles. La polyglycylation apparait lorsque le flagelle est entièrement allongé et au cours du processus d'individualisation. La paire centrale ainsi que les microtubules accessoires ont une grande partie des poly glutamylation et glycylation alors que les doublets de microtubules périphériques ont une petite quantité de modifications (Hoyle, Turner, and Raff 2008). Il existe de nombreuses autres modifications des tubulines mais seules ces 4 modifications sont observées dans le flagelle de la drosophile (Fabian and Brill 2012).

L'acétylation et la détyrosination sont les premières modifications post traductionnelles à apparaître au début de la formation des axonèmes. Cependant, en fonction de l'anticorps utilisé, la détyrosination est parfois seulement visible au moment où les axonèmes sont à la fin de leur allongement. La mono et la polyglutamylation qui ne sont pas distinguables l'une de l'autre en immunofluorescence apparaissent en fin d'allongement du flagelle. Enfin la glycylation a lieu au moment de l'individualisation et est la dernière modification à perdurer dans les spermatozoïdes matures (Mendes Maia et al. 2014).
Les modifications post traductionnelles des microtubules jouent un rôle essentiel au cours de la spermatogenèse. En effet, le mutant de la glycylase *ttll3*, nécessaire à l'ajout de glycines, présente une stérilité associée à des défauts de maturation de l'axonème (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. Son absence provoque une perturbation des modifications post traductionnelles des tubulines, contrairement aux drosophiles sauvages (Soulavie et al., 2014).

Morphogenèse du noyau

A partir du stade spermatides rondes, le noyau va subir de nombreuses modifications morphologiques. La morphogenèse du noyau inclut deux aspects majeurs : l'élongation du noyau et la condensation de la chromatine associée au remplacement des histones par les protamines.

**Condensation de la chromatine*

Chez la drosophile, au cours de la spermiogénèse, le noyau diminue 200 fois de volume notamment grâce à la compaction de la chromatine. Le noyau va donc passer d'une forme ronde au stade spermatides rondes à une aiguille allongée au cours de l'individualisation. La compaction de l'ADN des spermatozoïdes est permise grâce aux remplacements des nucléosomes par la protéine Tpl94D d'une manière transitoire (Rathke et al. 2007) puis par

des protéines basiques nucléaires (SNBP) dont les plus connues sont les protamines (Figure 30) (Kimura and Loppin 2016).
Des modifications des histones sont nécessaires pour le remplacement des histones par des protamines. Les histones sont probablement dégradées par le protéasome spécifique Prosα6T (Zhong and Belote 2007). Chez la drosophile, il existe trois types de SNBP, les protamines A/B, la protéine Mst77F et la protamine-like 99C (Eren-Ghiani et al. 2015). Les composants majeurs du noyau du spermatozoïde sont les protamines A et B et Mst77F qui s'accumulent lorsque le noyau est allongé en aiguille (Figure 30). L'incorporation de la protéine Prtl99C apparaît un peu plus précocement que les autres protamines et le mutant Prtl99C a des noyaux plus longs que chez le contrôle au stade de l'individualisation quand le noyau atteint sa forme définitive (Eren-Ghiani et al. 2015).

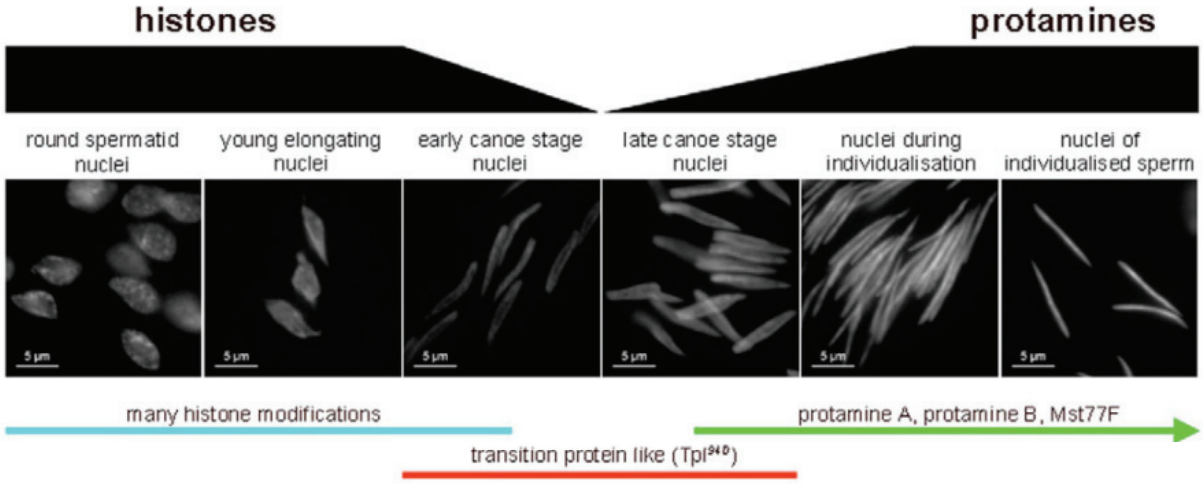


Figure 30 Evènements clés du remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse

Les noyaux au cours des différents stades sont visibles grâce au Hoechst. Les noyaux passent d'une forme ronde en spermatides rondes à une forme d'aiguille au cours de l'individualisation. Les histones sont progressivement enlevées au cours de l'allongement du noyau et une protéine de transition Tpl94D est ajoutée pour laisser ensuite place aux protamines (Rathke et al, 2007).

La condensation de la chromatine ne semble pas jouer un rôle direct dans la morphogenèse du noyau mais des défauts des protamines conduisent à une chromatine mal empaquetée qui par conséquent produit des noyaux anormaux. De plus, la protéine Mst77F a un rôle à la fois dans la condensation de la chromatine et dans la morphogenèse du noyau (Kimura and Loppin 2016; Rathke et al. 2010).

Comme chez les mammifères, la compaction de la chromatine par la transition histone-protamine est essentielle pour la fertilité des mâles (Oliva 2006). L'absence des protamines engendre une compaction aberrante et par conséquent, des noyaux mal formés. La double fonction de Mst77F permet de faire un lien entre la compaction de la chromatine et la morphogenèse du noyau qui sont deux processus concomitants mais qui ne semblaient jusque-là pas reliés.

**Morphogenèse du noyau*

La morphogenèse du noyau est orchestrée grâce aux microtubules entourant le noyau dans sa longueur qui émanent du corps basal et s'associent avec l'enveloppe nucléaire que l'on appelle le corps dense. Le noyau rond en stade spermatide va devenir plat sur un coté proche du corps basal. Les microtubules périnucléaires organisés en fibres parallèles forment le corps dense, une structure similaire à la manchette des vertébrés (Figure 29A). En effet, chez les mammifères, la manchette localisée autour du noyau et ancrée autour du centriole a pour rôle de structurer le noyau pour lui donner sa forme définitive (Kierszenbaum and Tres 2004). Chez la drosophile, le corps dense, composé de microtubules, de filaments d'actine ainsi que des protéines associées, est nécessaire pour donner sa forme au noyau (Fabian and Brill 2012). Le corps dense chez la drosophile correspond donc à la manchette des vertébrés. Au cours de l'élongation du noyau, les protéines initialement localisées au corps dense se retrouvent également concentrées au centriolar adjunct, une structure entourant le centriole ancré au noyau (Figure 31B) (Kracklauer et al. 2010; Texada et al. 2008).

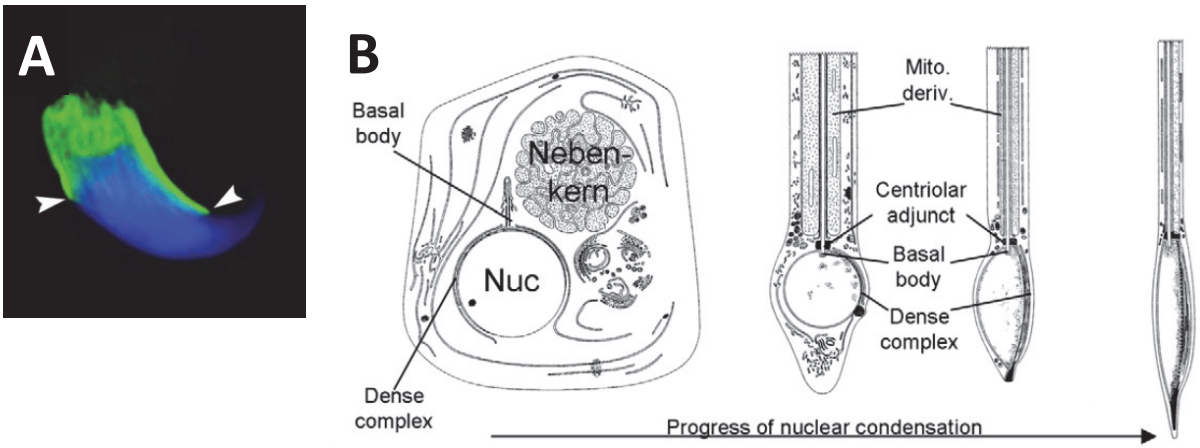


Figure 31 Morphogenèse du noyau

A) Manchette d'une spermatide, les microtubules de la manchette sont marqués par l'alpha tubuline en vert et le noyau en bleu (D'après O'Donnell 2014). B) Représentation schématique du corps dense et du centriolar adjunct au cours de la différenciation des spermatides. Au stade spermatides rondes, le corps dense forme un demi-cercle autour du noyau, puis lorsque le noyau s'allonge, le corps dense se positionne sur un coté entre le corps basal et l'acrosome (D'après Texada 2008).

Un rôle essentiel des protéines centriolaires est révélé par le phénotype anormal de détachement du centriole au noyau et de la morphogenèse du noyau à des stades précoces chez les mutants Grip75 et Grip128 qui font partie du complexe γTuRC. Ces deux protéines sont impliquées dans l'ancrage des microtubules au centriolar adjunct (Vogt et al. 2006). La centrosomine est impliquée dans la cytokinèse au cours des divisions méiotiques et le mutant produit des noyaux anormalement grand, l'organisation des microtubules cellulaires est perturbée (Li et al. 1998). Il est possible que les protéines centriolaires identifiées jouent un rôle dans la nucléation des microtubules périnucléaires.

Les protéines Yuri Gagarin et Spag4 font partie des protéines localisées au corps dense (Figure 31B). Dans les mutants *Yuri* et *Spag4*, le corps basal est détaché du noyau, et les noyaux s'allongent normalement mais deviennent courbés à des stades tardifs (Kracklauer et al. 2010; Texada et al. 2008). La protéine Spag4 contenant un domaine SUN est localisée à la

membrane nucléaire interne et est nécessaire à l'ancrage du corps basal au noyau. Yuri Gagarin, au domaine coil coiled joue un rôle en association avec Spag4. Ces deux protéines interviennent dans la même voie génétique pour l'ancrage du corps basal au noyau en régulant la localisation du complexe dynéine-dynactine au corps dense (Kracklauer et al, 2010). Des mutants de protéines se localisant au corps dense comme Spag4 et Yuri conduisent à des noyaux malformés et un détachement entre le corps basal et le noyau (Kracklauer et al. 2010; Texada et al. 2008). Les protéines localisées au corps dense ont donc un rôle essentiel dans la morphogenèse du noyau, comme c'est le cas de la manchette des spermatozoïdes chez les vertébrés (Fabian and Brill 2012).

Les microtubules ont un rôle essentiel au cours de la spermiogenèse et sont reliés au noyau grâce aux protéines du centriolar adjunct. La chaine légère des dynéines Tctex-1 est localisée au corps dense et au centriolar adjunct, la perte de cette protéine entraine une malformation des noyaux à des stades tardifs (Li et al. 2005). Les protéines associées aux microtubules autour de l'enveloppe nucléaire permettent au noyau de maintenir sa forme en aiguille dans les stades tardifs de la spermiogénèse.

Il est également intéressant de noter que certaines protéines impliquées dans la condensation de la chromatine jouent aussi un rôle dans la morphogenèse du noyau. En effet, Mst77F semble avoir un rôle double, elle est en effet, plus concentrée au corps dense dans des stades précoces et des interactions génétiques avec la β2 tubuline suggèrent un rôle dans l'organisation des microtubules (Rathke et al. 2010). Enfin, des protéines de l'assemblage du nucléosome comme Hanabi ont également un rôle dans la morphogenèse du noyau. Le mutant Hanabi provoque une stérilité des mâles associées avec un défaut de formation des noyaux au stade tardifs « canoë ». Les noyaux sont dispersés le long des cystes et ont une morphologie plus ovale et courte que les noyaux contrôles au même stade (Kimura 2013).
Enfin à l'instar des mammifères, où l'absence des enzymes de biosynthèse du PIP2 conduit à des défauts dans la morphogenèse du noyau, une perturbation de la biosynthèse des PIP par l'absence de Skittle ou une surexpression de SigD, conduit à des défauts d'ancrage du noyau au corps basal et une morphogenèse anormale des noyaux (Fabian et al. 2010).
Les protéines associées aux microtubules, tout comme les protéines du centriole, du corps dense et du centriolar adjunct ainsi que des protéines impliquées dans la condensation de la chromatine jouent donc un rôle important dans la morphogenèse du noyau.

Individualisation des spermatides : Production des spermatozoïdes matures

La spermiogenèse s'achève avec l'individualisation des spermatides et l'enroulement des spermatozoïdes matures avant le stockage dans les vésicules séminales.
L'individualisation permet de séparer chaque spermatide contenue dans un cyste. Cette étape consiste en un remodelage cellulaire et permet l'élimination du cytoplasme non nécessaire aux spermatozoïdes matures. Le processus d'individualisation démarre lorsque les spermatides sont complètement allongées et polyglycylées avec la formation d'un complexe d'individualisation au niveau des noyaux matures en forme d'aiguilles. Le complexe d'individualisation est organisé sous la forme de cône et est principalement composé

d'actine. Apres leur formation au niveau des noyaux, ceux-ci vont migrer le long des 2 mm de l'axonème en 10 heures environ afin de produire des spermatozoïdes matures (Figure 32A et B) (Noguchi, Lenartowska, Rogat, et al. 2007).

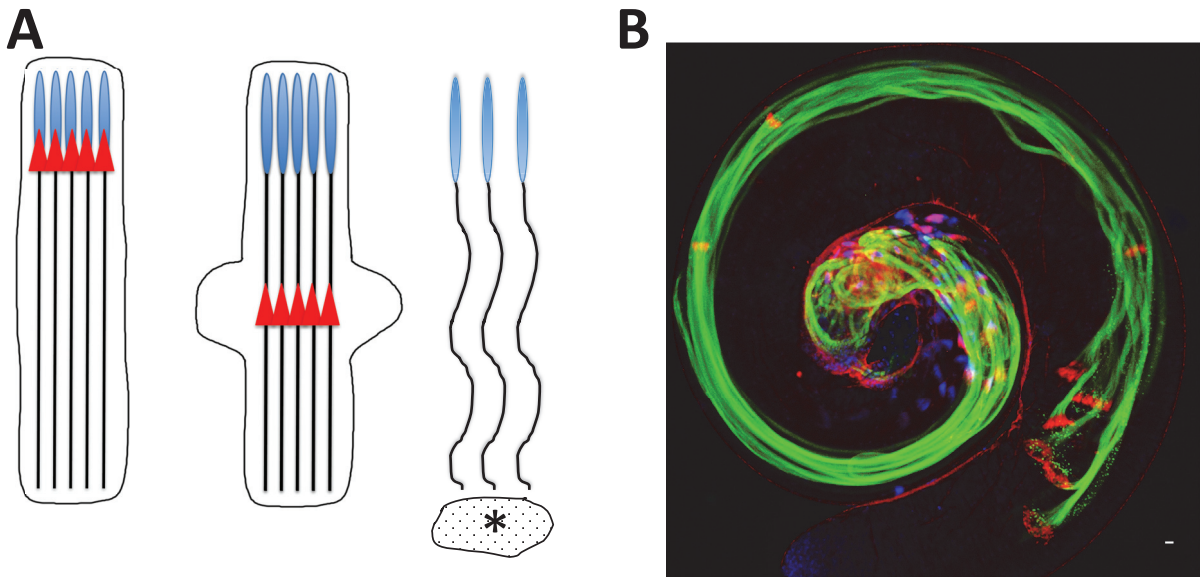


Figure 32 Individualisation des spermatides

A) L'individualisation des spermatides a lieu lorsqu'elles sont complètement matures. L'assemblage des cônes d'actines (triangles rouges) a lieu au niveau des 64 noyaux (bleu) qui migrent jusqu'à la partie distale/apex en formant un renflement cystique. Un waste bag (*) est ensuite libéré, chaque spermatozoïde individualisé va ensuite être transporté dans la vésicule séminale. B) Image en microscopie confocale d'un testis WT entier marqué avec les cônes d'actine en rouge, les noyaux en bleu et la tubuline polyglycylée en vert. Les cônes d'actine migrent de l'intérieur du testis là où se situent les noyaux jusqu'à l'apex du testis. Barre d'échelle 10µm.

**La progression des complexes d'individualisation*

Il existe des moteurs moléculaires qui permettent la migration des cônes d'actine au cours de l'individualisation. Les cônes d'actine sont initialement formés au niveau des noyaux puis migrent de la tête vers la queue des spermatides (Figure 32).
La formation des cônes d'actine au niveau du noyau nécessite la myosine V, en effet celle-ci s'accumule au niveau des noyaux au cours de la formation des cônes d'actine. Son absence entraine un défaut de recrutement de l'actine au niveau des noyaux (Mermall et al. 2005). Il existe également d'autres moteurs nécessaires à la formation des cônes d'actine, comme la dynéine Ddlc1 qui se localise comme la myosine V au niveau de l'acrosome.

Les cônes d'actine sont distingués en deux parties, la partie apicale et basale autrement appelées région empaquetée et maillage (Figure 33).

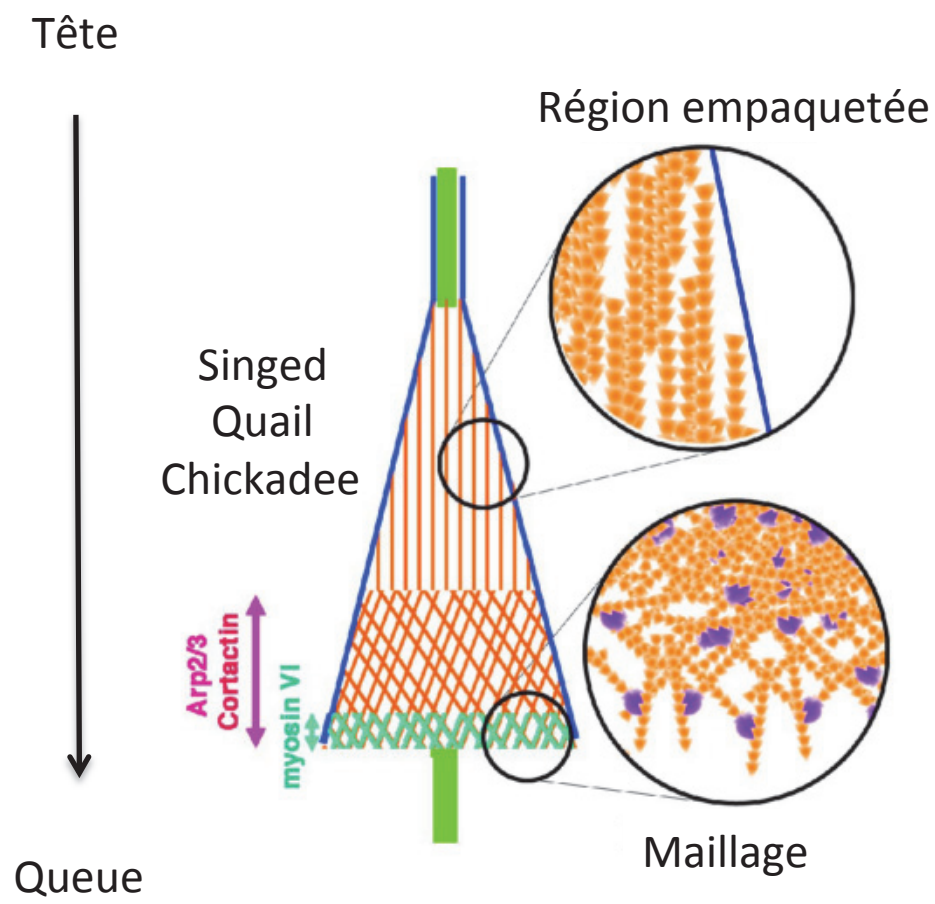


Figure 33 Organisation protéique du cône d'actine

Représentation schématique d'un cône d'actine représenté avec les 2 régions principales, la région empaquetée composée des protéines Singed, Quail et Chickadee et le maillage dans la partie distale composé des protéines Arp2/3, Cortactin et Myosine VI. L'axonème est représenté en vert, les filaments d'actine en orange. L'orientation de migration du cône d'actine est indiquée par la flèche de la tête vers la queue (D'après Noguchi 2007).

Dans la région empaquetée, les protéines Singed, Quail, Chickadee qui sont des orthologues respectivement de la Fascine, la Viline et la Profiline sont recrutées et présentes au cours du recrutement des filaments d'actine, avant l'initiation du mouvement (Pour revues Noguchi, Lenartowska, and Miller 2007; Steinhauer 2015).

Le maillage des cônes d'actine est composé principalement du complexe Arp2/3. La Myosine VI est une protéine coil coiled contenant un domaine moteur ATP dépendant qui permet la migration des cônes d'actine en tant que moteur moléculaire et permet la bonne localisation du complexe Arp2/3 ainsi que son activateur Cortactine (Figure 33). Dans le mutant *Myosine VI*, appelé Jar ou Jaguar, l'organisation des cônes d'actine est altérée et l'individualisation est arrêtée prématurément (Hicks et al. 1999). L'absence de la Myosine VI joue aussi un rôle mineur dans l'assemblage ou la stabilité de l'actine (Rogat and Miller 2002). Comme nous allons le voir (cf paragraphe remodelage des protéines membranaires), la Dynamine n'est pas requise pour l'individualisation mais agit d'une manière redondante avec la Myosine VI pour permettre l'assemblage et la stabilité des cônes d'actine (Rogat and Miller 2002). En revanche, le double mutant *MyosineVI* et *Dynamine* altère complètement la structure des cônes d'actine, révélant une interaction génétique entre la Myosine VI et la Dynamine.

**Remodelage des protéines membranaires*

La migration des cônes d'actine enlève le cytoplasme non nécessaire et individualise chaque spermatozoïde dans sa propre membrane (Figure 32A). De nombreux facteurs du métabolisme des lipides et des stérols sont requis pour l'individualisation des spermatides (Steinhauer 2015). En effet, comme chez les mammifères où les modifications de composition protéique de la membrane au cours de la maturation sont essentielles pour assurer la fertilité, l'individualisation chez la drosophile implique le métabolisme des lipides.
Pour révéler les structures membranaires, le marqueur fluorescent des membranes cellulaires, FM 1-43 a permis de mettre en évidence que la membrane au niveau du renflement cystique présente de nombreuses invaginations avec des connexions ouvertes vers le milieu extracellulaire mais n'a pas pu mettre en évidence une activité d'exocytose ou d'endocytose (Noguchi and Miller 2003). En revanche, un marqueur fluorescent se liant au stérol libre démontre un trafic spécifique de lipides au cours de l'individualisation dans le renflement cystique (Ma, Liu, and Huang 2010).
La Dynamine est une GTPase avec un rôle dans la fission des vésicules de Clathrines au cours de l'endocytose codé par le gène *shibire* chez la drosophile (Hinshaw 2000). Bien que la Dynamine soit localisée au niveau des cônes d'actine au cours de l'individualisation, la perte de fonction de cette protéine n'entraine pas d'arrêt du processus d'individualisation (Rogat and Miller 2002). La protéine d'adhésion focale Lasp montre une localisation similaire à la dynamine et est requise pour la formation robuste de cônes d'actine au cours de l'individualisation. Plus précisément, il est possible que cette protéine ancre les cônes d'actine à la membrane plasmique (S. Lee et al. 2008).
D'autres protéines impliquées dans le trafic de stérol et phospholipides sont nécessaires à la migration synchrone des cônes d'actine, mais aucun modèle d'assemblage précis du remodelage membranaire n'a pour l'instant été proposé. De plus l'implication de ces lipides d'un point de vue structurel n'a pas été montrée (Steinhauer 2015).

**Voie des caspases non apoptotiques*

La machinerie du complexe apoptotique ainsi que l'activation des caspases sont très régulées et sont essentielles à l'individualisation des spermatides. En effet, l'activité des caspases effectrices est requise pour supprimer les connexions entre les spermatides et évacuer le cytoplasme non nécessaire. C'est le travail d'Eli Arama qui a mis en évidence le rôle essentiel des caspases dans le processus d'individualisation avec l'étude du mutant nul cytochrome c-d au cours de la spermatogenèse chez la drosophile (Arama, Agapite, and Steller 2003). Ces travaux montrent que l'activité des caspases est nécessaire pour l'individualisation des spermatides grâce aux protéines cytochrome c-d et dBruce (Arama et al. 2003).
De nombreuses études ont ensuite permis de mieux comprendre l'implication des caspases dans le processus d'individualisation des spermatides. En effet, le renflement cystique ainsi que le waste bag contiennent de nombreuses caractéristiques de corps apoptotiques et des composants requis pour former un apoptosome fonctionnel. Plusieurs complexes d'effecteurs de l'apoptose semblent nécessaires pour déclencher le programme d'individualisation par les caspases effectrices, il s'agit notamment de la caspase-3 clivée, Drice et Dcp1 (Figure 34) (Aram et al. 2016; DeVorkin et al. 2014; Hay, Huh, and Guo 2004; Xu et al. 2006). On distingue d'une part les caspases initiatrices nécessaires à l'activation des caspases effectrices qui, elles, jouent un rôle dans le processus d'individualisation pour éliminer spécifiquement le cytoplasme non requis.
Une étude indique que les voies menant à l'activation des caspases ne sont pas strictement requises mais qu'il s'agirait plutôt d'un seuil de caspases effectrices à atteindre pour assurer l'individualisation (Huh et al. 2004). Une hypothèse appuyant cela est que la perte d'une voie activant les caspases peut être compensée par les autres voies afin d'initier l'individualisation. En effet, le simple mutant pour dFadd, une caspase initiatrice présente un phénotype peu pénétrant, où des cystes ont un défaut d'individualisation et d'autres où l'individualisation a lieu normalement. Cependant dès lors qu'il s'agit de double mutant dFadd et Ark, activateurs de caspases effectrices différentes, l'individualisation échoue et résulte en une stérilité des mâles (Huh et al. 2004). Une étude récente a montré l'implication d'enzymes qui dé-ubiquitines, comme DUBA qui contribue à la dé ubiquitination de Dronc et contribue ainsi à l'activation non apoptotique au cours de la spermatogenèse des caspases effectrices (Koerver et al. 2016).

Cependant lorsque la voie du complexe CRL3 (cullin-3-base ubiquitin ligase) est affectée avec l'absence d'un des composants du complexe activateurs de la caspase-3 comme Klhl10, Cullin3 ou Roc1b, l'individualisation n'a pas lieu et les mâles sont stériles (Arama et al. 2007). Il en est de même pour des mutants des inhibiteurs de l'activation des caspases impliquées dans la voie CRL3 tels que Soti ou dBruce, l'individualisation échoue et les mâles sont également stériles (Kaplan et al. 2010). Au cours des derniers stades de maturation des spermatides, un gradient de localisation des inhibiteurs Soti et dBruce du complexe CRL3 est généré et permet un gradient d'activation du complexe activateur CRL3. Le complexe SkpA-Cul1-Ntc est présent au niveau du complexe d'individualisation et se lie à l'inhibiteur dBruce

afin d'initier l'activation des caspases (Figure 34) (Bader, Arama, and Steller 2010). L'activation de la caspase 3 est donc présente en gradient du waste bag vers la queue des spermatides, dans un gradient opposé à l'inhibiteur Soti (Kaplan et al. 2010). L'élimination du cytoplasme et des caspases se produit dans le sens proximal à distal. Ce paramètre permet ainsi la protection de chaque spermatide pour que le niveau de caspases actives soit toujours contrôlé tout au long du processus d'individualisation (Kaplan et al. 2010). Le composant du cycle de Krebs SCSβ permet également la limitation spatiale de l'activation de CRL3 à proximité des mitochondries le long des spermatides en se liant au complexe CRL3 (Aram et al. 2016).

Les différents complexes initiant l'activation des caspases semblent avoir chacun leur rôle à jouer, le complexe CRL3 permet une restriction autour des mitochondries au cours de la migration des cônes d'actine alors que les voies impliquant Dronc, Dredd et Drice auraient à la différence une activation compartimentalisée plus diffuse localisée dans le complexe d'individualisation le long des spermatides (Figure 34) (Aram et al. 2016; D'Brot et al. 2013; Hay et al. 2004; Huh et al. 2004).

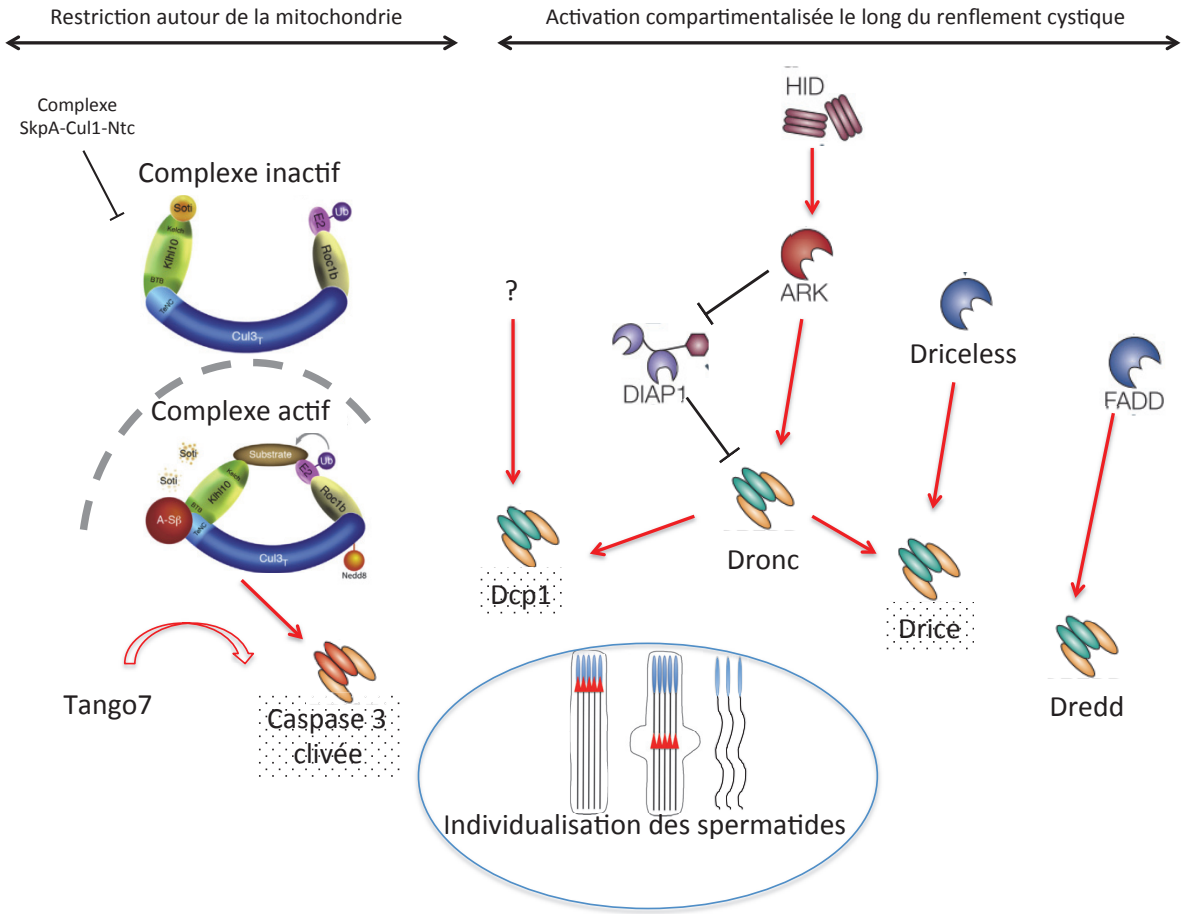


Figure 34 Voies des caspases non apoptotiques

L'individualisation nécessite l'implication de caspases effectrices (grisées en pointillés) pour dégrader le cytoplasme non nécessaire. Ces caspases effectrices dépendent de différentes voies. Le complexe CRL3 est composé notamment de Cullin3, Roc1b, Klhl10 qui sont des activateurs de la voie, alors que dBruce et Soti sont des inhibiteurs de ce complexe. Le complexe SkpA-Cul1-Ntc permet d'activer ce complexe en inhibant dBruce. L'activation spécifique de

CRL3 a lieu à proximité des mitochondries (trait discontinu gris). Un gradient de localisation spécifique de chaque protéine conduit à l'activation de ce complexe précis au cours de l'individualisation, le long du renflement cystique sans endommager la totalité des spermatides. Les autres complexes sont quant à eux compartimentalisés dans le renflement cystique. Les acteurs régulant positivement les caspases sont indiqués par une flèche rouge et les acteurs inhibiteurs par un connecteur noir. Tango7 permet l'activation de la Caspase-3 par une voie impliquant l'apoptosome (Aram 2016, Hay 2004, D'Brot 2013).

Il y a ensuite de nombreuses protéines impliquées dans l'activation des caspases comme Tango7 qui se localise au niveau du renflement cystique à la base des cônes d'actine, cette protéine joue le rôle d'activateur de l'apoptosome. Cependant la voie précise dans laquelle Tango7 est impliquée n'est pour l'instant pas claire, il s'agirait d'une activation de l'apoptosome en la recrutant directement pour le clivage de la Caspase 3 (Figure 34). Son absence entraine un échec de l'individualisation caractérisé par l'absence de caspase activée (D'Brot et al. 2013).

Enroulement des spermatozoïdes et transport dans la vésicule séminale

A la fin du processus d'individualisation, le waste bag est détaché des spermatozoïdes et chacun dispose de sa propre membrane mais les cellules cystes entourent encore les spermatozoïdes. Une dernière étape d'enroulement permet le passage dans la vésicule séminale. C'est une liaison étroite entre la cellule cyste entourant les noyaux et l'épithélium terminal qui entraine les spermatozoïdes à s'enrouler. Au cours de l'enroulement, la cellule cyste dégénère et les spermatozoïdes sont libérés dans la lumière du testis où ils sont ensuite dirigés dans la vésicule séminale. Tout le long de ce processus, la mobilité des flagelles n'est pas requise, il est en effet possible de trouver des spermatozoïdes matures mais immobiles dans la vésicule séminale. Les spermatozoïdes sont ainsi stockés dans la vésicule séminale jusqu'à la copulation avec la femelle (Bate and Martinez Arias 1993; Desai, Shirolikar, and Ray 2009).

V. Objectifs de la Thèse

Projet : Compréhension des mécanismes d'ancrage et d'assemblage de la zone de transition

La barrière ciliaire comprend les fibres de transition et la ZT. Chez les mammifères, les fibres de transition jouent un rôle essentiel dans l'initiation de la ciliogenèse afin de permettre l'ancrage des petites vésicules ciliaires puis de la vésicule ciliaire primitive.
Au cours de l'évolution, il semblerait que certains phylums, comme le nématode *C. elegans* ou encore la drosophile aient perdus les appendices distaux/fibres de transition normalement essentiels à la ciliogenèse. Cependant, des cils sont formés en l'absence de ces structures visibles. Les centrioles de la drosophile ne possèdent pas de structures assimilées à des appendices distaux cependant de nombreuses protéines orthologues des protéines des fibres de transition sont conservées. Hormis des approches génétiques, moléculaires, et des conditions d'élevage dont l'efficacité n'est plus à prouver, la drosophile possède également deux types de cellules ciliées qui ont un mode d'assemblage différents dans chacun des deux types ciliés mais qui récapitule ce que l'on retrouve dans le règne animal. Le fait que de nombreuses protéines des fibres de transition soient conservées alors que les structures ne

sont pas présentes suscite des questions sur les rôles peut-être primitifs ou ancestraux de ces protéines. De plus, chez la drosophile, seuls les centrioles pères des neurones sensoriels, sont capables de former un cil alors qu'au cours de la spermatogenèse, chaque centriole père et fils forment un cil. La question reste ouverte est-ce que la différence entre ces 2 tissus réside en une composition protéique différente des centrioles pères et fils ? Nous avons vu précédemment l'importance des fibres de transition pour initier la ciliogenèse. Comment une structure aussi importante a-t-elle pu être perdue chez certains organismes et comment la ciliogenèse y est initiée ? Est-ce le rôle d'autres protéines de permettre l'ancrage du corps basal à la membrane plasmique et ainsi d'initier la ciliogenèse?
Afin de déterminer le rôle des protéines des fibres de transition chez la drosophile, nous les avons caractérisées fonctionnellement. Au cours de ma thèse j'ai donc, dans un premier temps, cherché à comprendre le rôle de ces protéines conservées chez la drosophile, ODF2, C2CD3, CEP89, FBF1, CEP162 et SDCCAG8. La localisation de certains orthologues revèle une localisation similaire à ce qui est observé chez les mammifères alors que d'autres ont parfois une localisation inattendue en dehors de la région ciliaire dans les tissus ciliés. La caractérisation fonctionnelle par l'étude de mutants ou par ARNi a permis de révéler un rôle différent de ces protéines qui ne sont pas, pour la majorité, essentielles à l'initiation de la ciliogenèse et à l'ancrage du corps basal à la membrane comme chez les mammifères. Les mécanismes de l'initiation de la ciliogenèse chez la drosophile restent méconnus et d'un point de vue évolutif, les protéines orthologues des protéines des appendices distaux étudiées semblent avoir acquis des rôles nouveaux dans la maturation des spermatides au cours de la spermatogenèse.

Dans le but de comprendre les mécanismes d'assemblage des protéines de la zone de transition, l'équipe s'interroge sur le rôle de Chibby à la zone de transition. En effet, le lien entre les fibres de transition et la zone de transition semble être réalisé par certaines protéines comme Chibby qui interagit avec des protéines des fibres de transition comme CEP164 et ODF2 et des protéines de la zone de transition comme FAM92. Chibby est une protéine qui n'est jamais identifiée dans des cribles protéomiques des protéines de la ZT, elle ne fait pas partie des complexes protéiques existant. Elle est localisée à la zone de transition chez les mammifères et la drosophile et a un rôle important dans la ciliogenèse. Nous avons donc développé plusieurs approches pour identifier ses partenaires directs afin de découvrir des protéines qui pourraient jouer un rôle à la zone de transition mais dont les interactions seraient peut-être trop labiles pour être identifiées par les techniques de protéomiques utilisées jusqu'à présent.
Avant mon arrivée, l'équipe a criblé par double hybride une banque d'ADN complémentaire de testicules de drosophiles afin d'identifier des partenaires biochimiques de Cby spécifiques de la spermatogenèse. J'ai réalisé l'analyse de certains candidats obtenus, CG5987/TTLL13, CG3213/ODF2 et Salto et identifié leur rôle au cours de la spermatogenèse chez la drosophile. L'étude de l'une de ces protéines, Salto, a notamment révélé un rôle différent des protéines de la ZT et l'interaction par co-immunoprécipitation avec Chibby n'a pas été confirmée. En effet, je montre que Salto joue un rôle au niveau du lien corps basal/noyau et

sur la morphogenèse des noyaux au cours des stades tardifs de la spermatogenèse. Ces travaux font l'objet d'un article en cours de préparation.

Toujours dans le but de compléter la recherche des partenaires de Chibby afin de la relier fonctionnellement aux autres protéines connues et d'identifier de nouveaux partenaires biochimiques, un crible protéomique par spectrométrie de masse en utilisant la technique de purification LAP-TAG en cellules de mammifères a également été réalisé dans l'équipe. Ce crible a permis d'identifier principalement deux protéines DZIP1L et FAM92A comme partenaire de CBY. J'ai contribué à l'analyse de l'orthologue de FAM92A chez la drosophile et nous avons ainsi pu montrer que DZIP1L et FAM92A forment avec Cby un nouveau module biochimique, jouant un rôle important dans la mise en place de la zone de transition. Cette partie de mon travail fait l'objet d'un article qui est en préparation dans lequel je suis 2e auteur présenté dans le chapitre Résultats.

Chapitre 2 Résultats

1. Caractérisation fonctionnelle des protéines orthologues des appendices distaux chez la drosophile

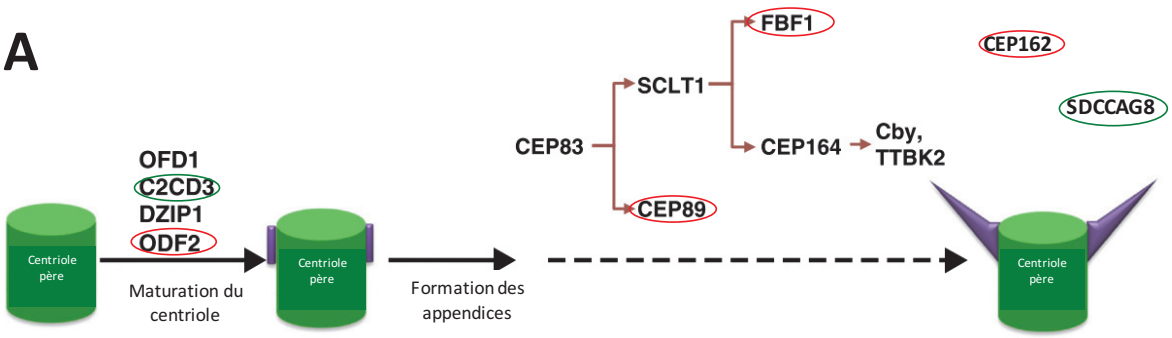
Introduction

Les appendices distaux ont un rôle essentiel dans l'ancrage du corps basal à la membrane plasmique et sont nécessaires à l'initiation de la ciliogenèse chez les mammifères. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la présence des appendices du centriole chez la drosophile est controversée. Les différents types cellulaires de la drosophile présentent des centrioles composés de doublets ou triplets de microtubules (Riparbelli et al. 2009). Seuls les centrioles nucléant un cil dans les neurones sensoriels semblent avoir des structures apparentées à des fibres de transition (Ma and Jarman 2011 ; Enjolras 2012 ; Vieillard 2016). En revanche dans les autres types cellulaires, qu'ils soient ou non ciliés, les centrioles pères et fils ont une structure identique et ne possèdent pas d'appendices distaux.

Chez les mammifères, des études ont permis d'identifier et de hiérarchiser les protéines des appendices du centriole (Tanos et al. 2013; Wei et al. 2015). Il existe 5 protéines appelées « cœurs » des appendices distaux chez les mammifères : CEP164, CEP89, CEP83, SCLT1 et FBF1 (Tanos et al. 2013). En analysant par ARNi la perte de ces différentes protéines, il a été montré que CEP83 agit sur la localisation des 4 autres protéines et que chacune d'entre elle est essentielle pour la formation du cil (Tanos et al. 2013).

Chez *C. elegans*, FBF1 est la seule protéine cœur conservée. Elle joue un rôle fonctionnel en permettant l'assemblage des particules IFT mais n'est pas nécessaire à la formation d'une structure analogue aux fibres de transition (Wei et al. 2013). Cependant chez la drosophile aucune étude ne décrit le rôle des nombreux orthologues qui sont conservés des protéines des appendices distaux (Figure 23B et 35).

Certaines protéines des appendices distaux ne sont pas conservées chez la drosophile, il s'agit notamment de OFD1 et CEP83 (Figure 35A). Ces protéines n'ont donc pas été étudiées au cours de ces travaux. Cependant, j'ai identifié les orthologues des protéines ODF2, C2CD3, CEP89, FBF1, CEP162 et SDCCAG8 par analyse de BLAST réciproques (Figure 35B).



B

Protéines assimilées aux fibres de transition

Protéines mammifère	Orthologues Drosophile
C2CD3	CG32425
ODF2	CG8851, CG3213
DZIP1	CG13617
SCLT1	CG31291
CEP89	CG8214
FBF1	CG5964
CEP164	CG9170
CBY	Cby
TTBK2	Asator

Protéines à l'interface des fibres de transition et de la zone de transition

Protéines mammifères	Orthologues Drosophile
CEP162	CG42699
SDCCAG8	CG31291, CG45105

Figure 35 Illustration des orthologues étudiés

A) Les protéines étudiées sont entourées par un cercle rouge ou vert. La couleur verte indique que, uniquement, la fonction de ces protéines a été étudiée au cours de ce travail et la couleur rouge désigne les protéines dont la localisation et la fonction ont été étudiées chez la Drosophile. Les protéines impliquées dans la formation des appendices du centriole sont représentées en cascade en fonction de leur rôle dans le recrutement des autres protéines (D'après Wei *et al.*, 2015). B) Les protéines chez les mammifères et leurs orthologues respectifs chez la Drosophile sont présentés dans 2 tableaux, les protéines localisées ou assimiliées aux fibres de transition et les protéines localisées ou jouant un rôle à l'interface entre les fibres de transition et la zone de transition. Le même code couleur que pour la figure A a été utilisé.

Parmi les orthologues des protéines des appendices distaux, nous avons, dans un premier temps, étudié les protéines qui jouent un rôle essentiel chez les mammifères dans la formation et la fonction des appendices distaux comme ODF2, CEP89, FBF1 et CEP162 (Figure 35A). La localisation et la fonction de ces protéines ont pu être étudiées dans les tissus ciliés de la drosophile. Afin de déterminer la localisation de ces orthologues dans les tissus ciliés, nous avons réalisé des lignées de drosophiles transgéniques exprimant les protéines d'intérêt fluorescentes. L'étude de la localisation des protéines de fusion pour ODF2, CEP89, FBF1 et CEP162 montre une localisation non limitée aux centrioles dans les cellules ciliées. Seule la protéine CEP162 est localisée au centriole et semble jouer un rôle dans les étapes précoces de la ciliogenèse. Les protéines FBF1 et CEP89 sont localisées à la base du cil dans les cellules ciliées du système nerveux périphérique. FBF1 a une localisation vésiculaire prépondérante au cours de la spermatogenèse et aucun signal au niveau du centriole n'a pu être détecté. La

localisation de CEP89 n'a pas été réalisée au cours de la spermatogenèse. L'étude de la fonction de ces 2 protéines montre qu'elles semblent jouer un rôle dans la ciliogenèse. Je me suis ensuite particulièrement intéressée aux orthologues de la protéine ODF2/Cenexine qui joue un rôle central chez les mammifères dans l'initiation de la formation des appendices du corps basal. Chez la drosophile, les orthologues de *ODF2/Cenexine* sont *CG8851* et *CG3213*. Ces protéines ont une localisation inattendue dans les tissus ciliés et la caractérisation fonctionnelle du double mutant *ODF2* (*CG8851-CG3213*) montre un défaut en spermatogenèse conduisant à une stérilité des mâles qui n'est pas associée avec un défaut ciliaire. La similarité avec un autre mutant étudié au cours de ma thèse (*CG5987*) révèle une fonction nouvelle de ces protéines chez la drosophile.

Dans un second temps, nous nous sommes également intéressés aux protéines C2CD3 et SDCCAG8 (Figure 35A). Nous avons étudié le rôle de ces protéines en utilisant des shARN spécifiques permettant, grâce au système UAS-Gal4, de les exprimer dans certains tissus. Je montre que ces 2 protéines jouent un rôle dans la ciliogenèse au cours de la spermatogenèse et par contre leurs fonctions dans le système nerveux périphérique ainsi que leurs localisations dans les tissus ciliés devront être étudiées.

Cette étude décrit pour la première fois la localisation et le rôle des protéines orthologues des appendices distaux du centriole chez la drosophile.

Résultats

Localisation des protéines orthologues des fibres de transition dans les tissus ciliés de la drosophile

Des constructions transgéniques pour chacune des protéines étudiées ont été réalisées. L'ajout de la séquence codante de la GFP ou Tomato en phase avec leur séquence codante permet la visualisation des protéines dans les tissus ciliés de la drosophile.

La protéine CEP162 est présente à la ZT dans les cellules ciliées chez la drosophile

Chez les mammifères, la protéine CEP162 est une protéine à l'interface entre les fibres de transition et la zone de transition qui contient un domaine ATPase et se lie aux microtubules et aux centrioles (Leon et al. 2006). Chez les mammifères, cette protéine possède trois domaines coil coiled, le premier domaine coil coiled est similaire à celui des kinésines et requis pour la liaison aux microtubules alors que les deux autres sont requis pour la liaison aux centrioles. De plus, la protéine CEP162 est une protéine des appendices distaux qui joue un rôle dans l'assemblage de la ZT (W. Wang et al. 2013).
Par l'analyse de l'alignement des séquences, nous avons identifié que CG42699 est l'orthologue de CEP162 chez la drosophile. L'alignement des séquences permet de montrer que les domaines coil coiled 1 et 3 sont conservés entre les différentes espèces, et en particulier chez la drosophile (Figure 36). Le domaine coil coiled 1 semble être important pour faire le lien avec les microtubules, alors que les domaines coil coiled 2 et 3 semblent important pour l'ancrage au centriole (W. Wang et al. 2013). D'un point de vue fonctionnel, chez les mammifères, le domaine coil coiled 3 seul n'est pas suffisant pour permettre l'attachement au centriole (W. Wang et al. 2013). Chez la drosophile, comme les domaines coil coiled 1 et 3 sont les seuls conservés, il semble donc que la protéine CG42699 ne contienne pas le domaine nécessaire à l'ancrage au centriole mais possède le **domaine en lien avec les microtubules en C-ter** (Figure 36).

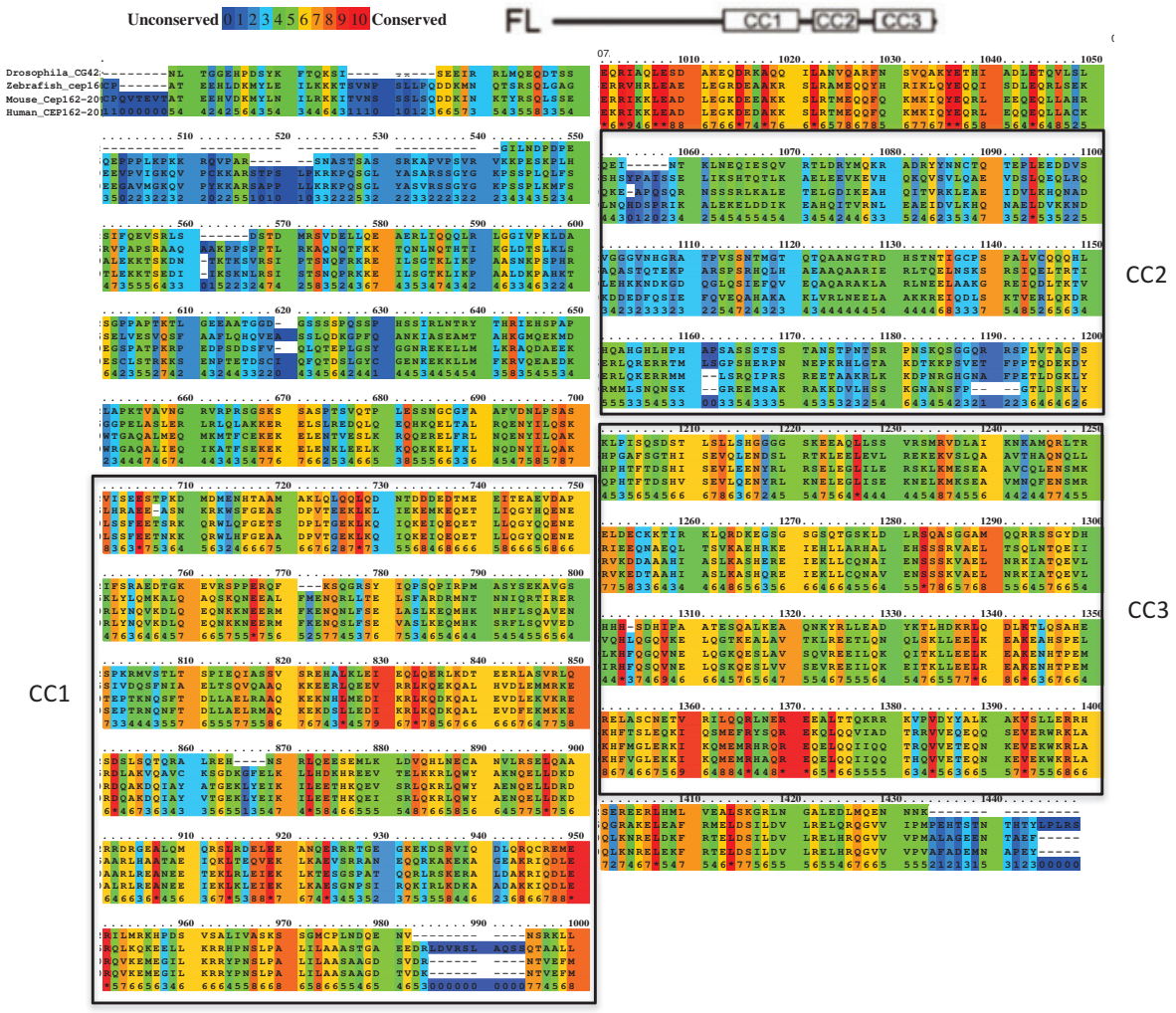


Figure 36 Comparaison des séquences protéiques de CEP162

Les 3 domaines coil coiled en Cter sont représentés en haut de la figure : CC1, CC2 et CC3 respectivement pour le domaine coil coiled 1, 2 et 3. Le score de conservation des acides aminés a été réalisé par PRALINE (Simossis and Heringa 2005) avec les séquences des protéines de *Drosophila melanogaster, Danio rerio, Mus musculus* et *Homo sapiens*. Le code couleur de conservation va de 0 à 10, 0 pour les acides aminés les moins conservés et 10 pour les mieux conservés.

Nous avons ensuite identifié la localisation de CEP162 dans les tissus ciliés de la drosophile. CEP162 est présente à la base des cils des neurones chordotonaux et sensoriels externes (Figure 37A). Plus précisément, la localisation de CEP162 à la ZT des neurones chordotonaux a été vérifiée par microscopie haute résolution 3D SIM et montre un profil très similaire à Chibby (Figure 37B). Dans les neurones chordotonaux et sensoriels, CEP162 est localisée à la base du cil pouvant suggérer une fonction similaire à Chibby (Figure 37B).

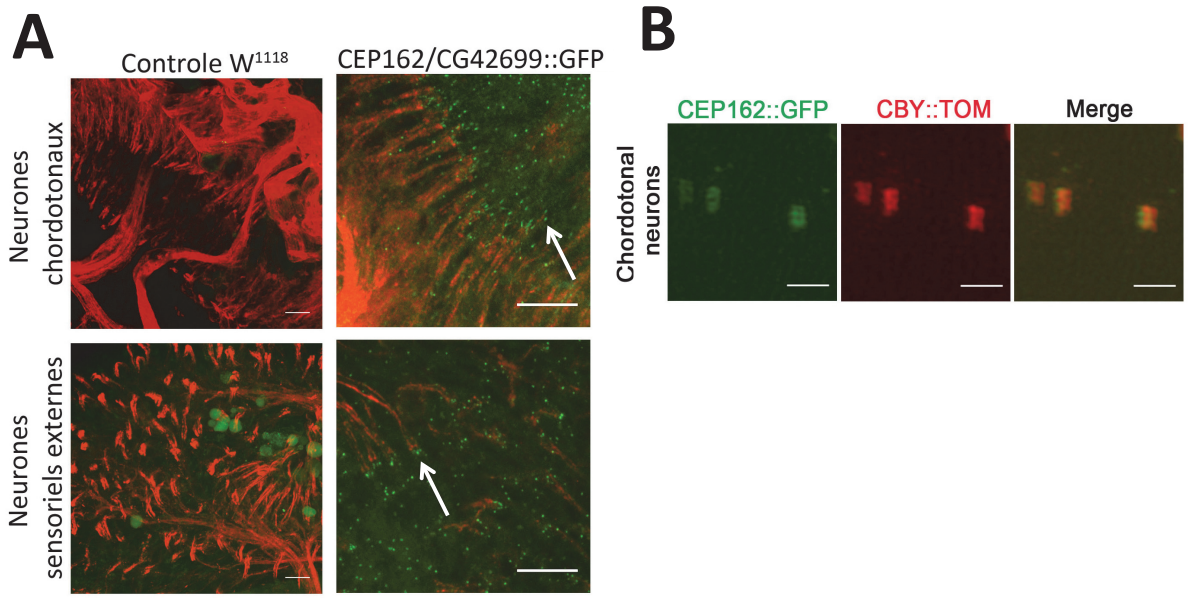


Figure 37 La protéine CEP162 est localisée à la ZT des cils dans le système nerveux périphérique

A) Le corps cellulaire des neurones est marqué par Futsch (22C10). La présence de CEP162 à la base des cils est indiquée par les flèches blanches. Barre d'échelle= 10 µm. B) CEP162 et CBY colocalise dans les neurones chordotonaux. Barre d'échelle= 1 µm.

Au cours de la spermatogenèse, CEP162 est localisée à la ZT comme Chibby au stade spermatocytes puis spermatides rondes (Figure 38). Lorsque la ZT commence à migrer quand les spermatides s'allongent, le marquage de CEP162 ::GFP est perdu.

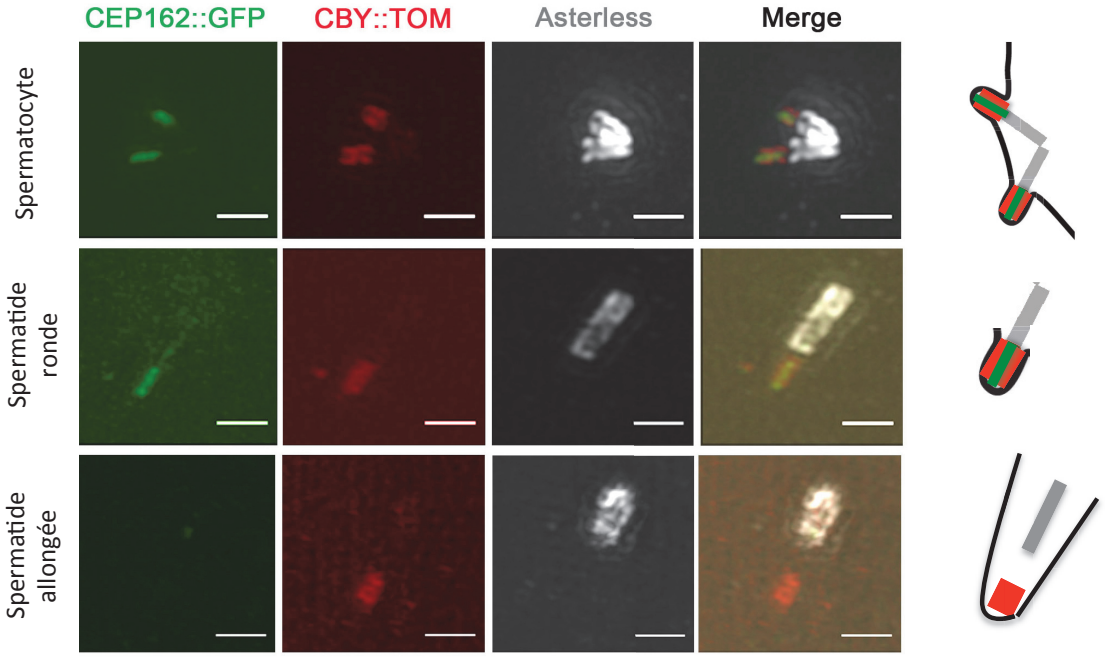


Figure 38 Localisation en 3D SIM de CEP162 par rapport à Chibby au cours de la spermatogenèse

CEP162 est présente au stade spermatocyte et spermatide ronde mais dès que Chibby se détache du centriole (marqué par Asterless en gris) CEP162 n'est plus présente. CEP162 est localisée à l'intérieur du marquage de Chibby et des dessins représentant le marquage sont présentés à droite des images. Barre d'échelle= 1 µm.

CEP162 est localisée à la ZT, à la fois, dans les neurones sensoriels et au cours de la spermatogenèse. Cependant, la localisation par rapport à Chibby est différente en 3D SIM dans les 2 types de cellules ciliées. Dans le cas des neurones sensoriels, cette protéine se superpose à Chibby (Figure 37B). Dans les stades précoces de la spermatogenèse, CEP162 est centrale par rapport à Chibby (Figure 38) et cela pourrait suggérer un rôle essentiel de cette protéine pour la formation de la ZT.

D'une manière intéressante, à un stade plus tardif d'allongement en spermatides allongées, CEP162 réapparait sous forme de comètes en amont de la ZT (Figure 39A).
La protéine CEP162 est également localisée dans les stades très tardifs au cours de l'individualisation à la base des cônes d'actine (Figure 39B). J'ai pu observer une cinétique de l'apparition de cette protéine pendant ce processus. Cette protéine n'est pas présente lorsque les cônes d'actine se forment aux noyaux des spermatides (Figure 39B). Dès que la migration des cônes d'actine va être initiée, CEP162 est présente à la base des cônes sous forme de point/barre le long de l'axonème en dehors de la structure en maillage des cônes. Au cours de la migration des cônes d'actine, dans les renflements cystiques, le marquage de CEP162 est plus étendu le long de l'axonème (Figure 39C).

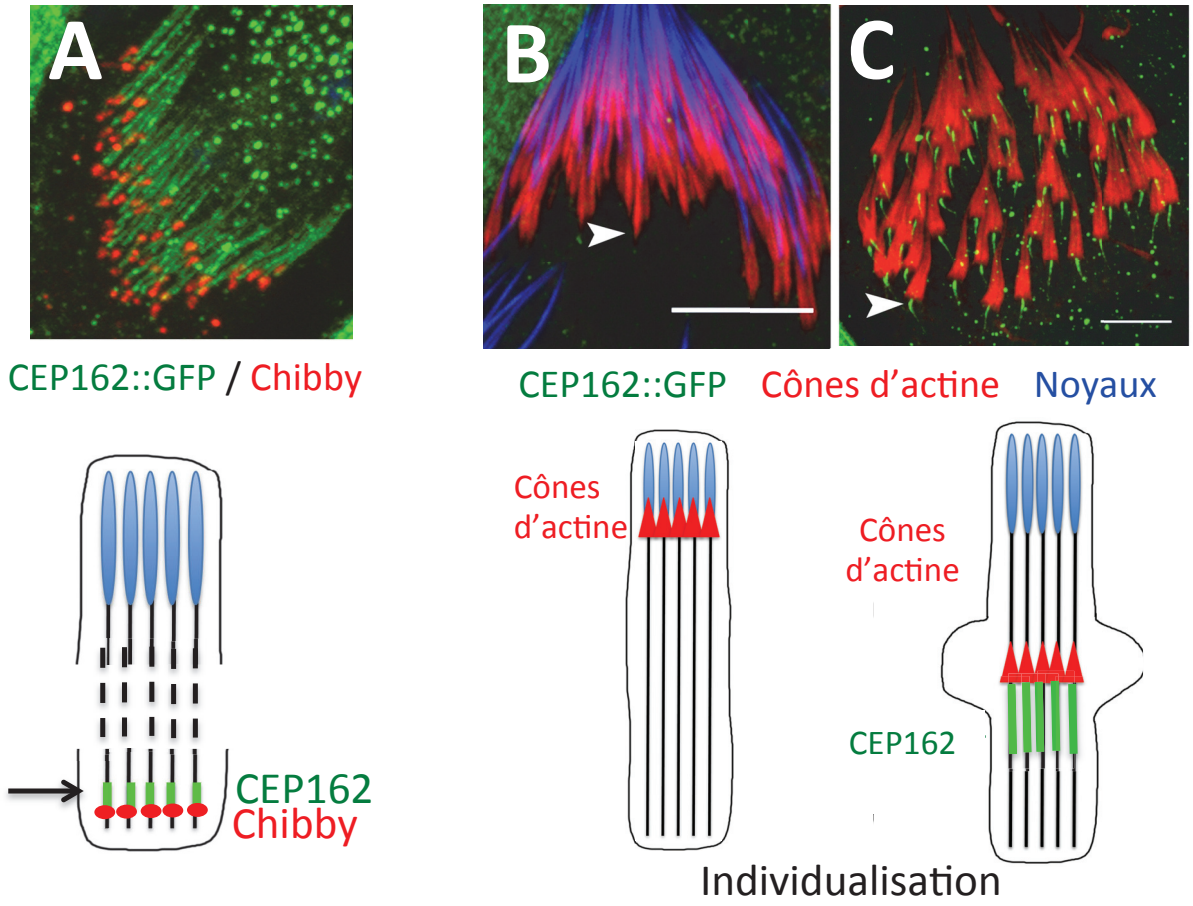


Figure 39 CEP162 possède des localisations supplémentaires dans des stades tardifs de la spermatogenèse

La protéine CEP162 est présente en amont de la ZT marquée par Chibby dans les stades tardifs au cours de l'élongation (A). Dans des stades plus tardifs au cours de l'individualisation les cônes d'actine sont recrutés au noyau (B) puis lorsque leur migration a commencé et au cours de l'individualisation, CEP162 est présente à leur base (C). CEP162 est présente dans les renflements cystiques. Les cônes d'actine sont marqués par la phalloïdine en rouge et les noyaux sont en bleus. Des schémas accompagnent les images. Barre d'échelle=10µm.

CEP162 présente donc plusieurs marquages au cours de la spermatogenèse, à la ZT d'une part, et à la base des cônes d'actine au cours de l'individualisation. Ces différentes localisations suggèrent un rôle dans au moins 2 processus différents, l'assemblage et la formation de la ZT et la migration des cônes d'actine au cours de l'individualisation.

La protéine CEP89 est présente à la base des cils dans le système nerveux périphérique

Chez les mammifères, CEP89 est une des protéines cœurs des appendices distaux nécessaire à la formation des appendices distaux et du cil (Sillibourne et al. 2013; Tanos et al. 2013).

Par l'analyse de l'alignement des séquences, nous avons identifié que CG8214 est l'orthologue de CEP89 chez la drosophile. L'alignement des séquences montre que la conservation de la protéine entre les différentes espèces ne révèle pas de domaine particulièrement conservé (Figure 40).

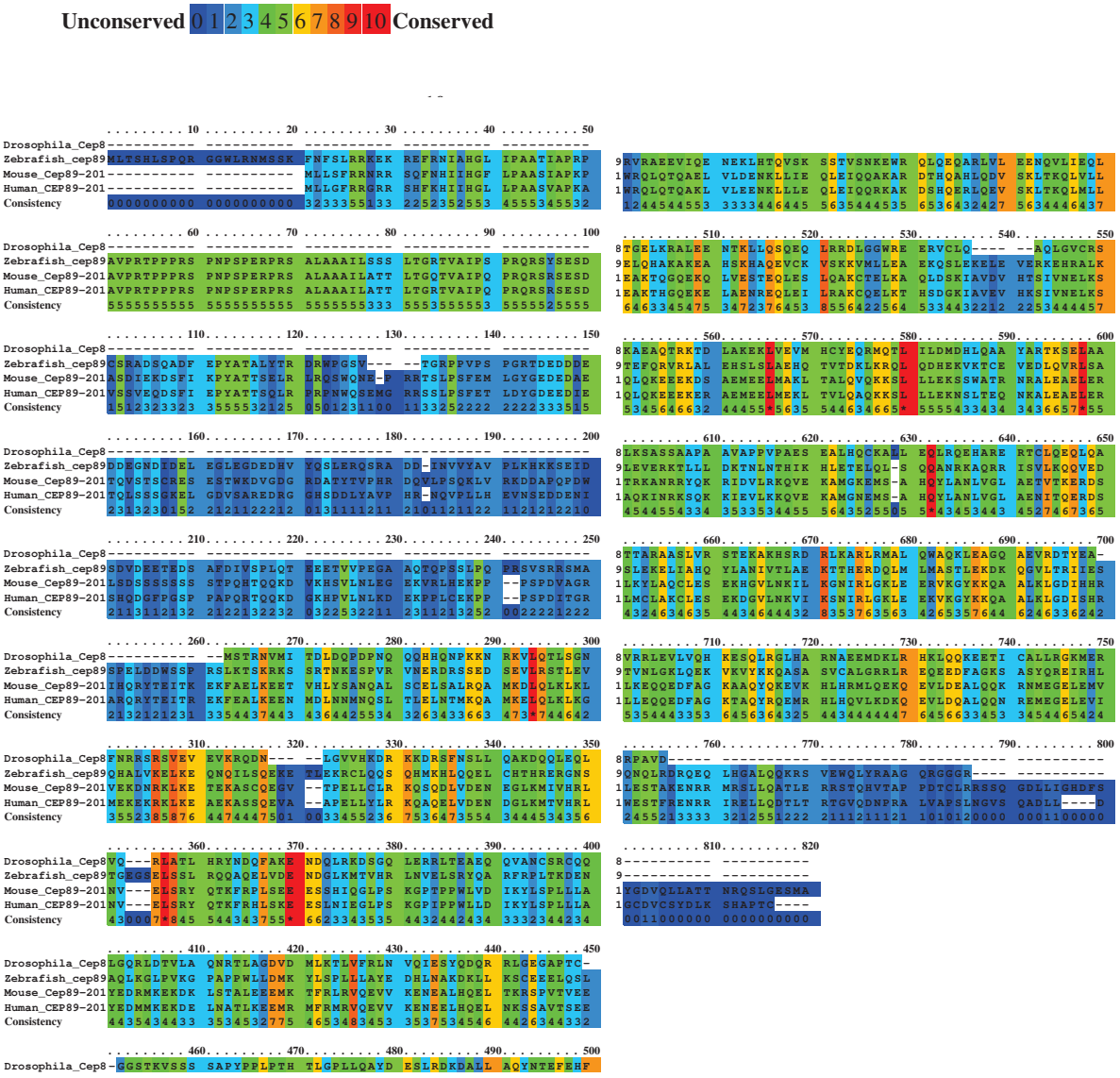


Figure 40 Comparaison des séquences protéiques de CEP89

Le score de conservation des acides aminés a été réalisé par PRALINE (Simossis and Heringa 2005) avec les séquences des protéines de *Drosophila melanogaster, Danio rerio, Mus musculus* et *Homo sapiens*. Le code couleur de conservation va de 0 à 10, 0 pour les acides aminés les moins conservés et 10 pour les mieux conservés.

Chez la drosophile, cette protéine est présente à la base des cils dans les neurones sensoriels et les neurones chordotonaux (Figure 41). La localisation de CEP89 à la base des cils dans les neurones sensoriels suggère un rôle conservé des mammifères à la drosophile dans l'assemblage de la ZT.

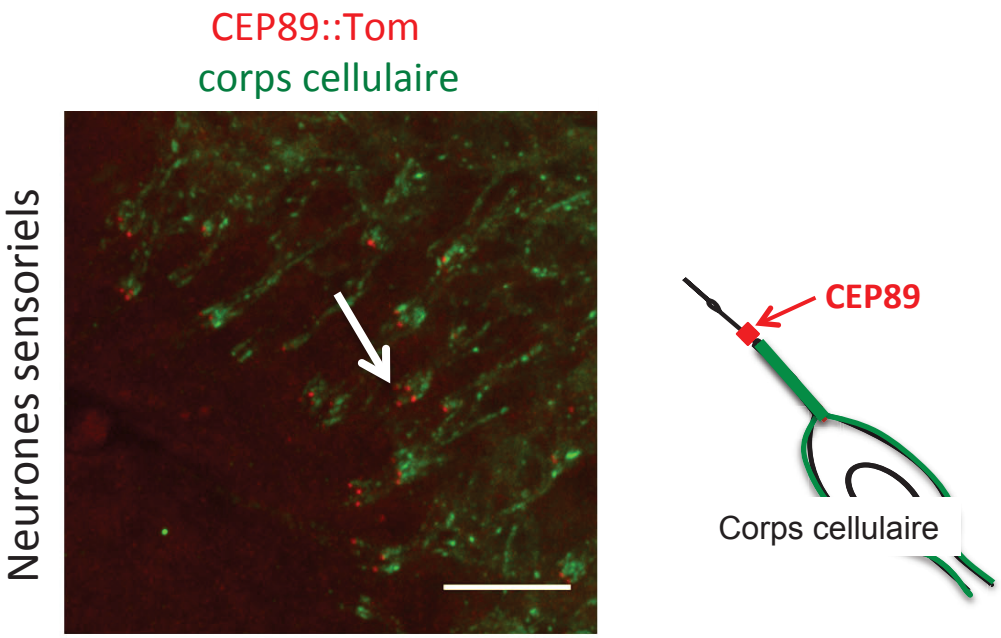


Figure 41 CEP89 est localisée à la base des cils dans le système nerveux périphérique

Le corps cellulaire des neurones est marqué par Futsch en vert (22C10). La protéine CEP89, CG8214 ::Tom est localisée à la base des cils en rouge (flèche) dans les neurones sensoriels. Barre d'échelle= 10 µm.

Au cours de la spermatogenèse, la protéine apparaît comme cytoplasmique avec un signal faible. Cependant ce résultat est à analyser avec précaution car cette observation n'a été réalisée qu'une seule fois sans anticorps dirigée contre la protéine fluorescente Tomato. Il est possible que l'utilisation d'un anticorps permette d'amplifier le signal et de détecter une localisation particulière de cette protéine au cours de la spermatogenèse. De nouvelles expériences d'immunofluorescence au cours de la spermatogenèse permettront de confirmer sa localisation dans ce type cellulaire.

La protéine FBF1 est localisée à la base des cils dans le système nerveux périphérique

La protéine CG5964 est l'orthologue de la protéine humaine FBF1 (Fas-Binding Factor 1). Cette protéine a un rôle fonctionnel chez les mammifères ; son absence entraine un blocage de la formation du cil dans des cellules de mammifères (Tanos et al. 2013). L'alignement des séquences de la protéine FBF1 révèle deux domaines « SMC » en Cter conservés et décrits pour être importants dans l'organisation et la dynamique des chromosomes au cours du cycle cellulaire (Figure 42).

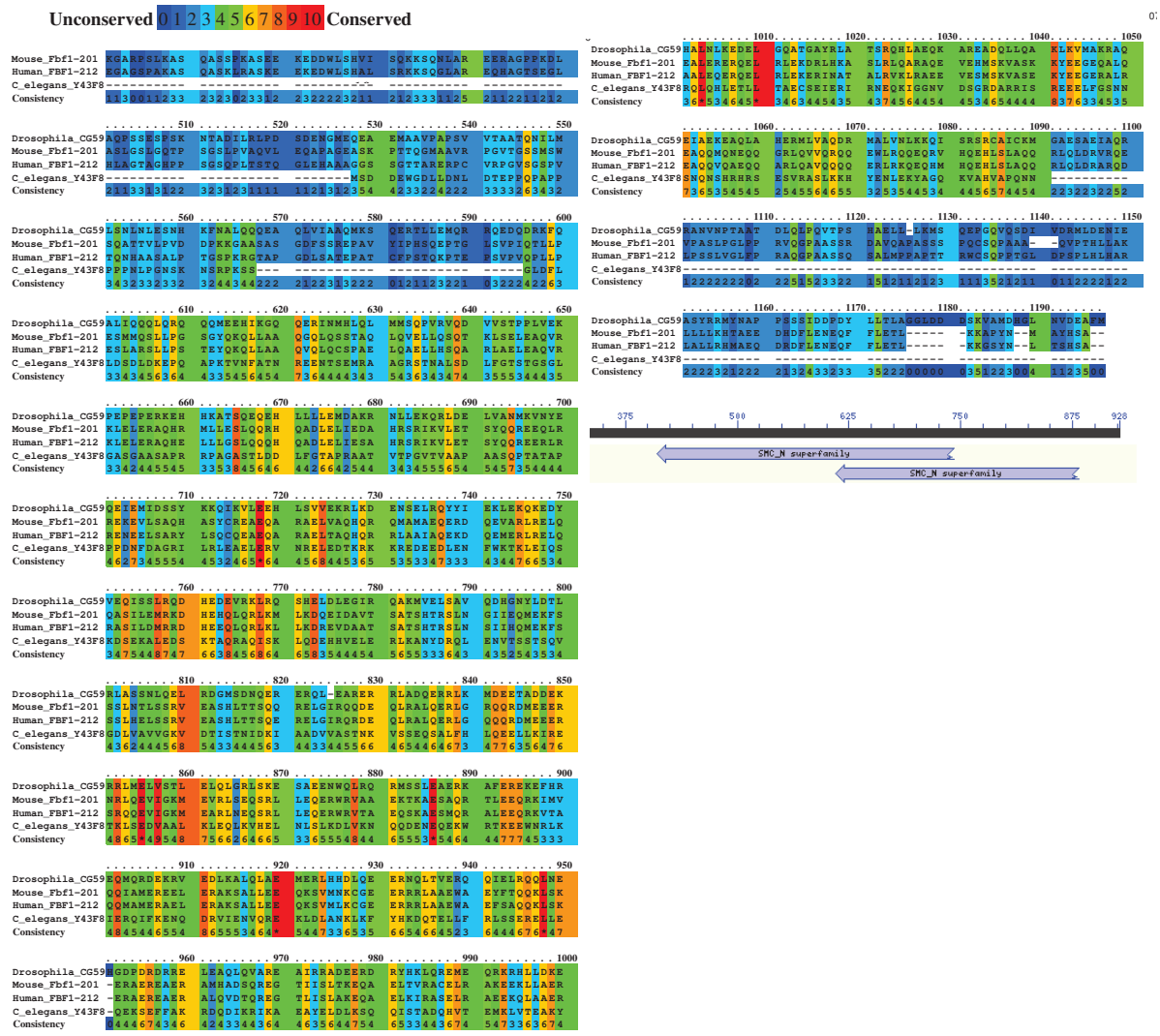


Figure 42 Comparaison des séquences protéiques de FBF1

Le score de conservation des acides aminés a été réalisé par PRALINE (Simossis and Heringa 2005) avec les séquences des protéines de *Drosophila melanogaster, Danio rerio, Mus musculus* et *Homo sapiens*. Le code couleur de conservation va de 0 à 10, 0 pour les acides aminés les moins conservés et 10 pour les mieux conservés. Les domaines SMC sont chevauchants en Cter des séquences protéiques et conservés chez la drosophile.

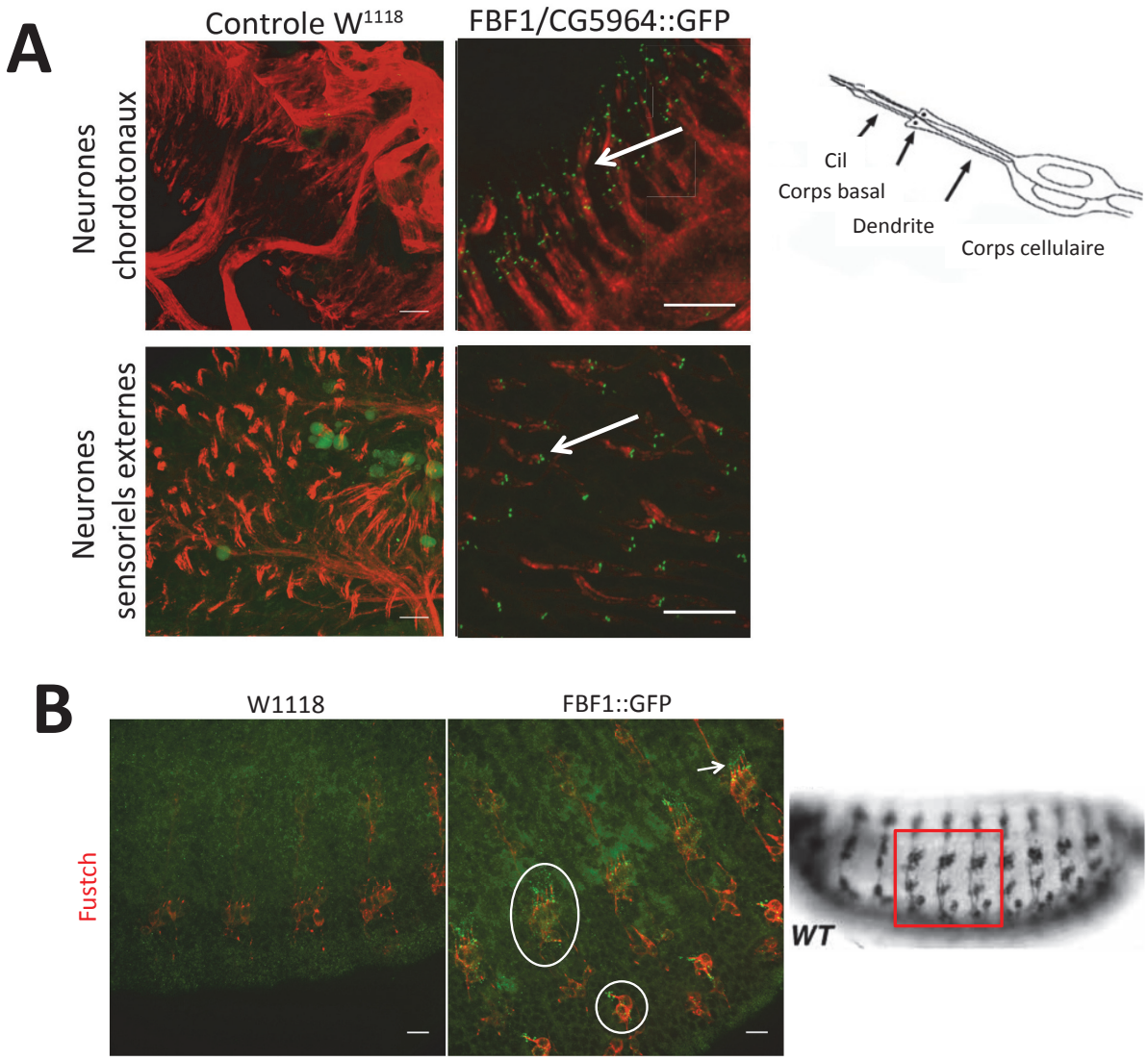


Figure 43 FBF1 est localisée à la base des cils dans le système nerveux periphérique

A) Le corps cellulaire des neurones est marqué par Futsch (22C10). La présence de FBF1 à la base des cils est indiquée par les flèches blanches. A droite, une représentation schématique des neurones chordotonaux, avec le corps cellulaire et la dendrite, le cil est à l'extrémité de la dendrite. Barre d'échelle= 10 µm. B) Images d'immunofluorescence d'embryons en entier permettant de visualiser les neurones chordotonaux de chaque segment. La protéine FBF1 ::GFP est localisée à la ZT (flèche) et présente un marquage vésiculaire (ronds blancs) . A droite image d'un embryon en entier avec le cadre rouge qui correspond à la zone visualisée en microscopie confocale (Image de l'embryon en entier d'après Dubruille et al, 2002).

J'observe que la protéine FBF1/CG5964 fusionnée à la GFP est localisée à base des cils dans les neurones chordotonaux et dans les neurones sensoriels externes des antennes (Figure 43A). Dans les neurones sensoriels, cette protéine a une localisation à la base du cil à proximité de la ZT. Le co-marquage avec une protéine de la ZT comme Chibby devra cependant être réalisé pour permettre d'identifier précisément la localisation de cette protéine dans les cils des neurones sensoriels. Dans un embryon en entier, permettant de visualiser les neurones sensoriels de chaque segment, FBF1 ::GFP est également vésiculaire masquant parfois le marquage à la ZT dans les neurones chordotonaux (Figure 43B).

Au cours de la spermatogenèse, en revanche, cette protéine n'est pas présente à proximité du centriole ou du cil mais FBF1 ::GFP colocalise partiellement avec une protéine de l'appareil

de Golgi (Lavalamp) (Figure 44A) aux stades spermatocytes, spermatides rondes et spermatides allongées mais n'est pas présente à proximité des protéines de la ZT, marquée par Cby (Figure 44B).

Ainsi, la protéine CG5964, présente, d'une part, une localisation vésiculaire à la fois dans le système nerveux périphérique et au cours de la spermatogenèse ; l'utilisation de l'anticorps Lavalamp dirigé contre une protéine de l'appareil de Golgi permettra de préciser sa localisation vésiculaire dans le système nerveux périphérique. D'autre part, le comarquage avec Chibby dans le système nerveux périphérique permettra de localiser précisément FBF1 à la ZT. La localisation de cette protéine dans les 2 types cellulaires ciliés suggère une différence de composition moléculaire à la base des cils.

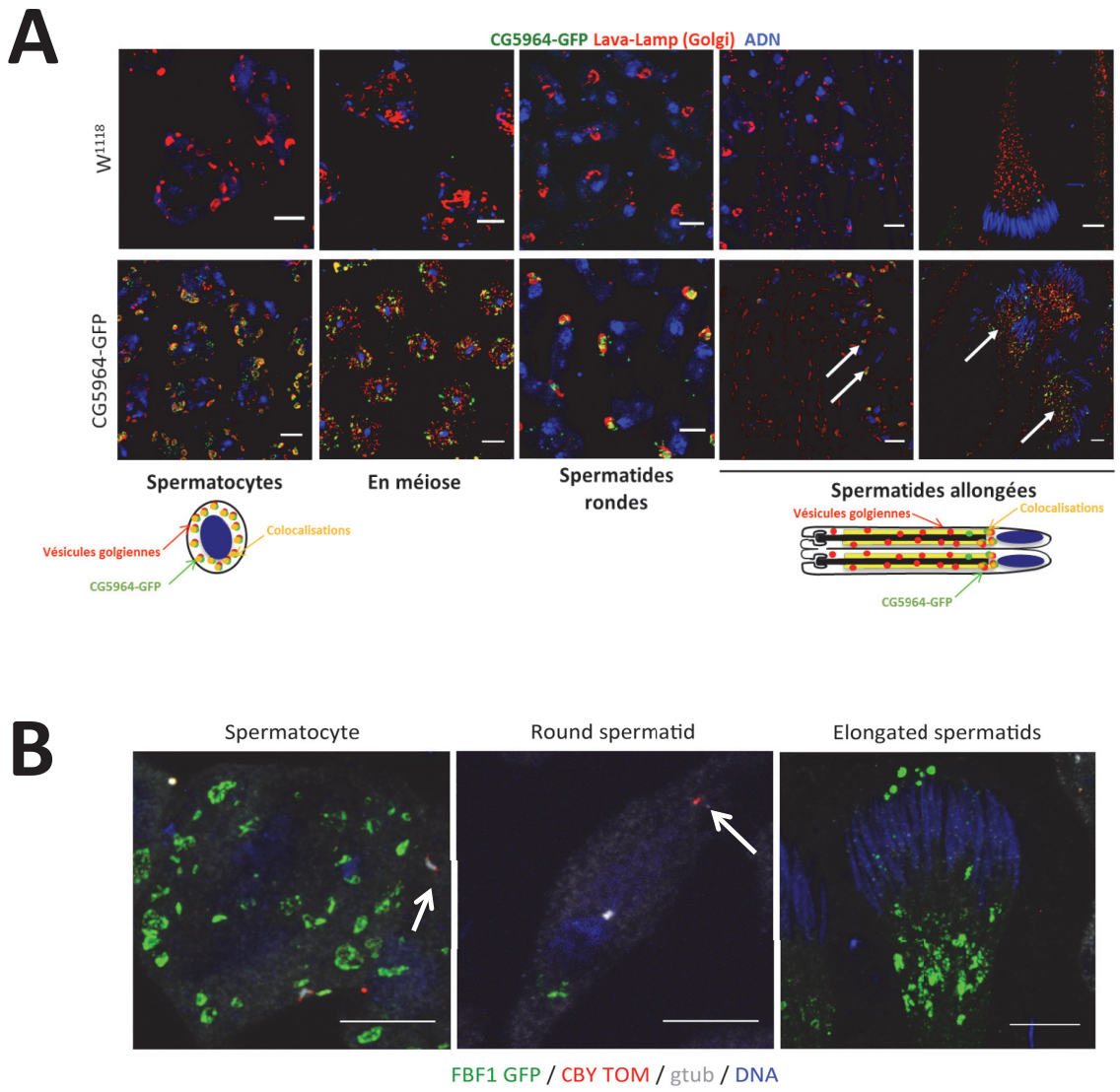


Figure 44 FBF1 est une protéine vésiculaire localisée à proximité des vésicules de l'appareil de Golgi

A) Les différents stades au cours de la spermatogenèse sont représentés de gauche à droite, les spermatocytes, spermatides rondes et les spermatides allongées. Lavalamp est un marqueur des vésicules provenant du Golgi, CG5964 colocalise partiellement avec ces vésicules (flèches). Images réalisées par Anne-Line Coolen. Barres

d'échelles= 10 µm. B) Les différents stades au cours de la spermatogenèse sont représentés de gauche à droite, les spermatocytes, spermatides rondes et les spermatides allongées. Les centrioles sont marqués par la γtubuline qui marque le matériel péri centriolaire et Chibby en rouge marque la ZT (flèches blanches). Barres d'échelles= 10 µm.

Les orthologues de ODF2 ont une localisation particulière dans les tissus ciliés

La protéine ODF2 (Outer Dense Fiber 2) a été, initialement, identifiée comme une protéine composant principalement les fibres denses externes dans les spermatozoïdes des mammifères (Hoyer-Fender et al. 1998).

Le gène *ODF2* code différentes isoformes chez les mammifères (Figure 45A). C'est l'isofome 9/Cenexine1 du gène *ODF2* qui joue un rôle aux appendices distaux (Chang et al. 2013). L'isoforme Cenexine1 possède un domaine C terminal plus grand que l'isoforme ODF2 (Chang et al. 2013). La protéine ODF2/Cenexine1 a été identifiée comme nécessaire au recrutement de Chibby à la zone de transition dans des cellules de mammifères (Chang et al. 2013).

La question que nous nous sommes posés et donc à savoir si ODF2/Cenexine1 possède des orthologues chez la drosophile et si ces orthologues sont nécessaires au recrutement de Chibby à la ZT et participent à l'ancrage du corps basal afin d'initier la ciliogenèse chez la drosophile ?

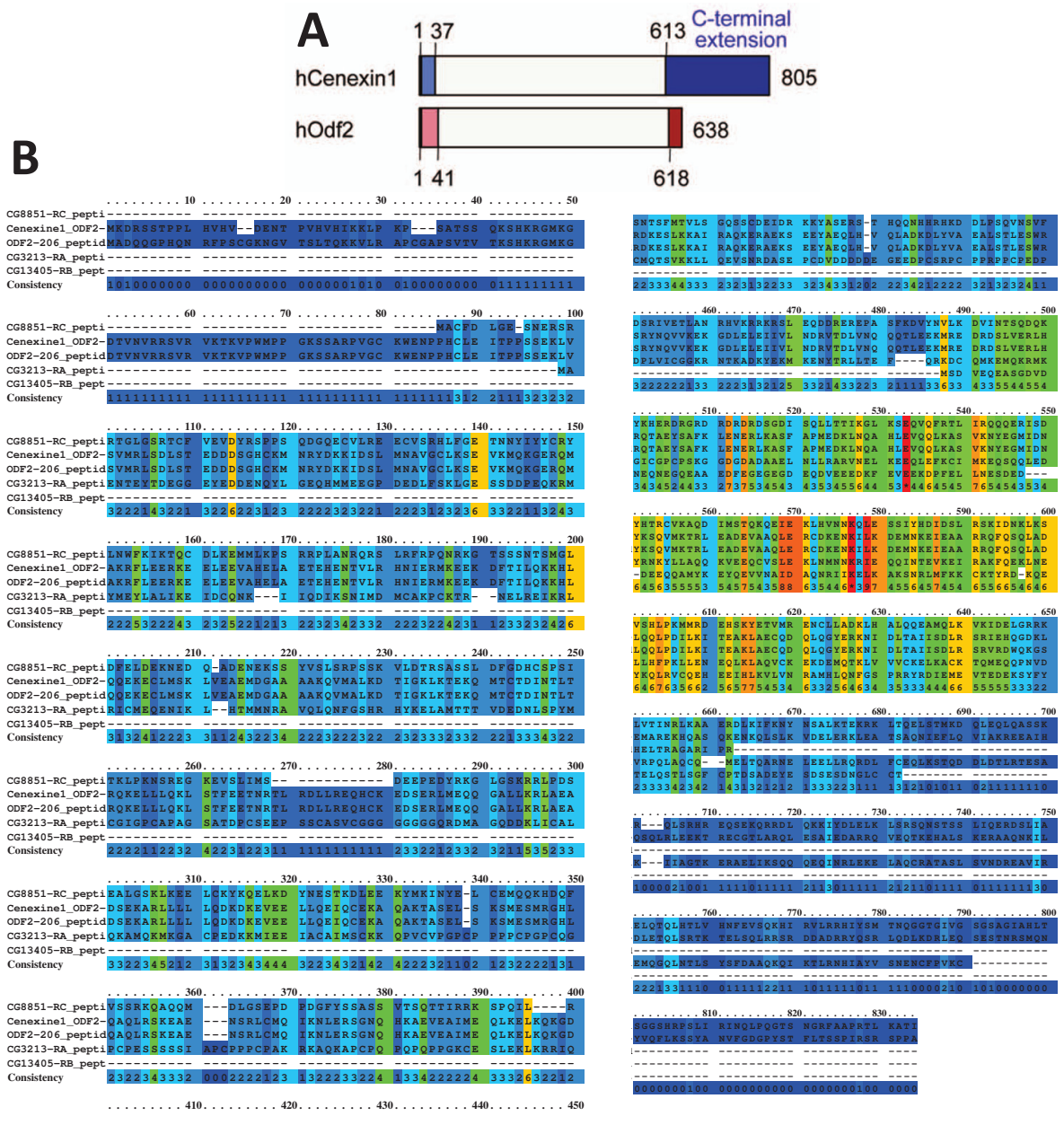


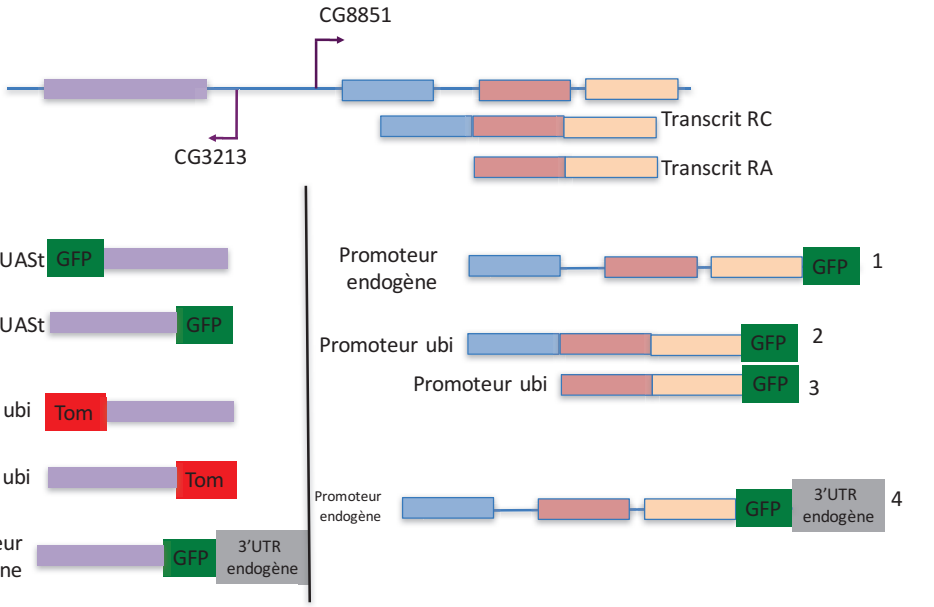
Figure 45 Comparaison des séquences protéiques ODF2

A) Images des isoformes différentes entre ODF2 et Cenexine1 d'après Chang 2013. B) Le score de conservation des acides aminés a été réalisé par PRALINE (Simossis and Heringa 2005) avec les séquences des protéines de *Drosophila melanogaster, Danio rerio, Mus musculus* et *Homo sapiens*. Le code couleur de conservation va de 0 à 10, 0 pour les acides aminés les moins conservés et 10 pour les mieux conservés.

Afin d'identifier les orthologues de ODF2/Cenexine1 chez la drosophile, j'ai réalisé des analyses de comparaison de séquence permettant de révéler le pourcentage d'identité entre les différentes isoformes du gène *ODF2* chez la drosophile. Chez la drosophile il existe potentiellement 3 orthologues de *ODF2*, il s'agit de CG8851, CG3213 et CG13405 (Figure 45B). En analysant la totalité de la séquence codante de Cenexine1, CG8851 possède 25% d'identité et CG3213 en possède 21%. En revanche CG13405 est retrouvé avec un indice de confiance très faible après plusieurs itérations et pourrait être un paralogue issu d'une duplication lointaine au cours de l'évolution des arthropodes du gène CG8851 ou CG3213.

Enfin, en utilisant uniquement la partie C terminale spécifique de Cenexine1 pour réaliser le BLAST, seul CG8851 est identifié avec 28% d'identité (données non montrées).
Enfin, l'alignement protéique obtenu par le logiciel Seaview des 3 orthologues de *ODF2* chez la drosophile montre que *CG8851* et *CG3213* semblent plus proche de l'isoforme Cenexine1 dont le C-ter est plus long que l'isoforme ODF2 (Figure 45A). *CG8851* et *CG3213* ont plus de domaines conservés comparés à *CG13405* qui est beaucoup plus court (Figure 45B).

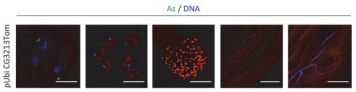
D'une manière intéressante, CG3213 a également été identifié comme potentiel interacteur de Chibby par le crible double hybride réalisé dans l'équipe d'une banque d'ADNc issue de testis de drosophile avec Chibby comme appât, mais son interaction n'a pas été confirmée par co-immunoprécipitation. Comme l'équipe de Monica Bettencourt-Dias avait déjà commencé la caractérisation de *CG3213*, j'ai réalisé l'analyse de CG8851 et ai ensuite réalisé le double mutant des deux gènes afin de caractériser leur fonction. Cette équipe a identifié la protéine CG3213 comme une protéine de la ZT dans les neurones sensoriels (donnée non montrée). Malgré l'utilisation de la même construction transgénique dans les mêmes conditions permettant l'expression de la protéine uniquement dans les neurones sensoriels, je n'ai obtenu aucun signal et je ne suis ainsi pas arrivée à reproduire ce résultat.
J'ai donc réalisé différentes constructions transgéniques afin de déterminer la localisation de cette protéine (Figure 46). Pour cela j'ai utilisé soit le promoteur endogène de CG3213, soit un promoteur ubiquitaire (pUbi) ou soit le promoteur pUAST sous le contrôle du facteur Gal4. Je ne détecte la protéine CG3213 fluorescente que par la construction qui porte la protéine de fusion avec le tomato en Cter. Dans ce cas, la localisation est vésiculaire au cours de la spermatogenèse (Figure 46). J'ai également réalisé une protéine fusion avec la protéine fluorescente E-GFP pour CG3213 et qui inclut la région 3'UTR du gène CG3213. Cependant cette dernière protéine de fusion n'est pas détectée non plus dans les neurones sensoriels et ne permet pas de confirmer la localisation à la ZT que l'équipe de M. Bettencourt-Dias a montré. Au cours de la spermatogenèse j'ai détecté un signal non spécifique de la protéine CG3213 ::GFP, dû à l'autofluorescence du tissu étudié. Les constructions dans les conditions étudiées n'ont pas permis de révéler un signal spécifique de cette protéine.
Afin d'éliminer l'hypothèse d'une compétition avec la protéine endogène à l'origine de l'absence de signal fluorescent dans le sauvage, j'ai réalisé le profil de localisation dans un contexte double mutant CG8851 et CG3213 mais la protéine CG3213 ::GFP n'a pas révélé de signal.
La localisation de la protéine CG3213 ne peut donc pas être confirmée dans les neurones sensoriels et comme chaque construction transgénique donne un profil différent au cours de la spermatogenèse, je ne peux donc pas conclure sur la localisation de cette protéine. Un bilan des différentes constructions testées pour *CG3213* est fourni en Figure 46.



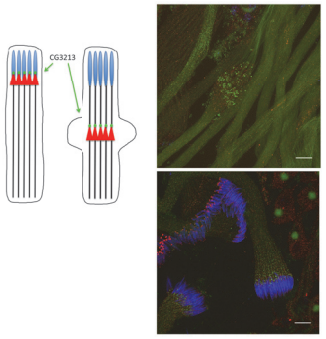
	Loc PNS	Loc Testis
1	ZT (M.Bettencourt-Dias) non vérifié	Non détecté
2	ZT (M.Bettencourt-Dias) non vérifié	Non détecté
3	Non détecté	Non détecté
4	Non détecté	Pas ZT/Non détecté
5	Non détecté	Pas ZT/Non détecté

	Loc PNS	Loc Testis
1	Non détecté	Amont de la ZT
2	Non détecté	Amont de la ZT
3	Non détecté	Non détecté
4	Non détecté	Amont de la ZT

Construction 4 Testis



Construction 5 Testis



Constructions 1, 2 et 4 Testis

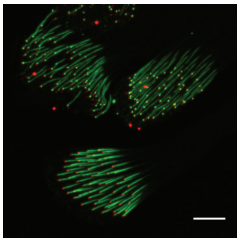


Figure 46 Bilan des constructions réalisées et testées pour CG8851 et CG3213

Un schéma du locus ainsi que des transgènes est indiqué en haut de la figure, un tableau indique ensuite pour les différentes constructions (1 à 5 ou 4 pour CG8851) la localisation dans le système nerveux périphérique (PNS) ou au cours de la spermatogenèse (Testis) puis des images illustrant les localisations de certaines constructions en bas de la figure.

Concernant la protéine CG8851, j'ai également testé différentes constructions qui sont résumées dans la Figure 46, et comme toutes les protéines transgéniques montraient un profil similaire, j'ai sélectionné la construction la plus physiologique pour continuer les expériences : la construction avec le promoteur endogène de CG8851, la protéine GFP en Cter et le 3'UTR endogène.

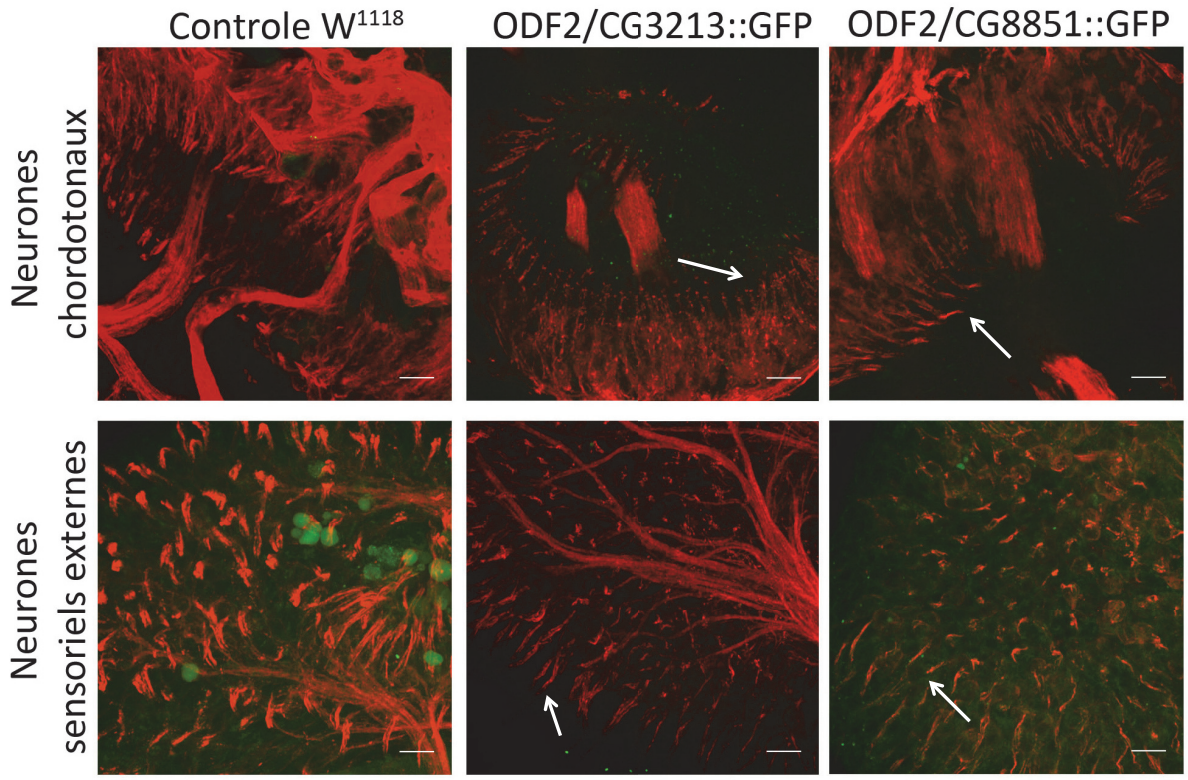


Figure 47 Les orthologues de ODF2, CG3213 et CG8851 ne sont pas détectables dans les neurones sensoriels de type 1

Le corps cellulaire est marqué par Fustch (22C10) en rouge dans les neurones chordotonaux (panel du haut) et les neurones sensoriels externes (panel du bas) et les deux transgènes visualisés sans anticorps, CG3213 au milieu et CG8851 à droite, n'ont pas révélé de marquage spécifique (flèches) par rapport au contrôle W1118 (à gauche). Barres d'échelles= 10 µm.

Les deux orthologues de ODF2, CG8851 et CG3213 ne sont pas détectés dans le système nerveux périphérique (Figure 47). L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la GFP n'amplifie pas le signal mais augmente le bruit de fond, les images ont donc été réalisées sans anticorps. Dans les deux cas, aucun signal n'est détecté dans les neurones chordotonaux et les neurones sensoriels avec ou sans l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la GFP (Figure 47).

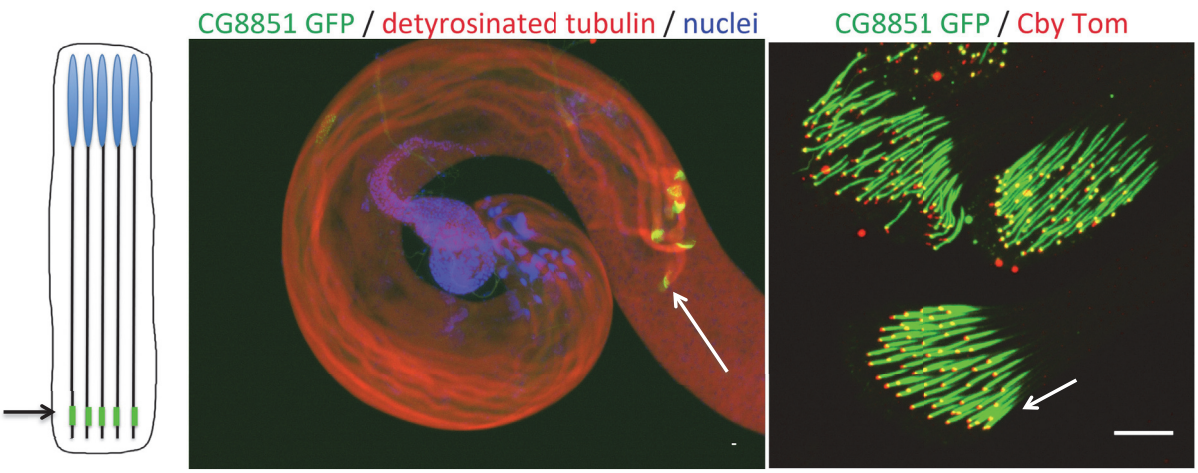


Figure 48 CG8851 est localisée dans les spermatides allongées en amont de la ZT

Représentation schématique de la localisation de CG8851 ::GFP à gauche à l'opposé des noyaux dans des spermatides allongés (flèches). L'observation d'un testis entier indique que CG8851 n'est présent que dans les spermatides allongées et détyrosinées uniquement. Le comarquage avec Chibby montre une localisation sous forme de comètes de CG8851 en amont de la ZT. Barre d'échelle= 10 µm.

Au cours de la spermatogenèse, CG8851 présente une localisation très restreinte dans le temps (Figure 48). Cette protéine est présente sous forme de comète juste en amont des protéines de la ZT dans des spermatides allongées marquées par la tubuline détyrosinée (Figure 48). Ce marquage très restreint de CG8851 a été vérifié en réalisant différentes constructions transgéniques incluant un positionnement du tag en N-ter ou en C-ter (Figure 46) et des séquences régulatrices permettant une expression ubiquitaire. J'ai également cloné les 2 isoformes RC et RA afin d'identifier si ces 2 isoformes présentaient le même marquage (Figure 46). L'isoforme longue RC avec le tag en N-ter est présente à l'extrémité des spermatides alors que l'isoforme plus courte RA ne contenant pas le premier exon n'est pas présente (Figure 46).

Bilan général sur la localisation des protéines orthologues des protéines des fibres de transition

L'ensemble de ces résultats montre que les protéines FBF1, CEP89 et CEP162 sont localisées à la ZT des cils dans les neurones sensoriels externes et les neurones chordotonaux alors que les protéines orthologues de ODF2 ne sont pas détéctées (Figure 49).
Ces protéines ne sont pas toutes présentes à la ZT au cours de la spermatogenèse, FBF1 et un des orthologue de ODF2, CG8851, sont exclues de la région centriolaire (Figure 49). Seule la protéine CEP162 est localisée à proximité de la ZT au cours de la spermatogenèse (Figure 49). La localisation de CEP89 au cours de la spermatogenèse reste à établir. Enfin, je n'ai pas réussi à déterminer la localisation de la protéine CG3213 dans les tissus ciliés et cela manque pour compléter la localisation des orthologues des protéines des fibres de transition.
Les différentes localisations des protéines orthologues des protéines des fibres de transition entre les neurones sensoriels de type 1 et les cellules germinales illustrent une composition moléculaire différente de la base du cil. Il est donc possible que les modes d'assemblage de la ZT soient spécifiques à chaque type cellulaire.

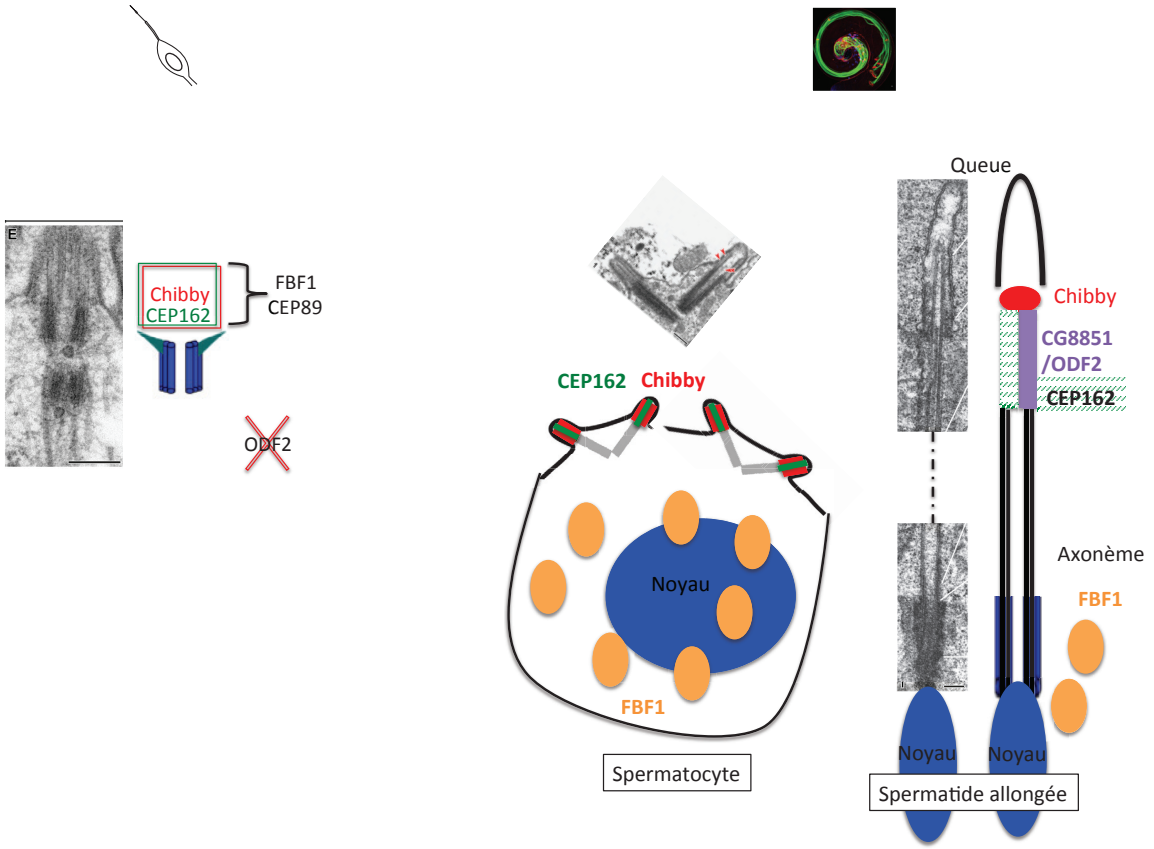


Figure 49 Schéma bilan sur la localisation des protéines orthologues des protéines des fibres de transition dans les tissus ciliés de la drosophile

A gauche, une image en miscrocopie électronique de la base du cil dans les neurones sensoriels ainsi qu'un schéma montrant les protéines CEP162 et Cby à la ZT, les protéines FBF1 et CEP89 sont localisées à la base du cil. A droite, la localisation de ces protéines au cours de la spermatogenèse dans des stades précoces (spermatocyte) et des stades plus tardif (spermatide allongée). Seule la protéine CEP162 est localisée à la ZT en spermatocyte, à des stades plus tardifs, on retrouve CEP162 et CG8851 en amont de la ZT. En revanche, la protéine FBF1 est vésiculaire au cours de la spermatogenèse. La protéine CEP89 devra elle être étudiée plus en détail au cours de la spermatogenèse.

Caractérisation fonctionnelle des protéines orthologues des protéines des appendices distaux

Chez la drosophile, dans les neurones sensoriels, des défauts des protéines de la ZT comme Chibby conduisent à une altération ou une absence du cil (Enjolras et al. 2012 ; Vieillard et al. 2016).

Au cours de la spermatogenèse, la co-déplétion des protéines du ring centriole Dila et Chibby provoquent une croissance aberrante de microtubules axonémaux à partir des corps basaux des spermatocytes (Vieillard et al. 2016). Ces extensions sont visibles avec la protéine CG6652 qui marque spécifiquement l'axonème (Vieillard et al. 2016). Ces extensions aberrantes sont, de plus, caractérisées par une perturbation du recrutement des protéines de la zone de transition. Un tel phénotype a été associé à un défaut d'ancrage du corps basal à la membrane plasmique (Vieillard et al. 2016).

L'expression tissu spécifique des shARN spécifiques de chacun des gènes est rendue possible grâce au système UAS-Gal4 ; le promoteur Bam permet l'expression du gène Gal-4 dans les

stades précoces de la spermatogenèse qui permet à son tour de contrôler l'expression des shARN sous le contrôle du promoteur UAS. Grâce à ces outils disponibles, j'ai donc pu analyser un plus grand nombre de protéines que ce que j'ai pu faire en réalisant des protéines fusions pour identifier la localisation des protéines.

CEP162 est impliquée dans l'ancrage du corps basal et dans la formation de la ZT au cours de la spermatogenèse chez la *Drosophile*

Les protéines des appendices distaux jouent un rôle essentiel dans l'ancrage du corps basal à la membrane plasmique afin de nucléer le cil (Tanos et al. 2013; Wei et al. 2015). Chez la drosophile, l'absence de structure assimilable à des fibres de transition au cours de la spermatogenèse suggère un mécanisme d'ancrage différent. Une hypothèse est que les orthologues des protéines cœurs des appendices distaux jouent un rôle d'ancrage sans former d'appendices visibles en microscopie électronique.

Afin de vérifier l'efficacité de diminution de la protéine par le shARN ciblant CEP162, j'ai quantifié l'intensité de la protéine fluorescente CEP162 ::GFP en l'exprimant en présence du shARN et j'ai constaté une perte quasi totale de la protéine CEP162 ::GFP (Figure 50). Le shARN dirigé contre le messager de CEP162 est donc très efficace et nous pouvons analyser les phénotypes associés à la perte de fonction de cette protéine.

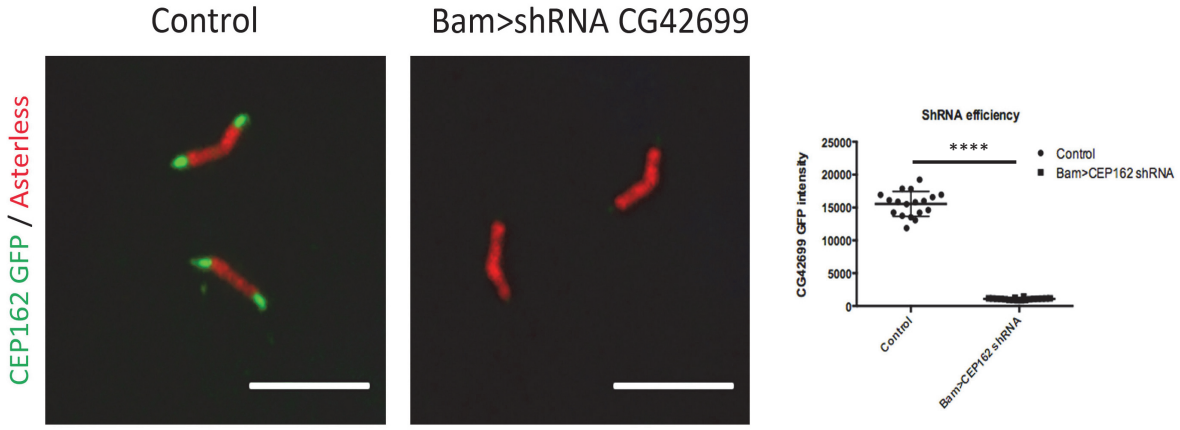


Figure 50 Perte quasi totale de la protéine CEP162 ::GFP après expression d'un shARN dirigé contre CEP162

Analyse par immunofluorescence de la perte de la protéine CEP162 ::GFP après expression du shARN dans le testis. La quantification de plus de 100 centrioles résulte en une diminution très forte d'intensité de la protéine CEP162 ::GFP. Barre d'échelle= 10 µm.

Au cours de la spermatogenèse, la perte de CEP162 conduit à des extensions aberrantes de l'axonème qui proviennent des corps basaux (Figure 51A). Au stade spermatocyte, un seul centriole de chaque paire montre une extension aberrante de l'axonème. Il semble donc qu'un seul centriole de chaque paire soit affecté par un défaut d'ancrage. Ce défaut persiste aux stades des spermatides allongées, l'axonème est ramifié au lieu d'être continu.
La perte de CEP162 dans le testis conduit à un fort défaut d'ancrage du corps basal.

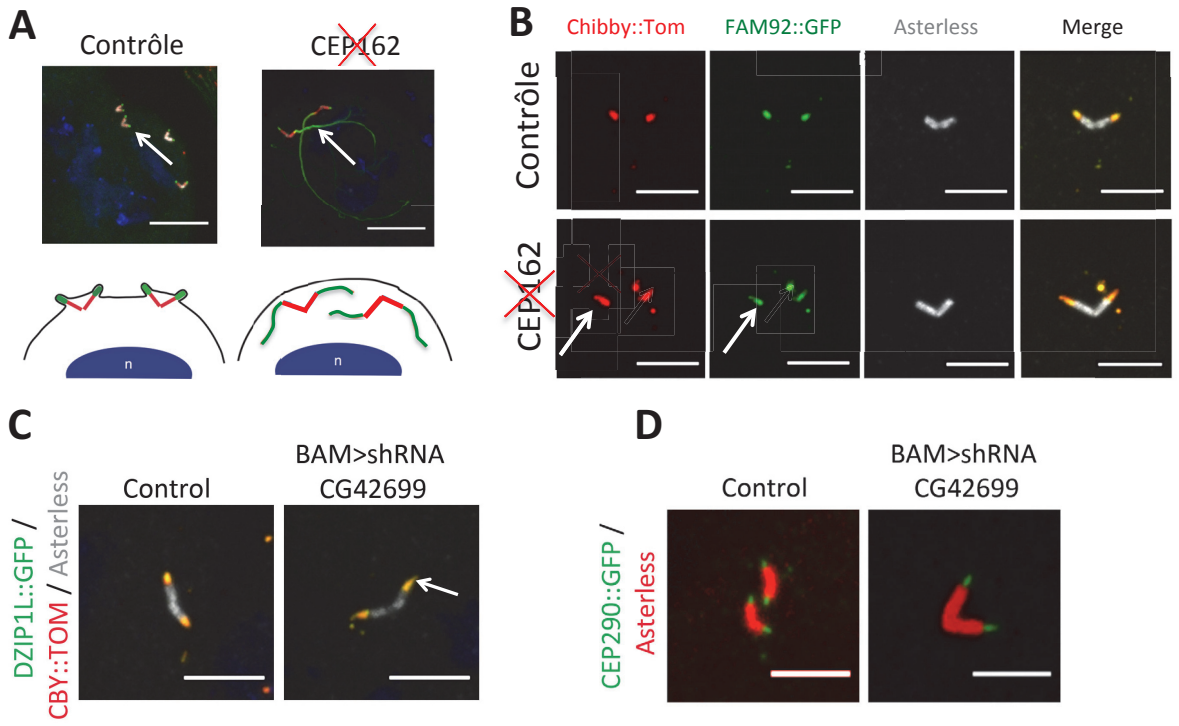


Figure 51 La perte de CEP162 conduit à des défauts d'ancrage des corps basaux et de formation de la ZT au cours de la spermatogenèse

A) Des extensions aberrantes de l'axonème sont présentes au stade spermatocyte et spermatides allongées lors de la perte de CEP162 (flèches). Les centrioles sont marqués en rouge par UncmKate et en blanc par Asterless. L'axonème est marqué par le transgène CG6652 ::GFP. Barre d'échelle= 10 µm. B) CBY et FAM92 (CG6405) ont un domaine étendu au stade spermatocyte (flèches). Barre d'échelle= 5µm. C) DZIP1L::GFP présente un domaine étendu après la perte de CEP162 (flèche). Barre d'échelle= 5 µm. D) CEP290 ::GFP n'est pas affectée par la perte de CEP162. Barre d'échelle= 5 µm.

Les défauts d'ancrage du corps basal peuvent correspondre à un défaut spécifique des protéines du ring centriole de la ZT. Pour confirmer que CEP162 est requise pour organiser les protéines du ring centriole, nous avons donc cherché à identifier si les protéines de la ZT sont perturbées après la perte de CEP162. Dans le contrôle, les protéines FAM92, DZIP1L et CBY sont présentes à la ZT mais la perte de CEP162 entraine une dispersion de ces protéines (Figure 51B et C). En revanche la protéine CEP290 ne semble pas affectée par la perte de CEP162 (Figure 51D). Cependant, la quantification d'intensité de CEP290 ::GFP permettrait de vérifier que CEP162 influe ou pas sur le recrutement de cette protéine.

Ces résultats indiquent que CEP162 est requise pour assembler et restreindre la ZT au cours de la spermatogenèse. L'absence de CEP162 provoque un défaut d'ancrage des corps basaux à la membrane, et potentiellement une absence du capuchon ciliaire, autour de la zone de transition. Cependant, seules des observations en microscopie électronique permettront de confirmer l'absence d'ancrage à la membrane plasmique.

Enfin, la protéine CEP162 semble avoir acquis une localisation nouvelle chez la drosophile au niveau des **stades tardifs** de la spermatogenèse (Figure 39). Cette localisation suggère un rôle dans la migration des cônes d'actine au cours de l'individualisation des spermatides mais l'étude fonctionnelle réalisée ici ne permet pas d'identifier le rôle potentiel de cette protéine dans ce processus, parce que les défauts engendrés par la perte de CEP162 sont précoces et parce qu'un défaut d'individualisation pourrait être la conséquence de ces mêmes défauts

précoces. La perte conditionnelle de cette protéine dans des stades plus tardifs permettrait d'identifier le rôle de cette protéine dans le mécanisme d'individualisation des spermatides.

Les autres protéines orthologues des protéines des fibres de transition jouent un rôle tardif dans la ciliogenèse

L'analyse des shARN dirigés contre FBF1, CEP89, C2CD3 et SDCCAG8 n'a révélé aucun défaut d'ancrage du corps basal visualisé par la protéine axonémale CG6652 (données non montrées). Cependant, la perte de ces protéines conduit à des défauts de la ciliogenèse plus tardif.

En effet, au cours de la spermatogenèse, dans des spermatides allongées, les noyaux sont contraints d'un côté du cyste et forment une couronne de 64 noyaux. Lors d'un défaut de croissance de l'axonème, les noyaux des spermatides allongées sont dispersés dans les cystes de spermatides au lieu d'être restreints à un côté du cyste. En étudiant la localisation des noyaux dans des spermatides allongées ayant perdu les protéines FBF1, CEP89, C2CD3 ou SDCCAG8, il apparaît que les noyaux sont dispersés le long des cystes (Figure 52).

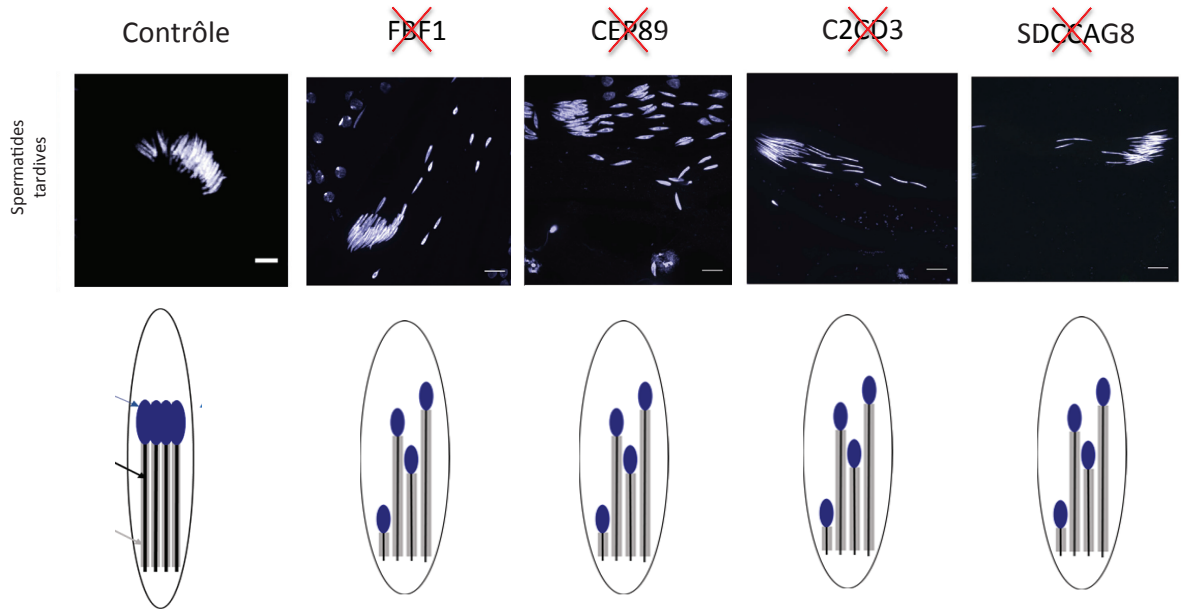


Figure 52 Les protéines FBF1, CEP89, C2CD3 et SDCCAG8 sont nécessaires pour la ciliogenèse

Les noyaux sont marqués en blanc, chez le contrôle, les noyaux sont contraints d'un seul côté du cyste ; après la perte de FBF1, CEP89, C2CD3 et SDCCAG8 les noyaux sont dispersés le long du cyste. Barre d'échelle= 10 µm.

Bien que l'initiation de la ciliogenèse se fasse normalement suite à la perte de FBF1, CEP89, SDCCAG8 et C2CD3, les noyaux délocalisés dans les cystes de spermatides allongées indiquent un défaut potentiel de croissance de l'axonème (Figure 52). Des analyses en microscopie électronique permettront d'identifier des défauts de structure de l'axonème après la perte de ces protéines.

Le double mutant CG8851-CG3213 ne présente pas de défaut de la ciliogenèse au cours de la spermatogenèse

La localisation d'un élément transposable de type « Minos » dans le premier intron du gène CG8851 conduit à l'absence d'expression des 2 transcrits de CG8851 (Figure 53A).
Concernant, le simple mutant *CG8851*, étant donné que l'élément transposable conduisant à la perte de fonction est situé dans l'intron, le doute subsiste à savoir si l'exon 1 seul peut produire une protéine active. En effet, il est possible que cette petite partie de protéine soit encore fonctionnelle même si cela ne représente qu'une petite partie de la séquence (Figure 53A). De plus, nous montrons que l'isoforme longue RC de *CG8851* dans le contrôle W1118 semble minoritaire dans le testis (Figure 53A). Pourtant, en réalisant des constructions transgéniques pour les 2 isoformes, je ne visualise, à proximité de la ZT dans les spermatides allongées, que la forme longue RC alors que la forme courte RA n'est pas détectée (Figure 46). Le premier exon pourrait donc être responsable de la localisation de CG8851 en amont de la ZT.

La perte de fonction de CG8851 ne conduit à aucun phénotype évident dans les neurones chordotonaux en mesurant la coordination des drosophiles par Bang Assay (Figure 53C). Les mâles mutants pour CG8851 sont fertiles et ne présentent aucun défaut ciliaire observable par la localisation des noyaux dans les cystes de spermatides au cours de la spermatogenèse (Figure 53B).

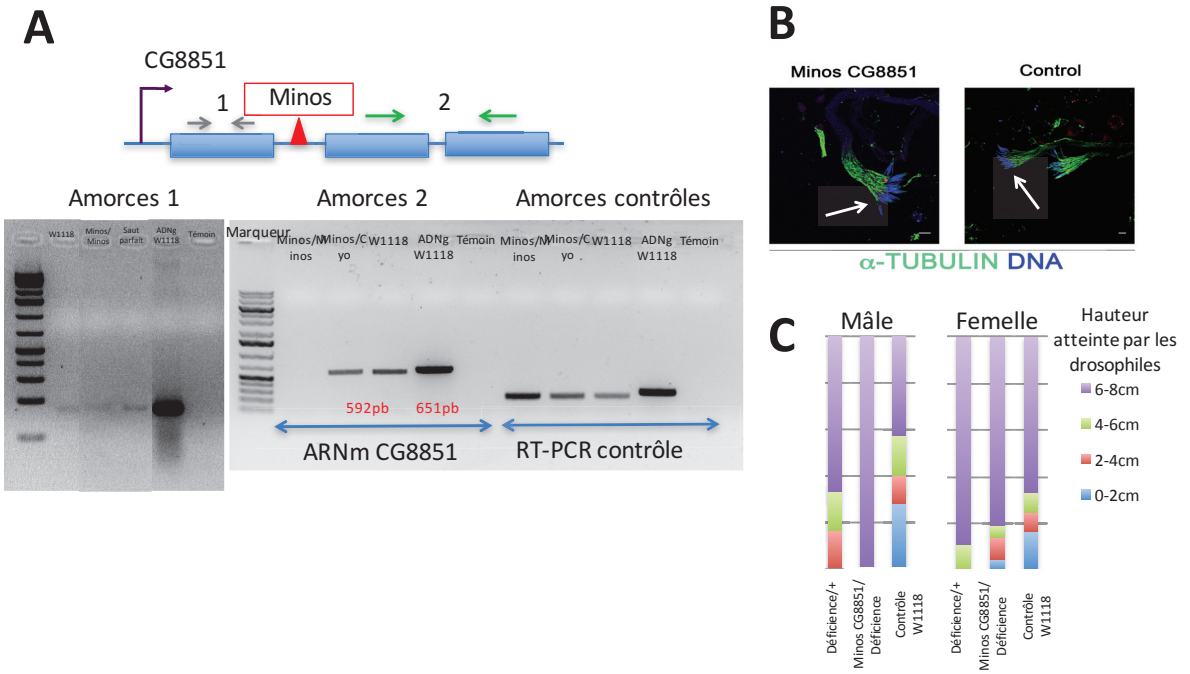


Figure 53 Le simple mutant CG8851 présente une ciliogenèse normale

A) Représentation schématique du locus du gène CG8851, l'élément transposable de type Minos est présent dans l'intron 1. Les amorces dans l'exon1 sont représentées par les flèches grises et révèlent l'amplification d'une forme minoritaire dans les testis dans l'image du gel à gauche. Il est possible qu'il reste une trace de cette isoforme mineure dans le testis du mutant *CG8851* ou qu'il s'agisse d'une contamination par le génomique. Les amorces utilisées pour vérifier la présence du transcrit RC et RA sont dans les 2 exons communs entre ces 2 isoformes représentés par deux flèches vertes. Une RT-PCR sur des drosophiles homozygotes pour l'élément Minos montre l'absence de transcrit

alors qu'il est bien présent dans les drosophiles hétérozygotes ainsi que le contrôle W1118. La piste ADNg indique la différence de taille entre l'ARNm (592 pb) et l'ADNg (651 pb). La RT-PCR contrôle sur un gène de ménage indique la présence d'ARN dans chaque piste. B) Spermatides allongées visualisées par immunofluorescence, les noyaux en bleu sont concentrés à une extrémité d'un cyste dans le mutant *CG8851* comme dans le contrôle (flèches blanches) Barre d'échelle= 10 µm. C) Le bang assay mesure la capacité des drosophiles à se déplacer en hauteur dans le tube. Les drosophiles mutantes pour *CG8851* en transhétérozygote avec une déficience sont capables de se déplacer tout en haut du tube (6-8cm) comme les drosophiles contrôles hétérozygotes pour la déficience ou le contrôle W1118.

Pour répondre à l'hypothèse d'une potentielle redondance entre les orthologues de *ODF2*, j'ai alors réalisé le double mutant en excisant l'élément transposable présent dans le premier intron du gène *CG8851* (Figure 54A). Les 2 gènes sont côte à côte, tête bêche l'un de l'autre (Figure 54A).

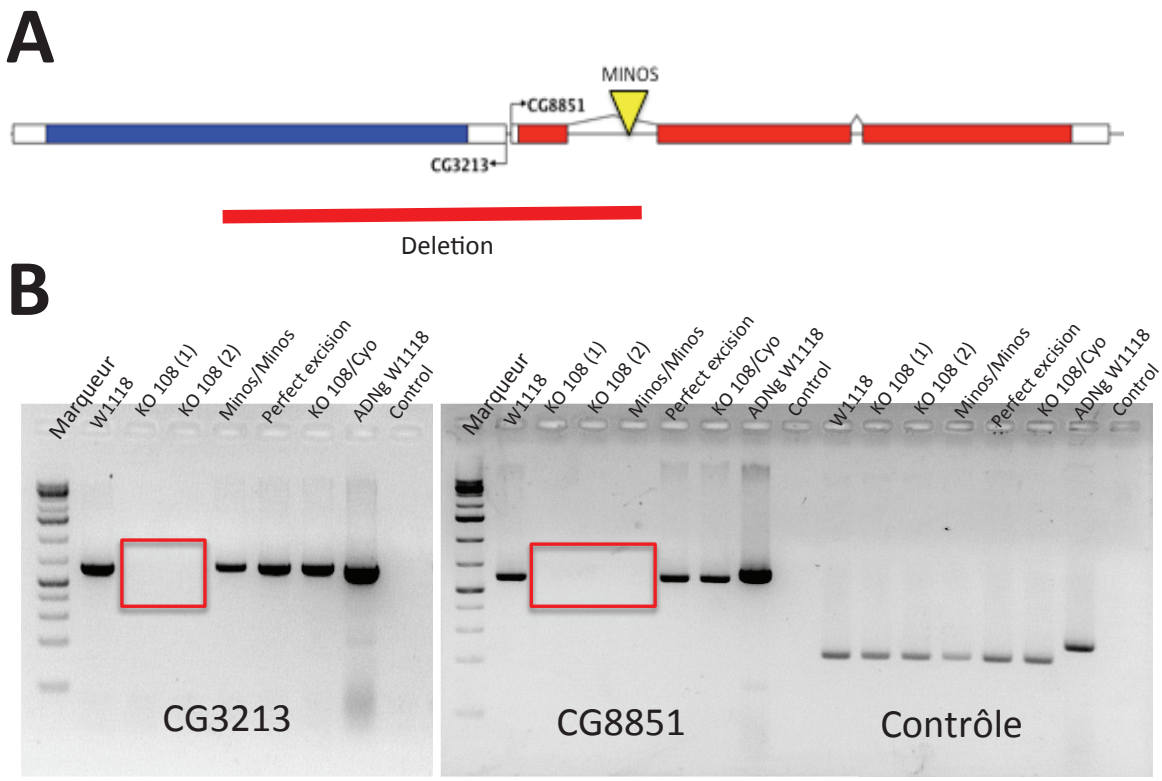


Figure 54 Représentation schématique de la délétion réalisée par l'excision de l'élément transposable de type Minos

A) Le gène *CG3213* est représentée en bleu et le gène CG8851 en rouge, le locus d'insertion du Minos est dans l'intron 1 du gène *CG8851* (triangle jaune). La délétion couvrant les deux gènes est représentée par une ligne rouge. B) Une RT-PCR sur deux lots différents de drosophiles homozygotes pour la délétion de *CG8851* et *CG3213* (KO108) montre l'absence du transcrit de *CG8851* et de *CG3213* alors qu'il est bien présent dans, les drosophiles hétérozygotes pour la mutation (KO108/CyO), les drosophiles avec excision parfaite du Minos (Perfect excision) ainsi que le contrôle W1118 (W1118). Le simple mutant pour *CG8851* ne présente pas de transcrit pour *CG8851* mais possède le transcrit de *CG3213*. La piste ADNg indique la différence de taille entre l'ARNm et l'ADNg. La RT-PCR contrôle sur un gène de ménage indique la présence d'ARN dans chaque piste.

L'excision imparfaite de ce Minos a permis de générer une lignée mutante pour les 2 gènes *CG8851* et *CG3213*, ce mutant a été appelé KO108. La délétion couvre les parties 5' de ces 2 gènes (Figure 54A) et une RT PCR a révélé l'absence des transcrits pour ces 2 gènes (Figure 54B).

Le premier phénotype évident de ce double mutant est une stérilité des males associée à des défauts au cours de la spermatogenèse (Figure 55A). La maturation des spermatides se fait correctement jusqu'aux spermatides tardives polyglycylées qui montrent un enroulement aberrant des cystes de spermatides comparé au contrôle (Figure 55B). Comme un défaut des spermatides allongées peut résulter d'un défaut d'individualisation, nous avons analysé la migration des cônes d'actine, structures essentielles pour l'individualisation. L'observation de testicules mutants pour les gènes *CG8851* et *CG3213* montre un défaut d'individualisation (Figure 55B), chez le contrôle, les cônes d'actine s'ancrent au niveau du noyau puis migrent le long des spermatides polyglycylées dans des renflements cystiques et sont enfin déposés dans les « waste bag ». Chez le mutant, les cônes d'actine sont présents au niveau du noyau (Figure 55B zone1) mais ne migrent pas le long des spermatides allongées (Figure 55B zone2-3).

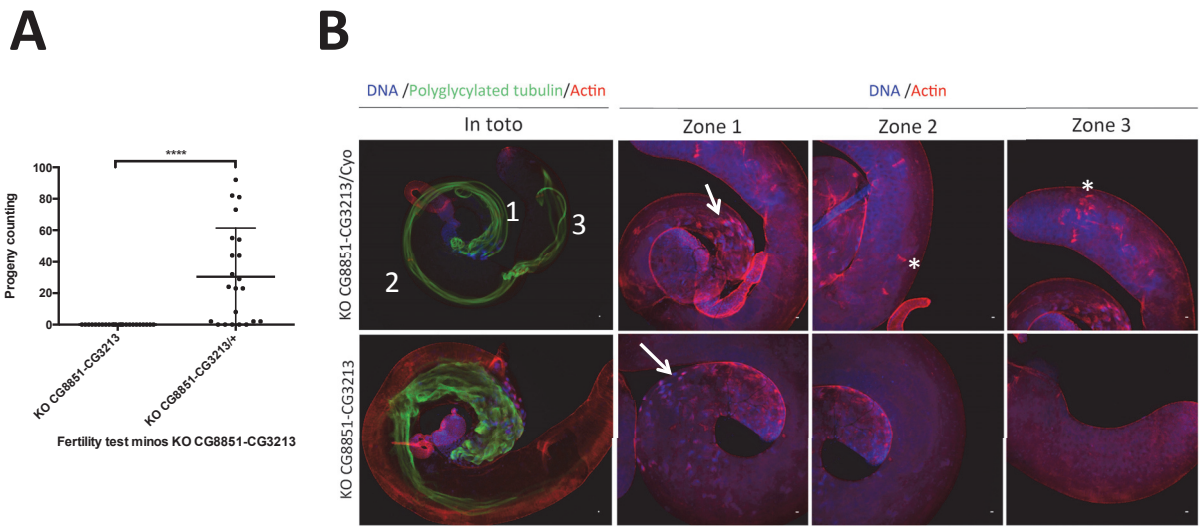


Figure 55 Le double mutant ODF2 est stérile et présente des défauts au cours de l'individualisation

A) Le test de fertilité des mâles montre une stérilité complète pour le double mutant KO *CG8851-CG3213* comparé au contrôle hétérozygote KO CG8851-CG3213/+. P<0,0001. B) Les défauts des mâles sont principalement caractérisés par un enroulement aberrant des spermatides polyglycylées. L'individualisation des spermatides mutant n'a pas lieu, les cônes d'actine sont présents au niveau du noyau (zone 1 flèche) mais ne migre pas sous forme de renflement cystique et ne deviennent pas des waste bag (astérisque en zone 2 et 3 respectivement).

Nous avons ainsi cherché à comprendre l'origine du défaut d'absence de migration des cônes d'actine. La myosine VI permet le recrutement des protéines de la partie maillage des cônes d'actine, et permet leur migration (Rogat and Miller 2002). Chez le contrôle, la myosine VI est localisée à la base de la partie maillage des cônes d'actine (Figure 56A). Chez le mutant, la myosine VI est bien localisée à la base des cônes d'actine également (Figure 56B). CG8851 et CG3213 sont impliquées dans la migration des cônes d'actine au cours de l'individualisation des spermatides mais ne sont pas nécessaires au recrutement de la myosine VI à la base des cônes d'actine.

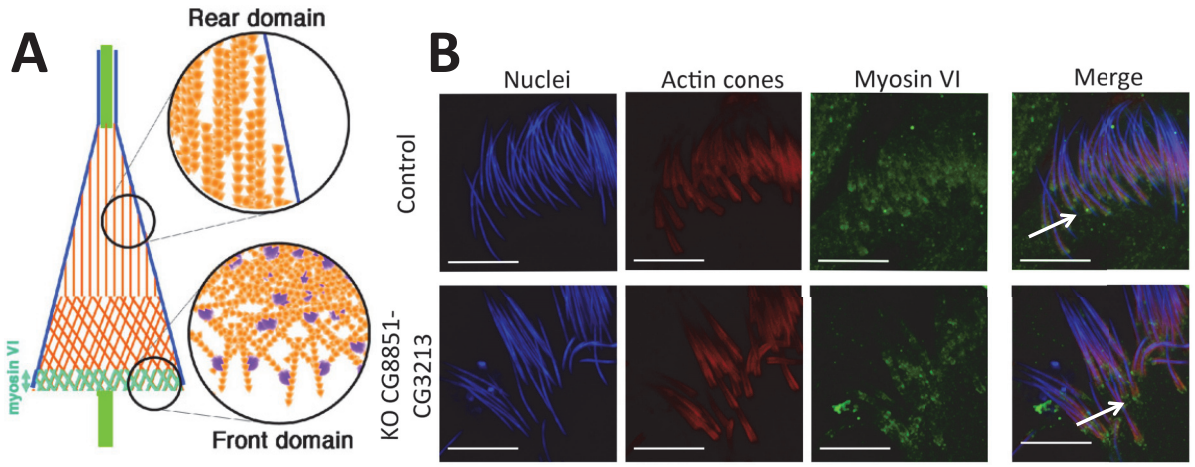


Figure 56 La myosine VI est bien localisée à la base des cônes d'actine dans le double mutant ODF2

A) Représentation schématique d'un cône d'actine, la myosine VI est localisé à la base de celui-ci (D'après Noguchi 2007). B) Chez le mutant ODF2 comme dans le contrôle, la myosine VI (vert) est bien localisée à la base de chaque cône d'actine (rouge) (flèche). Barres d'échelles= 10 µm.

Comme vu précédemment, la cinétique d'apparition de CEP162 au cours de l'initiation et la migration des cônes d'actine suggère un rôle possible dans leur avancement, j'ai donc vérifié si cette protéine est bien localisée dans le double mutant ODF2. Même si les cônes d'actine ne migrent pas, la protéine CEP162 ::GFP est bien recrutée à la base de ceux-ci au niveau des noyaux avant l'initiation de leur migration (Figure 57).

CG8851 et *CG3213* ne jouent donc pas de rôle dans le recrutement des protéines CEP162 et Myosine VI. Cette étude ne permet pas, cependant, de savoir si ces protéines recrutées sont fonctionnelles. Des analyses complémentaires sur le recrutement et la fonction d'autres protéines sont nécessaires afin de comprendre l'absence de migration de ces cônes d'actine dans ce mutant.

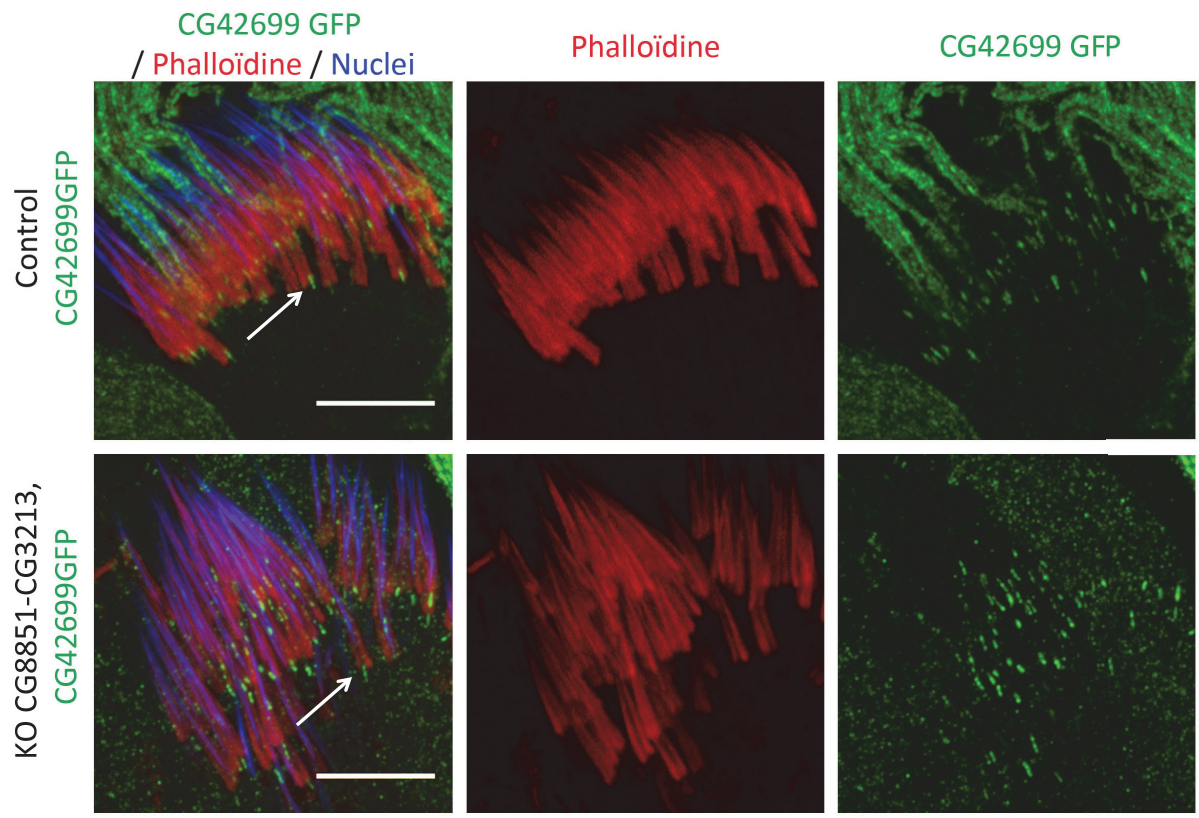


Figure 57 La protéine CEP162 est bien localisée à la base des cônes d'actine dans le double mutant ODF2

Après le recrutement de l'actine au niveau des noyaux (bleu) et avant le début de la migration des cônes d'actine (rouge), la protéine CEP162 s'accumule à la base de ceux-ci dans le contrôle et le mutant ODF2. Barre d'échelle=10µm.

Toutefois, les données du double mutant sont à analyser avec précaution car les transgènes de CG8851 et CG3213 seuls ne sauvent pas le phénotype du double mutant et l'apport des deux transgènes simultanément de CG8851 et CG3213 sous différentes constructions ne sauve pas non plus le phénotype du double mutant. On peut penser que la présence de tag fluorescent perturbe l'activité de la protéine. Dans ce contexte, il est indispensable de tester le sauvetage du double mutant par une construction comprenant le locus complet des gènes *CG8851* et *CG3213* sans rajouter de tag fluorescent afin confirmer la spécificité du phénotype chez le double mutant.

Discussion

Les fibres de transition : conservation des orthologues

Les cils présentent des variations de structure et de fonction au sein d'un même organisme. Chez la drosophile, il existe deux grands types de cellules ciliées, les neurones sensoriels et les cellules germinales mâles. Les cils présents sur les cellules de ces 2 tissus possèdent des modes d'assemblage différents et des particularités structurales. La drosophile récapitule ainsi les structures et les modes d'assemblage que l'on observe dans le règne eucaryote.
Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux orthologues des protéines des fibres de transition chez la drosophile, identifiés en faisant des BLAST réciproques entre les génomes

de drosophile et des mammifères. La question des orthologues peut être posée à différentes échelles ; nous avons étudié les protéines qui possèdent le plus de similitudes de séquences primaires. L'alignement des séquences protéiques montre que certains domaines protéiques sont parfois bien conservés comme dans le cas de CEP162, CEP89 ou encore FBF1, ce qui suggère un rôle important de ces domaines dans la fonction de ces protéines. En revanche, la conservation protéique en dehors de ces domaines est souvent faible. Les protéines orthologues conservées des protéines des fibres de transition ont donc évoluées entre les mammifères et la drosophile mais des domaines fonctionnels pourrait être conservés.
Il peut également exister des orthologues fonctionnels qui ne possèdent pas une séquence primaire conservée mais seulement une structure tridimensionnelle et donc que la fonction d'ancrage serait réalisée par des protéines qui auraient une fonction analogue de par leurs structures secondaires et tertiaire. Nous ne pouvons donc pas exclure l'existence chez la drosophile de protéines qui joueraient un rôle analogue aux protéines des fibres de transition mais que nous n'avons pas recherché par notre analyse.

L'étude des orthologues des protéines des fibres de transition que j'ai réalisée révèle pour la première fois la localisation et la fonction de ces protéines chez la drosophile et donne des perspectives nouvelles de leur rôle au cours de l'évolution.

Localisation des orthologues des protéines des fibres de transition dans les tissus ciliés de la drosophile

Les protéines orthologues des fibres de transition, FBF1, CEP162, CEP89, ODF2 ont été localisées dans les tissus ciliés de la drosophile au cours de ces travaux de thèse. Pour cela, plusieurs protéines, comme Chibby, une protéine de la ZT, ont été utilisées comme point de repère pour préciser la localisation de ces protéines.

Système nerveux périphérique

Chez les mammifères, CEP162 est localisée aux appendices distaux, formant un barreau central entouré par CEP164 en microscopie 3D-SIM (W. Wang et al. 2013). Les protéines FBF1 et CEP89 ont également été identifiées comme des protéines localisées aux appendices subdistaux (Tanos et al. 2013). Chez la drosophile, les neurones sensoriels sont des cellules ciliées dont les corps basaux sont dotés des fibres de transition lorsque le cil est formé (Enjolras et al. 2012; Ma and Jarman 2011; Vieillard et al. 2016). En dépit de l'observation des fibres de transition en microscopie éléctronique, aucune protéine n'a encore été localisée aux fibres de transition dans ce système.
Mes travaux chez la drosophile indiquent que les protéines orthologues de FBF1, CEP89 et CEP162 sont localisées à la base du cil dans les neurones sensoriels. Des comarquages avec Chibby analysés en 3D-SIM ou une localisation par immunogold permettrait de conclure sur la localisation de FBF1 et CEP89 à la ZT ou aux fibres de transition. Concernant CEP162, l'analyse haute résolution en 3D-SIM révèle une superposition des marquages entre CEP162

et la protéine de la ZT, Chibby. Mes résultats indiquent donc que CEP162 chez la drosophile est localisée à la ZT.
Les résultats obtenus sont donc différents de ce qui est observé chez les mammifères où ces protéines sont restreintes aux fibres de transition. L'organisation de la base du cil, comprenant les fibres de transition et la zone de transition est donc différente chez les mammifères et la drosophile bien que la composition moléculaire semble conservée.
D'autre part, dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la localisation de ces protéines lorsque le cil est déjà formé, à la fois dans des embryons et dans des antennes de pupes de 40 heures. Comme les premières étapes de la ciliogenèse dans le système nerveux périphérique ne sont pas détaillées et n'ont jamais été décrites, nous pouvons imaginer que FBF1, CEP89 et CEP162 soient localisées aux fibres de transition au cours des premières étapes de la ciliogenèse dans ce tissu puis lorsque le cil est formé qu'elles soient relocalisées à la ZT. Afin d'identifier le recrutement de ces protéines au cours de la ciliogenèse, il faudrait faire des études de microscopie en temps réel et de cinétique de recrutement de ces orthologues. Il serait également intéressant de regarder leur localisation dans un autre système que les neurones sensoriels présents dans les antennes, comme par exemple dans les cils des neurones sensoriels des pattes ou du thorax des pupes que l'on peut suivre au cours du développement.

Cellules germinales mâles

Au cours de la spermatogenèse, un cil/ZT se forme au stade spermatocyte puis après la méiose lorsque le flagelle commence à s'allonger, la ZT devient dynamique et reste localisée à l'extrémité distale en croissance de l'axonème. Au cours de ce processus, les fibres de transition n'ont pas été décrites. Mes travaux indiquent que certaines protéines orthologues des fibres de transition ne sont pas là où on aurait pu les attendre, à proximité de la ZT, au centriole ou au ring centriole au cours de la maturation des spermatides. En effet, la protéine orthologue de FBF1, elle, présente un profil vésiculaire qui colocalise partiellement avec les vésicules Golgiennes et je n'ai pas pu la détecter ni au niveau du ring centriole ou du centriole.

Des protéines étudiées, seule la protéine orthologue de CEP162 est localisée au niveau de la ZT dans les spermatocytes. L'étude de la localisation en haute résolution par 3D-SIM de cette protéine révèle une localisation centrale comparée à Chibby. CEP162 chez la drosophile possède un domaine similaire au moteur des kinésines mais ne possède pas le domaine de liaison au centriole qui est présent chez les mammifères. Sur la base de la conservation des domaines nous aurions pu émettre l'hypothèse que CEP162 permettrait de donner le caractère mobile de la ZT au cours de l'élongation de l'axonème. Cependant, lorsque le flagelle commence à s'allonger et la ZT à migrer, CEP162 disparaît des cellules, ce qui suggère que CEP162 n'est pas impliquée dans la migration de la ZT mais pourrait être requise pour son ancrage au centriole jusqu'à l'initiation de l'élongation de l'axonème. Le retrait de CEP162 serait alors nécessaire pour permettre à la ZT de progresser et à l'axonème de s'allonger.

Afin de tester cette hypothèse, il serait particulièrement intéressant de forcer l'expression de *CEP162* au centriole en la fusionnant au domaine PACT ou Bld10 sous un promoteur ubiquitaire au cours de la spermatogenèse. Le domaine PACT permet techniquement d'adresser spécifiquement une protéine au centriole ; conceptuellement cela permettrait de vérifier si le retrait de CEP162 est nécessaire pour amorcer la migration de la ZT. Si son élimination est requise pour initier la migration de la ZT, alors l'expression de CEP162 au centriole pourrait empêcher la croissance du cil en empêchant la migration des protéines de la ZT.
Un autre candidat qui pourrait expliquer la différence de comportement de la ZT mobile des spermatides, comparée à la ZT immobile des neurones sensoriels est CEP164, associée aux fibres de transition chez les mammifères. Chez la Drosophile, cette protéine n'est pas exprimée au cours de la spermatogenèse mais est exprimée dans le système nerveux sensoriel. L'absence de cette protéine au cours de la spermatogenèse pourrait expliquer les différences d'assemblage entre les 2 types de cils. Une hypothèse est que CEP164 permet de maintenir la ZT à la base des cils dans les neurones sensoriels. Si cette protéine joue un rôle de maintenance de la ZT, alors la surexpression de cette protéine au centriole au cours de la spermatogenèse pourrait empêcher la migration de la ZT.

Les résultats obtenus commencent à mettre en évidence des différences moléculaires de la ZT, les protéines orthologues de FBF1, CEP89 et CEP162 sont localisées à la ZT dans les neurones sensoriels, mais ne semblent pas définir un domaine plus restreint qui pourrait correspondre au domaine des fibres de transition. Au cours de la spermatogenèse, j'ai pu montrer que seule CEP162 est localisée à la base des cils. Pour aller plus loin, il faudrait poursuivre la caractérisation des compositions moléculaires des ZT lors de l'assemblage du cil des neurones sensoriels et la formation du flagelle des spermatides.

Fonction des orthologues des protéines des fibres de transition dans les tissus ciliés de la drosophile

Système nerveux périphérique

Dans le système nerveux périphérique, des défauts de structure ou du fonctionnement du cil conduisent à l'absence ou à la réduction du cil pouvant se caractériser par une non coordination des drosophiles dans les cas très sévères (Dubruille et al. 2002; Enjolras et al. 2012; Soulavie et al. 2014). Notre hypothèse est que les protéines FBF1, CEP89 et CEP162 localisées à la base du cil dans les neurones sensoriels jouent un rôle fonctionnel d'ancrage du corps basal à la membrane plasmique et soient nécessaires pour la nucléation du cil. Sur la base unique de l'observation du comportement des drosophiles, seule la perte de CEP89 conduit à un très fort phénotype de non coordination. Je n'ai pas eu le temps de réaliser une analyse quantifiée des défauts de coordination et donc d'étudier la fonction de ces orthologues dans les neurones sensoriels chez la drosophile.
Afin de compléter l'étude des orthologues des fibres de transition, il serait intéressant d'étudier les défauts induits par la perte par ARNi de ces protéines dans le système nerveux

périphérique. Il faudra étudier l'implication de ces protéines dans les neurones sensoriels en réalisant des « Bang assay » pour mesurer la coordination des drosophiles, des analyses en fluorescence pour caractériser des défauts de recrutement protéique et des études en microscopie électronique afin de révéler des défauts d'ultrastructure du cil.

Est-ce que ces protéines localisées à la ZT dans les cils des neurones sensoriels sont nécessaires à l'ancrage du corps basal au cours de la formation du cil ?

Dans cette étude, nous n'avons pas analysé l'ancrage des corps basaux dans les neurones sensoriels de la drosophile en absence de ces protéines. Afin de comprendre le rôle de ces protéines à la ZT, il sera particulièrement intéressant de regarder l'implication de ces protéines au cours de la ciliogenèse dans le système nerveux périphérique. 1) Des études en microscopie électronique de ces mutants permettraient de voir si ces protéines sont nécessaires à la formation des structures assimilées aux fibres de transition. 2) Dans le cas où l'ancrage du corps basal aurait lieu à la membrane plasmique, la formation du cil pourrait être affectée et détectée par des marquages spécifiques de protéines du cil. 3) Dans un dernier temps, comme ces protéines semblent être localisées à la ZT, il est possible qu'elles influent sur le recrutement des autres protéines de la ZT. L'analyse du recrutement des protéines du complexe MKS ou du complexe CEP290 devra donc être réalisée.

Cellules germinales mâles

CEP162 participe à l'assemblage de la ZT au cours de la spermatogenèse

Une observation majeure est que la perte de CEP162 conduit à la croissance aberrante de l'axonème au cours de la spermatogenèse. Cette protéine joue donc potentiellement un rôle dans l'ancrage du centriole à la membrane plasmique et éventuellement dans la formation du capuchon ciliaire. CEP162 est nécessaire à l'organisation de la ZT, elle restreint de plus, le domaine des protéines du ring centriole, Chibby, FAM92 et DZIP1L. CEP162 est donc requise pour l'organisation des protéines de la ZT mais ne semble pas affecter la protéine CEP290. Une hiérarchie entre ces protéines commence donc à être établie.

La protéine CEP162 semble donc avoir un rôle conservé dans l'ancrage du corps basal à la membrane de la drosophile aux mammifères. Dans le but de déterminer l'implication de cette protéine dans la formation du capuchon ciliaire, il faudrait cependant vérifier la présence de celui-ci par des immuno-marquages ou en microscopie électronique. Les données de la localisation de CEP162 nous indiquent que cette protéine disparaît dès l'allongement du flagelle, il est donc probable que son rôle soit principalement dans la formation de l'ancrage du centriole mais non pas dans le maintien de celui-ci. Beaucoup reste à faire pour caractériser finement les défauts d'ancrage et relier fonctionnellement cette protéine aux autres protéines de la ZT. La protéine CEP162 qui semble être chez les mammifères une protéine adaptatrice entre les fibres de transition et la zone de transition (W. Wang et al. 2013) semblerait avoir une fonction d'organisation de la ZT dans les deux modèles. Chez la drosophile, mes résultats indiquent que son rôle se distingue des autres protéines nécessaires à l'attachement de la ZT à la membrane, c'est à dire des protéines du ring centriole (Enjolras

et al. 2012 ; Vieillard et al. 2016 ; Lapart en prep), puisqu'elle est re-larguée au cours de la migration de la ZT lors de l'allongement de l'axonème.

Les protéines FBF1, CEP89, C2CD3 et SDCCAG8 sont requises pour l'allongement de l'axonème au cours de la spermatogenèse

Le phénotype d'extension microtubulaire du centriole n'est pas présent quand on réduit l'expression des protéines de FBF1, CEP89, C2CD3 et SDCCAG8. Sur la base de l'observation des centrioles des spermatocytes qui forment un cil/ZT correct, ces protéines ne semblent donc pas requises pour les premières étapes d'initiation de la ciliogenèse. En revanche, j'ai pu observer un défaut de délocalisation des noyaux le long des cystes de spermatides, ce qui révèle potentiellement un défaut de croissance de l'axonème (Soulavie et al. 2014). Ces protéines semblent donc jouer un rôle dans la croissance de l'axonème à des stades plus tardifs en spermatides. Ce résultat devra cependant être confirmé par des analyses de microscopie électronique afin d'identifier des défauts de structure de l'axonème. Au cours de la spermatogenèse, les protéines FBF1, CEP89, C2CD3 et SDCCAG8 jouent donc un rôle tardif au cours de la ciliogenèse mais ne sont pas impliquées comme chez les mammifères dans les étapes précoces d'ancrage du corps basal à la membrane plasmique.

Asymétrie des centrioles

A la fin du stade spermatocyte, les deux centrioles sont, d'un point de vue ultrastructural, identiques, aucune protéine n'a été décrite pour être exprimée de manière asymétrique sur les centrioles des spermatocytes de drosophile, mais il commence à être démontré une asymétrie fonctionnelle au sein de chaque paire. En effet, des drosophiles mutantes pour *klp10A*, une kinésine dépolymérisante, présentent un centriole père plus long que le centriole fils, qui ne parvient plus à recruter une protéine centriolaire, dPlp (Delgehyr et al. 2012; Gottardo et al. 2016). De plus, l'étude de FAM92 et DZIP1L chez la drosophile montre une altération beaucoup plus fréquente du centriole fils que du centriole père (Lapart, en préparation).
L'absence de CEP162 conduit, à une perturbation de la localisation des protéines de la zone de transition et à une extension aberrante de microtubules. De manière remarquable, dans un grand nombre de cas, sur la paire de centriole, 1 seul des deux centrioles présente ces défauts. Sur la base de cette observation, il apparaît que les centrioles ne sont pas équivalents, l'un semble plus affecté que l'autre car seul un des centrioles forme des extensions aberrantes suite à la perte de CEP162. La quantification du nombre de centrioles pères *versus* centrioles fils affectés sera nécessaire pour conclure sur la nature de cette asymétrie.

Deux protéines orthologues de ODF2, CG8851 et CG3213 ne semblent pas impliquées dans la ciliogenèse

Mes travaux indiquent que le mutant *CG8851/ODF2* ne présente pas de défauts caractéristiques de ciliogenèse à la fois dans le système nerveux périphérique et au cours de la spermatogenèse.

Pour s'abroger d'une éventuelle redondance fonctionnelle entre les deux orthologues de ODF2, j'ai réalisé le double mutant *CG8851* et *CG3213*. Ce double mutant révèle un phénotype non ciliaire affectant les spermatides allongées et ne semble pas affecter les stades précoces au cours de la spermatogenèse. Cependant, l'individualisation n'a pas lieu et les spermatides s'enroulent précocement. Le phénotype de ce double mutant doit cependant être considéré avec précaution, car la fertilité des mâles n'est pas restaurée par l'ajout des différentes constructions réalisées pour *CG3213* et *CG8851*. La dernière construction à tester correspond à la région complète de *CG8851* et *CG3213* sans rajouter de tag fluorescent. Dans le cas où cette construction ne sauverait pas non plus le phénotype de ce double mutant, il serait possible que la délétion de *CG8851* et *CG3213* ne soit pas la mutation causale du phénotype observé. Ce double mutant a été réalisé par l'excision de l'élément transposable de type Minos. Au cours de l'excision de ce Minos, il a été vérifié, par l'observation d'un marqueur spécifique compris dans ce Minos, que celui-ci n'a pas été intégré à un autre locus. De plus, l'analyse de ce mutant en trans-hétérozygote avec une déficience qui recouvre le locus de ces deux gènes a révélé un phénotype similaire démontrant donc que la mutation causale et, au moins, comprise dans la zone couverte par la déficience. La caractérisation des *loci* voisins sera nécessaire pour poursuivre les analyses en faveur de nouvelles constructions transgéniques ou en faveur de la réalisation d'un nouveau mutant pour ces 2 gènes par une nouvelle méthode comme le CRISPR-Cas9.

Enfin, l'étude du troisième orthologue de *ODF2* chez la drosophile, CG13405 ne doit pas être exclue, et permettrait de compléter l'étude des orthologues de *ODF2* chez la drosophile. Il est, en effet, possible que CG8851 et CG3213 aient acquis un rôle différent chez la drosophile et que seule CG13405 soit localisée et joue un rôle de fibres de transition chez la drosophile comme c'est le cas de Cenexine1 chez les mammifères.

ODF2 définit un nouveau domaine ciliaire à l'extrémité de l'axonème de spermatides tardives de drosophile, qui pourrait jouer le rôle de signal de terminaison de croissance.

Sur la base de l'absence de sauvetage par les différentes constructions réalisées, les localisations de 2 orthologues de ODF2, CG8851 et CG3213, décrites dans ce manuscrit, sont aussi à analyser avec précaution. Dans les cils des neurones sensoriels, les protéines CG3213 et CG8851 n'ont pas été détectées. Au cours de la spermatogenèse, la localisation de CG3213 est différente en fonction des constructions transgéniques utilisées, je ne peux donc pas conclure sur sa localisation. En revanche, quelques soient les constructions utilisées, *CG8851 ::GFP* présente une localisation similaire au cours de la spermatogenèse, le long de l'axonème des spermatides allongées dans une fenêtre de temps restreinte.
L'étude de ODF2 révèle donc un domaine axonémal particulier à l'extrémité du flagelle en fin d'élongation. De même, j'ai pu montrer que la protéine CG42699/CEP162 est accumulée de la même façon que CG8851 de façon proximale aux protéines de la ZT sous forme de comètes (Figure 39, 48) dans les spermatides allongées.

De manière remarquable, une autre protéine codée par le gène *CG5987* est également localisée dans ce compartiment. La protéine CG5987 a été retrouvée dans le crible double hybride comme étant un interacteur potentiel de CBY. Cependant, l'interaction biochimique entre les 2 protéines n'a pas été confirmée par co-immunoprécipitation dans l'équipe. Le gène *CG5987* est l'orthologue du gène *TTLL13*, codant chez les mammifères pour une Tubuline Tyrosine Ligase Like, responsable de la glutamylation des microtubules. J'ai pu montrer que la protéine TTLL13::TdTom n'est pas présente dans les cils des neurones sensoriels, mais est spécifique des testicules de drosophile et se trouve uniquement localisée dans des spermatides allongées. Cette protéine possède deux localisations le long des cystes de spermatides. Elle est localisée dans les cystes marqués par la tubuline glutamylée (Figure 58A). Et on retrouve également une localisation sous forme de comètes en amont de la ZT, une localisation très similaire à CG8851/ODF2 et CG42699/CEP162 (Figure 58B).

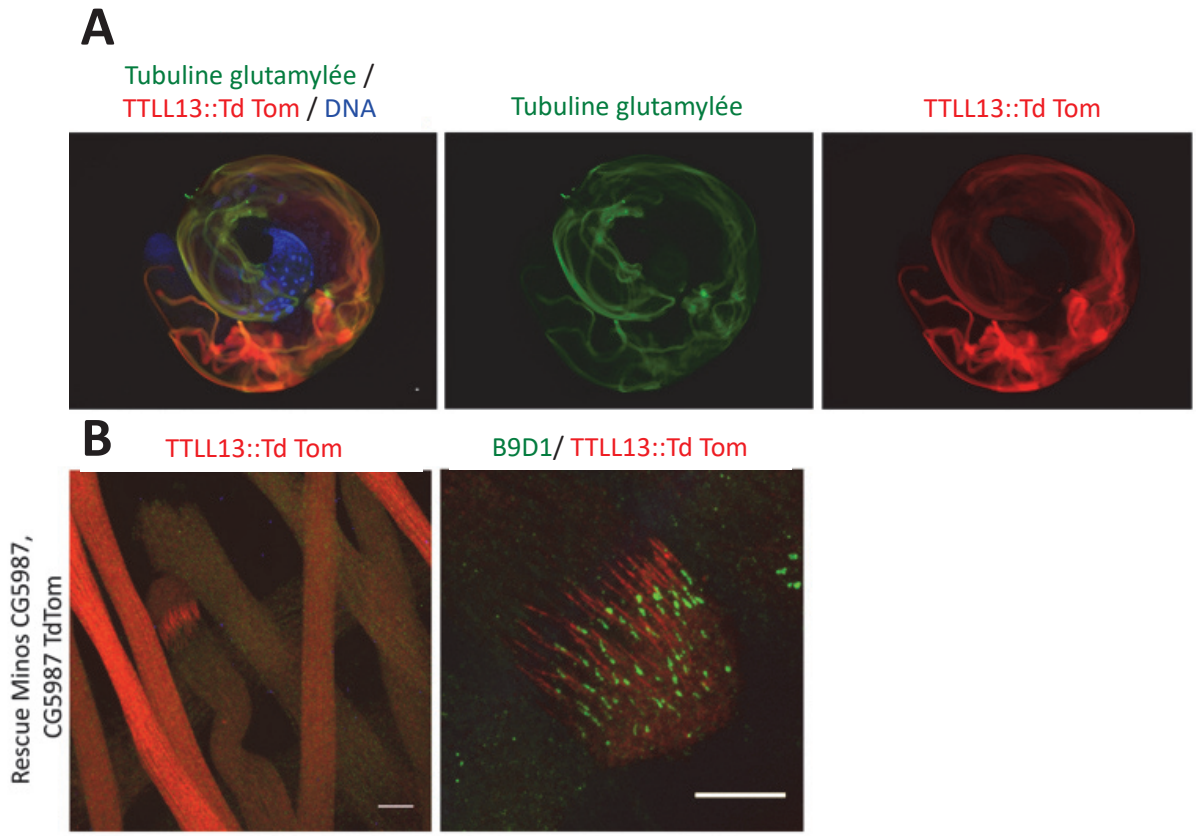


Figure 58 Images illustrant la localisation de TTLL13::TdTom dans les spermatides au cours de la spermatogenèse

(A) Image d'un testis entier montrant une localisation similaire à la tubuline glutamylée et de TTLL13::TdTom (CG5987::Td Tom). (B) Selon le stade d'allongement des spermatides et des modifications post-traductionnelles des tubulines, TTLL13::TdTom est soit présente tout le long des spermatides, soit accumulée à l'extrémité distale des spermatides d'un cyste, juste avant la zone de transition marquée par B9D1. Barre d'échelle= 10 µm.

Face à la localisation particulière de cette protéine, responsable de la glutamylation des microtubules chez les mammifères, située comme les protéines orthologues de ODF2 et CEP162, j'ai étudié le rôle de cette protéine au cours de la spermatogenèse afin de relier fonctionnellement cette localisation axonèmale avec un rôle dans la ciliogenèse.

La présence d'un élément transposable dans le locus de *CG5987* conduit à une perte de fonction totale révélée par l'absence du transcrit par RT-PCR (Figure 59A). Le mutant *CG5987* est stérile et son analyse a permis de révéler des défauts similaires au double mutant *CG8851-CG3213* (Figure 59A). En effet, l'absence de CG5987 se traduit par une mauvaise formation des cystes tardifs qui présentent un entortillement, comme le montre un marquage de la tubuline polyglycylée, associée à une absence de migration des cônes d'actine (Figure 59B). La fertilité des mâles ainsi que le phénotype d'entortillement des cystes tardifs sont restaurés par l'expression du transgène CG5987::TdTom (Figure 59B).
Sur la base des défauts des spermatides tardives, le mutant *CG5987* présente un phénotype similaire au double mutant *ODF2*.

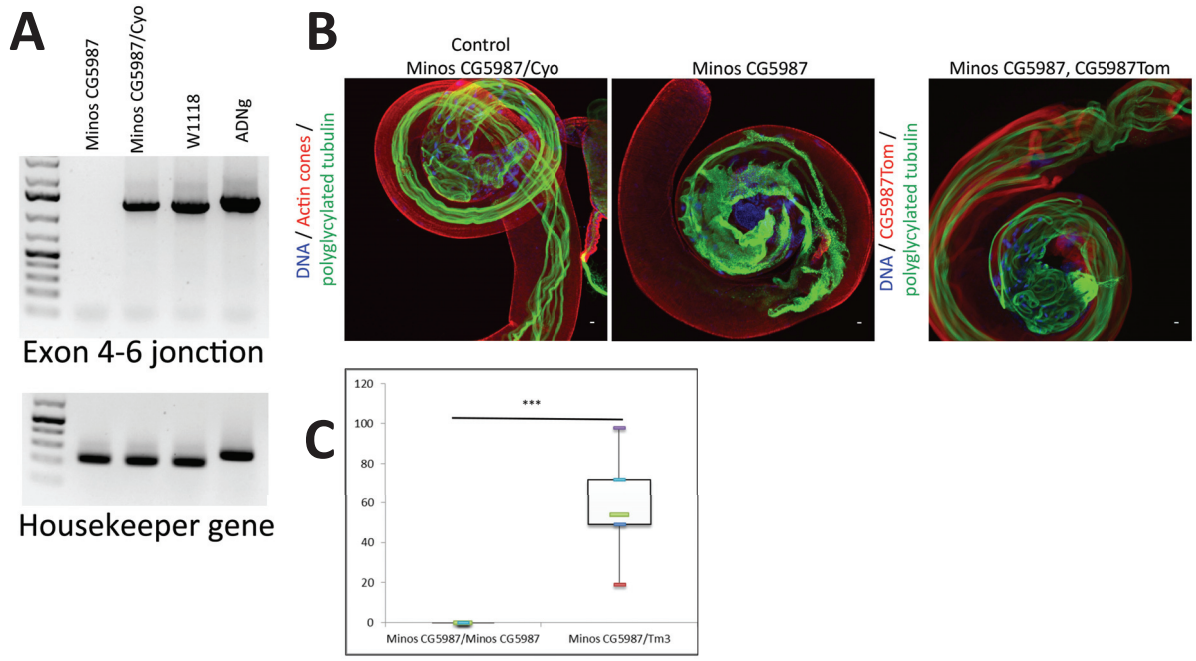


Figure 59 L'absence de l'orthologue TTLL13 chez la drosophile conduit à une stérilité des males associés à des défauts dans les spermatides tardives

(A) Une RT-PCR sur des drosophiles homozygotes pour le Minos montre l'absence de transcrit alors qu'il est bien présent dans les drosophiles hétérozygotes ainsi que le contrôle W1118. La piste ADNg indique la différence de taille entre l'ARNm et l'ADNg. La RT-PCR contrôle sur un gène de ménage indique la présence d'ARN dans chaque piste. (B) Le marquage de la tubuline polyglycylée révèle un entortillement des cystes de spermatides tardifs dans le mutant TTLL (Minos CG5987) comparé au contrôle et au sauvetage par l'expression de deux copies de CG5987 ::TdTom où la tubuline polyglycylée marque les spermatides allongés tout le long du testis. Barre d'échelle= 10 µm.

A la fois chez le double mutant *ODF2* et chez le mutant *TTLL13* les cônes d'actine ne migrent pas mais sont bien recrutés aux noyaux des spermatides, leur intégrité est correcte avec le recrutement de la myosine VI (Figure 55B et donnée non montrée).
Les défauts d'individualisation sont très fréquents et peuvent provenir de divers défauts au cours de la spermatogenèse et être la conséquence d'un défaut d'étapes plus précoces (Steinhaeur 2015). Cependant il n'y a que de rares cas où les cônes d'actine sont immobiles comme dans ces 2 mutants. Le fait que le phénotype dans le mutant CG5897 et dans le double mutant CG3213-CG8851 soit similaire suggère que ces gènes agissent dans des voies

communes ou convergentes. Une éventuelle interaction génétique n'a cependant pas pu être mise en évidence, le triple mutant ne présente pas de défauts synergiques et la localisation de TTLL13 ::TdTom dans le double mutant ODF2 est correcte et *vice versa*.

Alors que la protéine CG8851 est présente uniquement dans les spermatides détyrosinées ; je n'ai pas encore déterminé si c'est le cas également pour CG42699/CEP162 et CG5987/TTLL13 ou si leur localisation n'est pas aussi restreinte dans le temps. Des co-marquages entre ces 3 protéines ainsi que l'identification précise de leur apparition respective permettrait d'identifier la dynamique entre ces protéines.

Les spermatides dont les tubulines sont détyrosinées marquée par CG8851 semblent avoir allongé entièrement leur flagelle, est-ce la présence et l'accumulation de ces protéines qui entrainerait l'arrêt de la croissance du flagelle ? Ce compartiment pourrait jouer un rôle de signal d'arrêt de croissance de l'axonème lorsque l'axonème a atteint sa taille définitive. Une autre hypothèse serait simplement que cette zone soit un lieu de stockage de ces protéines avant leur implication dans des stades plus tardifs, comme pour TTLL13 qui est l'orthologue de l'enzyme permettant la glutamylation des microtubules. Cette protéine serait donc accumulée à des stades précoces avant de se propager le long de l'axonème pour glutamyler les microtubules. La présence restreinte de ces protéines dans la partie en amont de la ZT dans les spermatides allongées suggère un rôle moléculaire important de cette structure au cours de la maturation des spermatides. La localisation des protéines CG8851/ODF2, CG42699/CEP162 et CG5987/TTLL13 ainsi que le phénotype observé du double mutant *ODF2* et le mutant pour *TTLL13* pourrait révéler une implication dans l'initiation de la migration des cônes d'actine lors de l'individualisation.

En conclusion, cette étude sur les protéines orthologues des fibres de transition chez la drosophile a permis de localiser et d'étudier la fonction des protéines nécessaires à la maturation du corps basal, ODF2 et C2CD3 ; des protéines cœurs des appendices distaux, FBF1 et CEP89, et d'autres protéines assimilées aux appendices distaux chez les mammifères, les protéines SDCCAG8 et CEP162. Nos résultats montrent que la composition moléculaire à la base des cils est différente dans les tissus ciliés et que la fonction des protéines des fibres de transition chez la drosophile a évolué d'une manière différente des mammifères.

2. Article : Caractérisation de *Salto*, un gène essentiel pour la spermatogenèse

Résumé

La zone de transition est une structure complexe qui joue un rôle essentiel dans l'assemblage et la fonction des cils. L'étude de la zone de transition a été initiée dans l'équipe par l'étude de Chibby identifiée 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 reliée à un des complexes décrits à la zone de transition. Plusieurs stratégies ont été réalisées dans l'équipe pour identifier des partenaires de Chibby afin de comprendre les mécanismes d'assemblage de la zone de transition. L'une de ces approches a été un crible double hybride réalisé à partir d'ADNc de testis de drosophiles.

Durant ma thèse, j'ai analysé certaines de ces protéines identifiées par ce crible double hybride et je décris ici la caractérisation d'une protéine spécifique du testis de drosophile, Salto / CG13164. Je montre qu'elle est requise pour une individualisation adéquate des spermatides chez la drosophile. Les mouches mutantes sont stériles et présentent des défauts d'individualisation des spermatides, avec une activation élevée des caspases et une migration altérée du complexe d'individualisation. De plus, nous montrons que les spermatides mutants forment des noyaux enroulés à des stades de maturation tardive. Salto a une localisation dynamique lors de la différenciation des spermatides, qui est progressivement déplacée de la manchette nucléaire du sperme (ou corps dense) vers le centriolar adjunct et l'acrosome pendant la spermiogenèse. Ce travail a permis d'identifier un nouveau composant associé à la manchette du sperme, au corps basal et à l'acrosome, nécessaire pour la morphogenèse du noyau chez la drosophile. Ces résultats sont présentés sous forme d'article scientifique.

salto/CG13164*, is required for sperm head morphogenesis in *Drosophila

Céline Augière[1], Jean-André Lapart[1], Joëlle Thomas[1], Jean-Luc Duteyrat[1], Elisabeth Cortier[1], Charline Maire[1&], Bénédicte Durand[1*@]

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

Abstract

Producing mature spermatozoa is essential for the maintenance of metazoans. In many animal species, sperm cells differentiate as syncytial clusters because incomplete cytokinesis maintains bridges between germ cells, allowing exchanges of cytoplasmic components. Spermiation hence requires spermatozoid individualization and their release from their somatic environment. In *Drosophila* spermatid individualization, begins after complete elongation of the flagella and of the nuclei and involves complex membrane and organelle remodeling. It requires cytoskeleton and motor driven reorganization of the plasma membrane, while eliminating excessive cytoplasmic components by a non-apoptotic caspase pathway. Here, we describe the characterization of a testis specific protein, Salto/CG13164, required for proper spermatid individualization in *Drosophila*. *salto* null flies are sterile and show complete spermatid individualization defects with sustained caspase activation and impaired migration of the individualization complex. Moreover, we show that *sal* mutant spermatids show coiled nuclei at late maturation stages. Salto has a dynamic localization during spermatid differentiation, being progressively relocated from the sperm nuclear manchette (or dense complex) to the centriolar adjunct and acrosomal cap during spermiogenesis. Our work thus sheds light on a novel component associated with the sperm manchette, the basal body and the acrosome, required for sperm head morphogenesis in *Drosophila*.

Introduction

Both in mammals and insects, spermiogenesis ends with the individualization of spermatids and the elimination of bulk cytoplasmic content (O'Donnell 2014; Steinhauer 2015). Sperm individualization in *Drosophila* has also evolved to permit the individualization of unusually long sperm tails. It requires three successive steps: recruitment of the individualization complex (IC), migration of the IC associated with membrane remodelling, and elimination of excess material by a non-apoptotic caspase activated pathway (Fabian and Brill 2012). In *Drosophila*, the individualization complex (IC) is composed of actin cones and molecular motors. IC migration along the 64 interconnected spermatids removes most of their cytoplasm and organelles into a membrane-bound sack called the cystic bulge (CB), which is discarded as a waste bag (WB) when actin cones reach the tip of the spermatids (Fabrizio et al. 1998). Disturbing IC assembly or migration is correlated with defective individualization (Noguchi, Lenartowska, Rogat, et al. 2007; Steinhauer 2015). Individualization failure can also be the ultimate consequence of various precocious defects, including meiosis and flagellar assembly defects (Steinhauer 2015).

Another important feature of spermiogenesis is the remodeling of the nuclei from round to needle shaped. Nuclei elongation is associated with DNA condensation and involves different sets of proteins (Rathke et al. 2007). Protamines and transition proteins are involved in chromatin condensation. It also requires proteins of both the internal and external nuclear membrane and involves perinuclear microtubules. Indeed, the Sun domain containing protein Spag4 is required for nuclear morphogenesis (Kracklauer et al. 2010). This protein is associated with Yuri and Dynein-Dynactin and is also required to anchor the centrioles to the nuclei. Cytoplasmic microtubules aposed to the nuclei are also important for nuclear shaping. These microtubules compose the dense complex on the fenestrated part of the nuclei. The dense complex is analogous to the mammalian manchette (Tates 1972). During spermatid differentiation, the microtubules of the dense complex become concentrated on the fenestrated side of the nuclei and induce an invagination of this side. Additional microtubules are progressively redistributed around the nuclei until late spermiogenesis. Interestingly, proteins such as Yuri, known to distribute along the microtubules of the dense complex at early spermatid stages

become also concentrated at the centriolar adjunct, a dense structure which is formed around the basal body once it is anchored to the nucleus during spermiogenesis. Mutations in proteins localized at the dense complex present defects in nuclear/basal body anchoring at young spermatids stages (Kracklauer et al. 2010; Sitaram et al. 2012; Texada et al. 2008). For example, Yuri is essential for the attachment of the centriolar adjunct to the nuclei. As well, the Lis1 protein, which regulates the proper localization of Dynein and is associated with the spermatid manchette, has been shown to be required to anchor the basal body to the nuclei (Sitaram et al. 2012).

In a two-hybrid screen for Cby interacting proteins, we have identified an uncharacterized protein, encoded by CG13164, and specific of the male germ cells. This protein was previously described as interacting with syntaxin and named Sip2 protein (for syntaxin interacting protein2). Based on the mutant phenotype described thereafter, we renamed this gene *salto* (french name for somersault), because of a potential confusion between *CG13164/sip2* and another gene *SIP2/septin interacting proteins 2/CG9188*). Whereas, we could not confirm any interaction with Cby, we observed a critical function of this protein in spermiogenesis. *salto* null flies are sterile and show spermiogenesis defects characterized by failure of sperm individualization leading to abnormal nuclear coiling of late spermatids. Actin cones are properly formed but fail to migrate and exuberant caspase activity is observed along the length of the spermatids. We show that *salto* is located at several major structures involved in sperm head architecture and in particular with the sperm dense complex and centriolar adjunct. Salto hence represents a novel actor involved in spermiogenesis and sperm head morphogenesis in *Drosophila*.

Results

salto encodes a testis specific protein in *Drosophila* that shows a dynamic distribution during spermatogenesis

Salto is highly conserved among Arthropods and especially in Drosophilids but not conserved in mammals (Figure S1). In *Drosophila melanogaster*, *salto* codes for 4 different transcripts (Figure 1 and Figure S1). A BAR domain is only present in the long isoform and is, as well, conserved between species (Figure S1). Because the long isoform was isolated in our two-hybrid screen, we designed a reporter construct with the longest *salto* coding transcript fused to GFP and under the control of its own promotor (Figure 1A-B) to create transgenic flies. Sal-GFP expression was only observed in the testis. In embryos or in 40h pupae antenna, we could not detect any presence of Sal-GFP (not shown). Sal-GFP is detectable at all step of spermatogenesis, from spermatocytes to fully elongated spermatids (Figure 1C-H). In spermatocytes, Sal-GFP forms a halo around centrioles and is located at the transition zone or primary like cilium above the centrioles (Figure 1C). Sal-GFP also encages the nuclei (Figure 1D). During meiosis, high levels of Sal-GFP are observed at the spindle poles and decorate proximal astral microtubules (Figure 1E). After meiosis, Sal-GFP defines a half dome encircling the nuclei and anchored to the basal body (Figure 1F). This likely corresponds to the microtubule network that surrounds the fenestrated part of the nuclei at this stage and forms the sperm manchette or dense complex. After the beginning of flagellar elongation, Sal-GFP is relocalized to both the centriolar adjunct and to the acrosome (Figure 1G). When spermatids are fully elongated and before the beginning of individualization, Sal-GFP is only observed at the acrosome (Figure 1H). After individualization, in mature sperm, this protein is not detected (data not shown). Altogether, these observations indicate that Sal-GFP is dynamically associated with the pericentriolar material and with the network of microtubules that contribute to meiosis and to nuclear shaping during spermiogenesis.

sal^{1} null mutant males are sterile and show sperm individualization defects.

To understand the function of Salto, we generated *sal* null mutant flies (*sal*^{1} allele) by CRISPR-Cas9 mediated homologous recombination, replacing all *sal* coding sequences

by the mini white gene (Figure 2A). We confirmed by sequencing that all the coding sequence of *sal* was replaced by the *white*+ gene. *sal*^{1} homozygous mutant flies and *sal*^{1} heterozygotes over a deletion that uncovers the *salto* locus (Df(2R)BSC463) are viable and females are fertile (data not shown). However, males are sterile and do not produce any mature sperm (Figure 2B). Fertility could be partially rescued by introducing two copies of a *sal-GFP* expressing transgene (Figure 2B).

Because we observed no mature sperm in the seminal vesicle of *sal*^{1} mutant, we looked at the testis organization. Using poly-glycylated tubulin staining, we observed apparently normal elongation of the spermatids but aberrant coiling of late spermatids inside the testis (Fig 2C). This is suggestive of individualization defects. Individualization requires the formation of investment cones (IC) composed of different proteins and in particular of F-actin (Desai et al. 2009). Whereas actin cones are well formed at the base of the nuclei, they are mostly scattered around the nuclei and only a few progressing actin cones could be observed in *sal*^{1} mutant testes (Figure 2C). Strikingly, we observed that nuclei were not properly shaped in late elongated spermatids. Instead of forming long needles they appear coiled and twisted (Figure 2D).

An ultrastructural analysis was carried out to determine whether any other morphological abnormalities were present in mutant testes. Transverse sections of mutant testes revealed abnormal mitochondrial derivatives (Figure S2). The major derivative was variable in morphology, often very long and appearing expanded (Figure S2). But no defects of the axoneme could be observed (Figure S2).

Individualization defects are associated with abnormal caspase activation.

To understand the individualization defect, we first addressed the organization of the IC. We did not observe an obvious morphological defect of the actin cones at the onset of sperm individualization (Figure S3). Jar, the myosin VI ortholog is essential for IC migration and locates at the base of the actin cones (Rogat and Miller 2002) at the onset and during IC migration. We observed that in *sal*^{1} testes, Jar motor protein is localized, as in control flies, at the base of the actin cones despite their altered distribution (Figure S3). Hence, *sal*^{1} is not essential for the recruitment of Jar at the leading edge of actin cones.

Because spermatid individualization involves non apoptotic caspase activation independently of actin cone formation (Arama et al. 2003), we also determined if caspase activation could be affected in *sal*^{1} mutants. In wild type cysts, an activity gradient of active caspase 3 is induced, progressively decreasing from the cystic bulge, formed by migrating IC, towards the distal end of the flagella (Figure 3). During actin cone progression, active caspase is removed from post-individualized spermatid ends. Hence, active caspase 3 is only found distal to the migrating actin cones. We observed that *sal*^{1} mutants display elevated levels of active caspase 3 all along the spermatid cysts (Figure 3A, C, D). In *sal*^{1} cysts, the entire length of the spermatid show elevated caspase 3 and in particular in the proximal section of the cyst, active caspase 3 is still present (Figure 3C) and the cystic bulges are barely formed compared to controls (Figure 3D). This indicate that even migrating IC are ineffective in creating the cystic bulge and hence in removing active caspase3 and cytoplasm in *sal*^{1} testes. This phenotype is rescued by adding two copies of *sal::GFP* transgene (Figure 3B). To check that elevated levels of active caspase are not due to defects in the distribution of caspase inhibitors, we looked for the localization of Soti and dBruce, two inhibitors of the Cullin complex (Kaplan et al. 2010). These inhibitors form opposite gradients from the nucleus to the caudal flagellar tip in control testes. In *sal*^{1}, both proteins are distributed as in controls (Figure 3E).

Hence are results indicate, that sperm individualization defects are likely due to impaired or inefficient actin cone migration and not by directed regulation of the caspase pathway.

Salto is required for sperm nuclear shaping

The most striking defects of *sal*^{1} mutants is the coiling of the nuclei at late stages of differentiation. We first determined the precise onset of nuclear coiling. We observed that coiling only takes place after the beginning of actin recruitment before complete assembly of the actin cones (Figure 4A).

We checked whether nuclear shaping defects could be associated with altered chromatin remodelling. We did not observe any recruitment defects of Tpl94D, a transition protein incorporated at the histone to protamine transition, nor of the protamine protein Mst35Bb. Both are incorporated in *sal*^{1} nuclei as in controls (Figure

4B). By EM, we looked at the structure of the dense complex and associated nucleus during spermatid differentiation. We did not observe obvious defects of the dense complex nor of the fenestred nuclear membrane. We however observed that at intermediate elongating steps, the nuclear membrane was more tortuous in *sal*^{1} testes compared to controls in which the nuclear membrane appears smoother (Figure 4C, arrows). In addition, we observed an apparent misshaping of the centriolar adjunct that surrounds the basal body from intermediate to late spermiogenesis stages (Figure 4D).

Whereas the ultrastructure of the dense complex is apparently normal in *sal*^{1} mutant testes, we addressed whether we could observe functional alterations of other known dense complex (DC) components. Several proteins have been described to be involved in dense complex homeostasis in *Drosophila* (Kracklauer et al. 2010; Sitaram et al. 2012; Texada et al. 2008). Lis1, is a Dynein associated protein involved in the localization of Dynein around the nuclei (Sitaram et al. 2012). This protein is properly located at the base of the nuclei (Figure 4E). Spag4, a SUN protein involved in nuclear morphogenesis is first localized around the nuclei and centriolar adjunct in elongated spermatids. At all maturation steps, there was no alteration of spag4 localization in *salto* mutants (Figure 4E and 5A). We observed as well no alteration of Salto localization in *spag4* mutants (Figure 5B). Two other unrelated proteins, CG4329 and CG12184, that we have characterized to be localized at the dense complex respectively in round or elongated spermatids, are also properly distributed in *sal*^{1} mutants (Figure 4E).

Altogether, these results indicate that *salto* is not required for the localization of the other known components involved in dense complex homeostasis in *Drosophila*.

Salto and Spag4 genetically interact

Among the proteins that are associated with the DC, Spag4 and Yuri show null mutant phenotypes strikingly similar to *sal*^{1} in the testes. Both of these proteins are required for proper spermatid individualization and shaping of the nuclei. Although *sal*^{1} spermatids exhibited no gross defects in early and mid-stages of spermatogenesis, we observed in a few occasions, defects of basal body to nuclear attachment in round spermatids (Figure 4E). Such defects are also observed in *spag4* mutant spermatids. In

addition, we observed that cleaved caspase 3 in *spag4* mutant testes was distributed all along the spermatids (figure 5C, D), with no cystic bulge or waste bags, as we observed in *sal*^{1} mutant. We thus tested a possible genetic interaction between *sal*^{1} and *spag4*. In *sal*^{1}*/+; spag4*$^{-}$/+ trans heterozygotes, we observed properly formed nuclei, but spermatid cysts display a high level of active caspase 3 (Figure 5D). Fertility is not affected. Altogether, these results suggest that *sal* and *spag4* could be involved in two convergent pathways required for sperm nuclear shaping and tail to nuclei attachment.

Discussion

Salto is a protein only expressed in the testis and associated with the sperm manchette

In agreement with *salto*'s expression profile, *sal*^{1} mutants show no developmental defects, grow normally and their only phenotype is male sterility. Hence, Salto is only required for spermatogenesis in *Drosophila*. This protein locates around the nuclei and the basal body at all steps of spermatid maturation. Salto is apparently associated with microtubules forming a cage around the nuclei, as revealed by β2 tubulin immunostaining (Sitaram et al. 2012). Hence, Salto appears to be associated with dense complex microtubules and involved in sperm head shaping (Kracklauer et al. 2010).
It is important to note that adding two copies of Sal::GFP incompletely rescues fertility of *sal*^{1} mutant males. One possible explanation is that the GFP tag alters the localization of Salto. Hence, we cannot exclude that our observations, using the GFP-Tag, do not fully reflect Salto's distribution. Alternatively, the GFP tag could only disturb Salto's function and hence preclude complete mutant rescue. It would be necessary to create other rescuing constructs, either with a smaller tag or fused to the N-ter of the protein and check Salto's distribution to discriminate between these hypotheses.

Salto is required for sperm head morphogenesis

Nuclear shaping defects could originate from different impaired pathways. Because Salto::GFP is located to the dense complex, we hypothesize that Salto could be required for the integrity of the microtubule network of the sperm manchette. However, using immunofluorescence analysis, we did not manage to identify defects of the microtubule network around the nuclei, nor of other components known to be associated with the dense complex in *Drosophila* (Sitaram et al. 2012). Therefore, we expect Salto to play a role downstream or parallel to the organization of the microtubule network. As Salto is also present both at the centriolar adjunct and the acrosome, one possibility could be that Salto is required for bridging the microtubule network to both ends of the nuclei and to the nuclear membrane. In absence of Salto, these links would be weakened and the nuclei would coil under the mechanical constraints imposed by microtubule rearrangements. In agreement with this hypothesis, mutation of the Spag4 protein

which is a nuclear inner membrane protein leads nuclear shaping defects similar to *sal*^{1} (Kracklauer et al. 2010) indicating that the tight association of the nuclear membrane to the microtubule network is required for nuclear shaping. Interestingly, Sal harbours a Bar domain, known to be involved in lipid membrane association and thus could be required for linking the microtubule network to membrane domains (Stanishneva-Konovalova et al. 2016). Further work will be required to identify more precisely the partners of Salto and to understand how they are involved in nuclear shaping. To understand the role of Salto in nuclear morphology, it also could be interesting to test whether the tension force applied by the microtubules around the nuclei during the elongation is different in context of *Salto* mutant spermatids by using video force microscopy (Brodland et al. 2010).

Other pathways could also account for nuclear shaping defects observed in *salto* mutants. For example, in humans, globozoospermia, a cause of male infertility, is characterized by abnormal round sperm head (Dam et al. 2011). It is often caused by acrosome defects (Ray et al. 2017). Among the genes responsible for globozoospermia in human is the kinesin 14, KIFC1 that could play a role in organizing microtubules (Nath et al. 2010; Zhi et al. 2016). In the lobster, mutations of the ortholog KifC1, induces acrosome malformation and nuclear shaping defects (Ma, Bi, and Yang 2017). Acrosome and microtubules could be working together and contribute to normal nuclear shaping as the acrosome could be an anchoring plateform for microtubules. We did not check if the acrosome is properly formed in *salto* mutants, but defects in acrosome formation could also account for the nuclear shaping defects.

Salto is involved in basal body and centriolar adjunct homeostasis

In *sal*^{1} mutant, we observed a significant but scarcely penetrant defect in nuclei/basal body anchoring at round spermatid stage, as only 4% of cells clearly showed this defect. This indicates that Sal is not essential for basal body anchorage but that Salto could play a redundant function with other, yet to be identified, genes required for nuclear-basal body anchoring. Interestingly, *spag4* mutant spermatids show basal body anchoring defects also associated with nuclear coiling strikingly similar to *sal*^{1} mutants. We did not identify genetic interactions for this function between *salto* and *spag4,* as the double heterozygous mutants show no anchoring defects and double homozygous mutant are

similar to *spag4* mutant. However, this suggests that Salto could act, like Spag4, in connecting the nuclear membrane to the cytoskeleton network. In support of a function of Salto in basal body-nuclei anchoring, we observed, by EM, defects of the centriolar adjunct, indicating that Salto is required to organize the basal body/nuclear interface.
Interestingly, the Angiotensin converting enzyme (Ance) is a peptidyl dipeptidase implicated in male fertility. *Ance* mutant presents a defect in nuclear morphology similar to those observed in Sal^1. *Ance* mutant spermatids also show mitochondrial defects, the major and the minor derivatives being misshapen compared to control spermatids (Hurst et al. 2003). We observed similar misshaping of the major mitochondria derivative in *sal1* mutants (Figure S2), suggesting that Ance and Sal could be involved in convergent pathways. Further studies will be required to understand the molecular links between nuclear shaping, basal body anchoring and mitochondria morphogenesis, but Salto appears to be an important player in these processes.

Origin of the individualization defects in sal^1 mutants

Individualization defects can be a consequence of various impaired pathways (Steinhauer 2015). We have excluded several of the possible causes, as we did not observe axonemal defects (Figure S2) nor mis-organization of the formation of the actin cones (Figure S3). Nevertheless, individualization defects could still originate directly from impaired manchette organization. Indeed, analysis of mutants for *sal*, *spag4*, *yuri* and *pros-α6T* indicate that coiling of elongated nuclei is always correlated with failed IC-progression (Kracklauer et al. 2010; Texada et al. 2008; Zhong and Belote 2007). In addition, in *spag4*, and *yuri* mutant, basal body is not properly linked to the nuclei. We observed that nuclear coiling appears after the onset of actin cone formation in sal^1 mutants. The signals that trigger actin cone formation and progression are unknown, but these observations, suggest that proteins associated with the sperm manchette/dense complex are all required for IC progression. Altogether, this supports the conclusion of a tight association between sperm manchette organization and IC progression.

Impaired individualization can also be a consequence of impaired caspase activation (Arama et al. 2003; Fabian and Brill 2012). During actin cones progression, activated

caspase should form a gradient from the cystic bulge to the tail of the cyst. We identified that *salto* mutants present an elevated level of activated caspase from head to tail. We did not observe any distribution defects of the regulators of the caspase pathway, Soti or dBruce, indicating that exuberant caspase 3 activation is not associated with reduced levels of inhibition. Because *sal* and *spag4* null mutants show a similar profile of caspase 3 activation it is likely that this defect is a direct consequence of impaired actin cone progression. It could be necessary to check the status of activated caspase 3 in all mutants showing impaired IC progression to confirm this hypothesis. However, it is important to note that *spag4* and sal^1 double heterozygous mutants show exacerbated activated caspase 3, but no nuclear coiling. This suggests that exacerbated caspase 3 activation is not a consequence of nuclear coiling. More likely, nuclear coiling, failure of actin cone progression and ultimately exacerbated caspase 3 activation might be a downstream consequence of impaired manchette and basal body anchoring. Alternatively, mitochondria are directly involved in regulating caspase 3 activation during spermatid individualization, as regulation of caspase 3 activation has been shown to be restricted at the mitochondria vicinity by a protein of the mitochondrial outer membrane (Aram et al. 2016). Hence, it is also plausible that the mitochondria shaping defects observed in sal^1 mutants could be responsible for caspase over-activation. More work will be required to understand how Salto exerts its function in the Drosophila testis, in particular by identifying it's partners.

Conclusion

Here we show that Salto plays a critical role in organizing the sperm head. The similarities between spermatid individualization processes and nuclear shaping in *Drosophila* and mammals suggest that further studies during sperm differentiation in *Drosophila* may provide new insights into the etiology of some forms of human infertilities.

Materials and Methods

Fly stocks and maintenance

The following lines were obtained from Bloomington Drosophila Stock Center: vasa::Cas9 (Bl#51323), Spag4 mutant: w[*];TI{w[+mW.hs]=TI}spag4[6]/CyO (Bl#29978), reporter gene Spag4-Myc: w[*]; P{w[+mC]=spag4.6xMyc}3/TM6B, Tb[1] (Bl#29981), deficiency that cover Salto locus (Bl#24967), lis1-cherry for dense complex marker (Bl# 57339). The flies were raised on standard media between 21°C and 25°C.

Generation of *sal[1]* allele

The *sal[1]* allele (CG13164) was generated by CRISPR/Cas9 induced homologous directed repair (Gratz et al., 2014). Two gRNA were selected using the http ://tools.flycrispr .molbio .wisc .edu /targetFinder / website: 5′ -CCATTTACACTAGACGTAGTTCA-3′ and 5′ -CCGTCGAGCAGTTGATGCTGCAG-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 BsiWI-NheI and AvrII-BglII sites of pRK2 plasmid containing a white+ CDS (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.

Generation of sal-GFP expressing transgene

1 kb of upstream regulatory sequences and the entire coding sequence of CG13164 were cloned in frame with GFP of pJT61 (Vieillard et al. 2016). The resulting constructs were integrated by PhiC31 mediated recombination at attb plateform at 89E11 (III). All transgenic lines were obtained from BestGene Inc.

Immunofluorescence on *Drosophila* testes squashes

Testes from young adult flies were dissected in PBS1X, fixed 15 minutes in PBS1X/PFA 4%. For squash preparation, testes were 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. For both whole testis or squash immunofluorescence, testes were permeabilized 15 min in PBS1X/Triton 0.1% (PBT) and blocked 2h in PBT/BSA 3%/NGS 5%.

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

The antibodies used were the following:

Guinea pig anti-Asterless (1/30000 gift from C. Rogers, University of Arizona, Tucson, AZ; Klebba et al. 2013) ; mouse Axo49 anti–polygly- cylated tubulin (1/100; provided by N. Levilliers, Laboratoire de Biolo- gie Cellulaire 4, CNRS, Université Paris-Sud, Orsay, France); anti Rabbit Tpl94D 1/100 and Rabbit Mst35Bb 1/200 kindly provided from B. Loppin (Kimura and Loppin 2016); mouse alpha tubuline DM1a 1/500 (SigmaAdrich); mouse anti Myosine VI jaguar 1/200 from Kellerman and Miller 1992, kindly provided by Stéphane Vincent;

anti Rabbit Cleaved caspase3 1/100 (Cell Signaling); guinea pig anti Soti 1/100 and rabbit anti dBruce 1/500 kindly provided by E.Arama; mouse anti Lamin C 1/250 (DHSB).

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 10x or 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.

Fertility test

1- or 2-d-old males were crossed individually with two 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.

EM

Samples were processed as previously described (Enjolras et al. 2012)(Vieillard et al. 2016).

Statistics

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, $P > 0.05$; *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$; ****, $P \leq 0.0001$).

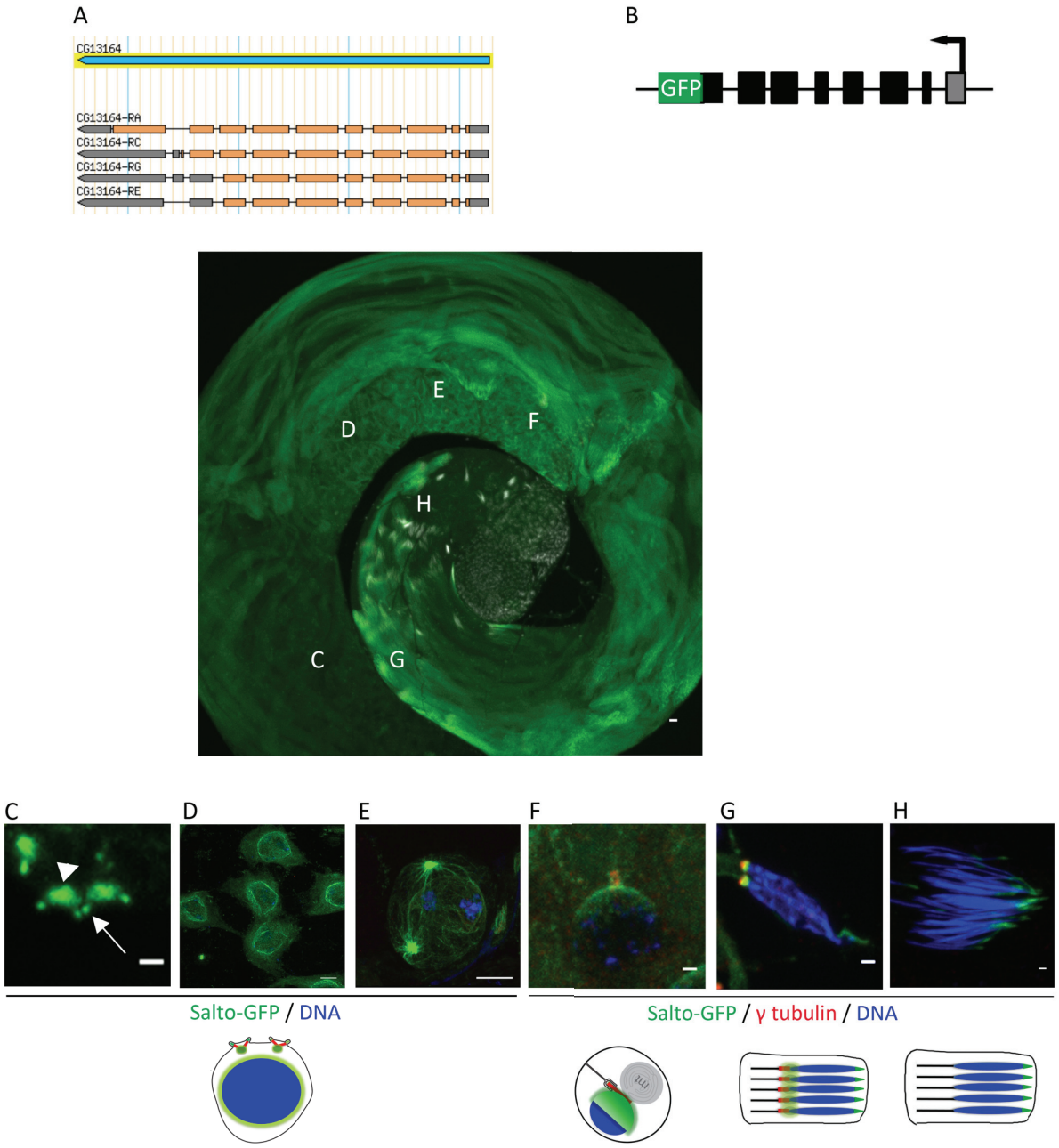


Figure 1: Salto::GFP is dynamically distributed during spermatogenesis
Upper top, a scheme represents the different isoforms (A); the long one RA is fused to the GFP (B). Image of the whole testis showing that Salto-GFP is present at all steps of spermatogenesis (C-H). (C) Young spermatocytes express Salto::GFP around the centrioles (arrowheads) and at the cilia/TZ (arrows). (D) In mature spermatocytes Salto::GFP is relocated around the nuclei. (E) Before the beginning of meiosis, Salto decorates the spindle. (F) In round spermatids, Salto::GFP is present as a half ring around the nuclei. (G) In late elongated spermatids, Salto is present both at the acrosome and centriolar adjunct. (H) It remains at the acrosome at later stages. Scale bars=10 µm.

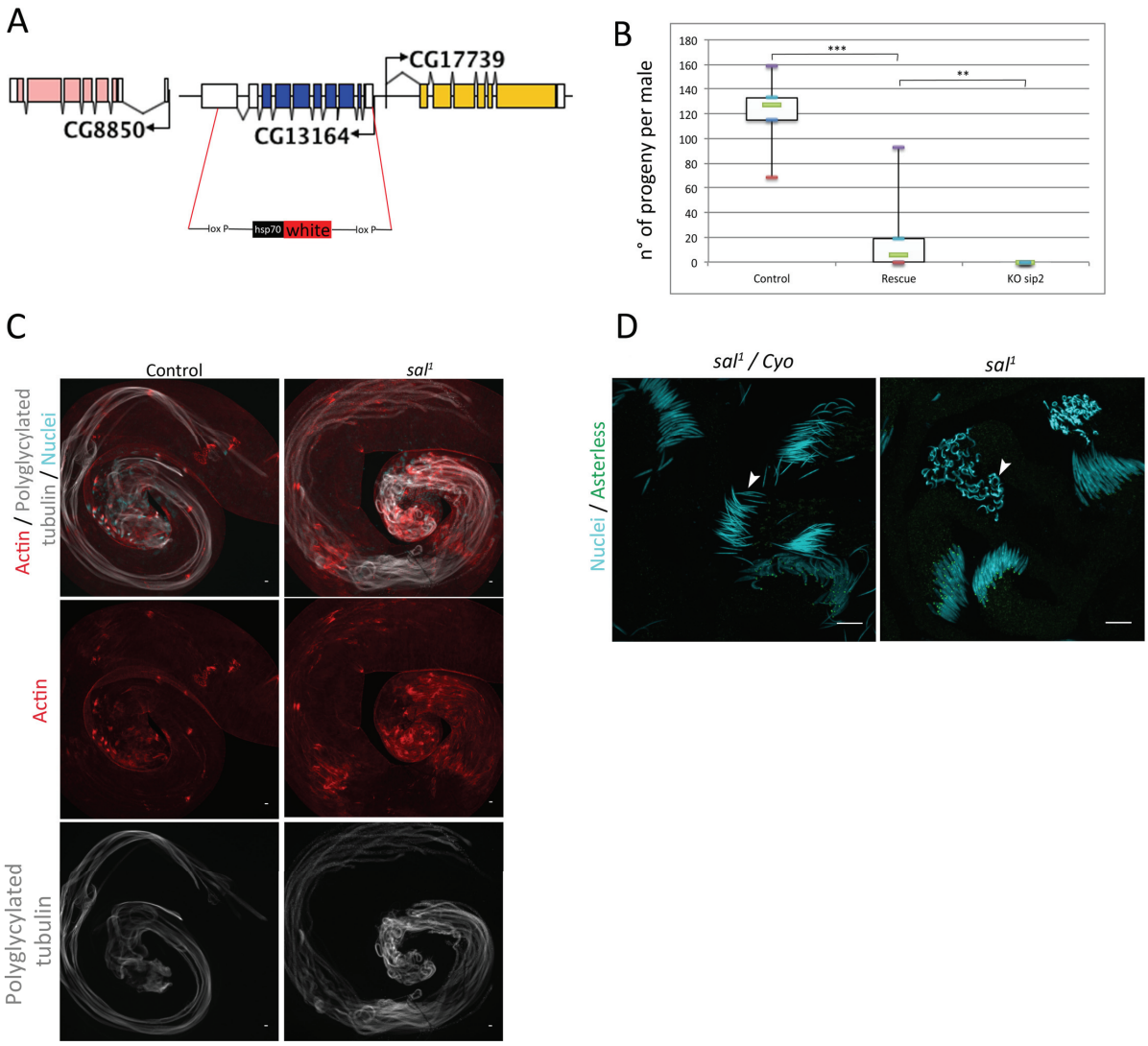


Figure 2: *Sal*^{1} null mutant males are sterile and show sperm individualization defects
(A) CRISPR-Cas9 homologous recombination scheme for deletion of *salto* (*CG13164*). The mini-white gene replaces *salto* upon recombination. (B) Graph of fertility assays representing the number of progeny for control, rescue and *sal*^{1} mutant males. n=25 for each genotype. (C) Images of the whole testis showing that actin cones migration (red) is altered in *sal* mutant compare to control. Polyglycylated tubulin shows an aberrant coiling of spermatids (gray). (D) Images showing bending nuclei in *sal* mutant (arrowhead) compare to long needle shape nuclei in control (arrowhead). Scale bars=10 µm.

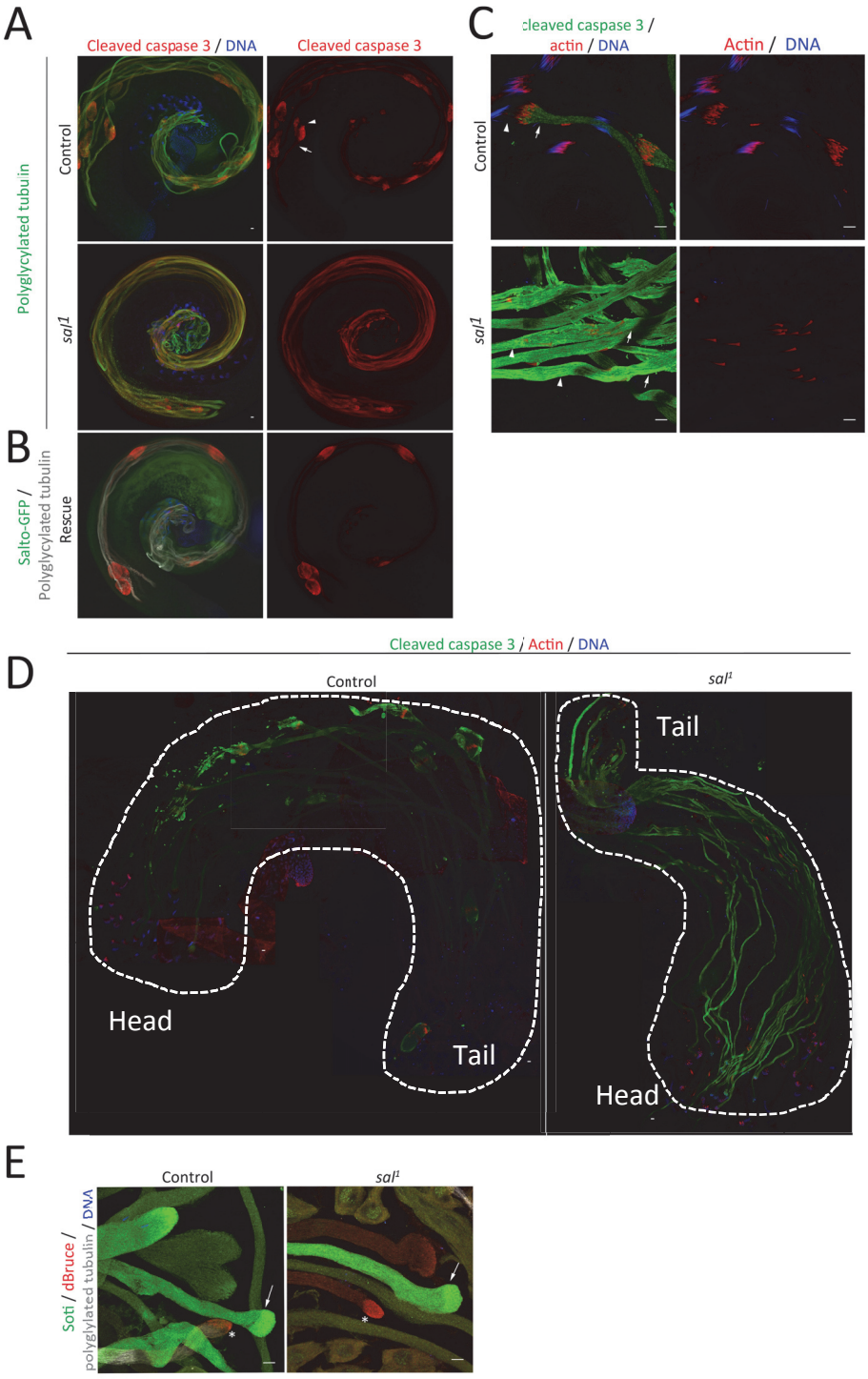


Figure 3: *salto* mutant spermatids exhibit an elevated level of active effector caspase and progressive individualization defects.

(A) Elongated spermatids from wild-type and *sal*^{1} mutant and (B) *sal*^{1} mutant rescue with two copies of Salto::GFP were stained with anti-cleaved caspase-3 antibody (green), phalloidin which labels the actin-based investment cones of the IC (red), and DAPI to visualize the nuclei (blue). The red channel is also shown on the right. (C) Magnification of the post individualized (arrowhead) and pre-individualized (arrow) segments show that in *sal*^{1} mutants, caspase 3 is active both before and after the IC. The cystic bulge is flat compared to control. Images on the right show the altered actin cone distribution in *sal*^{1} testes compared to control. (D) Complete testis showing the differences in caspase 3 activation levels along the spermatids. (E) Visualization of Soti (arrow) and dBruce (asterisk) proteins in spermatids using antibodies. They are located at the tip of spermatids both in control and *sal*^{1} mutant. Scale bars=10 µm.

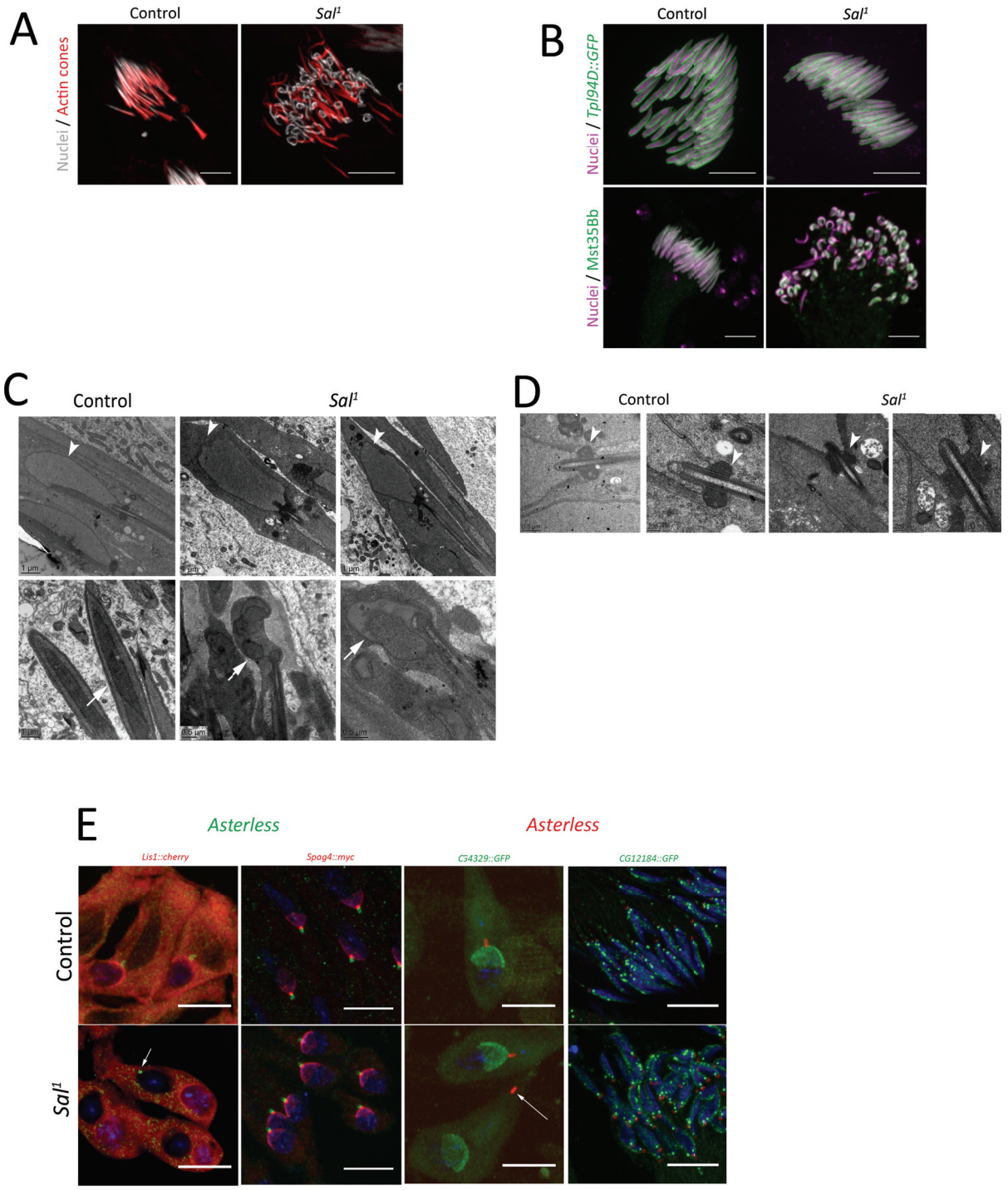


Figure 4: Salto is required for sperm nuclear shaping
(A) Nuclei (white) are coiling at the onset of actin cone assembly (red). (B) Transition protein Tpl94D and protamine Mst35Bb are correctly incorporated in the nuclei of both control and *sal*^{1} mutant spermatids. (C) EM sections of nuclei show that *sal*^{1} mutant has a rougher membrane (arrowhead) compared to control. Bending of *sal*^{1} mutant nuclei compared to control is indicated by white arrows. (D) EM sections of the centriolar adjunct show that it appears larger in *sal*^{1} mutant compared to control (arrowhead). (E) Images of dense complex components: Lis1 (first panel in red), Spag4 (second panel in red), CG4329 (third panel in green) and CG12184 (last panel in green) at different stages of nuclei elongation. Basal bodies (Asterless respectively in green or red) are in rare occasions undocked to the nuclei in *sal*^{1} mutant spermatids (arrow). Unless indicated, Scale bars =10 µm.

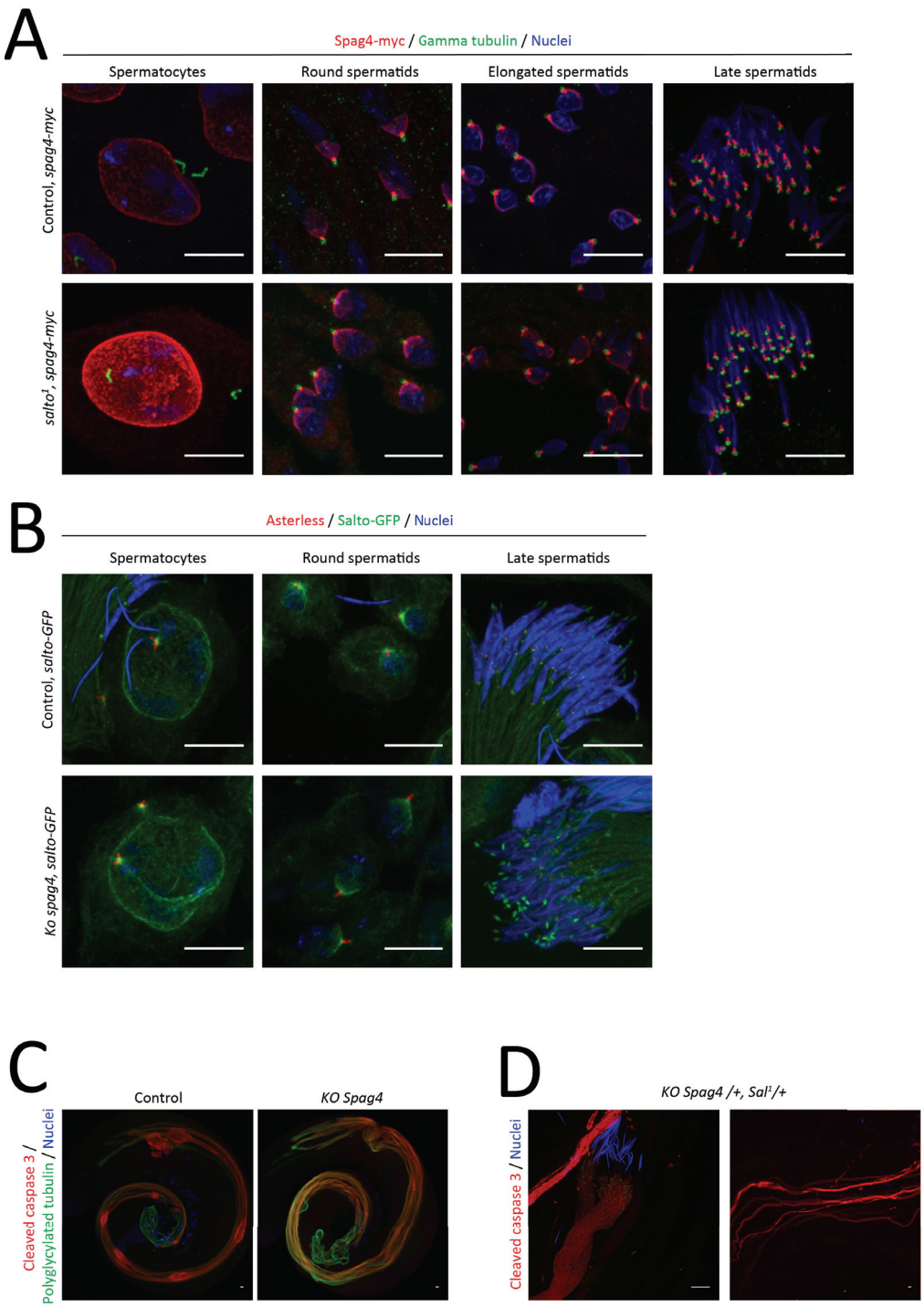


Figure 5: Salto and Spag4 genetically interact

(A) Spag4::myc localization in *sal*^{1} mutant during spermatogenesis, Spag4 is correctly located around the nuclei in spermatocytes and at the dense complex in round and elongated spermatids. It is relocated at the centriolar adjunct in late spermatids. Centrioles are stained with γ-tubulin in green and nuclei in blue. (B) Salto::GFP localization in *spag4* mutant during spermatogenesis. Salto::GFP is similarly located at all steps of maturation in control or in *spag4* mutant spermatids. (C) *spag4* mutant spermatids exhibit elevated caspase levels (red). (D) Trans-heterozygous of *KOspag4* and *sal*^{1} display elevated caspase levels, but nuclei are properly elongated and do not bend. Scale bars=10 µm.

Supplemental data

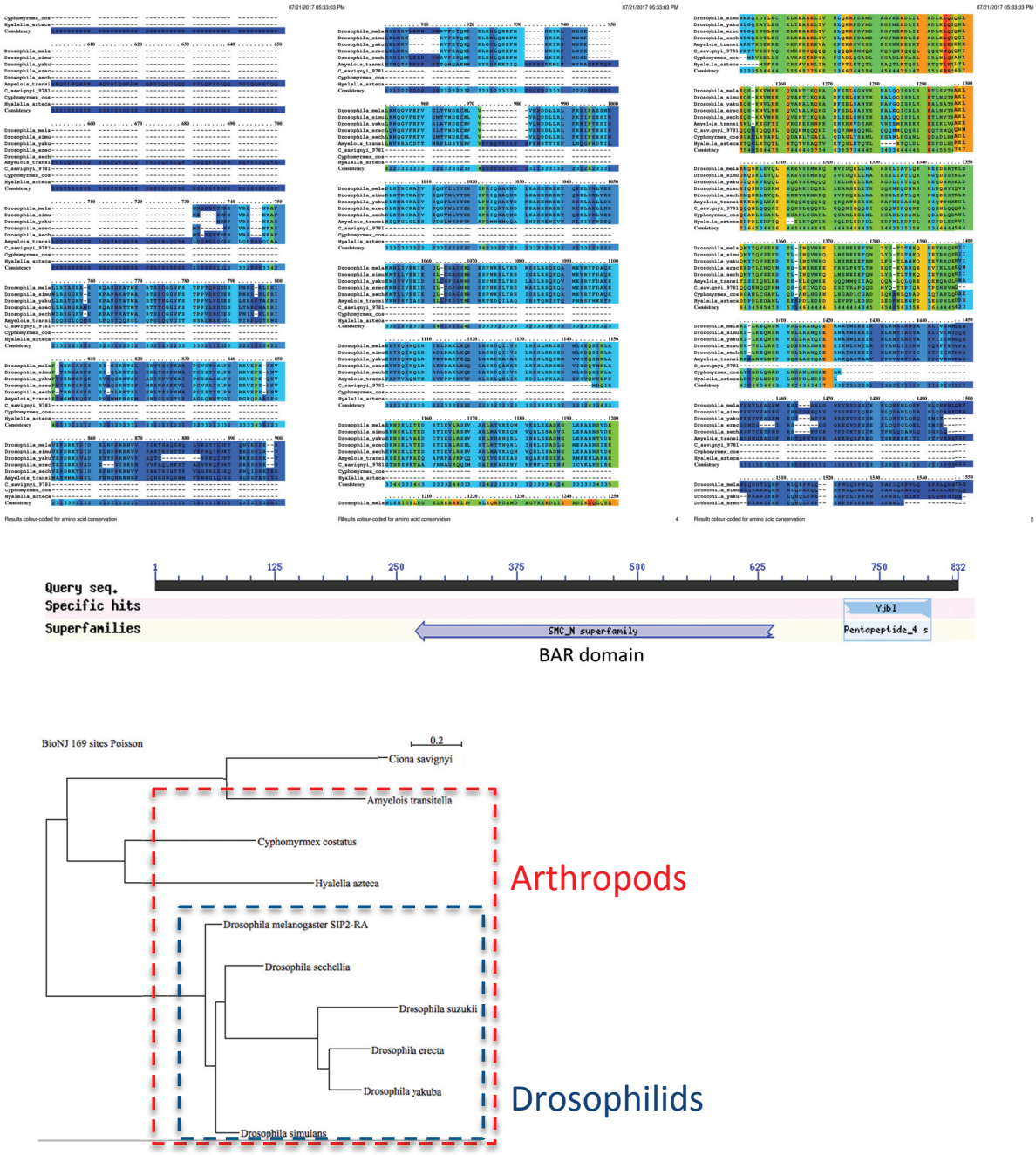


Figure S1: Protein sequence comparison of Salto and domain conservation
The amino acid conservation scoring is performed by PRALINE (Simossis and Heringa 2005). The scoring scheme works from 0 for the least conserved alignment position (blue), up to 10 for the most conserved alignment position (red), with all shades between them. The BAR domain is contained from the middle to the N-ter and is conserved among species. A tree using the distance technique by the Poisson rule shows that Salto is conserved among drosophilids.

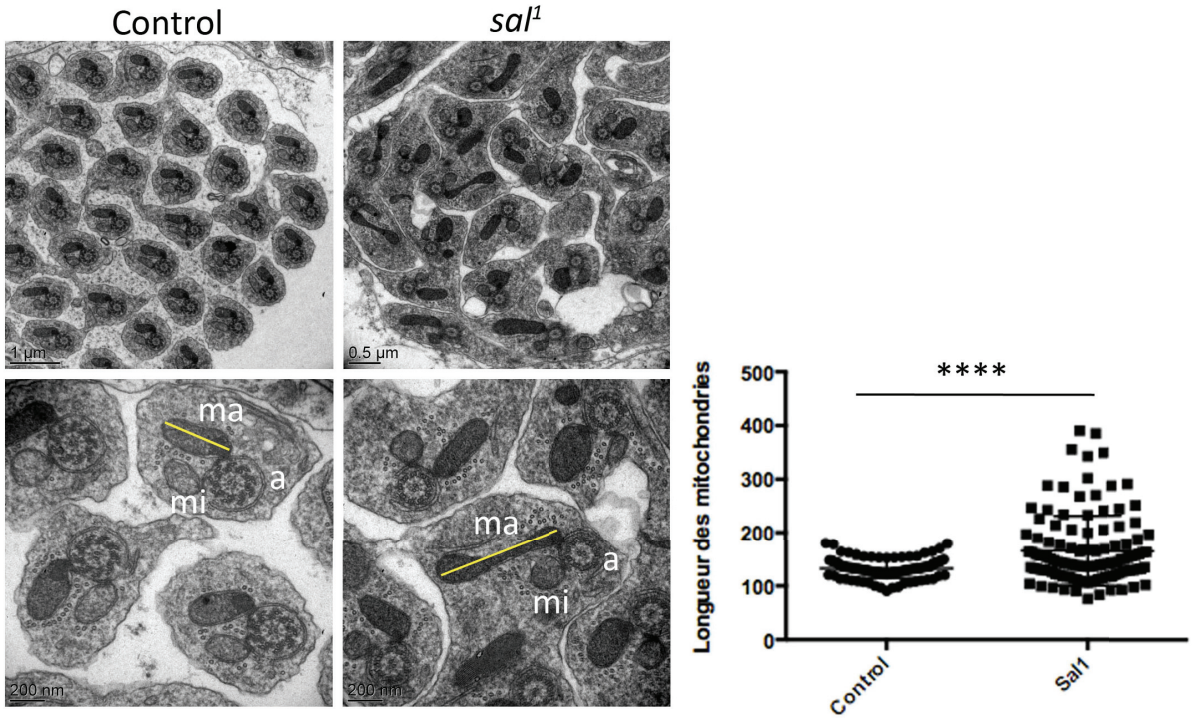


Figure S2: Major derivative mitochondria are longer in *sal*[1] mutant.
EM transverse sections and graph of measured mitochondria length, show a significant difference between control and *sal*[1] mutant spermatids. All cells are in perfect cross section, based on doublet microtubule observations of the axoneme (a), the major derivative (ma) presents a paracrystalline material at the contact point with the axoneme, the minor derivative (mi) appears generally less dense. Mitochondria length has been measured as shown in picture (yellow bar) and statistical significance was calculated using t-test.

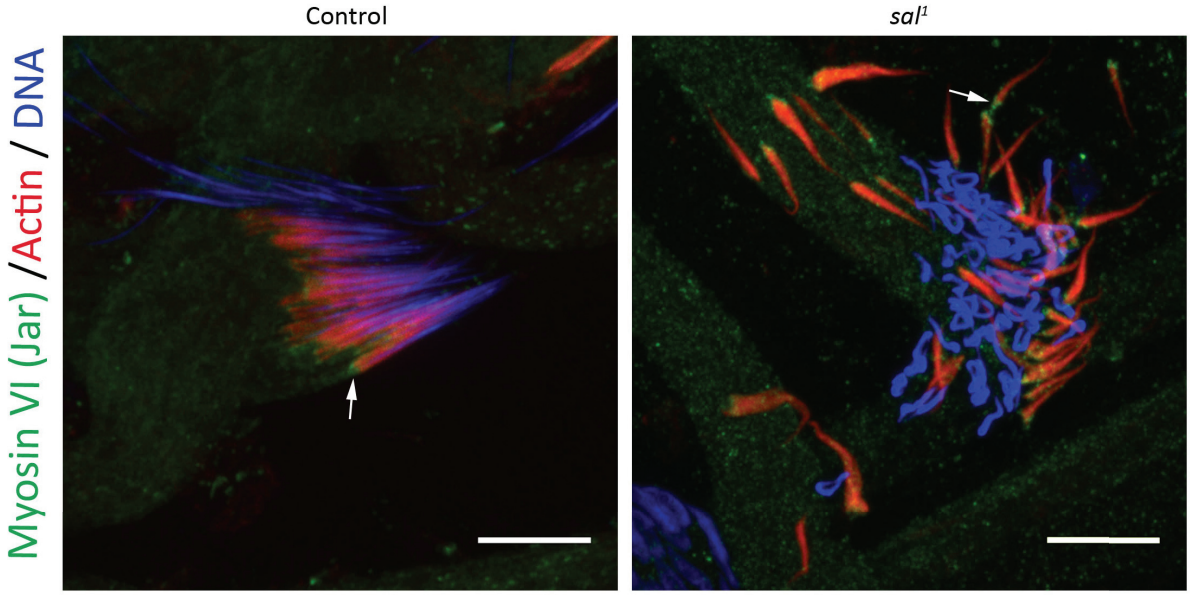


Figure S3: Actin cones are correctly formed and myosin VI is well located
Myosin VI is present at the edge of the actin cones both in control and in *sal*[1] mutant spermatids. Scale bars=10 µm.

References

Aram, L. et al., 2016. A Krebs Cycle Component Limits Caspase Activation Rate through Mitochondrial Surface Restriction of CRL Activation. *Developmental Cell*, 37(1), pp.15–33. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2016.02.025.

Arama, E., Agapite, J. & Steller, H., 2003. Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in Drosophila. *Developmental Cell*, 4, pp.687–697.

Brodland, G.W. et al., 2010. Video force microscopy reveals the mechanics of ventral furrow invagination in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(51), pp.22111–6. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3009801&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Dam, A.H. et al., 2011. Morphology of partial globozoospermia. *Journal of andrology*, 32(2), pp.199–206.

Desai, B.S., Shirolikar, S. & Ray, K., 2009. F-actin-based extensions of the head cyst cell adhere to the maturing spermatids to maintain them in a tight bundle and prevent their premature release in Drosophila testis. *BMC Biology*, 7, p.19. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2683793&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Enjolras, C. et al., 2012. Drosophila chibby is required for basal body formation and ciliogenesis but not for Wg signaling. *The Journal of cell biology*, 197(2), pp.313–25. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3328381&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed February 25, 2014].

Fabian, L. & Brill, J.A., 2012. Drosophila spermiogenesis Big things come from little packages. , (September), pp.197–212.

Fabrizio, J.J. et al., 1998. Genetic dissection of sperm individualization in Drosophila melanogaster. *Development (Cambridge, England)*, 125, pp.1833–1843.

Hurst, D. et al., 2003. The drosophila angiotensin-converting enzyme homologue Ance is required for spermiogenesis. *Developmental Biology*, 254, pp.238–247.

Kaplan, Y. et al., 2010. Gradients of a Ubiquitin E3 Ligase Inhibitor and a Caspase Inhibitor Determine Differentiation or Death in Spermatids. *Developmental Cell*, 19(1), pp.160–173. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2010.06.009.

Kimura, S. & Loppin, B., 2016. The Drosophila chromosomal protein Mst77F is processed to generate an essential component of mature sperm chromatin. *Open Biology*, 6(11).

Kracklauer, M.P. et al., 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(16), pp.2763–2772. Available at: http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.066589.

Ma, D., Bi, L. & Yang, W., 2017. KIFC1 is essential for acrosome formation and nuclear shaping during spermiogenesis in the lobster Procambarus clarkii. , 8(22), pp.36082–36098.

Noguchi, T. et al., 2007. Proper Cellular Reorganization during Drosophila Spermatid Individualization Depends on Actin Structures Composed of Two Domains, Bundles and Meshwork, That Are Differentially Regulated and Have Different Functions. *Molecular biology of the cell*, 19(1), pp.308–317.

O'Donnell, L., 2014. Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are

disturbed. *Spermatogenesis*, 4(2), p.e979623. Available at: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/21565562.2014.979623.
Rathke, C. et al., 2007. Transition from a nucleosome-based to a protamine- based chromatin configuration during spermiogenesis in Drosophila.
Ray, P.F. et al., 2017. Genetic abnormalities leading to qualitative defects of sperm morphology or function. *Clinical Genetics*, 91(2), pp.217–232.
Rogat, A.D. & Miller, K.G., 2002. A role for myosin VI in actin dynamics at sites of membrane remodeling during Drosophila spermatogenesis. *Journal of cell science*, 115, pp.4855–4865.
Sangeeta Nath, † et al., 2010. Kif5B and Kifc1 Interact and Are Required for Motility and Fission of Early Endocytic Vesicles in Mouse Liver. *International Journal of Biological Sciences*, 6(6), pp.569–583.
Simossis, V.A. & Heringa, J., 2005. PRALINE: A multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2), pp.289–294.
Sitaram, P. et al., 2012. Regulation of dynein localization and centrosome positioning by Lis-1 and asunder during Drosophila spermatogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 139(16), pp.2945–54. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3403104&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed December 30, 2014].
Stanishneva-Konovalova, T.B. et al., 2016. The Role of BAR Domain Proteins in the Regulation of Membrane Dynamics. *Acta Naturae*, 8(4), pp.60–69.
Steinhauer, J., 2015. Separating from the pack: Molecular mechanisms of *Drosophila* spermatid individualization. *Spermatogenesis*, 5(February 2016), p.e1041345. Available at: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21565562.2015.1041345.
Tates, A.D., 1972. *Cytodifferentiation during spermatogenesis in Drosophila Melanogaster: an electron microscope study*, Available at: http://books.google.fr/books/about/Cytodifferentiation_during_spermatogenes.html?id=v6zwAAAAMAAJ&pgis=1 [Accessed May 20, 2014].
Texada, M.J. et al., 2008. yuri gagarin is required for actin, tubulin and basal body functions in Drosophila spermatogenesis. *Journal of Cell Science*, 121, pp.1926–1936. Available at: http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.026559.
Vieillard, J. et al., 2016. Transition zone assembly and its contribution to axoneme formation in *Drosophila* male germ cells. *The Journal of Cell Biology*, p.jcb.201603086. Available at: http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201603086.
Zhi, E. et al., 2016. Decreased expression of KIFC1 in human testes with globozoospermic defects. *Genes*, 7(10), pp.1–11.
Zhong, L. & Belote, J.M., 2007. The testis-specific proteasome subunit Prosalpha6T of D. melanogaster is required for individualization and nuclear maturation during spermatogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 134, pp.3517–3525.

3. Crible protéomique : FAM92, une protéine interagissant avec Chibby chez les mammifères et chez la drosophile

Résumé :

Toujours dans le but d'identifier des partenaires de Chibby pour comprendre les mécanismes d'assemblage de la ZT, un crible protéomique a été réalisé dans l'équipe 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 a permis d'identifier plusieurs candidats et notamment les protéines DZIP1L et FAM92A. L'interaction biochimique chez les mammifères et chez la drosophile entre DZIP1L et CBY1, et FAM92 et CBY1 a été démontrée.

J'ai caractérisé fonctionnellement FAM92 chez la drosophile et j'ai pu montrer que son absence conduit 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.

La caractérisation de DZIP1 et FAM92 montre que ces protéines sont requises pour l'assemblage de la zone de transition et forme 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. Mes résultats sur FAM92 sont intégrés dans une publication en préparation présentée ici.

***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

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 (F.-Q. Li et al. 2016). 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 (F.-Q. Li et al. 2016), 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). 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.

Chez la drosophile, FAM92 et DZIP1 sont présentes à la zone de transition

Nos résultats montrent que FAM92 et DZIP1 se comportent comme Cby chez la drosophile et sont localisées à 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; Basiri et al. 2014; Enjolras et al. 2012; Vieillard et al. 2016). Ainsi, à la fois dans les organes sensoriels de la drosophile et au cours de la spermatogenèse, nous montrons que FAM92 et DZIP1 se superpose aux protéines connues de la ZT comme Chibby, MKS1 et CEP290 (Pratt et al. 2016; Vieillard et al. 2016).
Par l'observation de la dynamique de recrutement de FAM92 et DZIP1 au cours de la spermatogenèse, nous avons montré 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 FAM92 et DZIP1 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.
Ainsi, la zone de transition semble 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.

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

Afin d'étudier le rôle de FAM92 et DZIP1, 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. En effet, le shARN dirigé contre FAM92 ne permet pas de diminuer la présence de la protéine FAM92 fusionnée à la GFP dont la séquence est également ciblée par le shARN (données non montrées). Ce résultat indique que le shARN dirigé contre FAM92 n'est pas très efficace. L'analyse du phénotype du shARN de FAM92 est donc à analyser avec précaution. Plusieurs stratégies sont en cours pour déterminer si les phénotypes assez forts mais peu pénétrants dans les différents tissus ciliés sont la cause du shARN peu efficace. Une stratégie pour l'obtention du mutant nul par CRISPR-Cas9 est en cours dans le laboratoire. Dans le cas où l'obtention du mutant nul échouerait, une seconde stratégie a été réalisée afin de créer un nouvel shARN en ciblant l'exon 2 et 3 du gène, séquence prédite pour être plus efficace que le shARN utilisée dans cette étude. Ces 2 stratégies permettront d'identifier la fonction précise de FAM92 dans l'assemblage de la zone de transition dans les neurones sensoriels et au cours de la spermatogenèse.
Le shARN dirigé contre DZIP1 semble beaucoup plus pénétrant et le phénotype est plus fort que pour FAM92. Le mutant nul vient d'être obtenu au laboratoire et sa caractérisation va permettre de préciser les défauts observés par shARN dans les tissus ciliés chez la Drosophile.

Au cours de la spermatogenèse

La déplétion de FAM92 induite par l'expression d'un shARN spécifiquement dans les testicules de drosophiles conduit à une désorganisation de la spermatogenèse, associée à d'importants défauts d'assemblage de la zone de transition. 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, DZIP1 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 FAM92 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 FAM92 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 FAM92 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 DZIP1 et un phénotype plus fort est observé dans les testicules. D'importants défauts d'assemblage de la zone de transition sont également observés.

L'ensemble de ces résultats montre que FAM92 et DZIP1 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., 2016) 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 démontrons donc que les protéines FAM92 et DZIP1 jouent un rôle très important dans la mise en place de la zone de transition chez la drosophile.

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 nécessaires afin de déterminer si l'ultrastructure de la zone de transition est perturbée. En revanche, la déplétion de FAM92 dans les neurones sensoriels conduit à une perte de coordination légère et variable en fonction des individus, et l'analyse par immunofluorescence indique que le cil est toujours présent.

Il sera nécessaire d'analyser les mutants nuls de FAM92 et DZIP1 afin de pouvoir conclure définitivement sur leurs rôles respectifs dans l'assemblage de la zone de transition.

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. Sur la base des résultats actuels,

il semble qu'au sein de ce nouveau module protéique, DZIP1 soit 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., 2016). De plus, chez les mammifères, DZIP1 agit en amont de CBY1 (Wang et al., 2013). 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. 2013; Lee et al., 2014; Li et al., 2016). En revanche, toutes ces protéines se superposent avec le complexe MKS au niveau de la zone de transition chez la drosophile.
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.

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

Au cours de la spermatogenèse, la perte de FAM92 et DZIP1 produit des extensions microtubulaires aberrantes provenant du centriole. Ce défaut semble corréler avec un défaut de formation du capuchon ciliaire (Vieillard et al., 2016 et résultats non publiés). Il semble donc qu'au cours de la spermatogenèse FAM92 et DZIP1 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, présente des défauts d'ancrage des corps basaux dans les cellules multiciliées de l'épithélium respiratoire (Voronina et al., 2009 ; Burke et al., 2014). Le mécanisme par lequel ces 3 protéines agissent à la formation de la ZT et l'ancrage reste donc à être identifiés. L'identification des partenaires de FAM92 et DZIP1 permettrait de relier le module CBY avec les complexes déjà existants de la ZT.

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

L'absence de FAM92 et DZIP1 conduit dans un grand nombre de cas à la croissance aberrante d'extension microtubulaire sur un seul des centrioles de la paire. Nous avons pu observer que dans 85% des cas pour FAM92 et pour DZIP1, 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.

Conclusion

Ma contribution dans la caractérisation de FAM92 chez la drosophile a permis d'identifier son rôle et avec la caractérisation fonctionnelle de DZIP1, 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. Les interactions protéiques sont conservées des mammifères à la drosophile et ce complexe joue un rôle important dans l'assemblage de la zone de transition dans les 2 types de cellules ciliées chez la drosophile.

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.

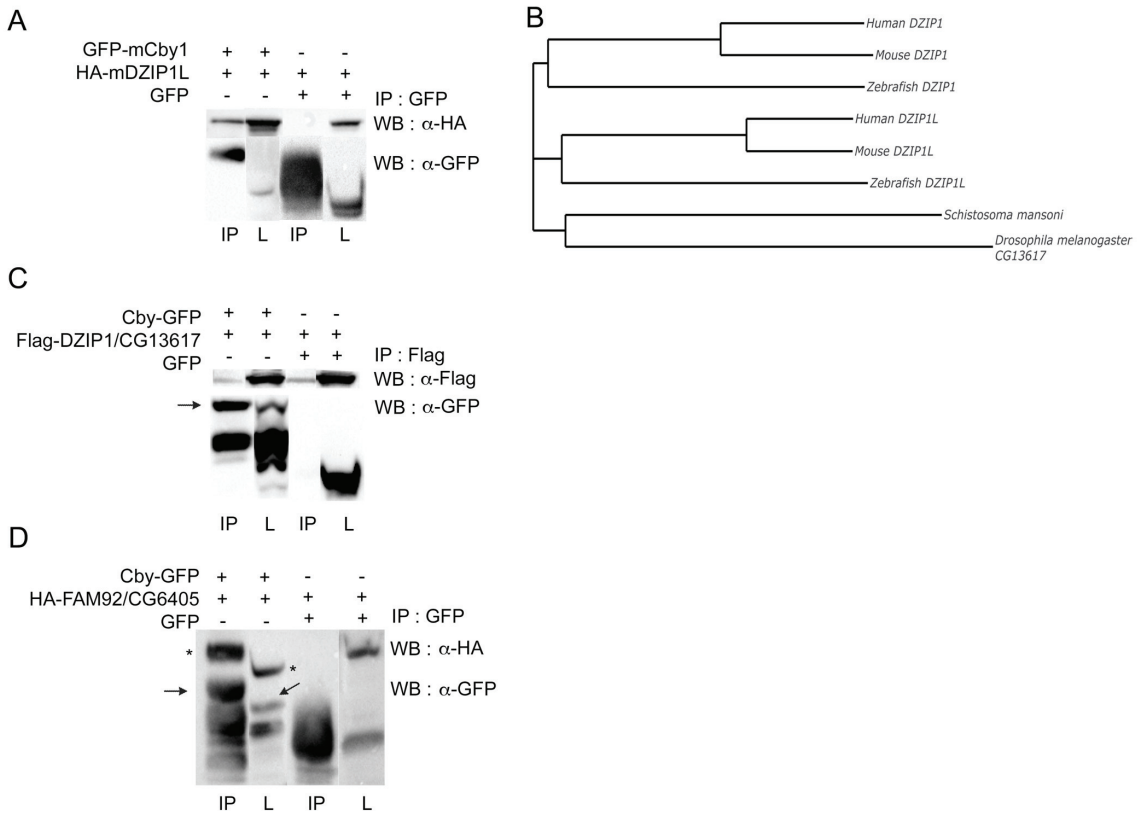


Figure 1

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.

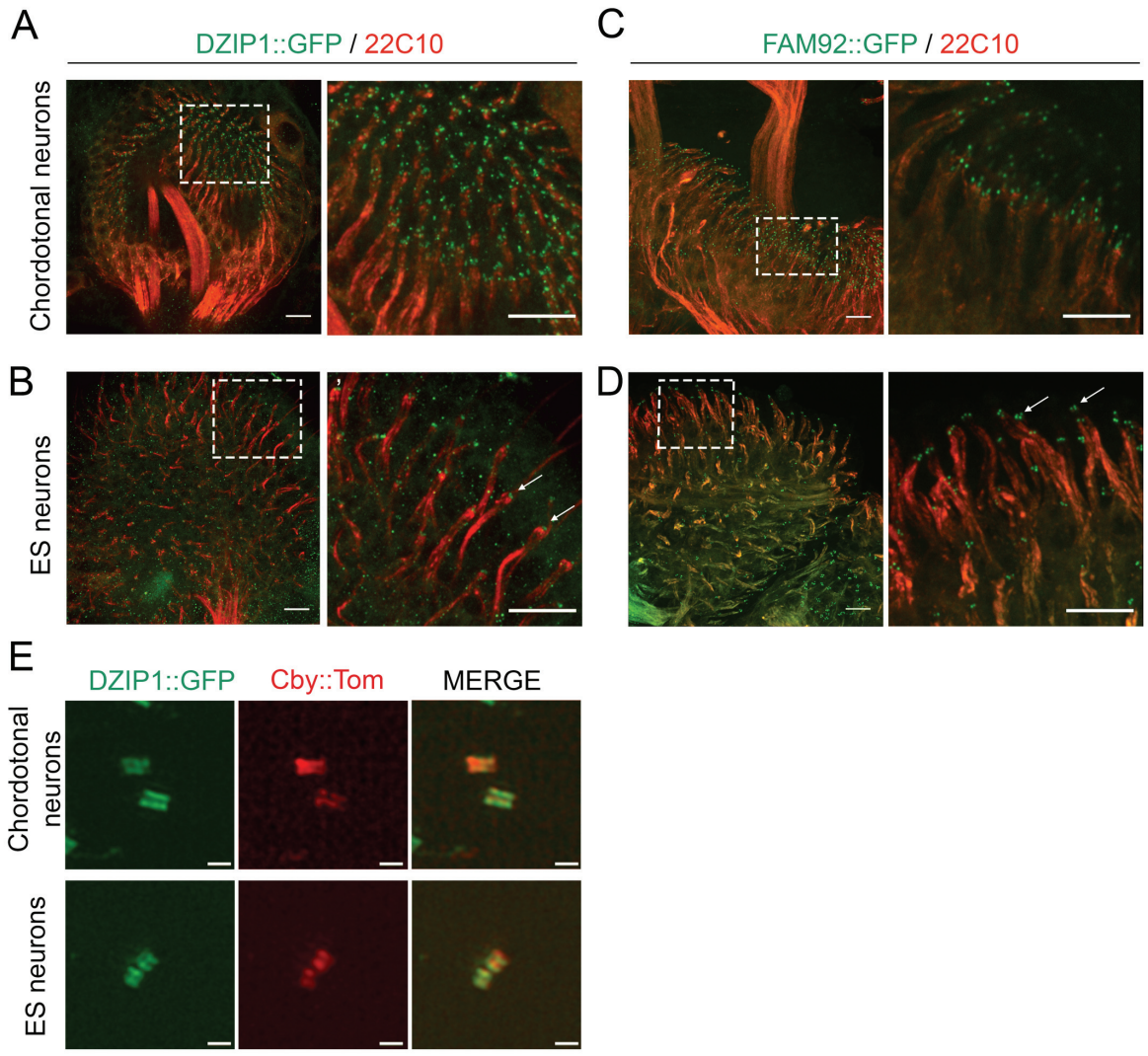


Figure 2

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).

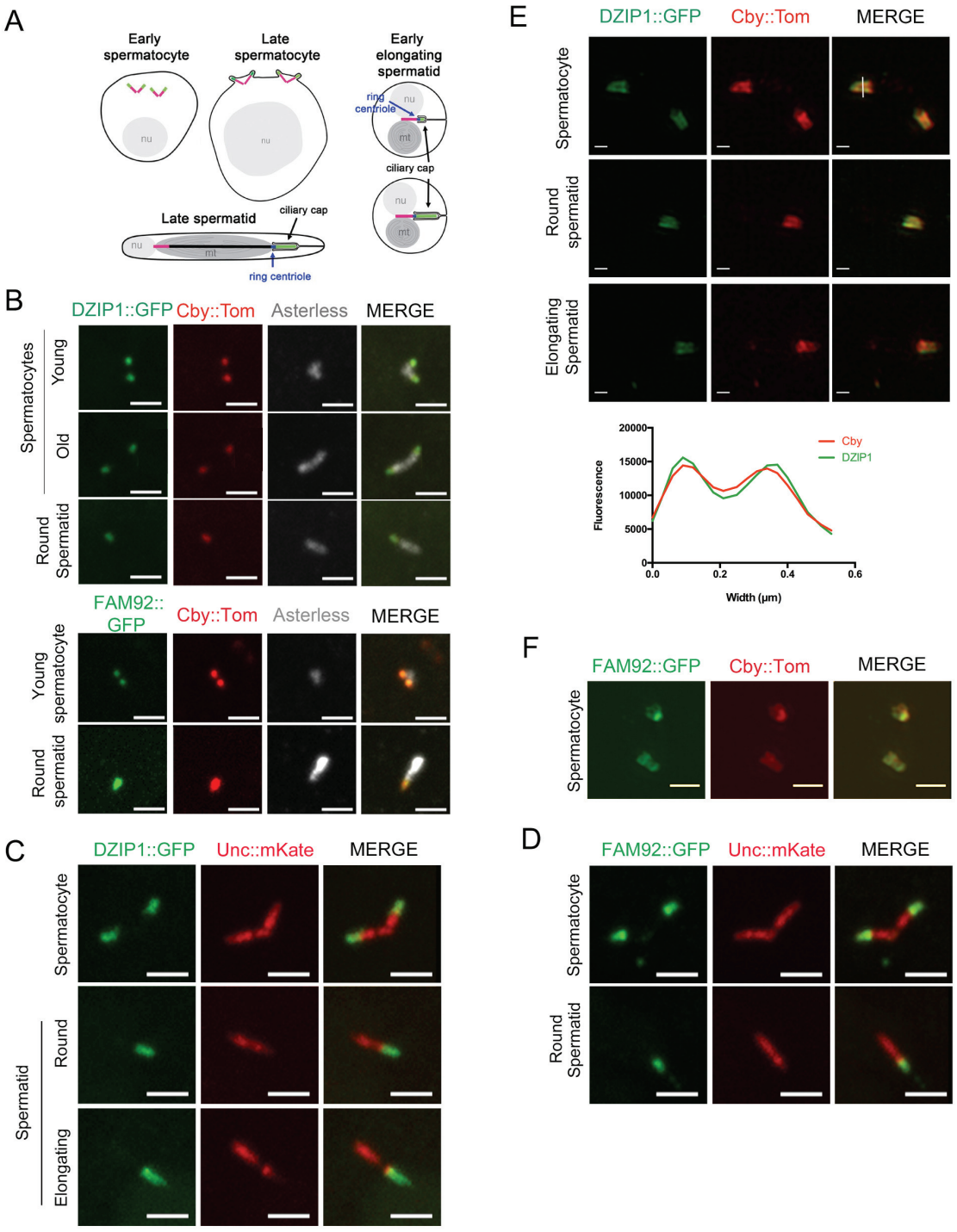


Figure 3

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

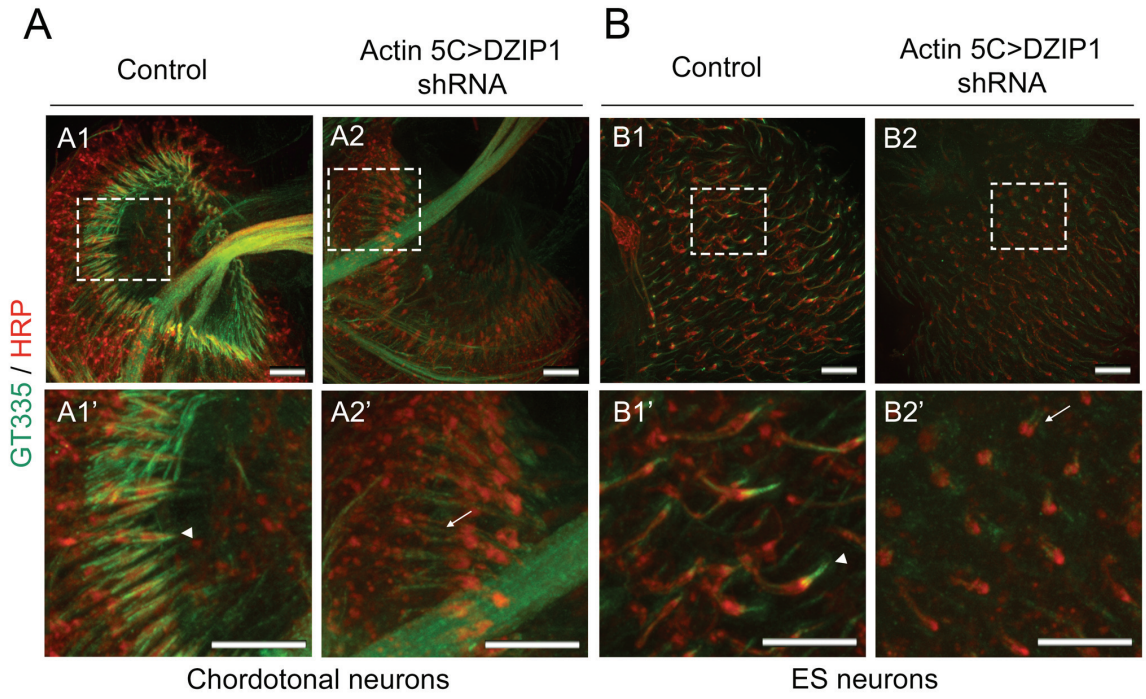


Figure 4

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.

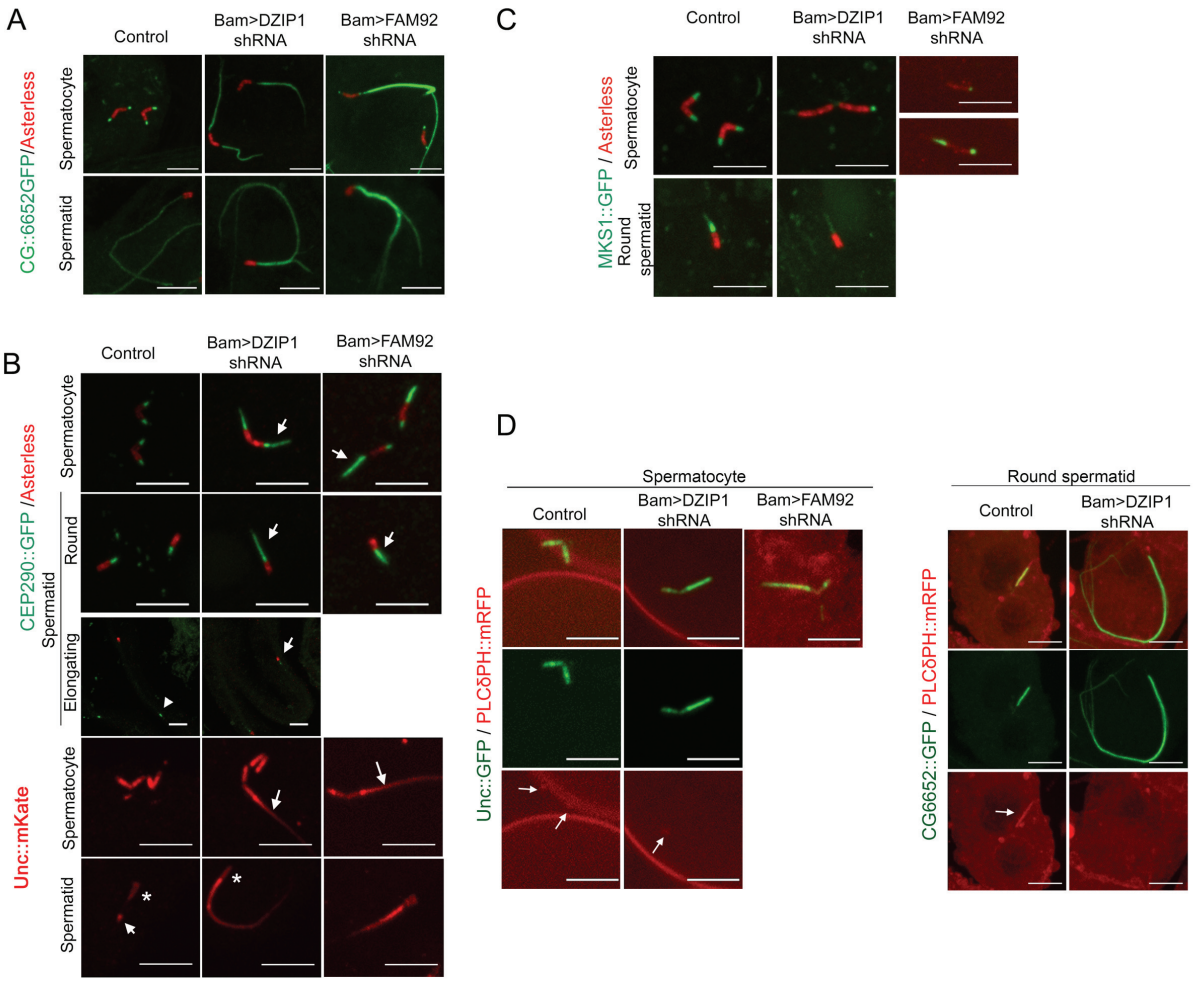


Figure 5

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.

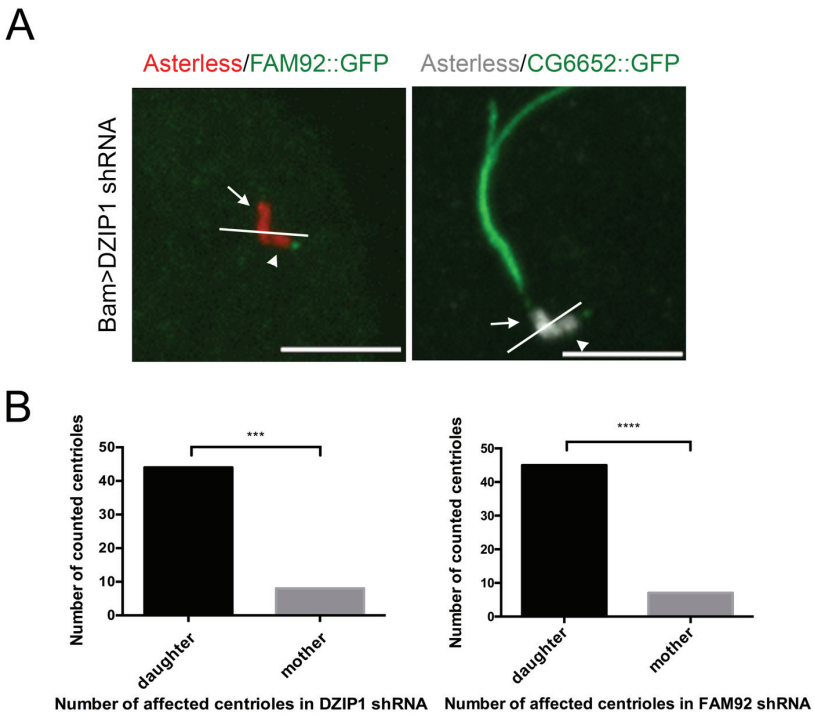


Figure 6

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.

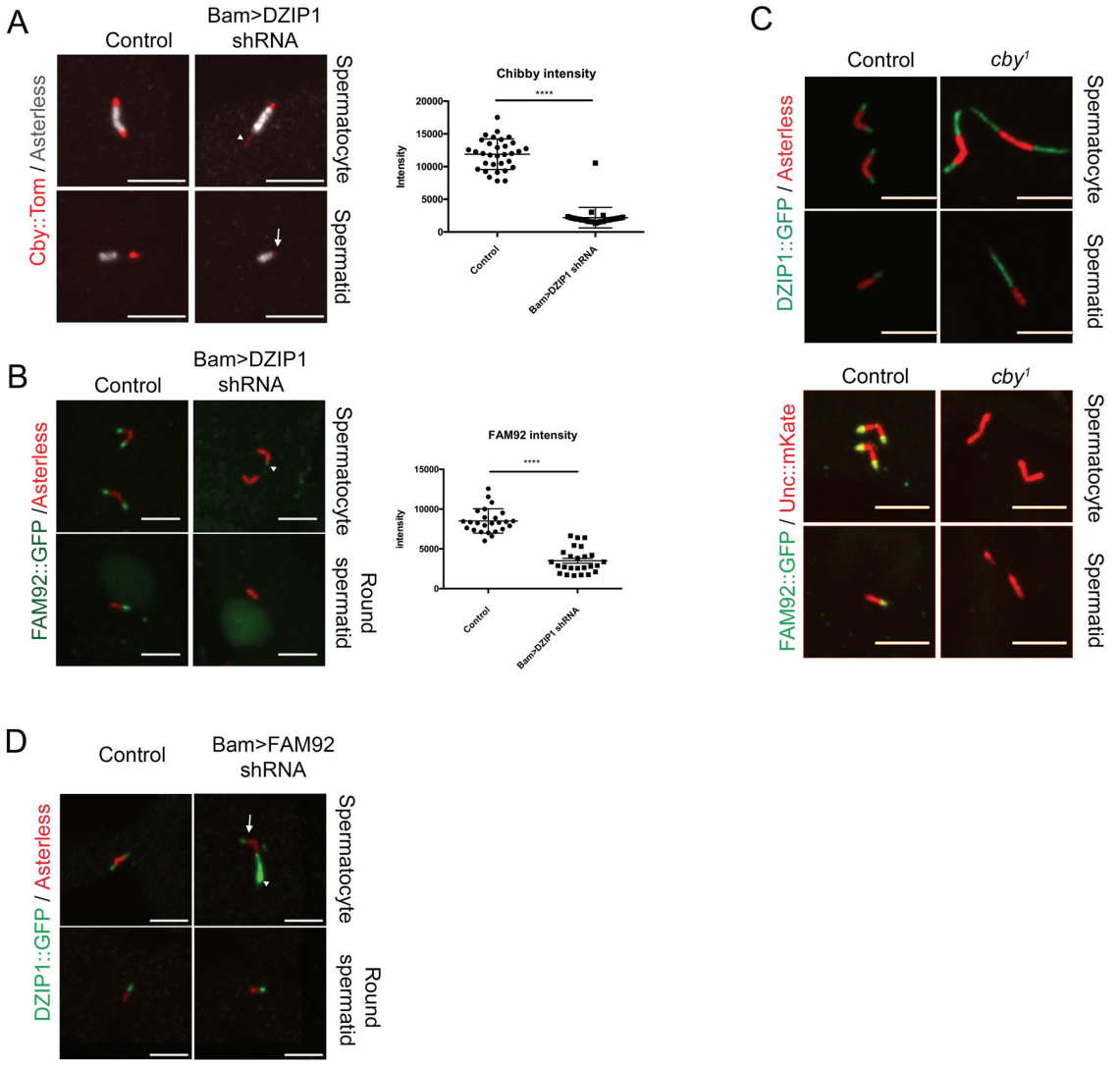


Figure 7

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.

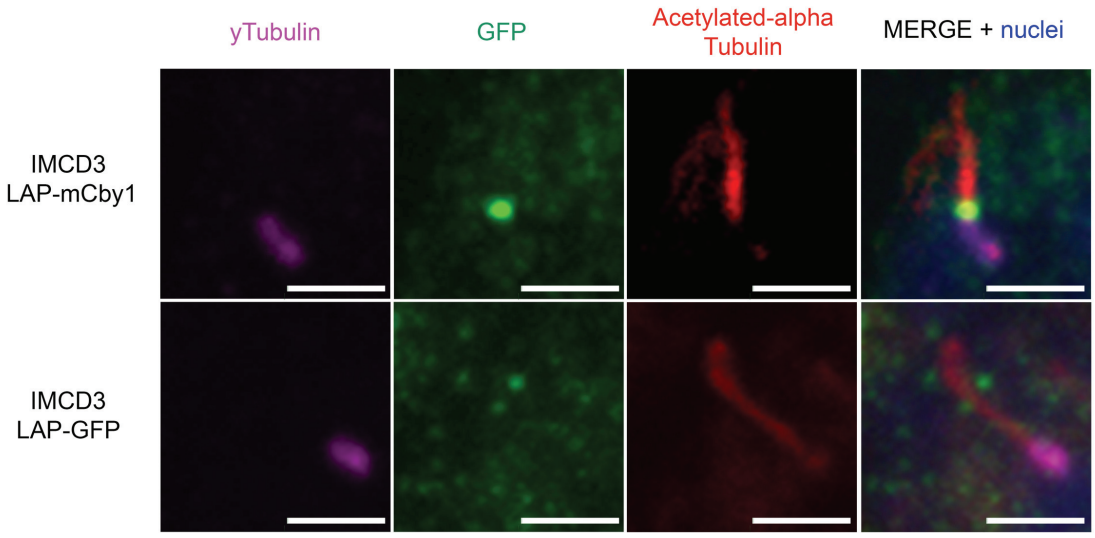


Figure S1

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

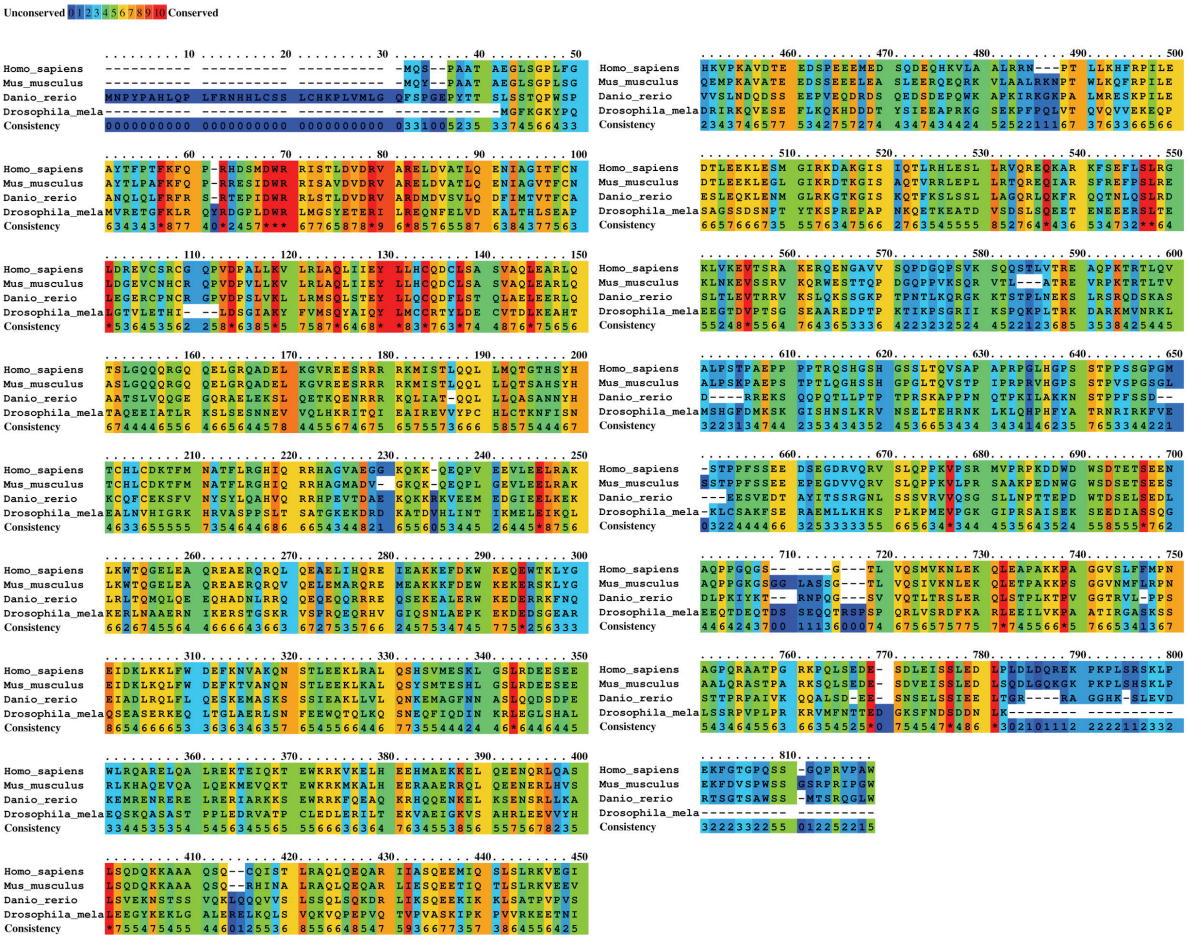


Figure S2

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.

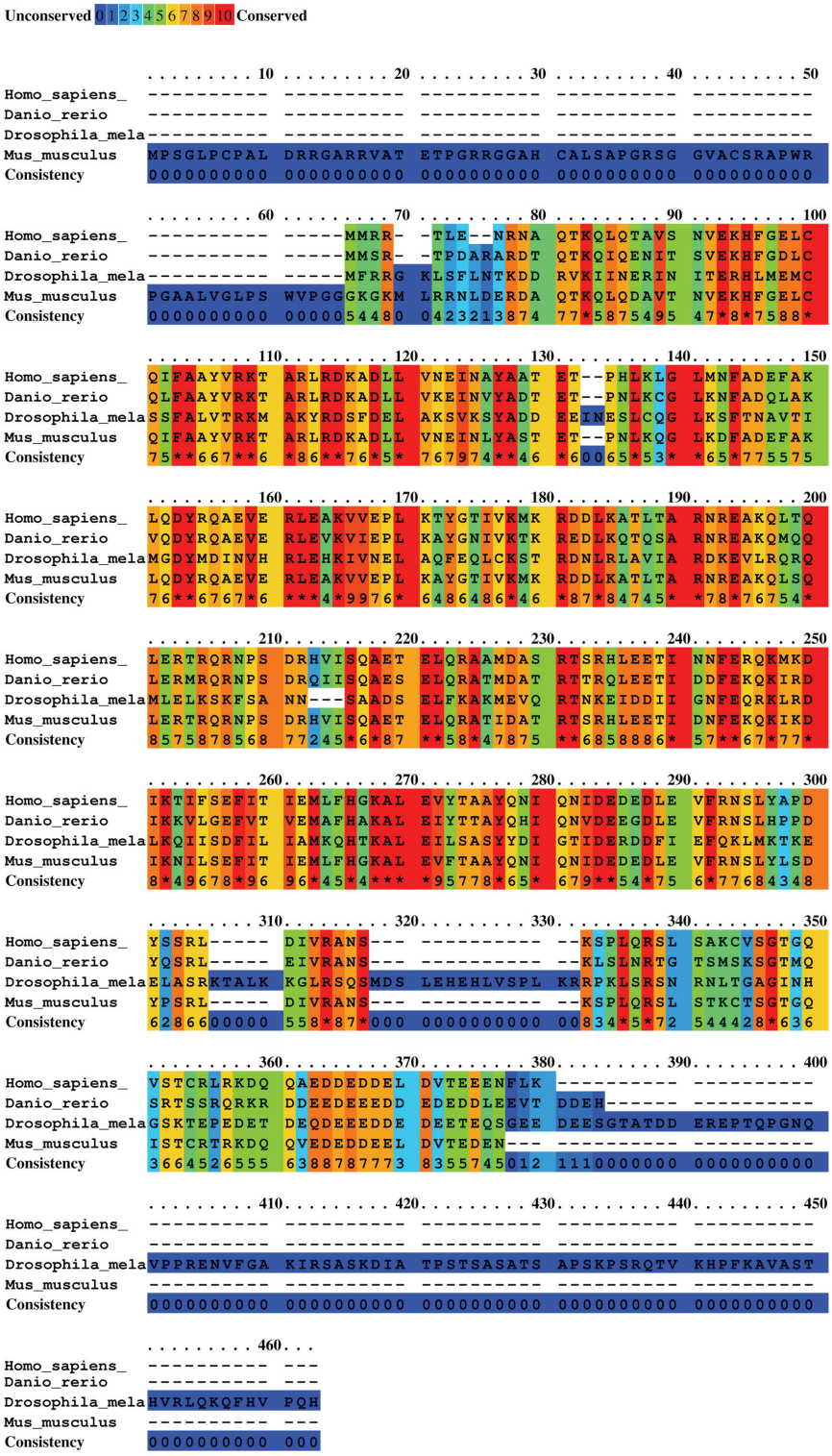


Figure S3

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.

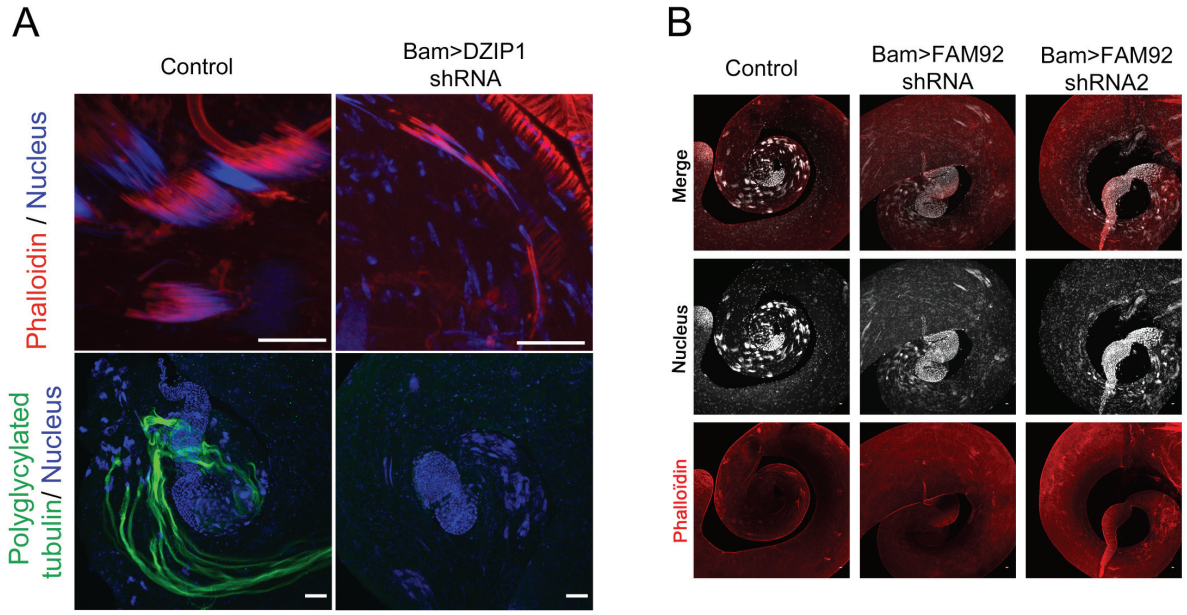


Figure S4

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.

Discussion générale et perspectives

L'ensemble de mes travaux de thèse a visé à comprendre les mécanismes d'assemblage de la zone de transition chez la drosophile, par le biais de l'étude des protéines orthologues des fibres de transition et par la caractérisation d'un nouveau complexe protéique de la ZT composé de Chibby, FAM92 et DZIP1L.

1) Etude des protéines orthologues des fibres de transition

L'assemblage de la ZT commence à être bien caractérisé chez la drosophile, cependant aucune étude ne montre le rôle des protéines des fibres de transition chez cet organisme. La drosophile apparaît comme un modèle intéressant pour la description fonctionnelle des protéines des fibres de transition puisque les appendices distaux sont absents des centrioles mais les protéines importantes chez les mammifères sont codées par le génome et conservées chez la drosophile. La drosophile possède 2 types de ciliogenèse : un mode d'assemblage compartimenté dans les cils des neurones sensoriels et cytosolique au cours de la spermatogenèse. Ces 2 types de ciliogenèse s'accompagnent de différences majeures puisque dans les cils sensoriels, des structures similaires aux fibres de transition ont été observées alors que les images de microscopie électronique au cours de la spermatogenèse révèlent clairement l'absence de fibres de transition (Vieillard et al. 2016). Comme de nombreuses protéines des fibres de transition sont conservées chez cet organisme, j'ai donc participé à une première analyse des orthologues des fibres de transition au cours de ma thèse. J'ai réalisé la caractérisation de certains orthologues des fibres de transition en choisissant les protéines ayant un rôle essentiel chez les mammifères dans un premier temps. L'étude des protéines orthologues chez la drosophile de SCLT1, CEP164 et TTBK2 n'a pu être réalisée au cours de cette étude et permettrait de donner une vue d'ensemble sur leurs localisations et fonctions chez la drosophile. La réalisation de drosophiles transgéniques pour SDCCAG8 et C2CD3 permettra de compléter le travail sur ces 2 orthologues dont la caractérisation fonctionnelle a déjà été initiée au cours de ces travaux.

Des nouveaux composants protéiques sont localisés à la ZT des cils dans les neurones sensoriels et au cours de la spermatogenèse

Les données que j'ai obtenues au cours de ma thèse révèlent une localisation à la base des cils des neurones sensoriels pour FBF1, CEP162 et CEP89. Mes résultats montrent que ces protéines semblent se localiser comme des protéines de la ZT et non pas comme des protéines présentes au niveau des fibres de transition. L'étude du recrutement de ces protéines, FBF1, CEP89 et CEP162 vis-à-vis des autres protéines de la ZT permettra de préciser leur dynamique au cours de la formation du cil. La caractérisation fonctionnelle de ces protéines sera nécessaire dans les cils des neurones sensoriels afin d'identifier un rôle d'ancrage du corps basal à la membrane plasmique.

L'étude en spermatogenèse révèle une localisation et un rôle nouveau, différents des

protéines des fibres de transition des mammifères. Seule la protéine CEP162 est présente à la ZT et son marquage ne se superpose pas à Chibby. Chibby se localise autour de l'anneau central de CEP162 en microscopie 3D-Sim. L'orthologue de FBF1 présente une localisation vésiculaire mais n'est jamais présent à proximité du centriole ou du cil. Une des protéines orthologues de ODF2, CG8851, est localisée en amont de la ZT dans des spermatides allongées. Ces protéines montrent donc une localisation différente des mammifères (Tanos et al. 2013), elles ne sont pas présentes au centriole au niveau des fibres de transition. Les corps basaux au cours de la spermatogenèse ne possèdent pas de fibres de transition, il semble donc possible que ces protéines, normalement présentes à la ZT, aient acquis une localisation différente et potentiellement des rôles différents chez la drosophile.

Au cours de ma thèse je me suis intéressée au rôle d'ancrage du corps basal à la membrane plasmique de ces protéines au cours de la spermatogenèse révélant un rôle clé dans l'initiation de la ciliogenèse de CEP162. J'ai mis en évidence qu'au cours de la spermatogenèse, CEP162 est directement ou indirectement impliquée dans l'ancrage des corps basaux à la membrane plasmique. Chez les mammifères, la perte de CEP162 entraine un arrêt avant l'assemblage de la ZT mais les premières étapes de la ciliogenèse et donc l'ancrage d'une vésicule aux appendices distaux ont lieu normalement (W. Wang et al. 2013). Il y a ainsi une différence entre ces 2 organismes et CEP162 semble avoir un rôle plus précoce d'ancrage du corps basal à la membrane chez la drosophile. Toutefois, en accord avec son rôle chez les mammifères, la protéine CEP162 joue un rôle permettant de limiter le domaine d'expression de certaines protéines de la ZT comme DZIP1L, FAM92 ou Chibby. Cependant, cette protéine n'influe pas sur la localisation de CEP290 et une nouvelle hiérarchie est donc en train d'être établie entre ces protéines. Des études au laboratoire sont en cours afin de préciser l'implication relative de ces protéines dans l'initiation de la ciliogenèse.

La perte de FBF1, SDCCAG8, C2CD3 et CEP89 conduit à un défaut de croissance de l'axonème dans les spermatides allongées. Au cours de la spermatogenèse, ces protéines jouent un rôle dans la ciliogenèse mais ces protéines ne semblent pas impliquées dans l'ancrage du centriole comme c'est le cas chez les mammifères (Tanos et al. 2013).

Enfin, les orthologues de ODF2 par l'analyse du double mutant des deux orthologues *CG8851* et *CG3213* révèlent une implication au cours de la spermatogenèse mais ne semblent pas affecter la ciliogenèse. L'étude de CG13405, le troisième orthologue de *ODF2* chez la drosophile pourrait peut-être révéler un rôle similaire de ODF2 chez les mammifères et même si la conservation est moins forte, on ne peut pas exclure que seul cet orthologue pourrait jouer un rôle dans la ciliogenèse.

Ces données révèlent une architecture différente de la ZT des cils dans les neurones sensoriels et au cours de la spermatogenèse. La composition moléculaire et le mode d'assemblage sont différents dans ces 2 types de cil. L'implication des protéines de la ZT dans l'assemblage de cette structure dans les 2 types de cellules ciliées devra être

approfondie. Nous avons révélé un rôle d'ancrage du corps basal à la membrane plasmique pour une des protéines orthologue des protéines des fibres de transition, pour les autres nous avons montré une implication dans la ciliogenèse. Enfin la caractérisation de ODF2 révèle un nouveau rôle chez la drosophile.

Est-ce que ces protéines jouent un premier rôle de barrière de diffusion chez la drosophile ?

Chez les mammifères, la barrière de diffusion des cils permet de séparer le compartiment ciliaire du reste de la cellule. Il a été montré chez les mammifères que la première structure qui joue le rôle de filtre est les fibres de transition (Madhivanan and Aguilar 2014).

L'étude réalisée au cours de ma thèse ne permet pas de répondre à la question de barrière de diffusion à la base de ces cils, il faudrait regarder à la fois dans les cils des neurones sensoriels et au cours de la spermatogenèse le rôle de ces protéines en tant que filtre du compartiment ciliaire.

Dans les neurones sensoriels, il est possible que les protéines de la ZT jouent un rôle de barrière de diffusion comme chez les mammifères. 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. Dans le mutant *cby*, il y a une perturbation de la localisation dans le cil de protéines de l'IFT ou couplée à l'IFT, IFT88 et ARL13B (Enjolras et al. 2012). L'analyse de protéines localisées uniquement dans le compartiment ciliaire comme les protéines de l'IFT (Fort and Bastin, 2014) permettra d'identifier le rôle dans la barrière ciliaire des protéines localisées à la ZT comme FBF1, CEP89 et CEP162 dans le cil des neurones sensoriels.

Une barrière de diffusion au cours de la spermatogenèse ?
Le ring centriole partage des similarités avec l'annulus du spermatozoïde de mammifères en permettant de séparer les 2 parties de l'axonème (Avidor reiss et al. 2015). L'annulus, une structure riche en Septine permet d'établir une barrière de diffusion entre la pièce principale et la pièce intermédiaire. Une étude montre que la souris mutante pour *Sept4* qui n'a pas d'annulus, ne permet plus de restreindre la localisation de la protéine Basigin normalement contenue uniquement dans la pièce principale (Kwitny et al. 2010).
Chez la drosophile, une seule étude montre pour l'instant un rôle possible des protéines de la ZT du module MKS et CEP290 comme jouant un rôle de barrière de diffusion au niveau du ring centriole dans les spermatides allongées (Basiri et al. 2014). Le compartiment membranaire entourant le ring centriole est mis en évidence par une sensibilité à des détergents plus ou moins forts et révèle potentiellement une composition membranaire différente. Mais pour l'instant, aucune protéine n'a été identifiée comme enrichie dans le compartiment membranaire après le ring centriole. Pour l'instant, aucun autre moyen ne permet de tester la diffusion des protéines dans les spermatocytes ou les spermatides.

En savoir davantage sur les étapes précoces de la ciliogenèse afin d'identifier l'implication des protéines orthologues des protéines des fibres de transition

Les premières étapes de la ciliogenèse dans le système nerveux périphérique n'ont jamais été détaillées et l'ancrage de vésicules au corps basal n'a jamais permis d'identifier si les appendices distaux sont présents au centriole. Il est possible que les fibres de transition soient formées après l'ancrage du corps basal à la membrane plasmique et jouent le rôle de maintien mais ne soient pas impliquées dans l'initiation de l'ancrage.
Dans l'équipe nous nous intéressons à ces étapes précoces en étudiant la localisation et la fonction des orthologues des protéines Rab8 et Rab11, nécessaires aux étapes précoces de la ciliogenèse pour l'ancrage de vésicules au niveau des appendices distaux chez les mammifères.
Cependant, les données préliminaires réalisées dans l'équipe chez la drosophile ne sont pas complètement en accord avec les observations chez les mammifères. 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, Rab8 se localise au niveau du capuchon ciliaire, mais il semblerait qu'elle ne soit recrutée qu'à partir du stade spermatide (Vieillard et al. 2016). 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. Le rôle de Rab8 semble donc différent de sa fonction chez les mammifères, puisqu'elle n'est pas impliquée dans les étapes précoces de la ciliogenèse. 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. En effet, malgré le rôle décrit de Rab8 en cellules en culture, le double mutant murin *Rab8a* et *b* ne montre pas de défaut de ciliogenèse (Sato et al. 2014).

Les protéines SNAP29 et EHD1 sont impliquées dans la fusion des membranes pour la formation de la vésicule ciliaire primitive au niveau des appendices distaux chez les mammifères (Lu et al. 2015). Chez la drosophile, il existe un orthologue pour chacune de ces protéines mais si l'analyse de SNAP29 dans les tissus ciliés n'a pas été réalisée (Morelli et al. 2014) ; une étude chez la drosophile montre que la protéine EHD1 est nécessaire pour l'individualisation des spermatides mais aucune donnée n'est indiquée concernant la ciliogenèse dans les neurones sensoriels et au cours de la spermatogenèse. De plus la localisation dans les tissus ciliés chez la drosophile n'a pas été réalisée (Olswang-Kutz et al. 2009).

La compréhension de l'ensemble des premières étapes de la ciliogenèse chez la drosophile permettra de proposer un modèle d'assemblage au cours de l'ancrage similaire ou différent de celui décrit chez les mammifères.

2) Etude des protéines identifiées comme potentiel interacteur de Chibby par le crible double hybride

Ce crible double hybride a été réalisé afin d'identifier des nouveaux partenaires de Chibby au cours de la spermatogenèse dans le but de comprendre le rôle de Chibby à la zone de transition. Comment Chibby est reliée aux autres protéines connues de la zone de transition et par quel mécanisme la zone de transition au cours de la spermatogenèse est dynamique au cours de la croissance de l'axonème ?

Les protéines identifiées par le crible double hybride apportent des nouvelles connaissances sur les étapes terminales de la spermatogenèse

Parmi les protéines identifiées par le crible double hybride, j'ai analysé les protéines CG3213 (orthologue de ODF2), CG5987 (orthologue de TTLL13) et Salto (protéine non conservée chez les mammifères). Ces protéines identifiées par ce crible ont été testées et aucune d'elles n'est une protéine localisée à la ZT ou joue un rôle dans la ciliogenèse.

Cependant, ce crible a permis de mettre en évidence des protéines qui semblent exclusivement restreintes à la spermatogenèse et jouant un rôle dans les mécanismes d'individualisation des spermatides. L'analyse du mutant *TTLL13* révèle un phénotype similaire à celui du double mutant ODF2 et pourrait potentiellement agir dans la même voie nécessaire à la migration des cônes d'actine au cours de l'individualisation des spermatides.
L'analyse du mutant *Salto* révèle l'implication de cette protéine dans la morphogenèse des noyaux dans des spermatides allongées. Cette protéine semble plus particulièrement jouer un rôle à la manchette.

Cette technique destinée à identifier des partenaires de Chibby chez la drosophile ne s'est pas révélée efficace puisque parmi les protéines identifiées dans ce crible seule l'interaction de 2 protéines avec Chibby a été confirmée en co-immunoprécipitation dans l'équipe mais leur localisation ne semble pas restreinte à la ZT au cours de la spermatogenèse. Le fait que certaines interactions n'aient pas été validées n'exclut pas une interaction potentielle mais suggère que les conditions d'immunoprécipitation qui ont été utilisées n'étaient pas optimales. En effet, Salto est présent d'une manière transitoire à la ZT dans des spermatocytes jeunes et peut donc potentiellement interagir avec Chibby. Cette potentielle interaction entre Chibby et Salto n'est cependant pas nécessaire pour recruter les protéines entre elles, en effet, j'ai montré que Chibby n'est pas nécessaire à recruter Salto au cours de la spermatogenèse et *vice versa*.
TTLL13 n'est, à la différence de Salto, jamais présente dans le même compartiment cellulaire que Chibby, l'interaction entre TTLL13 et Chibby pourrait alors être un faux positif du crible double hybride.
De part l'étude fonctionnelle de *TTLL13* et *Salto*, il apparaît donc que la potentielle interaction avec Chibby ne soit pas nécessaire pour la fonction de Chibby dans la ciliogenèse.

L'étude de ces mutants, *ODF2*, *TTLL13* et *Salto* apporte donc des connaissances nouvelles sur la spermatogenèse et le processus d'individualisation mais ne permet pas de répondre à notre question initiale sur le rôle de Chibby et ses partenaires à la ZT.

3) Etude du nouveau complexe protéique composé de Chibby, FAM92 et DZIP1L

Parallèlement à l'analyse des résultats obtenus par le crible double hybride ne permettant pas de répondre à la question initiale du rôle de Chibby à la ZT, dans l'équipe, une analyse protéomique a été réalisé en utilisant la technique LAP-Tag en cellule de mammifères (IMCD3), exprimant de façon stable la protéine CBY1 afin d'identifier des partenaires. Ce crible a permis d'identifier plusieurs candidats et notamment les protéines DZIP1L et FAM92.

Les protéines Chibby, FAM92 et DZIP1L forment un nouveau complexe fonctionnel de la ZT

FAM92 et DZIP1L ont été récemment découvertes comme des protéines de la ZT (F.-Q. Li et al. 2016; Lu et al. 2017). FAM92 a également été identifiée comme un partenaire de Chibby (F.-Q. Li et al. 2016). Nos résultats sont en accord avec ces données puisque nous montrons que FAM92 et DZIP1L sont des protéines conservées de la ZT chez la drosophile. L'étude que j'ai réalisée dans l'équipe permet de compléter le travail d'un autre doctorant de l'équipe sur la compréhension de ce nouveau module. Nous avons ainsi, ensemble, identifié et montré le rôle d'un nouveau module protéique incluant CBY, DZIP1L et FAM92, nécessaire à l'assemblage de la zone de transition et plus généralement des cils et des flagelles chez la drosophile. L'interaction entre DZIP1L et FAM92 est en cours dans le laboratoire afin de préciser les relations de ce complexe. Afin de compléter l'identification des partenaires de ce complexe et pour permettre de le relier au complexe existant, il serait intéressant de poursuivre des approches biochimiques pour comprendre l'architecture de la ZT.

4) **Perspectives : identification de nouveaux partenaires afin de compléter l'étude du module de Chibby**

Dans le but de relier le nouveau complexe identifié Cby, FAM92 et DZIP1, au laboratoire une expérience de marquage de proximité en fusionnant Cby à l'ascorbate peroxidase (APEX) chez la drosophile est en cours de réalisation. L'APEX biotinyle toutes les protéines environnantes dans un rayon de 20 nm, ceci permettra d'identifier de nouveaux partenaires de Cby qui sont impliqués dans l'assemblage de ce complexe et devrait confirmer la proximité de FAM92 et DZIP1L avec Chibby. Ceci permettra également de réaliser une cartographie de ce compartiment de la zone de transition à proximité de Chibby. Etant donné que la biotinylation est activable par l'ajout d'H_2O_2, il est 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 à différents stades de développement pour obtenir des informations quant à l'environnement protéique autour de Chibby au cours de

l'assemblage, de la migration et de la maintenance de la ZT.
De plus, la réalisation de ce crible à la fois dans les neurones sensoriels et au cours de la spermatogenèse apportera des données sur les similitudes et les différences entre la ZT dans les 2 types de ciliogenèse : compartimentée et cytosolique.
Cette étude va donc identifier des nouvelles protéines de la ZT et potentiellement des protéines de fibres de transition.

Conclusion

En conclusion générale, mes travaux de thèse ont permis de préciser les mécanismes de l'assemblage de la zone de transition en étudiant à la fois les protéines orthologues des fibres de transition et le module protéique de Chibby.
Dans un contexte plus général, l'ensemble de ces résultats ont permis de préciser les mécanismes d'assemblage et le fonctionnement des cils chez la drosophile.
Mes travaux de thèse ont permis de montrer qu'une protéine des fibres de transition, CEP162, est nécessaire à l'ancrage des corps basaux dans les cils des spermatocytes chez la drosophile et que les autres orthologues jouent un rôle dans la croissance de l'axonème. J'ai également montré qu'une nouvelle protéine de la zone de transition chez la drosophile, FAM92, est nécessaire à l'ancrage des corps basaux et que, d'une manière plus générale, les protéines de la zone de transition chez la drosophile semblent jouer un rôle d'ancrage similaire aux protéines des fibres de transition chez les mammifères.
D'autre part, mes travaux ont contribué à identifier les limites de l'approche double hybride dans le but d'identifier des partenaires de Chibby.

De nouvelles approches protéomiques permettront, sans aucun doute, la découverte de protéines impliquées à la zone de transition et leur caractérisation fonctionnelle permettra de mieux comprendre les mécanismes d'assemblage de la zone de transition et de mettre en lumière la complexité du degré de conservation fonctionnelle chez la drosophile et chez les mammifères.

Références bibliographiques

Absalon, Sabrina et al. 2008. “Flagellum Elongation Is Required for Correct Structure, Orientation and Function of the Flagellar Pocket in Trypanosoma Brucei.” *Journal of Cell Science* 121:3704–16.

Albert, Jörg T. and Martin C. Göpfert. 2015. “Hearing in Drosophila.” *Current Opinion in Neurobiology* 34:79–85.

Anderson, R. G. and C. E. Hein. 1977. “Distribution of Anionic Sites on the Oviduct Ciliary Membrane.” *The Journal of Cell Biology* 72(2):482–92.

Aram, Lior et al. 2016. “A Krebs Cycle Component Limits Caspase Activation Rate through Mitochondrial Surface Restriction of CRL Activation.” *Developmental Cell* 37(1):15–33.

Arama, Eli, Julie Agapite, and Hermann Steller. 2003. “Caspase Activity and a Specific Cytochrome C Are Required for Sperm Differentiation in Drosophila.” *Developmental Cell* 4:687–97.

Arama, Eli, Maya Bader, Gabrielle E. Rieckhof, and Hermann Steller. 2007. “A Ubiquitin Ligase Complex Regulates Caspase Activation during Sperm Differentiation in Drosophila.” *PLoS Biology* 5(10):2270–87.

Aubusson-Fleury, Anne et al. 2012. “The Conserved Centrosomal Protein FOR20 Is Required for Assembly of the Transition Zone and Basal Body Docking at the Cell Surface.” *Journal of Cell Science* 125(Pt 18):4395–4404.

Avidor-Reiss, Tomer and Michel R. Leroux. 2015. “Shared and Distinct Mechanisms of Compartmentalized and Cytosolic Ciliogenesis.” *Current Biology : CB* 25(23):R1143-50.

Awata, Junya et al. 2014. “NPHP4 Controls Ciliary Trafficking of Membrane Proteins and Large Soluble Proteins at the Transition Zone.” *Journal of Cell Science* 127(Pt 21):4714–27.

Azimzadeh, Juliette and Michel Bornens. 2007. “Structure and Duplication of the Centrosome.” *Journal of Cell Science* 120(Pt 13):2139–42.

Azimzadeh, Juliette and Wallace F. Marshall. 2010. “Building the Centriole.” *Current Biology* 20(18):R816–25.

Bader, Maya, Eli Arama, and Hermann Steller. 2010. “A Novel F-Box Protein Is Required for Caspase Activation during Cellular Remodeling in Drosophila.” *Development* 137(10):1679–88.

Badgandi, Hemant B., Sun Hwang, Issei S. Shimada, Evan Loriot, and Saikat Mukhopadhyay. 2017. “Tubby Family Proteins Are Adapters for Ciliary Trafficking of Integral Membrane Proteins.” 216(3):743–60.

Baker, James D., Sreedevi Adhikarakunnathu, and Maurice J. Kernan. 2004. “Mechanosensory-Defective, Male-Sterile Unc Mutants Identify Anovel Basal Body Protein Required for Ciliogenesis inDrosophila.” *Development* 131(14):3411–22.

Barbelanne, Marine, Delowar Hossain, David Puth Chan, Johan Peränen, and William Y. Tsang. 2015. “Nephrocystin Proteins NPHP5 and Cep290 Regulate BBSome Integrity, Ciliary Trafficking and Cargo Delivery.” *Human Molecular Genetics* 24(8):2185–2200.

Basiri, Marcus L. et al. 2014. “A Migrating Ciliary Gate Compartmentalizes the Site of Axoneme Assembly in Drosophila Spermatids.”

Basto, Renata et al. 2006. “Flies without Centrioles.” *Cell* 125(7):1375–86.

Bate, Michael and Alfonso Martinez Arias. 1993. *The Development of Drosophila Melanogaster*.

Beales, Phil and Peter K. Jackson. 2012. “Cilia - the Prodigal Organelle.” *Cilia* 1(1):1.
Bechstedt, S., J. T. Albert, D. P. Kreil, and J. Howard. 2010. “A Doublecortin Containing Microtubule-Associated Protein Is Implicated in Mechanotransduction in Drosophila Sensory Cilia.”
Bengueddach, Hakim, Michel Lemullois, Anne Aubusson-Fleury, and France Koll. 2017. “Basal Body Positioning and Anchoring in the Multiciliated Cell Paramecium Tetraurelia: Roles of OFD1 and VFL3.” *Cilia* 6(1):6.
Benmerah, Alexandre. 2014. “La Poche Ciliaire: Fruit Des Liaisons Du Centrosome Avec Le Trafic Vésiculaire.” *Medecine/Sciences* 30(11):962–67.
Benmerah, Alexandre. 2013. “The Ciliary Pocket.” *Current Opinion in Cell Biology* 25(1):1–7.
Berbari, Nicolas F., Amber K. O. Connor, Courtney J. Haycraft, and Bradley K. Yoder. 2010. “The Primary Cilium as a Complex Signaling Center.” 19(13):1–21.
Bertelli, E. and M. Regoli. 1994. “A Morphological Study of the Primary Cilia in the Rat Pancreatic Ductal System: Ultrastructural Features and Variability.” *Acta Anatomica* 151(3):194–97.
Blacque, Oliver E. and Anna A. W. M. Sanders. 2014. “Compartments within a Compartment: What C. Elegans Can Tell Us about Ciliary Subdomain Composition, Biogenesis, Function, and Disease.” *Organogenesis* 10(1):126–37.
Bloodgood, Robert A. 2009. *Background From Central to Rudimentary to Primary : The History of an Underappreciated Organelle Whose Time Has Come . The Primary Cilium*. Vol. 94. First edit. Elsevier.
Blum, Martin, Axel Schweickert, Philipp Vick, Christopher Wright, and Michael Danilchik. 2014. “Symmetry Breakage in the Vertebrate Embryo: When Does It Happen and How Does It Work?” *Developmental Biology* 1–15.
Blum, Martin, Axel Schweickert, Philipp Vick, Christopher Wright, and Oregon Health. 2015. “Symmetry Breakage in the Vertebrate Embryo: When Does It Happen and How Does It Work?” 393(1):109–23.
Boekhoff-falk, Grace and Daniel F. Eberl. 2014. “The Drosophila Auditory System.” 3(April).
Boisvieux-Ulrich, E., M. C. Lainé, and D. Sandoz. 1990. “Cytochalasin D Inhibits Basal Body Migration and Ciliary Elongation in Quail Oviduct Epithelium.” *Cell and Tissue Research* 259(3):443–54.
Bonnafe, E. et al. 2004. “The Transcription Factor RFX3 Directs Nodal Cilium Development and Left-Right Asymmetry Specification.” *Molecular and Cellular Biology* 24(10):4417–27.
Bornens, Michel. 2012. “The Centrosome in Cells and Organisms.” *Science* 335(6067):422–26.
Braun, Daniela A. and Friedhelm Hildebrandt. 2017. “Ciliopathies.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9(3):a028191.
Breslow, David K., Elena F. Koslover, Federica Seydel, Andrew J. Spakowitz, and Maxence V Nachury. 2013. “An in Vitro Assay for Entry into Cilia Reveals Unique Properties of the Soluble Diffusion Barrier.” *The Journal of Cell Biology* 203(1):129–47.
Brodland, G.Wayne et al. 2010. “Video Force Microscopy Reveals the Mechanics of Ventral Furrow Invagination in Drosophila.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(51):22111–16.
Bujakowska, Kinga M., Qin Liu, and Eric A. Pierce. 2017. “Photoreceptor Cilia and Retinal Ciliopathies.”

Burke, Michael C. et al. 2014. “Chibby Promotes Ciliary Vesicle Formation and Basal Body Docking during Airway Cell Differentiation.” *Journal of Cell Biology* 207(1):123–37.
Cajánek, Lukáš and Erich a Nigg. 2014. “Cep164 Triggers Ciliogenesis by Recruiting Tau Tubulin Kinase 2 to the Mother Centriole.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(28):E2841-50.
Carbajal-González, Blanca I. et al. 2013. “Conserved Structural Motifs in the Central Pair Complex of Eukaryotic Flagella.” 148(6):895–901.
Carvalho-Santos, Z., J. Azimzadeh, J. B. Pereira-Leal, and M. Bettencourt-Dias. 2011. “Evolution: Tracing the Origins of Centrioles, Cilia, and Flagella.” *The Journal of Cell Biology* 194(2):165–75.
Carvalho-Santos, Zita et al. 2012. “BLD10/CEP135 Is a Microtubule-Associated Protein That Controls the Formation of the Flagellum Central Microtubule Pair.” *Developmental Cell* 23(2):412–24.
Cavalier-Smith, T. 2002. “The Phagotrophic Origin of Eukaryotes and Phylogenetic Classification of Protozoa Introduction : Revising the Neomuran Theory of the Origin of Eukaryotic Cells.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52(31):297–354.
Chang, Jaerak et al. 2013. “Essential Role of Cenexin1, but Not Odf2, in Ciliogenesis.” *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 12(4):655–62.
Chang, P., T. H. Giddings Jr., M. Winey, and T. Stearns. 2003. “Epsilon-Tubulin Is Required for Centriole Duplication and Microtubule Organization.” *Nat Cell Biol* 5(1):71–76.
Chauvet, Veronique et al. 2004. “Mechanical Stimuli Induce Cleavage and Nuclear Translocation of the Polycystin-1 C Terminus.” *Journal of Clinical Investigation* 114(10):1433–43.
Chávez, Marcelo et al. 2015. “Modulation of Ciliary Phosphoinositide Content Regulates Trafficking and Sonic Hedgehog Signaling Output.” *Developmental Cell* 34(3):338–50.
Chen, Jieyan V et al. 2015. “Rootletin Organizes the Ciliary Rootlet to Achieve Neuron Sensory Function in Drosophila.” 211(2):435–53.
Chen, Zhihong, Vahan B. Indjeian, Michael McManus, Leyu Wang, and Brian David Dynlacht. 2002. “CP110, a Cell Cycle-Dependent CDK Substrate, Regulates Centrosome Duplication in Human Cells.” *Developmental Cell* 3(3):339–50.
Chih, Ben et al. 2011. “A Ciliopathy Complex at the Transition Zone Protects the Cilia as a Privileged Membrane Domain.” *Nature Cell Biology* 14(1):61–72.
Chih, Ben et al. 2012. “A Ciliopathy Complex at the Transition Zone Protects the Cilia as a Privileged Membrane Domain.” *Nature Cell Biology* 14(1):61–72.
Clare, Daniel K. et al. 2014. “Basal Foot MTOC Organizes Pillar MTs Required for Coordination of Beating Cilia.”
Comartin, David et al. 2013. “CEP120 and SPICE1 Cooperate with CPAP in Centriole Elongation.” 1360–66.
Coppieters, Frauke, Steve Lefever, Bart P. Leroy, and Elfride De Baere. 2010. “CEP290, a Gene with Many Faces: Mutation Overview and Presentation of CEP290base.” *Human Mutation* 31(10):1097–1108.
Craige, Branch et al. 2010. “CEP290 Tethers Flagellar Transition Zone Microtubules to the Membrane and Regulates Flagellar Protein Content.” *Journal of Cell Biology* 190(5):927–40.
Czarnecki, Peter G. and Jagesh V Shah. 2012. “The Ciliary Transition Zone: From

Morphology and Molecules to Medicine." *Trends in Cell Biology* 22(4):201–10.
D'Brot, Alejandro et al. 2013. "Tango7 Directs Cellular Remodeling by the Drosophila Apoptosome." *Genes and Development* 27(15):1650–55.
Dalen, Helge. 1983. "An Ultrastructural Study of the Tracheal Epithelium of the Guinea-Pig with Special Reference to the Ciliary Structure." *J Anat* 136(Pt 1):47–67.
Dallai, R. et al. 2010. "The Spermatogenesis and Sperm Structure of Acerentomon Microrhinus (Protura, Hexapoda) with Considerations on the Phylogenetic Position of the Taxon." *Zoomorphology* 129(1):61–80.
Dam, Anika H. et al. 2011. "Morphology of Partial Globozoospermia." *Journal of Andrology* 32(2):199–206.
Damerla, Rama Rao et al. 2015. "Novel Jbts17 Mutant Mouse Model of Joubert Syndrome with Cilia Transition Zone Defects and Cerebellar and Other Ciliopathy Related Anomalies." *Human Molecular Genetics* 24(14):3994–4005.
Dasgupta, Agnik and Jeffrey D. Amack. 2016. "Cilia in Vertebrate Left–right Patterning." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371(1710).
Dawson, Scott C. and Susan A. House. 2010. "Life with Eight Flagella: Flagellar Assembly and Division in Giardia." *Current Opinion in Microbiology* 13(4):480–90.
Debec, Alain, Christiane Marcaillou, Yves Bobinnec, and Caroline Borot. 1999. "The Centrosome Cycle in Syncytial Drosophila Embryos Analyzed by Energy Filtering Transmission Electron Microscopy." *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 91(4–5):379–91.
Delgehyr, Nathalie et al. 2012. "Klp10A, a Microtubule-Depolymerizing Kinesin-13, Cooperates with CP110 to Control Drosophila Centriole Length." *Current Biology* 22(6):502–9.
Delgehyr, Nathalie, James Sillibourne, and Michel Bornens. 2005. "Microtubule Nucleation and Anchoring at the Centrosome Are Independent Processes Linked by Ninein Function." *Journal of Cell Science* 118(Pt 8):1565–75.
Dentler, William L. 1984. "Attachment of the Cap to the Central Microtubules of Tetrahymena Cilia." *Journal of Cell Science* 66(1):167–73.
Dentler, William L. and Joel L. Rosenbaum. 1977. "Flagellar Elongation and Shortening in Chlamydomonas. III. Structures Attached to the Tips of Flagellar Microtubules and Their Relationship to the Directionality of Flagellar Microtubule Assembly." *Journal of Cell Biology* 74(3):747–59.
Desai, Bela S., Seema Shirolikar, and Krishanu Ray. 2009. "F-Actin-Based Extensions of the Head Cyst Cell Adhere to the Maturing Spermatids to Maintain Them in a Tight Bundle and Prevent Their Premature Release in Drosophila Testis." *BMC Biology* 7:19.
DeVorkin, Lindsay et al. 2014. "The Drosophila Effector Caspase Dcp-1 Regulates Mitochondrial Dynamics and Autophagic Flux via SesB." *Journal of Cell Biology* 205(4):477–92.
Dishinger, John F. et al. 2010. "Ciliary Entry of the Kinesin-2 Motor KIF17 Is Regulated by Importin-beta2 and RanGTP." *Nature Cell Biology* 12(7):703–10.
Dowdle, William E. et al. 2011. "Disruption of a Ciliary B9 Protein Complex Causes Meckel Syndrome." *American Journal of Human Genetics* 89(1):94–110.
Dubruille, Raphaelle et al. 2002. "Drosophila Regulatory Factor X Is Necessary for Ciliated Sensory Neuron Differentiation." *Development* 129(23):5487–98.
Dutcher, Susan K. and Eileen T. O'Toole. 2016. "The Basal Bodies of Chlamydomonas Reinhardtii." *Cilia* 5:18.
Dute, Roland and Ching Kung. 1978. "CILIA IN OF THE REGION OF PARAMECIUM

TETRA URELIA From the Laboratory of Molecular Biology and the Department of Genetics , University of Wisconsin , Polycationic Ferritin." *Cell*.
Enjolras, Camille et al. 2012. "Drosophila Chibby Is Required for Basal Body Formation and Ciliogenesis but Not for Wg Signaling." *The Journal of Cell Biology* 197(2):313–25.
Eren-Ghiani, Zeynep, Christina Rathke, Ina Theofel, and Renate Renkawitz-Pohl. 2015. "Prtl99C Acts Together with Protamines and Safeguards Male Fertility in Drosophila." *Cell Reports* 13(11):2327–35.
Fabian, Lacramioara et al. 2010. "Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Directs Spermatid Cell Polarity and Exocyst Localization in Drosophila." *Molecular Biology of the Cell* 21(22):4042–56.
Fabian, Lacramioara and Julie A. Brill. 2012. "Drosophila Spermiogenesis Big Things Come from Little Packages." (September):197–212.
Fabrizio, J. J., G. Hime, S. K. Lemmon, and C. Bazinet. 1998. "Genetic Dissection of Sperm Individualization in Drosophila Melanogaster." *Development (Cambridge, England)* 125:1833–43.
Failler, Marion et al. 2014. "Mutations of CEP83 Cause Infantile Nephronophthisis and Intellectual Disability." *American Journal of Human Genetics* 94(6):905–14.
Fairchild, Michael J., Christopher M. Smendziuk, and Guy Tanentzapf. 2014. "A Somatic Permeability Barrier around the Germline Is Essential for Drosophila Spermatogenesis." *Development (Cambridge, England)* 268–81.
Fan, Juan, Andrew D. Griffiths, Andrew Lockhart, Robert A. Cross, and Linda A. Amos. 1996. "Microtubule Minus Ends Can Be Labelled with a Phage Display Antibody Specific to Alpha-Tubulin." *Journal of Molecular Biology* 259(3):325–30.
Fawcett, D. W., E. M. Eddy, and D. M. Phillips. 1970. "Observations on the Fine Structure and Relationships of the Chromatoid Body in Mammalian Spermatogenesis." *Biology of Reproduction* 2(1):129–53.
Field, Christine M., Margaret Coughlin, Steve Doberstein, Thomas Marty, and William Sullivan. 2005. "Characterization of Anillin Mutants Reveals Essential Roles in Septin Localization and Plasma Membrane Integrity." *Development (Cambridge, England)* 132(12):2849–60.
Fisch, Cathy and Pascale Dupuis-Williams. 2011. "Ultrastructure of Cilia and Flagella - back to the Future!" *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 103(6):249–70.
Follit, John A., Richard A. Tuft, Kevin E. Fogarty, and Gregory J. Pazour. 2006. "The Intraflagellar Transport Protein IFT20 Is Associated with the Golgi Complex and Is Required for Cilia Assembly." *Molecular Biology of the Cell* 17(9):3781–92.
Fort, Cécile and Philippe Bastin. 2014. "Élongation De L ' Axonème Et Dynamique Du Transport Intraflagellaire." *Medecine/Sciences* 30:955–61.
Francia, Maria E., Jean-Francois Dubremetz, and Naomi S. Morrissette. 2015. "Basal Body Structure and Composition in the Apicomplexans Toxoplasma and Plasmodium." *Cilia* 5:3.
Fritz-Laylin, Lillian K. and Chandler Fulton. 2016. "Naegleria: A Classic Model for de Novo Basal Body Assembly." *Cilia* 5(1):10.
Fry, Andrew M., Michelle J. Leaper, and Richard Bayliss. 2014. "The Primary Cilium." *Organogenesis* 10(1):62–68.
Fu, Jingyan, Iain M. Hagan, and David M. Glover. 2015. "The Centrosome and Its Duplication Cycle." 1–35.
Fujita, Hiroki, Yuki Yoshino, and Natsuko Chiba. 2016. "Regulation of the Centrosome

Cycle." *Molecular & Cellular Oncology* 3(2):e1075643.
Fujiu, Kenta, Yoshitaka Nakayama, Ayaka Yanagisawa, Masahiro Sokabe, and Kenjiro Yoshimura. 2009. "Chlamydomonas CAV2 Encodes a Voltage- Dependent Calcium Channel Required for the Flagellar Waveform Conversion." *Current Biology* 19(2):133–39.
Gadadhar, Sudarshan, Satish Bodakuntla, Kathiresan Natarajan, and Carsten Janke. 2017. "The Tubulin Code at a Glance." 1347–53.
Garcia-gonzalo, Francesc R. et al. 2012. "A Transition Zone Complex Regulates Mammalian Ciliogenesis and Ciliary Membrane Composition." 43(8):776–84.
Garcia-Gonzalo, Francesc R. and Jeremy F. Reiter. 2016. "Open Sesame: How Transition Fibers and the Transition Zone Control Ciliary Composition." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* a028134.
Geng, Lin et al. 2006. "Polycystin-2 Traffics to Cilia Independently of Polycystin-1 by Using an N-Terminal RVxP Motif." *Journal of Cell Science* 119(Pt 7):1383–95.
Ghossoub, Rania, Anahi Molla-Herman, Philippe Bastin, and Alexandre Benmerah. 2011. "The Ciliary Pocket: A Once-Forgotten Membrane Domain at the Base of Cilia." *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 103(3):131–44.
Ghysen, Alain and Christine Dambly-Chaudière. 1995. "Le Développement Des Organes Sensoriels Chez La Drosophile." *Medecine/Sciences* 11:178–88.
Gibbons, I. R. and A. V Grimstone. 1960. "On Flagellar Structure in Certain Flagellates." *J Biophys Biochem Cytol* 7(4):697–716.
Gilula, Norton B. and Peter Satir. 1972. "The Ciliary Necklace: A Ciliary Membrane Specialization." *The Journal of Cell Biology* 53(2):494–509.
Glazer, Andrew M. et al. 2010. "The Zn Finger Protein Iguana Impacts Hedgehog Signaling by Promoting Ciliogenesis." *Developmental Biology* 337(1):148–56.
Goetz, Sarah C. and Kathryn V Anderson. 2010. "The Primary Cilium: A Signalling Centre during Vertebrate Development." *Nature Reviews. Genetics* 11(5):331–44.
Goetz, Sarah C., Karel F. Liem, and Kathryn V. Anderson. 2012. "The Spinocerebellar Ataxia-Associated Gene Tau Tubulin Kinase 2 Controls the Initiation of Ciliogenesis." *Cell* 151(4):847–58.
Gonçalves, João and Laurence Pelletier. 2017. "The Ciliary Transition Zone: Finding the Pieces and Assembling the Gate." *Molecules and Cells* 40(4):1–11.
Gönczy, Pierre. 2012. "Towards a Molecular Architecture of Centriole Assembly." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13(7):425–35.
Gopfert, MartinC and Daniel Robert. 2001. "Turning the Key on Drosophila Audition." 411(June):2001.
Gottardo, Marco, Giuliano Callaini, and Maria Giovanna Riparbelli. 2016. "Klp10A Modulates the Localization of Centriole-Associated Proteins during Drosophila Male Gametogenesis." *Cell Cycle* 15(24):3432–41.
Gottardo, Marco, Giuliano Callaini, and Maria Giovanna Riparbelli. 2015. "The Drosophila Centriole - Conversion of Doublets into Triplets within the Stem Cell Niche." *Journal of Cell Science* 128(June):2437–42.
Graser, Susanne et al. 2007. "Cep164, a Novel Centriole Appendage Protein Required for Primary Cilium Formation." *Journal of Cell Biology* 179(2):321–30.
Gromley, Adam et al. 2003. "A Novel Human Protein of the Maternal Centriole Is Required for the Final Stages of Cytokinesis and Entry into S Phase." *Journal of Cell Biology* 161(3):535–45.
Guan, Jikui, Makoto Kinoshita, and Li Yuan. 2009. "Spatiotemporal Association of

DNAJB13 with the Annulus during Mouse Sperm Flagellum Development." *BMC Developmental Biology* 9(1):23.
Habedanck, Robert, York-Dieter Stierhof, Christopher J. Wilkinson, and Erich a Nigg. 2005. "The Polo Kinase Plk4 Functions in Centriole Duplication." *Nature Cell Biology* 7(11):1140–46.
Hagiwara, Haruo, Nobuo Ohwada, and Takeo Aoki. 2008. "The Primary Cilia of Secretory Cells in the Human Oviduct Mucosa." 193–98.
Halachmi, Naomi, Atalya Nachman, and Adi Salzberg. 2016. "A Newly Identi Fi Ed Type of Attachment Cell Is Critical for Normal Patterning of Chordotonal Neurons." *Developmental Biology* 411(1):61–71.
Han, Young-Goo, Benjamin H. Kwok, and Maurice J. Kernan. 2003. "Intraflagellar Transport Is Required in Drosophila to Differentiate Sensory Cilia but Not Sperm." *Current Biology : CB* 13(19):1679–86.
Hartenstein. 1993. *Atlas of Drosophila Development*.
Hay, Bruce A., Jun R. Huh, and Ming Guo. 2004. "The Genetics of Cell Death: Approaches, Insights and Opportunities in Drosophila." *Nature Reviews Genetics* 5(12):911–22.
Hayes, Julie M. et al. 2007. "Identification of Novel Ciliogenesis Factors Using a New in Vivo Model for Mucociliary Epithelial Development." *Developmental Biology* 312(1):115–30.
He, Qian et al. 2012. "Characterization of an Apical Ceramide-Enriched Compartment Regulating Ciliogenesis." *Molecular Biology of the Cell* 23(Cv):3156–66.
Hicks, J. L., W. M. Deng, A. D. Rogat, K. G. Miller, and M. Bownes. 1999. "Class VI Unconventional Myosin Is Required for Spermatogenesis in Drosophila." *Molecular Biology of the Cell* 10(12):4341–53.
Hildebrandt, Friedhelm, Thomas Benzing, and Nicholas Katsanis. 2013. "Ciliopathies." 364(16):1533–43.
Hildebrandt, Friedhelm, Thomas Benzing, and Nicholas Katsanis. 2011. "Ciliopathies." *The New England Journal of Medicine* 364(16):1533–43.
Hinshaw, J. E. 2000. "Dynamin and Its Role in Membrane Fission." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16(1):483–519.
Hirota, Yuki et al. 2010. "Planar Polarity of Multiciliated Ependymal Cells Involves the Anterior Migration of Basal Bodies Regulated by Non-Muscle Myosin II." *Development* 137(18):3037–46.
Hodges, Matthew E., Nicole Scheumann, Bill Wickstead, Jane A. Langdale, and Keith Gull. 2010. "Reconstructing the Evolutionary History of the Centriole from Protein Components." *J Cell Sci* 123(Pt 9):1407–13.
Hong, Hyowon, Jongshin Kiim, and Joon Kim. 2015. "Myosin Heavy Chain 10 (MYH10) Is Required for Centriole Migration during the Biogenesis of Primary Cilia." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 461(1):180–85.
Horst, C. J., L. V Johnson, and J. C. Besharse. 1990. "Transmembrane Assemblage of the Photoreceptor Connecting Cilium and Motile Cilium Transition Zone Contain a Common Immunologic Epitope." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 17(4):329–44.
Hoyer-Fender, S., C. Petersen, H. Brohmann, K. Rhee, and D. J. Wolgemuth. 1998. "Mouse Odf2 cDNAs Consist of Evolutionary Conserved as Well as Highly Variable Sequences and Encode Outer Dense Fiber Proteins of the Sperm Tail." *Molecular Reproduction and Development* 51(2):167–75.
Hoyle, Henry D., F.Rudolf Turner, and Elizabeth C. Raff. 2008. "Axoneme-Dependent Tubulin Modifications in Singlet Microtubules of the Drosophila Sperm Tail." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 65(4):295–313.

Huang, Lijia et al. 2011. "TMEM237 Is Mutated in Individuals with a Joubert Syndrome Related Disorder and Expands the Role of the TMEM Family at the Ciliary Transition Zone." *American Journal of Human Genetics* 89(6):713–30.
Hubbert, Charlotte et al. 2002. "HDAC6 Is a Microtubule-Associated Deacetylase." *Nature* 417(6887):455–58.
Huh, Jun R. et al. 2004. "Multiple Apoptotic Caspase Cascades Are Required in Nonapoptotic Roles for Drosophila Spermatid Individualization." *PLoS Biology* 2(1).
Humbert, Melissa C. et al. 2012. "ARL13B, PDE6D, and CEP164 Form a Functional Network for INPP5E Ciliary Targeting." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(48):19691–96.
Hunnicutt, G. R., M. G. Kosfiszer, and W. J. Snell. 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(4):1605–16.
Hurd, T. W., S. Fan, and B. L. Margolis. 2011. "Localization of Retinitis Pigmentosa 2 to Cilia Is Regulated by Importin 2." *Journal of Cell Science* 124(5):718–26.
Hurst, Debra, Caroline M. Rylett, R.Elwyn Isaac, and Alan D. Shirras. 2003. "The Drosophila Angiotensin-Converting Enzyme Homologue Ance Is Required for Spermiogenesis." *Developmental Biology* 254:238–47.
Inoko, Akihito et al. 2012. "Trichoplein and Aurora A Block Aberrant Primary Cilia Assembly in Proliferating Cells." *The Journal of Cell Biology* 197(3):391–405.
Ishikawa, Hiroaki, Akiharu Kubo, Shoichiro Tsukita, and Sachiko Tsukita. 2005. "Odf2-Deficient Mother Centrioles Lack Distal/subdistal Appendages and the Ability to Generate Primary Cilia." *Nature Cell Biology* 7(5):517–24.
Jakobsen, Lis et al. 2011. "Novel Asymmetrically Localizing Components of Human Centrosomes Identified by Complementary Proteomics Methods." *The EMBO Journal* 30(8):1520–35.
Jana, Swadhin Chandra et al. 2016. "Drosophila Melanogaster as a Model for Basal Body Research." *Cilia* 5:22.
Janke, Carsten. 2014. "The Tubulin Code : Molecular Components , Readout Mechanisms , and Functions." 206(4):461–72.
Janke, Carsten, Jeannette Chloë Bulinski, and Jeannette Chloë Bulinski. 2011. "Post-Translational Regulation of the Microtubule Cytoskeleton: Mechanisms and Functions." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12(12):773–86.
Jarman, Andrew P. 2002. "Studies of Mechanosensation Using the Fly." *Human Molecular Genetics* 11(10):1215–18.
Jensen, Victor L. and Michel R. Leroux. 2017. "Gates for Soluble and Membrane Proteins, and Two Trafficking Systems (IFT and LIFT), Establish a Dynamic Ciliary Signaling Compartment." *Current Opinion in Cell Biology* 47:83–91.
Jiang, Si-Tse et al. 2008. "Targeted Disruption of Nphp1 Causes Male Infertility due to Defects in the Later Steps of Sperm Morphogenesis in Mice." *Human Molecular Genetics* 17(21):3368–79.
Joly, Dominique, Christophe Bressac, Danielle Jaillard, Daniel Lachaise, and Michel Lemullois. 2003. "The Sperm Roller : A Modified Testicular Duct Linked to Giant Sperm Transport within the Male Reproductive Tract." 142:348–55.
Joo, Kwangsic et al. 2013. "CCDC41 Is Required for Ciliary Vesicle Docking to the Mother Centriole." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(15):5987–92.
Al Jord, Adel et al. 2014. "Centriole Amplification by Mother and Daughter Centrioles

Differs in Multiciliated Cells." *Nature* 516(7529):104–7.
Kaplan, Yosef, Liron Gibbs-Bar, Yossi Kalifa, Yael Feinstein-Rotkopf, and Eli Arama. 2010. "Gradients of a Ubiquitin E3 Ligase Inhibitor and a Caspase Inhibitor Determine Differentiation or Death in Spermatids." *Developmental Cell* 19(1):160–73.
Karak, Somdatta et al. 2015. "Diverse Roles of Axonemal Dyneins in Drosophila Auditory Neuron Function and Mechanical Amplification in Hearing." (November):1–12.
Karamanou, M., E. Poulakou-Rebelakou, M. Tzetis, and G. Androutsos. 2010. "Anton van Leeuwenhoek (1632-1723): Father of Micromorphology and Discoverer of Spermatozoa." *Revista Argentina de Microbiologia* 42(4):311–14.
Kee, Hooi Lynn et al. 2012. "A Size-Exclusion Permeability Barrier and Nucleoporins Characterize a Ciliary Pore Complex That Regulates Transport into Cilia." *Nature Cell Biology* 14(4):431–37.
Keeling, Jacob, Leonidas Tsiokas, and Dipak Maskey. 2016. "Cellular Mechanisms of Ciliary Length Control." *Cells* 5(1):6.
Kernan, Maurice J. 2007. "Mechanotransduction and Auditory Transduction in Drosophila." *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 454(5):703–20.
Kessel, RG. and RH. Kardon. 1979. *Tissues and Organs: A Text Atlas of Scanning Electron Microscopyby R. G. Kessel and R. H. Kardon. San Francisco: W. H. Freeman.* Vol. 17. Elsevier.
Khire, Atul et al. 2016. "Centriole Remodeling during Spermiogenesis in Drosophila." *Current Biology* 26(23):3183–89.
Kierszenbaum, Abraham L. and Laura L. Tres. 2004. "The Acrosome-Acroplaxome-Manchette Complex and the Shaping of the Spermatid Head." *Archives of Histology and Cytology* 67(4):271–84.
Kim, Joon, Suguna Rani Krishnaswami, and Joseph G. Gleeson. 2008. "CEP290 Interacts with the Centriolar Satellite Component PCM-1 and Is Required for Rab8 Localization to the Primary Cilium." 17(23):3796–3805.
Kimura, Shuhei. 2013. "The Nap Family Proteins, CG5017/Hanabi and Nap1, Are Essential for Drosophila Spermiogenesis." *FEBS Letters* 587(7):922–29.
Kimura, Shuhei and Benjamin Loppin. 2016. "The Drosophila Chromosomal Protein Mst77F Is Processed to Generate an Essential Component of Mature Sperm Chromatin." *Open Biology* 6(11).
King, Stephen M. 2016. "Axonemal Dynein." *Cold Spring Harb Perspect Biol*.
Kitagawa, Daiju et al. 2011. "Structural Basis of the 9-Fold Symmetry of Centrioles." *Cell* 144(3):364–75.
Klos Dehring, Deborah A. et al. 2013. "Deuterosome-Mediated Centriole Biogenesis." *Developmental Cell* 27(1):103–12.
Knowles, Michael R., Maimoona Zariwala, and Margaret Leigh. 2016. "Primary Ciliary Dyskinesia." *Clinics in Chest Medicine* 37(3):449–61.
Kobayashi, Tetsuo and Brian D. Dynlacht. 2011. "Regulating the Transition from Centriole to Basal Body." *The Journal of Cell Biology* 193(3):435–44.
Koch, A., F. Poirier, R. Jacob, and D. Delacour. 2010. "Galectin-3, a Novel Centrosome-Associated Protein, Required for Epithelial Morphogenesis." *Molecular Biology of the Cell* 21(2):219–31.
Kodani, Andrew, Maria Salomé Sirerol-Piquer, Allen Seol, Jose Manuel Garcia-Verdugo, and Jeremy F. Reiter. 2013. "Kif3a Interacts with Dynactin Subunit p150 Glued to Organize Centriole Subdistal Appendages." *The EMBO Journal* 32(4):597–607.
Koerver, Lisa et al. 2016. "The de-Ubiquitylating Enzyme DUBA Is Essential for

Spermatogenesis in Drosophila." *Cell Death and Differentiation* 1–12.
Kott, Esther et al. 2013. "Loss-of-Function Mutations in RSPH1 Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Central-Complex and Radial-Spoke Defects." *American Journal of Human Genetics* 93(3):561–70.
Koyfman, A. Y. et al. 2011. "Structure of Trypanosoma Brucei Flagellum Accounts for Its Bihelical Motion." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(27):11105–8.
Kracklauer, Martin P. et al. 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(16):2763–72.
Kubo, Akiharu, Akiko Yuba-Kubo, Shoichiro Tsukita Sachiko Tsukita, and and Masayuki Amagai. 2008. "Sentan: A Novel Specific Component of the Apical Structure of Vertebrate Motile Cilia." *Molecular Biology of the Cell*.
Kumar, Dhivya et al. 2016. "Early Eukaryotic Origins for Cilia-Associated Bioactive Peptide-Amidating Activity." *Journal of Cell Science* 129(5):943–56.
Kunimoto, Koshi et al. 2012. "Coordinated Ciliary Beating Requires Odf2-Mediated Polarization of Basal Bodies via Basal Feet." *Cell* 148(1–2):189–200.
Kwitny, Susanna, Angela V Klaus, and Gary R. Hunnicutt. 2010. "The Annulus of the Mouse Sperm Tail Is Required to Establish a Membrane Diffusion Barrier That Is Engaged during the Late Steps of Spermiogenesis." *Biology of Reproduction* 82(4):669–78.
Lai, Michele et al. 2016. "Gene Editing of *DNAH11* Restores Normal Cilia Motility in Primary Ciliary Dyskinesia." *Journal of Medical Genetics* 53(4):242–49.
Lambacher, Nils J. et al. 2016. "TMEM107 Recruits Ciliopathy Proteins to Subdomains of the Ciliary Transition Zone and Causes Joubert Syndrome." 18(1).
Latta, Harrison, Arvid B. Maunsbach, and Sidney C. Madden. 1961. "Cilia in Different Segments of the Rat Nephron." *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11:248–252.
Lattao, Ramona, Levente Kovács, and David M. Glover. 2017. "The Centrioles, Centrosomes, Basal Bodies, and Cilia of Drosophila Melanogaster." 206(May):33–53.
Leblond, C. P. and Y. Clermont. 1952. "Definition of the Stages of the Cycle of the Seminiferous Epithelium in the Rat." *Annals of the New York Academy of Sciences* 55(4):548–73.
Lechtreck, Karl Ferdinand et al. 2009. "The Chlamydomonas Reinhardtii BBSome Is an IFT Cargo Required for Export of Specific Signaling Proteins from Flagella." *Journal of Cell Biology* 187(7):1117–32.
Lee, Eugene, Elena Sivan-loukianova, Daniel F. Eberl, and Maurice J. Kernan. 2008. "An IFT-A Protein Is Required to Delimit Functionally Distinct Zones in Mechanosensory Cilia." *Current Biology* 18(24):1899–1906.
Lee, Ji Eun and Joseph G. Gleeson. 2011. "A Systems-Biology Approach to Understanding the Ciliopathy Disorders."
Lee, Soojin, Lili Zhou, Jieun Kim, Stephen Kalbfleisch, and Frieder Scho. 2008. "Lasp Anchors the Drosophila Male Stem Cell Niche and Mediates Spermatid Individualization." 5:0–8.
Lee, Yin Loon et al. 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:mbc.E14-02-0735-.
Leewenhoeck, Antony Van. 1677. "Observations, Communicated to the Publisher by Mr. Antony van Leewenhoeck, in a Dutch Letter of the 9th of Octob. 1676. Here

English'd: Concerning Little Animals by Him Observed in Rain-Well-Sea. and Snow Water; as Also in Water Wherein Pepper Had Lain In." *Phil. Trans* 12:821–31.
Lemullois, M., E. Boisvieux-Ulrich, M. C. Laine, B. Chailley, and D. Sandoz. 1988. "Development and Functions of the Cytoskeleton during Ciliogenesis in Metazoa." *Biology of the Cell* 63(2):195–208.
Leon, a, B. Omri, a Gely, C. Klein, and P. Crisanti. 2006. "QN1/KIAA1009: A New Essential Protein for Chromosome Segregation and Mitotic Spindle Assembly." *Oncogene* 25(13):1887–95.
Li, Chunmei et al. 2016. "MKS5 and CEP290 Dependent Assembly Pathway of the Ciliary Transition Zone." *PLoS Biology* 14(3):1–29.
Li, Feng-Qian et al. 2016. "BAR Domain-Containing FAM92 Proteins Interact with Chibby1 to Facilitate Ciliogenesis." *Molecular and Cellular Biology* 36(August):MCB.00160-16.
Li, Kaijun et al. 1998. "Drosophila Centrosomin Protein Is Required for Male Meiosis and Assembly of the Flagellar Axoneme." 141(2):455–67.
Li, Min-gang, Serr Madeline, Eric A. Newman, and and Thomas S. Hays. 2005. "The Drosophila Tctex-1 Light Chain Is Dispensable for Essential Cytoplasmic Dynein Functions but Is Required during Spermatid Differentiation." *Molecular Biology of the Cell* 16(8):1–13.
Lin, Yi Nan et al. 2013. "CEP120 Interacts with CPAP and Positively Regulates Centriole Elongation." *Journal of Cell Biology* 202(2):211–19.
Linck, Richard W., Hector Chemes, and David F. Albertini. 2016. "The Axoneme: The Propulsive Engine of Spermatozoa and Cilia and Associated Ciliopathies Leading to Infertility." *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 33(2):141–56.
Lindsey, D. L. and K. T. Tokuyasu. 1980. *The Genetics and Biology of Drosophila.* Vol. 2.
Lopes, Carla A. M. et al. 2011. "Centriolar Satellites Are Assembly Points for Proteins Implicated in Human Ciliopathies, Including Oral-Facial-Digital Syndrome 1." *Journal of Cell Science* 124(Pt 4):600–612.
Loreng, Thomas D. and Elizabeth F. Smith. 2017. "The Central Apparatus of Cilia and Eukaryotic Flagella."
Louie, Carrie M. et al. 2010. "AHI1 Is Required for Photoreceptor Outer Segment Development and Is a Modifier for Retinal Degeneration in Nephronophthisis." *Nature Genetics* 42(2):175–80.
Loukil, Abdelhalim, Kati Tormanen, and Christine Sütterlin. 2017. "The Daughter Centriole Controls Ciliogenesis by Regulating Neurl-4 Localization at the Centrosome." *Journal of Cell Biology* 216(5):1287–1300.
Love, Damon et al. 2010. "Altered Lung Morphogenesis, Epithelial Cell Differentiation and Mechanics in Mice Deficient in the Wnt/β-Catenin Antagonist Chibby." *PloS One* 5(10):e13600.
Lu, Hao et al. 2017. "Mutations in DZIP1L, Which Encodes a Ciliary-Transition-Zone Protein, Cause Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease." *Nature Genetics* (May).
Lu, Quanlong et al. 2015. "Early Steps in Primary Cilium Assembly Require EHD1- and EHD3- Dependent Ciliary Vesicle Formation." *Nature Cell Biology* 17(3):228–40.
Ma, Dan-dan, Lian Bi, and Wan-xi Yang. 2017. "KIFC1 Is Essential for Acrosome Formation and Nuclear Shaping during Spermiogenesis in the Lobster Procambarus Clarkii." 8(22):36082–98.
Ma, Lina and Andrew P. Jarman. 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(Pt 15):2622–30.
Ma, Zhiguo, Zhonghua Liu, and Xun Huang. 2010. "OSBP- and FAN-Mediated Sterol Requirement for Spermatogenesis in Drosophila." 3784:3775–84.
Madhivanan, Kayalvizhi and Ruben Claudio Aguilar. 2014. "Ciliopathies: The Trafficking Connection." *Traffic* 15(10):1031–56.
Mahowald, Anthony P. and Joan M. Strassheim. 1970. "Intercellular Migration of Centrioles in the Germarium of Drosophila Melanogaster. An Electron Microscopic Study." *Journal of Cell Biology* 45(2):306–20.
Mahuzier, Alexia et al. 2012. "Dishevelled Stabilization by the Ciliopathy Protein Rpgrip1l Is Essential for Planar Cell Polarity." *The Journal of Cell Biology* 198(5):927–40.
Margulis, Lynn, Leleng P. To, and David Chase. 1981. "Microtubules, Undulipodia and Pillotina Spirochetes." *Annals of the New York Academy of Sciences* 81:356–68.
Mazo, Gregory, Nadine Soplop, Won Jing Wang, Kunihiro Uryu, and Meng Fu Bryan Tsou. 2016. "Spatial Control of Primary Ciliogenesis by Subdistal Appendages Alters Sensation-Associated Properties of Cilia." *Developmental Cell* 39(4):424–37.
McKean, P., Andrea Baines, Sue Vaughan, and and Keith Gull. 2003. "Gamma-Tubulin Functions in the Nucleation of a Discrete Subset of Microtubules in the Eukaryotic Flagellum." *Current Biology* 13:598–602.
McMahon, H. T. and E. Boucrot. 2015. "Membrane Curvature at a Glance." *Journal of Cell Science* 128:1065–70.
Mendes Maia, Teresa, Delphine Gogendeau, Carole Pennetier, Carsten Janke, and Renata Basto. 2014. "Bug22 Influences Cilium Morphology and the Post-Translational Modification of Ciliary Microtubules." *Biology Open* 3(2):138–51.
Mermall, Valerie et al. 2005. "Drosophila Myosin V Is Required for Larval Development and Spermatid Individualization." *Developmental Biology* 286(1):238–55.
Meunier, Alice and Nathalie Spassky. 2016. "Centriole Continuity: Out with the New, in with the Old." *Current Opinion in Cell Biology* 38:60–67.
Mitchell, David R. 2016. "Evolution of Cilia." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* a028290.
Mitchell, David R. 2004. "Speculations on the Evolution of 9+2 Organelles and the Role of Central Pair Microtubules." 96(9):691–96.
Mitchell, David R. and Winfield S. Sale. 1999. "Characterization of a Chlamydomonas Insertional Mutant That Disrupts Flagellar Central Pair Microtubule-Associated Structures." *Journal of Cell Biology* 144(2):293–304.
Mitchison, Hannah M. and Enza Maria Valente. 2017. "Motile and Non-Motile Cilia in Human Pathology : From Function to Phenotypes." 294–309.
Mogensen, Mette M., Azer Malik, Matthieu Piel, Véronique Bouckson-Castaing, and Michel Bornens. 2000. "Microtubule Minus-End Anchorage at Centrosomal and Non-Centrosomal Sites: The Role of Ninein." *Journal of Cell Science* 113 (Pt 1(17):3013–23.
Molla-Herman, Anahi et al. 2010. "The Ciliary Pocket: An Endocytic Membrane Domain at the Base of Primary and Motile Cilia." *Journal of Cell Science* 123:1785–95.
Morelli, Elena et al. 2014. "Multiple Functions of the SNARE Protein Snap29 in Autophagy, Endocytic, and Exocytic Trafficking during Epithelial Formation in Drosophila." *Autophagy* 10(12):2251–68.
Morga, Benjamin and Philippe Bastin. 2013. "Getting to the Heart of Intraflagellar Transport Using Trypanosoma and Chlamydomonas Models: The Strength Is in Their Differences." *Cilia* 2(1):16.

Moritz, M. et al. 1995. “Three-Dimensional Structural Characterization of Centrosomes from Early Drosophila Embryos.” *The Journal of Cell Biology* 130(5):1149–59.
Mottier-Pavie, Violaine and Timothy L. Megraw. 2009. “Drosophila Bld10 Is a Centriolar Protein That Regulates Centriole, Basal Body, and Motile Cilium Assembly.” *Molecular Biology of the Cell* 82(4):327–31.
Mourão, André, Søren T. Christensen, and Esben Lorentzen. 2016. “The Intraflagellar Transport Machinery in Ciliary Signaling.” *Current Opinion in Structural Biology* 41:98–108.
Nachury, Maxence V. 2014. “How Do Cilia Organize Signalling Cascades?” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 369(1650):20130465-.
Nachury, Maxence V. 2011. “Trafficking to the Ciliary Membrane.” *Annu Rev Cell Dev Biol* 26:59–87.
Nath, Sangeeta et al. 2010. “Kif5B and Kifc1 Interact and Are Required for Motility and Fission of Early Endocytic Vesicles in Mouse Liver.” *International Journal of Biological Sciences* 6(6):569–83.
Nigg, Erich A. 2007. “Centrosome Duplication: Of Rules and Licenses.” *Trends in Cell Biology* 17(5):215–21.
Noguchi, Tatsuhiko, Marta Lenartowska, and Kathryn G. Miller. 2007. “Myosin VI Stabilizes an Actin Network during Drosophila Spermatid Individualization.” *Molecular Biology of the Cell* 18(8):2991–3001.
Noguchi, Tatsuhiko, Marta Lenartowska, Aaron D. Rogat, Deborah J. Frank, and Kathryn G. Miller. 2007. “Proper Cellular Reorganization during Drosophila Spermatid Individualization Depends on Actin Structures Composed of Two Domains, Bundles and Meshwork, That Are Differentially Regulated and Have Different Functions.” *Molecular Biology of the Cell* 19(1):308–17.
Noguchi, Tatsuhiko and Kathryn G. Miller. 2003. “A Role for Actin Dynamics in Individualization during Spermatogenesis in Drosophila Melanogaster.” *Development* 130:1805–16.
North, Brian J., Brett L. Marshall, Margie T. Borra, John M. Denu, and Eric Verdin. 2003. “The Human Sir2 Ortholog, SIRT2, Is an NAD+-Dependent Tubulin Deacetylase.” *Molecular Cell* 11(2):437–44.
O’Donnell, Liza. 2014. “Mechanisms of Spermiogenesis and Spermiation and How They Are Disturbed.” *Spermatogenesis* 4(2):e979623.
Oda, Toshiyuki, Tatsuiki Abe, Haruaki Yanagisawa, and Masahide Kikkawa. 2016. “Structure and Function of Outer Dynein Arm Intermediate and Light Chain Complex.” *Molecular Biology of the Cell* 27:1–44.
Olcese, C. et al. 2017. “X-Linked Primary Ciliary Dyskinesia due to Mutations in the Cytoplasmic Axonemal Dynein Assembly Factor PIH1D3.”
Oliva, Rafael. 2006. “Protamines and Male Infertility.” *Human Reproduction Update* 12(4):417–35.
Olmos, Y. and J. G. Carlton. 2016. “The ESCRT Machinery : New Roles at New Holes.” *Current Opinion in Cell Biology* 38:1–11.
Olswang-Kutz, Yael et al. 2009. “Drosophila Past1 Is Involved in Endocytosis and Is Required for Germline Development and Survival of the Adult Fly.” *Journal of Cell Science* 122(Pt 4):471–80.
Ong, Shao-En et al. 2002. “Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics.” *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 1(5):376–86.

Ou, Young Y., Gary J. Mack, Meifeng Zhang, and Jerome B. Rattner. 2002. "CEP110 and Ninein Are Located in a Specific Domain of the Centrosome Associated with Centrosome Maturation." *Journal of Cell Science* 115(Pt 9):1825–35.
Paintrand, Michel, Mohammed Moudjou, Hervé Delacroix, and Michel Bornens. 1992. "Centrosome Organization Their Sensitivity." *Journal of Structural Biology* 128:107–28.
Paniagua, Ricardo, Manuel Nistal, Pedro Amat, and Marina C. Rodriguez. 1987. "Presence of Basic Proteins and Ribonucleoproteins in the Neck Region of Human Spermatids and Spermatozoa *." 137–42.
Park, Tae Joo, Brian J. Mitchell, Philip B. Abitua, Chris Kintner, and B. John. 2008. "Dishevelled Controls Apical Docking and Planar Polarization of Basal Bodies in Ciliated Epithelial Cells." 40(7):871–79.
Pedersen, Lotte B., Stefan Geimer, Roger D. Sloboda, and Joel L. Rosenbaum. 2003. "The Microtubule Plus End-Tracking Protein EB1 Is Localized to the Flagellar Tip and Basal Bodies in Chlamydomonas Reinhardtii." *Current Biology* 13(22):1969–74.
Pigino, Gaia et al. 2009. "Electron-Tomographic Analysis of Intraflagellar Transport Particle Trains in Situ." *The Journal of Cell Biology* 187(1):135–48.
Pitaval, Amandine, Qingzong Tseng, Michel Bornens, and Manuel Théry. 2010. "Cell Shape and Contractility Regulate Ciliogenesis in Cell Cycle–arrested Cells." *The Journal of Cell Biology* 191(2):303–12.
Pratt, Metta B. et al. 2016. "*Drosophila* Sensory Cilia Lacking MKS Proteins Exhibit Striking Defects in Development but Only Subtle Defects in Adults." *Journal of Cell Science* 129(20):3732–43.
Prensier, G., E. Vivier, G. Goldstein, and J. Schrevel. 1980. "Motile Flagellum with a '3 + 0' ultrastructure." *Science* 207(4438):1493–94.
Prevo, Bram, Jonathan M. Scholey, and Erwin J. G. Peterman. 2017. "Intraflagellar Transport: Mechanisms of Motor Action, Cooperation and Cargo Delivery." *The FEBS Journal*.
Rathke, Christina et al. 2010. "Distinct Functions of Mst77F and Protamines in Nuclear Shaping and Chromatin Condensation during Drosophila Spermiogenesis." *European Journal of Cell Biology* 89(4):326–38.
Rathke, Christina et al. 2007. "Transition from a Nucleosome-Based to a Protamine-Based Chromatin Configuration during Spermiogenesis in Drosophila."
Ray, P. F. et al. 2017. "Genetic Abnormalities Leading to Qualitative Defects of Sperm Morphology or Function." *Clinical Genetics* 91(2):217–32.
Reiter, Jeremy F. and Michel R. Leroux. 2017. "Genes and Molecular Pathways Underpinning Ciliopathies." *Nature Publishing Group*.
Riparbelli, Maria Giovanna, Giuliano Callaini, and Timothy L. Megraw. 2012. "Assembly and Persistence of Primary Cilia in Dividing Drosophila Spermatocytes." *Developmental Cell*.
Riparbelli, Maria Giovanna, Gabriele Colozza, and Giuliano Callaini. 2009. "Procentriole Elongation and Recruitment of Pericentriolar Material Are Downregulated in Cyst Cells as They Enter Quiescence." *Journal of Cell Science* 122(Pt 20):3613–18.
Rogat, Aaron D. and Kathryn G. Miller. 2002. "A Role for Myosin VI in Actin Dynamics at Sites of Membrane Remodeling during Drosophila Spermatogenesis." *Journal of Cell Science* 115:4855–65.
Rogowski, Krzysztof et al. 2009. "Evolutionary Divergence of Enzymatic Mechanisms for Posttranslational Polyglycylation." *Cell* 137:1076–87.
Rohatgi, Rajat and William J. Snell. 2010. "The Ciliary Membrane." *Current Opinion in Cell*

Biology 22(4):541–46.
Ronquillo, Cecinio C. et al. 2016. "Ciliopathy-Associated IQCB1/NPHP5 Protein Is Required for Mouse Photoreceptor Outer Segment Formation." *FASEB Journal* 30(10):3400–3412.
Rosales, Jesusa L., Jerome B. Rattner, and Ki-Young Lee. 2010. "Cdk5 in the Centriolar Appendages Mediates cenexin1 Localization and Primary Cilia Formation." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 9(10):2037–39.
Rosenbaum, Joel L. and George B. Witman. 2002. "Intraflagellar Transport." *Current Biology* 3(4):R125.
Rotem-Yehudar, Rinat, Emilia Galperin, and Mia Horowitz. 2001. "Association of Insulin-like Growth Factor 1 Receptor with EHD1 and SNAP29." *Journal of Biological Chemistry* 276(35):33054–60.
Sagan, L. 1967. "On the Origin of Mitosing Cells." *Journal of Theoretical Biology* 14(3):255–74.
Sale, W. S. and P. Satir. 1976. "Splayed Tetrahymena Cilia. A System for Analyzing Sliding and Axonemal Spoke Arrangements." *The Journal of Cell Biology* 71(2):589–605.
San Agustin, Jovenal T., Gregory J. Pazour, George B. Witman, and Wallace Marshall. 2015. "Intraflagellar Transport Is Essential for Mammalian Spermiogenesis but Is Absent in Mature Sperm."
Sang, Liyun et al. 2011. "Mapping the Nephronophthisis-Joubert-Meckel-Gruber Protein Network Reveals Ciliopathy Disease Genes and Pathways." 145(4):513–28.
Sarpal, Ritu et al. 2003. "Drosophila KAP Interacts with the Kinesin II Motor Subunit KLP64D to Assemble Chordotonal Sensory Cilia, but Not Sperm Tails." *Current Biology* 13(19):1687–96.
Satir, P. 1999. "Erratum: Landmarks in Cilia Research from Leeuwenhoek to Us (Cell Motility and the Cytoskeleton (1995) 32 (90-94))." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 42(1):82.
Satir, P. 1968. "Studies on Cilia. 3. Further Studies on the Cilium Tip and a "sliding Filament" Model of Ciliary Motility." *The Journal of Cell Biology* 39(1):77–94.
Satir, Peter and Søren T. Christensen. 2007. "Overview of Structure and Function of Mammalian Cilia." *Annu. Rev. Physiol*.
Satir, Peter, Thomas Heuser, and Winfield S. Sale. 2014. "A Structural Basis for How Motile Cilia Beat." *BioScience* 64(12):1073–83.
Satir, Peter, David R. Mitchell, and Gaspar Jékely. 2008. *Chapter 3 How Did the Cilium Evolve?* Vol. 85. 1st ed. Elsevier Inc.
Sato, T. et al. 2014. "Rab8a and Rab8b Are Essential for Several Apical Transport Pathways but Insufficient for Ciliogenesis." *Journal of Cell Science* 127(2):422–31.
Schmidt, Kerstin N. et al. 2012. "Cep164 Mediates Vesicular Docking to the Mother Centriole during Early Steps of Ciliogenesis." *Journal of Cell Biology* 199(7):1083–1101.
Schouteden, Clementine, Daniel Serwas, Mate Palfy, and Alexander Dammermann. 2015. "The Ciliary Transition Zone Functions in Cell Adhesion but Is Dispensable for Axoneme Assembly in C. Elegans." *Journal of Cell Biology* 210(1):35–44.
Shanbhag, S. R., B. Muller, and Rudolf Alexander Steinbrecht. 1999. "Atlas of Olfactory Organs of Drosophila Melanogaster 1 . Types , External Organization , Innervation and Distribution of Olfactory Sensilla." (February).
Shiba, Dai et al. 2009. "Localization of Inv in a Distinctive Intraciliary Compartment Requires the C-Terminal Ninein-Homolog-Containing Region." *Journal of Cell Science* 122(Pt 1):44–54.

Shiba, Dai and Takahiko Yokoyama. 2012. "The Ciliary Transitional Zone and Nephrocystins." *Differentiation; Research in Biological Diversity* 83(2):S91-6.
Shida, Toshinobu, Juan G. Cueva, Zhenjie Xu, Miriam B. Goodman, and Maxence V Nachury. 2010. "The Major Alpha-Tubulin K40 Acetyltransferase alphaTAT1 Promotes Rapid Ciliogenesis and Efficient Mechanosensation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(50):21517–22.
Sillibourne, James E. et al. 2013. "Primary Ciliogenesis Requires the Distal Appendage Component Cep123." *Biology Open* 2:535–45.
Simossis, V. A. and J. Heringa. 2005. "PRALINE: A Multiple Sequence Alignment Toolbox That Integrates Homology-Extended and Secondary Structure Information." *Nucleic Acids Research* 33(SUPPL. 2):289–94.
Sinden, R. E., A. Talman, S. R. Marques, M. N. Wass, and M. J. E. Sternberg. 2010. "The Flagellum in Malarial Parasites." *Current Opinion in Microbiology* 13(4):491–500.
Singla, Veena and Jeremy F. Reiter. 2006. "The Primary Cilium as the Cell's Antenna: Signaling at a Sensory Organelle." *Science* 313(5787):629–33.
Singla, Veena, Miriam Romaguera-Ros, Jose Manuel Garcia-Verdugo, and Jeremy F. Reiter. 2010. "Ofd1, a Human Disease Gene, Regulates the Length and Distal Structure of Centrioles." *Developmental Cell* 18(3):410–24.
Sitaram, P., Michael a Anderson, Jeanne N. Jodoin, Ethan Lee, and Laura a Lee. 2012. "Regulation of Dynein Localization and Centrosome Positioning by Lis-1 and Asunder during Drosophila Spermatogenesis." *Development (Cambridge, England)* 139(16):2945–54.
Sloboda, Roger D. and Louisa Howard. 2007. "Localization of EB1, IFT Polypeptides, and Kinesin-2 in Chlamydomonas Flagellar Axonemes via Immunogold Scanning Electron Microscopy." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 64(6):446–60.
Sorokin, S. 1962. "Centrioles and the Formation of Rudimentary Cilia by Fibroblasts and Smooth Muscle Cells." *The Journal of Cell Biology* 15(10):363–77.
Soulavie, Fabien et al. 2014. "Hemingway Is Required for Sperm Flagella Assembly and Ciliary Motility in Drosophila." *Molecular Biology of the Cell* 25:1276–86.
Spektor, Alexander, William Y. Tsang, David Khoo, and Brian David Dynlacht. 2007. "Cep97 and CP110 Suppress a Cilia Assembly Program." *Cell* 130(4):678–90.
Stanishneva-Konovalova, T. B., N. I. Derkacheva, S. V. Polevova, and O. S. Sokolova. 2016. "The Role of BAR Domain Proteins in the Regulation of Membrane Dynamics." *Acta Naturae* 8(4):60–69.
Steere, Nathan et al. 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(7):e41077.
Steinhauer, Josefa. 2015. "Separating from the Pack: Molecular Mechanisms of *Drosophila* Spermatid Individualization." *Spermatogenesis* 5(February 2016):e1041345.
Stevens, Naomi R., Jeroen Dobbelaere, Kathrin Brunk, Anna Franz, and Jordan W. Raff. 2010. "*Drosophila* Ana2 Is a Conserved Centriole Duplication Factor." *The Journal of Cell Biology* 188(3):313–23.
Stinchcombe, Jane C. et al. 2015. "Mother Centriole Distal Appendages Mediate Centrosome Docking at the Immunological Synapse and Reveal Mechanistic Parallels with Ciliogenesis." *Current Biology* 25(24):3239–44.
Styczynska-Soczka, Katarzyna and Andrew P. Jarman. 2015. "The Drosophila Homologue of Rootletin Is Required for Mechanosensory Function and Ciliary Rootlet Formation in Chordotonal Sensory Neurons." *Cilia* 4(1):9.

Szymanska, Katarzyna and Colin a Johnson. 2012. "The Transition Zone: An Essential Functional Compartment of Cilia." *Cilia* 1(1):10.
Takemaru, Ken-Ichi et al. 2003. "Chibby, a Nuclear Beta-Catenin-Associated Antagonist of the Wnt/Wingless Pathway." *Nature* 422(6934):905–9.
Tanaka, Yosuke, Yasushi Okada, and Nobutaka Hirokawa. 2005. "FGF-Induced Vesicular Release of Sonic Hedgehog and Retinoic Acid in Leftward Nodal Flow Is Critical for Left–right Determination." *Nature* 435(7039):172–77.
Tang, Zaiming et al. 2013. "Autophagy Promotes Primary Ciliogenesis by Removing OFD1 from Centriolar Satellites." *Nature* 502(7470):254–57.
Tanos, Barbara E. et al. 2013. "Centriole Distal Appendages Promote Membrane Docking, Leading to Cilia Initiation." *Genes and Development* 27:163–68.
Taschner, Michael, Sagar Bhogaraju, and Esben Lorentzen. 2012. "Architecture and Function of IFT Complex Proteins in Ciliogenesis." *Differentiation* 83(2):S12–22.
Tateishi, Kazuhiro et al. 2013. "Two Appendages Homologous between Basal Bodies and Centrioles Are Formed Using Distinct Odf2 Domains." *Journal of Cell Biology* 203(3):417–25.
Tates, Arie Dirk. 1972. *Cytodifferentiation during Spermatogenesis in Drosophila Melanogaster: An Electron Microscope Study*.
Texada, M. J., R. a. Simonette, C. B. Johnson, W. J. Deery, and K. M. Beckingham. 2008. "Yuri Gagarin Is Required for Actin, Tubulin and Basal Body Functions in Drosophila Spermatogenesis." *Journal of Cell Science* 121:1926–36.
Thauvin-Robinet, Christel et al. 2014. "The Oral-Facial-Digital Syndrome Gene C2CD3 Encodes a Positive Regulator of Centriole Elongation." *Nature Genetics* 46(8):905–11.
Tilney, L. G. et al. 1973. "Microtubules: Evidence for 13 Protofilaments." *Journal of Cell Biology* 59(2):267–75.
Ting, C. T. et al. 2004. "Gene Duplication and Speciation in Drosophila: Evidence from the Odysseus Locus." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(33):12232–35.
Tollenaere, Maxim A. X., Niels Mailand, and Simon Bekker-Jensen. 2015. "Centriolar Satellites: Key Mediators of Centrosome Functions." *Cellular and Molecular Life Sciences* 72(1):11–23.
Toure, Aminata et al. 2007. "The Testis Anion Transporter 1 (Slc26a8) Is Required for Sperm Terminal Differentiation and Male Fertility in the Mouse." *Human Molecular Genetics* 16(15):1783–93.
Toure, Aminata, Baptiste Rode, R. Gary, and Denise Escalier. 2011. "Septins at the Annulus of Mammalian Sperm." 392:799–803.
Tsao Che-Chia and Gorovsky Martin A. 2008. "Different Effects of Tetrahymena IFT172 Domains on Anterograde and Retrograde Intraflagellar Transport." *Molecular Biology of the Cell* 19(1):308–17.
Tuthill, John C. and Rachel I. Wilson. 2016. "Mechanosensation and Adaptive Motor Control in Insects." *Current Biology* 26(20):R1022–38.
Urbanska, P. et al. 2015. "The CSC Proteins FAP61 and FAP251 Build the Basal Substructures of Radial Spoke 3 in Cilia." *Mol Biol Cell* 26(8):1463–75.
VanCamp, Jasmijn K. et al. 2013. "No Important Role for Genetic Variation in the Chibby Gene in Monogenic and Complex Obesity." *Molecular Biology Reports* 40(7):4491–98.
Vannuccini, Elisa et al. 2016. "Two Classes of Short IFT Trains with Different 3D Structure Are Present in Chlamydomonas Flagella." *Journal of Cell Science*

jcs.183244-.
Veleri, Shobi et al. 2014. “Ciliopathy-Associated Gene Cc2d2a Promotes Assembly of Subdistal Appendages on the Mother Centriole during Cilia Biogenesis.” *Nature Communications* 5(May):4207.
Vieillard, Jennifer et al. 2016. “Transition Zone Assembly and Its Contribution to Axoneme Formation in *Drosophila* Male Germ Cells.” *The Journal of Cell Biology* jcb.201603086.
Vierkotten, J., R. Dildrop, T. Peters, B. Wang, and U. Ruther. 2007. “Ftm Is a Novel Basal Body Protein of Cilia Involved in Shh Signalling.” *Development* 134(14):2569–77.
Vincensini, Laetitia, Thierry Blisnick, and Philippe Bastin. 2011. “1001 Model Organisms To Study Cilia and Flagella.” *Biol Cell* 103(3):109–30.
Vogt, Nina, Iris Koch, Heinz Schwarz, Frank Schnorrer, and Christiane Nüsslein-volhard. 2006. “The Gamma TuRC Components Grip75 and Grip128 Have an Essential Microtubule-Anchoring Function in the Drosophila Germline.” 3972:3963–72.
Voronina, Vera a et al. 2009. “Inactivation of Chibby Affects Function of Motile Airway Cilia.” *The Journal of Cell Biology* 185(2):225–33.
Walentek, Peter et al. 2016. “Ciliary Transcription Factors and miRNAs Precisely Regulate Cp110 Levels Required for Ciliary Adhesions and Ciliogenesis.” *eLife* 5(September2016):1–24.
Wang, Chengbing, Wee Chuang Low, Aimin Liu, and Baolin Wang. 2013. “Centrosomal Protein DZIP1 Regulates Hedgehog Signaling by Promoting Cytoplasmic Retention of Transcription Factor GLI3 and Affecting Ciliogenesis.” *Journal of Biological Chemistry* 288(41):29518–29.
Wang, Won-jing et al. 2013. “CEP162 Is an Axoneme-Recognition Protein Promoting Ciliary Transition Zone Assembly at the Cilia Base.” 15(6):1–25.
Watanabe, Daisuke et al. 2003. “The Left-Right Determinant Inversin Is a Component of Node Monocilia and Other 9+0 Cilia.” *Development (Cambridge, England)* 130(9):1725–34.
Watanabe, Tsuyoshi. 1990. “The Role of Ciliary Surfaces.” *Ciliary and Flagellar Membranes* 149–50.
Weatherbee, Scott D., Lee A. Niswander, and Kathryn V Anderson. 2009. “A Mouse Model for Meckel Syndrome Reveals Mks1 Is Required for Ciliogenesis and Hedgehog Signaling.” *Human Molecular Genetics* 18(23):4565–75.
Wei, Qing et al. 2014. “Transition Fibre Protein FBF1 Is Required for the Ciliary Entry of Assembled Intraflagellar Transport Complexes.”
Wei, Qing et al. 2013. “Transition Fibre Protein FBF1 Is Required for the Ciliary Entry of Assembled Intraflagellar Transport Complexes.” *Nature Communications* 4:2750.
Wei, Qing, Kun Ling, and Jinghua Hu. 2015. “The Essential Roles of Transition Fibers in the Context of Cilia.” *Current Opinion in Cell Biology* 35:98–105.
Wilkinson, C. J., M. Carl, and W. A. Harris. 2009. “Cep70 and Cep131 Contribute to Ciliogenesis in Zebrafish Embryos.” *BMC Cell Biol* 10:17.
Williams, Corey L. et al. 2014. “Direct Evidence for BBSome-Associated Intraflagellar Transport Reveals Distinct Properties of Native Mammalian Cilia.” *Nature Communications* 5:5813.
Williams, Corey L. 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(6):1023–41.
Wilsman, N. J., C. E. Farnum, and D. K. Reed-Aksamit. 1980. “Incidence and Morphology of Equine and Murine Chondrocytic Cilia.” *The Anatomical Record* 197(3):355–61.

Winey, Mark and Eileen O'Toole. 2014. "Centriole Structure." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 369(1650):20130457-.
Won, Jungyeon et al. 2011. "NPHP4 Is Necessary for Normal Photoreceptor Ribbon Synapse Maintenance and Outer Segment Formation, and for Sperm Development." *Human Molecular Genetics* 20(3):482–96.
Woolley, D. M. and S. N. Nickels. 1985. "Microtubule Termination Patterns in Mammalian Sperm Flagella." *Journal of Ultrastructure Research* 90(3):221–34.
Woolley, David, Catarina Gadelha, and Keith Gull. 2006. "Evidence for a Sliding-Resistance at the Tip of the Trypanosome Flagellum." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 63(12):741–46.
Wright, Kevin J. et al. 2011. "An ARL3-UNC119-RP2 GTPase Cycle Targets Myristoylated NPHP3 to the Primary Cilium." *Genes & Development* 25(22):2347–60.
Xie, Ting. 2008. *Germline Stem Cell Niches*. StemBook,.
Xu, D. et al. 2006. "The Effector Caspases drICE and Dcp-1 Have Partially Overlapping Functions in the Apoptotic Pathway in Drosophila." *Cell Death and Differentiation* 13(10):1697–1706.
Yadav, Sharda Prasad et al. 2016. "Centrosomal Protein CP110 Controls Maturation of the Mother Centriole during Cilia Biogenesis." *Development (Cambridge, England)* 143(9):1491–1501.
Yaeger, Robert G. 1996. "Chapter 77 Protozoa : Structure Classification Growth and Development." in *medical microbiology 4th*.
Yang, Jun et al. 2002. "Component of the Ciliary Rootlet." 159(3):431–40.
Yang, Jun et al. 2005. "The Ciliary Rootlet Maintains Long-Term Stability of Sensory Cilia." 25(10):4129–37.
Yang, T.Tony et al. 2015. "Superresolution Pattern Recognition Reveals the Architectural Map of the Ciliary Transition Zone." *Nature Publishing Group* (August):1–13.
Ye, Xuan, Huiqing Zeng, Gang Ning, Jeremy F. Reiter, and Aimin Liu. 2014. "C2cd3 Is Critical for Centriolar Distal Appendage Assembly and Ciliary Vesicle Docking in Mammals." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(6):2164–69.
Yee, Laura E. et al. 2015. "Conserved Genetic Interactions between Ciliopathy Complexes Cooperatively Support Ciliogenesis and Ciliary Signaling." edited by G. S. Barsh. *PLoS Genetics* 11(11):e1005627.
Yin, Yili et al. 2009. "The Talpid3 Gene (KIAA0586) Encodes a Centrosomal Protein That Is Essential for Primary Cilia Formation." 664:655–64.
Yoshimura, Shin Ichiro, Johannes Egerer, Evelyn Fuchs, Alexander K. Haas, and Francis A. Barr. 2007. "Functional Dissection of Rab GTPases Involved in Primary Cilium Formation." *Journal of Cell Biology* 178(3):363–69.
Yu, Ian, Christopher P. Garnham, and Antonina Roll-Mecak. 2015. "Writing and Reading the Tubulin Code." *Journal of Biological Chemistry* 290(28):17163–72.
Zhang, Boyan et al. 2015. "GSK3 β -Dzip1-Rab8 Cascade Regulates Ciliogenesis after Mitosis." 1–25.
Zhang, Houbin et al. 2011. "UNC119 Is Required for G Protein Trafficking in Sensory Neurons." *Nature Neuroscience* 14(7):874–80.
Zhang, Jing, Naava Naslavsky, and Steve Caplan. 2012. "Rabs and EHDs: Alternate Modes for Traffic Control." *Bioscience Reports* 32(1):17–23.
Zhang, Wei et al. 2015. "Ankyrin Repeats Convey Force to Gate the NOMPC Mechanotransduction Channel Article Ankyrin Repeats Convey Force to Gate the

NOMPC Mechanotransduction Channel." 1391–1403.
Zhao, H. et al. 2013. "The Cep63 Paralogue Deup1 Enables Massive de Novo Centriole Biogenesis for Vertebrate Multiciliogenesis." *Nat Cell Biol* 15(12):1434–44.
Zhi, Erlei et al. 2016. "Decreased Expression of KIFC1 in Human Testes with Globozoospermic Defects." *Genes* 7(10):1–11.
Zhong, Lei and John M. Belote. 2007. "The Testis-Specific Proteasome Subunit Prosalpha6T of D. Melanogaster Is Required for Individualization and Nuclear Maturation during Spermatogenesis." *Development (Cambridge, England)* 134:3517–25.
Zhu, Xiaoyan, Yi Liu, and Pinfen Yang. 2017. "Radial Spokes — A Snapshot of the Motility." 1–14.
Zimmerman, KW. 1898. "Beitrage Zur Kenntnis Einiger Drusen Und Epithelien." *Arch Mikrosk Anat* 52:552–706.