

Université
de Liège



ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT DES SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE ET DES EQUIDES
PATHOLOGIE MEDICALE DES ANIMAUX DE COMPAGNIE

**Etude épidémiologique et moléculaire de la dyskinésie ciliaire
chez le chien**

Anne-Christine Merveille

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES
VETERINAIRES**

ANNEE ACADEMIQUE 2014-2015

Remerciements

Il est naturel de remercier, lorsqu'un travail touche à sa fin, tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué à le rendre possible. C'est avec un enthousiasme certain que je profite de ces quelques lignes pour rendre hommage aux personnes qui ont participé à leur manière à la réalisation de cette thèse.

Je tiens tout d'abord à adresser ma sincère gratitude à ma promotrice, le Dr Anne-Sophie Lequarré pour m'avoir encadrée tout le long de ce travail de recherche. Je la remercie en particulier pour la confiance qu'elle m'a témoignée depuis le début, pour sa patience à toute épreuve et les précieux conseils qu'elle m'a prodigués tout au long du chemin.

J'exprime mes plus sincères remerciements à ma co-promotrice, le Professeur Cécile Clercx pour son aide inestimable. Je la remercie en particulier pour sa disponibilité, son enthousiasme et son humanité, autant d'éléments qui font que c'est un plaisir de travailler au quotidien à ses côtés.

J'exprime toute ma reconnaissance au Professeur Michel Georges pour m'avoir permis de mener à bien ce projet et pour tout le temps et les conseils qu'il m'a accordés durant la réalisation de ce travail. Je le remercie également pour m'avoir laissé la liberté de me ré-orienter au cours du déroulement de cette thèse.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse: le Professeur Catherine André de l'Institut de génétique et de développement de Rennes, le Professeur Jean-Luc Cadoré, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, le Professeur Vincent Bours, le Professeur Philippe Lefèbvre, le Professeur Johann Detilleux et le Professeur Dominique Peeters pour avoir accepté de lire ce manuscrit et de participer à la soutenance de cette thèse.

Je tiens à remercier Géraldine Bataille et le Dr Yukihide Momozawa pour leur excellente assistance technique et leurs précieux conseils dans les différentes étapes de ce travail. Je tiens également à remercier les membres de l'unité de génomique animale pour leur accueil et leurs conseils qui ont permis d'éclairer ce monde qu'est le laboratoire et qui m'était jusque-là, inconnu.

Evidemment, je tiens à remercier nos différents collaborateurs sans qui, ce travail n'aurait pas pu être réalisé. J'exprime tout particulièrement ma gratitude à l'équipe du professeur Amselem, à l'équipe du Professeur Katsanis et à l'équipe du Professeur Omran. Je tiens également à remercier tous les collaborateurs du projet Européen Lupa qui ont été les premiers témoins de ce travail.

Je tiens à remercier Emilie et Morgane pour l'entraide et les conseils précieux qui ont rythmé ce doctorat. Je tiens également à remercier toute l'équipe de médecine qui au fil des ans m'a soutenu dans la réalisation de ce travail. Ils sont trop nombreux pour que je les cite tous mais ils y ont tous contribué.

Enfin, je souhaite remercier tout particulièrement mes proches sans qui, ce travail aurait eu bien du mal à aboutir. Par leur présence et leur bonne humeur, ils m'ont apporté un soutien indispensable, ainsi que les bouffées d'oxygène qui m'ont permis de le mener à bien. Je tiens plus particulièrement à remercier ma mère pour son soutien inconditionnel, et ce, depuis toujours. Je terminerai par te remercier, Gilles, pour ta patience, tes encouragements et pour me supporter au jour le jour. Tu m'apportes un équilibre au quotidien. Cette thèse et moi te devons beaucoup. Merci.

Résumé

Les dyskinésies ciliaires primaires (DCP) sont des maladies génétiques rares regroupant des pathologies respiratoires liées à une anomalie constitutionnelle des cils dits “mobiles” (Leigh, 2006). Ces cils jouent un rôle important dans l’organisme, notamment au niveau du tractus respiratoire, où ils entrent dans la composition de l’escalator mucociliaire. Ils jouent également un rôle au niveau du système reproducteur et durant l’embryogénèse. Chez l’homme, la prévalence des DCP est estimée à 1 :10.000 (Afzelius et Stenram, 2006). Chez le chien, il existe une trentaine de cas décrits dans la littérature dans 20 races différentes. Les deux espèces partagent des manifestations cliniques similaires, directement liées à la dysfonction de la mobilité ciliaire. La plupart des individus touchés présentent des signes dès leur plus jeune âge. Parmi ces signes, on retrouve une atteinte des voies respiratoires comprenant des infections récidivantes des voies hautes (rhino-sinusites) et basses (bronchites et bronchopneumonies qui mènent à de la bronchiectasie), mais aussi de l’infertilité et, dans la moitié des cas environ, des défauts de latéralité que l’on appelle *situs inversus* (Leigh, 2006). La structure des cils mobiles est hautement conservée entre les différentes espèces et se caractérise par un agencement de neuf paires de microtubules périphériques organisées autour d’une paire centrale de microtubules. A cette structure, se rajoutent des complexes protéiques qui permettent de stabiliser les différents composants comme les crêtes radiales ou le complexe régulateur des dynéines, mais aussi des protéines motrices qui permettent au cil de se mouvoir comme les bras de dynéine. Cet agencement est perturbé dans la grande majorité des DCP qui présentent différents types de défauts ultrastructuraux en fonction des différents gènes impliqués (Papon *et al.*, 2010) (Jorissen *et al.*, 2000b). Chez l’homme, comme chez le chien, le défaut ultrastructurel le plus fréquent est une atteinte des bras de dynéine externes. La plupart des DCP se transmettent selon un mode autosomique récessif et plusieurs gènes causals ont été identifiés (Zariwala *et al.*, 2011). Toutefois, les bases moléculaires d’un certain nombre de cas chez l’homme restent à ce jour indéterminées et chez le chien aucun gène responsable n’avait été identifié avant cette présente étude. Le chien représente un modèle spontané de DCP qui pourrait être utile dans la découverte de nouveaux gènes impliqués dans cette pathologie. Les différents objectifs de ce travail étaient d’une part, d’étudier le phénotype clinique d’une DCP ségrégant au sein d’une race de chien, le bobtail, et d’autre part, d’identifier le mode de transmission génétique ainsi que les bases moléculaires de cette DCP. Nous avons également voulu étudier la fréquence de la mutation identifiée dans cette race. Une fois le gène identifié chez le bobtail, nous avons voulu déterminer si celui-ci pouvait être responsable de cas de DCP humaines présentant un phénotype ultrastructurel similaire à celui des bobtails atteints. Ensuite, nous avons voulu

évaluer les conséquences qu'une dysfonction de ce gène pouvait entraîner, afin de gagner en compréhension sur le rôle de la protéine impliquée et pour confirmer que les mutations identifiées étaient bien à l'origine du phénotype clinique observé. Enfin, nous avons voulu déterminer si ce gène pouvait être impliqué dans d'autres ciliopathies.

Nous avons tout d'abord obtenu des données cliniques sur une dizaine de chiens atteints. Tous appartenaient au même pedigree et présentaient un phénotype clinique caractéristique apparu très tôt dans la vie de l'animal. Ce phénotype se caractérisait par un jetage nasal bilatéral, une toux productive, une leucocytose neutrophilique et des infections respiratoires récurrentes dont les séquelles étaient visibles sur les radiographies thoraciques avec des lésions de bronchopneumonie touchant les lobes crâniens et moyen droit ainsi que des lésions de bronchiectasie. L'analyse du sperme d'un de ses chiens mettait en évidence une réduction de la mobilité des spermatozoïdes et un pourcentage important de formes anormales en microscopie optique. Un *situs inversus* était également présent dans environ un tiers des cas. Les anomalies ciliaires observées en microscopie électronique chez ces chiens révélaient un phénotype ultrastructurel peu commun, associant une atteinte des bras de dynéine internes et des anomalies de la paire centrale de microtubules.

L'analyse du pedigree de ces chiens était en faveur d'un mode de transmission autosomique récessif. L'étude d'association génome entier réalisée chez 5 atteints et 15 contrôles a permis d'identifier une région contenant 151 gènes candidats. Une sélection des gènes décrits comme impliqués dans la structure et/ou la fonction des cils (Gherman *et al.*, 2006; Inglis *et al.*, 2006) a permis une réduction drastique des gènes candidats. Le séquençage de ceux-ci a permis d'identifier un codon stop prématuré au sein de *CCDC39*, un gène codant pour une protéine enrichie en domaine « coiled-coils ». Tous les chiens atteints possédaient cette mutation à l'état homozygote tandis que leurs parents étaient tous hétérozygotes, confirmant ainsi le mode de transmission autosomique récessif. Après avoir mis au point un test génétique rapide basé sur la technologie Taqman, plus de 500 bobtails ont été génotypés afin d'estimer la fréquence de la mutation au sein de cette race. L'allèle muté se retrouvait plus fréquemment dans la population européenne avec une fréquence d'hétérozygotes autour de 19%. Les hétérozygotes étaient plus rares chez les chiens provenant d'Amérique du nord avec une fréquence d'hétérozygotes de 7%. Plusieurs éléments étaient en faveur du fait que cette mutation était bien la mutation causale. Premièrement, le séquençage d'une population de 80 chiens issus de 9 races différentes, n'a pas permis d'identifier une seule fois cette mutation. De plus, en étudiant l'expression de *CCDC39* au sein de l'épithélium respiratoire de chiens porteurs, nous avons mis en évidence un phénomène de dégradation de l'ARNm non-sens. Une nette diminution de l'expression de *CCDC39* était visible chez les atteints par rapport aux sains et la protéine était absente des cellules ciliées

respiratoires des atteints, contrairement aux chiens contrôles. Nous avons également pu démontrer que *CCDC39* était principalement exprimé dans les tissus ciliés chez la souris et chez l'homme. Enfin, pour confirmer définitivement que *CCDC39* joue un rôle important dans la mobilité ciliaire, nous avons supprimé son expression à l'aide de morpholinos dans des embryons de zebrafish. L'injection provoquait l'apparition de défauts de latéralité, dose-dépendants. Ce phénotype était spécifique car il disparaissait lorsque les embryons étaient co-injectés avec de l'ARNm sauvage.

Vu son implication dans une DCP canine, il était légitime de suspecter que *CCDC39* pouvait être à l'origine de cas humains. Nous avons sélectionné une cinquantaine de patients présentant un phénotype ultrastructurel identique à ceux des bobtails atteints. Le séquençage de ces patients a permis d'identifier quinze mutations différentes. Chez la plupart des atteints, ces mutations étaient, soit à l'état homozygote, soit à l'état d'hétérozygote composite. Par contre, nous n'avons pas mis en évidence de mutation au sein de *CCDC39* pour une vingtaine de patients atteints de DCP avec un phénotype ultrastructurel différent ou chez plus de 200 patients ne présentant que des défauts de latéralité.

Afin de mieux comprendre la fonction de *CCDC39* et l'impact de sa dysfonction sur la structure ciliaire, nous avons analysé son expression au niveau protéique, en examinant des cellules épithéliales nasales prélevées par frottis brosse. Comme chez le chien, la protéine était absente des cellules épithéliales respiratoires des patients atteints, alors qu'elle était présente chez les contrôles. En utilisant des techniques d'immunofluorescence à haute résolution, nous avons pu démontrer que *CCDC39* se localisait principalement au niveau de l'axonème ciliaire chez l'individu sain mais pas chez l'individu atteint. Afin de caractériser l'impact d'une déficience de *CCDC39*, nous avons étudié les autres composants de l'axonème ciliaire en utilisant des anticorps dirigés spécifiquement sur des sous-unités de l'axonème ciliaire. Nous avons ainsi pu démontrer que l'absence de *CCDC39* est responsable d'une absence de certains constituants axonémaux comme les bras de dynéine internes ou le complexe régulateur des dynéines. Enfin, l'analyse du battement ciliaire de certains sujets atteints a permis de mettre en évidence un pattern dyskinétique, caractérisé par une amplitude réduite et des axonèmes rigides.

Cette étude a permis d'identifier un nouveau gène impliqué dans les DCP tant dans la race bobtail que chez l'homme. Nous avons pu mettre en évidence que ce gène code pour une protéine axonémale dont l'absence est responsable d'une atteinte des bras de dynéine internes et d'une désorganisation axonémale, ce qui a pour conséquence un battement ciliaire dyskinétique. Le phénotype clinique présenté par les chiens atteints est remarquablement similaire à celui de l'homme, avec une atteinte sévère des voies respiratoires, mais également

des anomalies spermatiques chez le mâle et l'existence de défaut de latéralité chez certains atteints.

Comme dans la grande majorité des DCP, les individus ne présentent la maladie que s'ils reçoivent deux copies défectueuses de *CCDC39*, puisque nous avons pu montrer que tous les chiens atteints étaient homozygotes pour la mutation et que la plupart des patients humains atteints possédaient soit une mutation à l'état homozygote, soit deux mutations différentes. Toutes les mutations identifiées au sein de ce gène sont associées à une perte de fonction et sont vraisemblablement responsables d'une absence de production de la protéine, secondaire à un phénomène de dégradation de l'ARNm, comme nous avons pu le mettre en évidence chez le bobtail. Par la suite, d'autres études ont confirmé cette hypothèse en identifiant de nouvelles mutations au sein de *CCDC39*, pratiquement toutes liées à une perte de fonction (Blanchon *et al.*, 2012) (Zariwala *et al.*, 2013) (Antony *et al.*, 2013). Les mutations identifiées étaient systématiquement associées à un phénotype ultrastructurel bien particulier représentant environ 12% des cas de DCP (Jorissen *et al.*, 2000b) (Chilvers *et al.*, 2003a) (Papon *et al.*, 2010) (Shoemark *et al.*, 2012).

Simultanément à la découverte de *CCDC39*, un autre gène, *CCDC40*, a été identifié comme étant responsable d'un phénotype ultrastructurel identique. Ces deux gènes sont étroitement liés, puisque l'absence de *CCDC40* affecte la localisation axonémale de *CCDC39* au sein de la cellule ciliée (Becker-Heck *et al.*, 2010). Ces deux gènes expliquent à eux seuls une grande proportion des patients présentant ce phénotype particulier (Blanchon *et al.*, 2012) (Antony *et al.*, 2013).

Nous avons pu démontrer, par différentes méthodes, que ce gène jouait un rôle important dans la structure et la fonction des cils mobiles en observant que son expression était principalement localisée dans les organes présentant des cils mobiles et que la protéine était absente chez des individus porteurs de mutation. De plus, en inactivant l'expression de ce gène dans des embryons de zebrafish, nous avons observé l'apparition de défaut de latéralité ce qui suggère une atteinte des cils mobiles de la vésicule de Kupffer, responsable de l'asymétrie droite gauche. L'identification de ce gène est particulièrement intéressante car *CCDC39* a été la première protéine enrichie en domaine « coiled-coils » à être impliquée dans une DCP et a permis de souligner l'importance de ces motifs pour la fonction du cil mobile. Depuis lors, plusieurs autres gènes possédant ces structures particulières ont été associés avec d'autres cas de DCP humaines (Becker-Heck *et al.*, 2010) (Hjeij *et al.*, 2014) (Horani *et al.*, 2013a) (Knowles *et al.*, 2013a) (Panizzi *et al.*, 2012) (Wirschell *et al.*, 2013). Le rôle exact de ces protéines riches en des domaines « coiled-coils » reste à préciser, mais elles semblent jouer un rôle dans la structure du complexe régulateur des dynéines et dans l'ancrage des bras de dynéine aux microtubules adjacents.

Cette étude a permis d'identifier le premier gène responsable de DCP dans l'espèce canine. Le génotypage de plus 500 bobtails a permis d'établir que la mutation semble plus fréquente en Europe, ce qui pourrait être lié à l'usage intensif de certains grands champions dans les années 80. La disponibilité de ce test permettra aux éleveurs de dépister les porteurs asymptomatiques et évitera l'apparition de nouveaux atteints.

Enfin, cette étude permet de mettre en lumière l'intérêt du chien en tant qu'organisme modèle pour identifier les origines génétiques de certaines pathologies humaines. En effet, le chien représente un modèle unique à bien des égards (Lequarré *et al.*, 2011). Le chien bénéficie de soins médicaux de plus en plus poussés et chaque race de chien représente un isolat génétique, ce qui a pour conséquence une concentration de certains allèles morbides responsables de pathologies similaires à celles de l'homme. On peut ajouter que le chien possède un répertoire génétique très proche de celui de l'homme et que la structure de son génome est particulièrement intéressante pour disséquer génétiquement des caractères mendéliens, mais aussi des caractères complexes (Lindblad-Toh *et al.*, 2005). Enfin, on peut imaginer que les bobtails atteints de DCP pourraient représenter une opportunité unique pour tester de nouvelles thérapies et éventuellement pour mettre au point une thérapie ciblée contre le défaut génétique responsable.

Summary

Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a rare inherited disorder characterized by specific ultrastructural defects of motile cilia associated with impaired ciliary motion and mucociliary clearance (Leigh, 2006). Motile cilia play an important role in the organism. They are present at most airways surface but they are also located in the brain, the fallopian tube and the embryonic node. Spermatozoid flagella have a core structure similar to motile cilia. In human, PCD prevalence is estimated around 1:10000 (Afzelius et Stenram, 2006). In dogs, more than thirty cases have been published in twenty different breeds. Both species share similar clinical signs related to impaired ciliary motility. Most of affected individuals harbour clinical signs since birth. These signs include recurrent rhino-sinusitis, recurrent bronchitis or bronchopneumonia leading to bronchiectasis, fertility disorders and in half of the cases, some laterality defects also called *situs inversus* (Leigh, 2006). Motile cilia structure is highly conserved across species and is characterized by 9 peripheral doublets of microtubules organized around a central pair of microtubules. Several other structures are also present to stabilize the various components of the axonema, including radial spokes and dynein regulatory complex as well as the dynein arms conferring motility to the cilia. This structure is quite disorganized in most PCD cases and several ultrastructural defects are reported related to the underlying genes (Papon *et al.*, 2010) (Jorissen *et al.*, 2000b). In human and in dogs, the most common defect is an absence of outer dynein arms. PCD is usually recessively inherited and several causative genes have been identified (Zariwala *et al.*, 2011). However, the molecular bases of a significant proportion of human cases are still unknown and in the dog no gene was yet identified. The dog represents a spontaneous model of the disease and might be useful to unravel the genetic basis of some PCD cases. This work had several objectives. A first objective was to describe the clinical phenotype of PCD segregating in an Old English Sheepdog pedigree and to identify the molecular basis of this defect. We then aimed determining the mutation frequency in the breed. The next objective was to investigate if the gene identified in this breed might be responsible for some human PCD cases with an ultrastructural defect similar to the one observed in affected dogs. Another objective was then to investigate the functional impact of dysfunction of this gene in order to better understand the role of the involved protein as well as to confirm that the identified gene was really the causative gene. A last objective was to test this gene as a potential candidate for other ciliopathies.

We have obtained clinical data for eleven affected dogs. All these dogs were related and had a compatible clinical phenotype, present shortly after birth. All dogs had bilateral nasal discharge, moist productive cough, neutrophilic leucocytosis and recurrent respiratory infections with radiographic lesions of bronchopneumonia affecting cranial and middle lung lobes and bronchiectasis. Semen analysis revealed reduced motility of spermatozooids and high percentage of abnormal morphology. *Situs inversus* was also present in one third of the cases. Ciliary anomalies in transmission electron microscopy revealed an uncommon phenotype characterized by the absence of inner dynein arms and axonemal disorganization. Pedigree analysis suggested an inherited autosomique recessive pattern. Genome wide association study performed on five affected dogs and fifteen control dogs allowed the identification of an area containing 151 genes. To select the best candidate genes, cilia database were interrogated and ten candidates were selected (Gherman *et al.*, 2006) (Inglis *et al.*, 2006). Sequencing of these candidates allowed the identification of a premature stop codon within *CCDC39*, a gene coding for a protein enriched in coiled coils domains. All affected dogs were homozygous for the mutation, all obligated carriers were heterozygous, confirming the autosomal recessive inherited pattern. To assess the mutation prevalence with Old English Sheepdogs breed, more than 500 dogs were genotyped using Taqman technology. The mutated allele was more frequent in the European population with a carrier frequency of 19%. Heterozygous were less common in dogs from North America, with a frequency around 7%.

Several results confirmed that this mutation is responsible for the observed clinical phenotype. First, this variant was not found in a control population of 80 dogs from nine different breeds. Second, non-sense mediated RNA decay was visualized in respiratory epithelial cells from a carrier and mRNA expression of *CCDC39* was severely reduced in affected dogs compared to control dogs. *CCDC39* protein was also absent from affected ciliated cells compared to control ciliated cells in dogs. Furthermore, we were able to show that *CCDC39* was preferentially expressed within ciliated tissues in mouse and human. Finally, when *CCDC39* expression is suppressed in zebrafish embryos, we observed the occurrence of dose dependent laterality defects. When morphants embryos were rescued with wild type *CCDC39* mRNA, the left lateral expression became predominant again. Due to its involvement in canine PCD, *CCDC39* might be responsible for human cases. To test this hypothesis, we selected 53 human patients with a similar ultrastructural phenotype. Sequencing of coding parts and exon-intron boundaries revealed 15 different mutations. In most of the cases, mutations were present either at homozygous state or as compound heterozygous. However, no mutations were identified in patients exhibiting a different ultrastructural phenotype or in patients with laterality defect alone.

To better understand *CCDC39* function on ciliary structure, protein expression analysis were performed. *CCDC39* protein was absent in respiratory epithelial cells from human patients, as it was the case in affected dogs. High-resolution immunofluorescence analysis of respiratory cells showed predominant axonemal staining in controls but not in cells containing mutations in *CCDC39*. We used the same technique to characterize the effect of *CCDC39* deficiency on cilia structure using several antibodies directed against several cilia substructure. Inner dynein arms and dynein regulatory complex were absent from *CCDC39* mutant cells. Finally, a dyskinetic pattern was visualized for affected cells. This pattern was characterized by reduced amplitude with rigid axonemes that showed fast, flickery movements.

This study allowed the identification of a novel gene involved in PCD in Old English Sheepdogs and in human. This gene codes for an axonemal protein whose absence is responsible for inner dynein arms defect and axonemal disorganization resulting in a dyskinetic ciliary beating pattern. The clinical phenotype in Old English Sheepdogs is remarkably similar to human cases, with severe respiratory signs, spermatoc abnormalities and lateral defects in some of the cases. As in most of PCD cases, individuals will develop the disease if they receive two *CCDC39* damaged copies, as all affected dogs were homozygous for the mutation and human patients were either homozygous or compound heterozygous. All the mutations identified in this study were associated with a loss of function and are probably responsible for a loss of the protein, due to mRNA decay, as it has been shown in Old English Sheepdogs. Subsequently, other studies have confirmed this finding with identification of new mutations within *CCDC39* associated with a loss of function (Blanchon *et al.*, 2012) (Zariwala *et al.*, 2013) (Antony *et al.*, 2013). All the identified mutations were systematically associated with a well defined ultrastructural phenotype accounting for 12% of human PCD cases (Jorissen *et al.*, 2000b) (Chilvers *et al.*, 2003a) (Papon *et al.*, 2010) (Shoemark *et al.*, 2012).

Simultaneously to *CCDC39* discover, another gene, *CCDC40* was identified as a causative gene for the same ultrastructural phenotype. These two proteins are closely related as *CCDC40* deficiency lead to *CCDC39* mislocalization in ciliated cells (Becker-Heck *et al.*, 2010). These two genes explain most of PCD cases with inner dynein arms deficiency and axonemal disorganization (Blanchon *et al.*, 2012) (Antony *et al.*, 2013).

We demonstrated that *CCDC39* plays a key role in motile cilia structure and function. Indeed, expression analysis revealed that *CCDC39* was predominantly expressed in ciliated tissues and the protein was absent in mutated cells. Furthermore, inactivation of this gene in zebrafish embryos led to laterality defects suggesting a dysfunction of motile cilia from Kupffer vesicles, an organ responsible for left right asymmetry.

The identification of this gene is particularly interesting as it is the first gene enriched in coiled coils domains involved in PCD cases. This discovery highlighted the key role of these structures for motile cilia. Subsequently, several other genes coding for protein rich in coiled coils were associated with human PCD cases (Becker-Heck *et al.*, 2010) (Hjeij *et al.*, 2014) (Horani *et al.*, 2013a) (Knowles *et al.*, 2013a) (Panizzi *et al.*, 2012) (Wirschell *et al.*, 2013). The exact role of these proteins remains unclear, but they seem to play a role in dynein regulatory complex structure and in the anchoring of inner dynein arms to adjacent microtubules.

CCDC39 is the first gene involved in canine PCD. More than 500 Old English Sheepdogs were genotyped and higher carrier frequency was identified in Europe. This finding might be related to extensive use of some famous dogs in the eighties. The availability of this test is a tool for breeders to detect healthy carriers and avoid new cases occurrence.

Finally, this study is a good illustration of the use of dogs to unravel the genetic basis of some human pathologies. Indeed, the canine model is unique for various reasons (Lequarré *et al.*, 2011). First, dogs benefit from advanced health care. Furthermore, each breed represent a genetic isolate. The consequence is a concentration of deleterious alleles that can explain the high frequency of some pathologies similar to human diseases in specific breeds. Third, the canine genome is very similar to human genome and its structure is unique to decipher mendelian traits and complex traits (Lindblad-Toh *et al.*, 2005). Finally, affected Old English sheepdogs might be used to test new therapy and might represent a unique opportunity to develop gene therapy for PCD patients.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
AMPc : Adenosine monophosphate cyclique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
cGMP : Guanosine monophosphate cyclique
BD : Bras de dynéine
BI : Broncho-interstitiel
BDE : Bras de dynéine externes
BDI : Bras de dynéine internes
CBF : Fréquence du battement ciliaire
CR : Crêtes radiales
DCP : Dyskinésie ciliaire primaire
IFT : Transport intra-flagellaire
LCR : Liquide céphalo-rachidien
N-DRC : complexe régulateur des bras de dynéine
PCD : Primary ciliary dyskinesia
RFX : Regulatory factor X
SA : *Situs ambiguus*
SS : *Situs solitus*
SI : *Situs inversus*
TEM : Microscopie à transmission électronique
US : Ultrastructure

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	17
1 Les cils	17
1.1 Les cils primaires et les cils mobiles	18
1.2 Cils ou flagelle ?	19
1.3 La structure et l'ultrastructure du cil mobile	19
1.3.1 Structure transversale de l'axonème	19
1.3.2 Structure longitudinale de l'axonème	21
1.3.3 Les dynéines	24
1.3.4 Les crêtes radiales	24
1.3.5 Les liens de nexine et le complexe régulateur des dynéines (N-DRC)	25
1.4 Le battement ciliaire	26
1.5 Localisation et fonction des cils dans le corps humain	27
1.5.1 Localisation et fonction des cils primaires	27
1.5.2 Localisation et fonction des cils mobiles	27
1.5.2.1 Les cils de l'épithélium respiratoire	28
1.5.2.2 Les cils du système nerveux central	29
1.5.2.3 Les cils et le système reproducteur	30
1.5.3 Cas particulier du nœud embryonnaire	31
1.5.3.1 Structure du nœud embryonnaire	32
1.5.3.2 Génération du flux nodal :	32
2 Ciliogénèse et transport intra-flagellaire	35
2.1 Les premières étapes de l'assemblage ciliaire	35
2.2 Le transport intraflagellaire	36
2.3 La différenciation en cils mobiles	38
3 L'escalator et la clairance muco-ciliaire	39
3.1 L'épithélium	39
3.1.1 Le liquide présent à la surface de l'épithélium respiratoire	40
3.1.2 Mouvement du liquide présent à la surface des voies respiratoires	42
3.1.2.1 Transport macroscopique	42
3.1.2.2 Transport microscopique	42
3.2 La toux, second mécanisme de clairance mucociliaire	42
4 Ciliopathies	44
5 Ciliome et organisme modèle	45
5.1 Analyse protéomique de l'axonème	45
5.2 Analyse protéomique du corpuscule basal	46
5.2.1 Utilisation de la bioinformatique à la recherche des séquences X-box	46
5.2.2 Etude de génomique comparative	47
5.2.3 Analyse du transcriptome pendant la régénération flagellaire	47
6 Les dyskinésies ciliaires primaires chez l'homme	49
6.1 Définition	49
6.2 Epidémiologie	50
6.3 Phénotypes des dyskinésies ciliaires primaires	51
6.3.1 Atteinte du système respiratoire supérieur	51
6.3.1.1 Atteinte otologique	51
6.3.1.2 Atteinte sinonasale	52
6.3.2 Atteinte du système respiratoire inférieur	52
6.3.2.1 Le syndrome de détresse respiratoire du nouveau né	54
6.3.2.2 Bronchite chronique, pneumonie récurrente et bronchiectasie	55

6.3.2.3	Fonction pulmonaire.....	56
6.3.3	Atteinte du système reproducteur.....	57
6.3.3.1	Chez l'homme.....	57
6.3.3.2	Chez la femme.....	58
6.3.4	Défaut de latéralité.....	59
6.3.5	Autres atteintes plus rares :.....	60
6.3.5.1	Hydrocéphalie.....	60
6.3.5.2	Atteinte cardiovasculaire.....	60
6.4	Diagnostic des dyskinésies ciliaires primaires.....	62
6.4.1	Suspicion clinique.....	62
6.4.2	Tests de screening.....	63
6.4.2.1	Mesure du monoxyde d'azote (NO) nasal :.....	63
6.4.2.2	Test à la saccharine.....	64
6.4.2.3	Test de clairance mucociliaire à l'aide de radioaérosol.....	64
6.4.3	Confirmation du diagnostic.....	65
6.4.3.1	Anomalies structurelles : la microscopie électronique.....	65
6.4.3.1.1	Dyskinésies ciliaires primaires vs secondaires :.....	65
6.4.3.1.2	Les différents phénotypes ultrastructuraux des DCP.....	65
6.4.3.1.3	Prévalence des défauts ultrastructuraux.....	69
6.4.3.1.4	Limites de la microscopie électronique.....	70
6.4.3.2	Anomalies fonctionnelles : analyse de la fonction ciliaire.....	70
6.4.3.2.1	Mesure de la fréquence du battement ciliaire.....	71
6.4.3.2.2	Analyse du pattern du battement ciliaire.....	71
6.4.3.3	Ciliogénèse.....	73
6.4.3.4	Analyse par immunofluorescence.....	74
6.4.3.5	Analyse génétique.....	74
6.5	Génotypes des dyskinésies ciliaires primaires.....	75
6.5.1	Mode de transmission génétique.....	75
6.5.2	Différents gènes identifiés.....	75
6.5.2.1	Clonage positionnel : analyse de liaison génétique.....	75
6.5.2.2	Approche par gène candidat en utilisant des organismes modèles.....	76
6.5.2.3	Approche combinant clonage positionnel et organismes modèles.....	78
6.5.2.4	Approche combinant clonage positionnel et l'utilisation d'outil informatique d'analyses comparatives.....	79
6.5.2.5	Gènes identifiés après la découverte de CCDC39.....	80
6.5.2.6	Gènes identifiés récemment grâce au séquençage à haut débit.....	81
7	Les dyskinésies ciliaires primaires dans l'espèce canine.....	87
7.1	Présentation clinique.....	87
7.2	Anomalies ultrastructurelles :.....	89
7.3	Mode de transmission génétique.....	92
OBJECTIFS		93
ETUDES		
1.	Etude 1 : Identification de CCDC39, une gène impliqué dans les DCP chez le bobtail et dans l'espèce humaine	95
2.	Etude 2 : Phénotype clinique de la DCP et prévalence de la mutation dans la race bobtail	137
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		148
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		159

INTRODUCTION :

Avant d'aborder les dyskinésies ciliaires primaires, il est indispensable de se pencher sur le rôle des cils dans l'organisme et plus particulièrement dans le système respiratoire, et de rappeler leurs structures ainsi que leurs modes de formation. Ensuite, ce travail reprendra brièvement la composition et le rôle de l'escalator mucociliaire et les études réalisées sur différents organismes modèles qui ont contribué à une meilleure connaissance des gènes et des protéines impliquées dans la structure et la fonction des cils. La seconde partie de cette introduction se focalisera sur les dyskinésies ciliaires primaires en médecine humaine, puis dans l'espèce canine.

1 Les cils

Les cils sont des prolongements cytoplasmiques qui sont apparus très tôt dans l'évolution des eucaryotes. Ce sont des petites projections qui s'étendent à la surface de la cellule dans le milieu extracellulaire. Ils sont constitués de plusieurs centaines de protéines, organisées autour d'un squelette de microtubules, entourés par une prolongation de la membrane apicale cellulaire. Le squelette du cil ou axonème ciliaire dérive du centriole qu'il prolonge en formant une structure cylindrique composée de microtubules.

L'ancêtre eucariotique cilié commun contient un set de microtubules internes, la paire centrale, qui a soit été maintenue pendant l'évolution dans une configuration « 9+2 » ou perdue dans la configuration « 9+0 » (Figure 1).

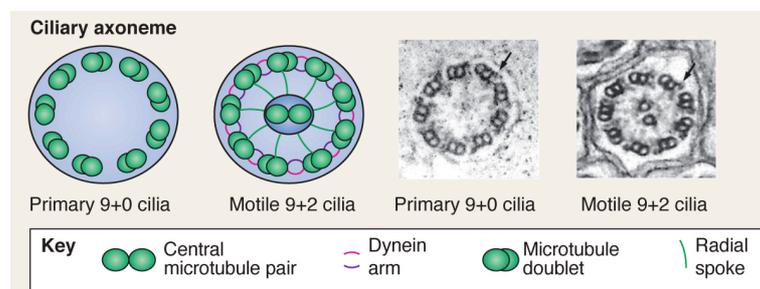


Figure 1 : Les cils sont des structures que l'on classe en fonction de la configuration des microtubules qui les composent. Les cils primaires ont une configuration 9+0 (neuf paires de doublet de microtubules) tandis que les cils mobiles possèdent une configuration 9+2 (+2 représente la paire centrale additionnelle)(Oh et Katsanis, 2012).

1.1 Les cils primaires et les cils mobiles

Historiquement, on distingue deux grands types de cils en fonction de cette architecture. La majorité des cils mobiles possèdent un arrangement 9+2, tandis que la plupart des cils primaires ou non-mobiles ont une configuration de type 9+0.

Il existe quelques exceptions à cette règle, comme par exemple, les cils mobiles du nœud embryonnaire qui possèdent un arrangement de type 9+0 (Nonaka *et al.*, 1998) et les kinocils présents dans l'oreille interne qui présentent un arrangement de type 9+2 et qui sont immobiles (Flock et Duvall, 1965). Un meilleur indicateur de la mobilité ciliaire est la présence de structures axonémales requises pour la génération du mouvement, comme les dynéines.

Les cils primaires sont des organelles sensorielles qui contiennent une variété de récepteurs, incluant des récepteurs couplés à la protéine G (Singla et Reiter, 2006). Typiquement un seul cil pousse à la surface de la cellule, telle une antenne qui reçoit les signaux venus de l'extérieur. Ces cils primaires possèdent un cytosquelette de microtubules organisés avec un arrangement « 9+0 ». Les cils primaires sont présents sur la plupart des cellules des vertébrés, sous la forme d'un cil isolé qui peut apparaître seulement pendant l'interphase (Satir *et al.*, 2010). Jusque récemment, les cils primaires étaient considérés comme des organelles vestigiales et isolées sans réelle signification clinique. Néanmoins, il devient de plus en plus clair que le cil primaire joue un rôle sensoriel, via des récepteurs extracellulaires qui répondent à des stimulations mécaniques, chimiques et pour les structures spécialisées, à des stimuli comme la lumière, la température ou la gravité. Les cils primaires jouent également un rôle prépondérant dans de nombreuses voies de signalisation du développement et de l'homéostasie de nombreux tissus (Satir et Christensen, 2007; Gerdes *et al.*, 2009). Pour se convaincre du rôle majeur des cils primaires, il suffit de voir le nombre de ciliopathies existantes, ainsi que leur grande variété de phénotypes.

A l'opposé de ces cils sensoriels, les cils mobiles apparaissent par dizaines voir centaines à la surface des cellules épithéliales où ils génèrent un rôle mécanique. Les cils mobiles possèdent un arrangement typique « 9+2 ». Les cils mobiles réalisent une variété de fonctions très différentes. Parmi ces fonctions, on peut citer la génération du mouvement d'organismes unicellulaires vers un signal lumineux ou vers des nutriments, le déplacement des spermatozoïdes vers l'ovocyte, le mouvement dirigé de matériel extracellulaire comme c'est le cas pour l'épithélium respiratoire ou encore une réception sensorielle (Mizuno *et al.*, 2012).

Dans des organismes simples, tels que l'algue flagellée unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*), il existe un chevauchement considérable entre les fonctions sensorielles et motrices et cette classification peut paraître simpliste. Les fonctions sensorielles et motrices sont considérées comme distinctes dans les cellules des mammifères, bien que certaines études récentes suggèrent que les cils mobiles ont des propriétés chemo-sensorielles et peuvent détecter des substances dans leur environnement (Shah *et al.*, 2009; Bloodgood, 2010).

1.2 Cils ou flagelle ?

Ces deux organelles partagent une structure largement commune, puisqu'elles possèdent entre autres une configuration identique de type 9+2 ainsi que les mêmes mécanismes d'assemblage (transport intra-flagellaire) (Silverman et Leroux, 2009).

Classiquement, on distingue les cils mobiles des flagelles grâce à leur différence de longueur, leurs types de mouvement et le nombre d'organelles présentes par cellule. Le flagelle est classiquement plus long que l'axonème des cils mobiles. Le mouvement flagellaire est en général sinusoïdal et se déroule sur un même plan, tandis que celui des cils mobiles est plus complexe. Enfin on retrouve un ou deux flagelles par cellule tandis que les cils mobiles sont plus nombreux (Afzelius, 2004).

1.3 La structure et l'ultrastructure du cil mobile

Les cils primaires et les cils mobiles partagent une structure largement commune composée des doublets de microtubules périphériques et de la membrane ciliaire. Ici, nous nous intéresserons principalement à la structure de base des cils mobiles.

Leur taille est d'environ 6-7 μm et de 0,2-0,3 μm de diamètre.

La plupart de nos connaissances en matière de constituants ciliaires sont basées sur l'étude du flagelle chez l'algue verte *C. Reinhardtii* (Dutcher, 1995).

1.3.1 Structure transversale de l'axonème

La structure basique du cil a été identifiée à l'aide du développement de la microscopie électronique. Les 9 doublets de microtubules sont disposés en parallèle et radialement autour d'une paire centrale de microtubules isolés. Les microtubules sont des cylindres creux constitués grâce à la polymérisation de tubulines α et β . Chaque doublet est composé d'un tubule A circulaire, composé de 13 protofilaments et d'un tubule B elliptique et incomplet,

composé de 10 protofilaments. Le tubule B partage donc une paroi commune avec le tubule A (Warner et Satir). Au niveau du corpuscule basal, on retrouve également un tubule C incomplet (10 protofilaments) en plus des 2 précédemment cités (Li *et al.*, 2011).

Dans la configuration 9+2, une paire de microtubules A est placée au centre de l'axonème ciliaire. Cette paire centrale possède son propre jeu de projections ainsi qu'un complexe de protéines qui forme une gaine centrale.

Dans la zone de doublet (voir ci-dessous, la structure de l'axonème), plusieurs complexes protéiques sont attachés aux paires de microtubules périphériques. Parmi ces complexes protéiques, on retrouve, les dynéines qui confèrent l'activité motrice au cil, ainsi que des crêtes radiales qui jouent un rôle structural en maintenant la paire centrale au milieu de l'axonème, mais également fonctionnel en régulant le battement ciliaire. Enfin, le complexe régulateur des dynéines contient les liens de nexine qui relient les paires de microtubules adjacents entre eux et jouent également un rôle dans la régulation du battement ciliaire (Heuser *et al.*, 2009).

L'axonème ciliaire est composé par la répétition de segments identiques d'environ 96 nm. Les différents complexes protéiques sont représentés dans ce segment et sont donc régulièrement espacés le long du tubule A, tous les 96 nm environ (Figure 2) (Fisch et Dupuis-Williams, 2011).

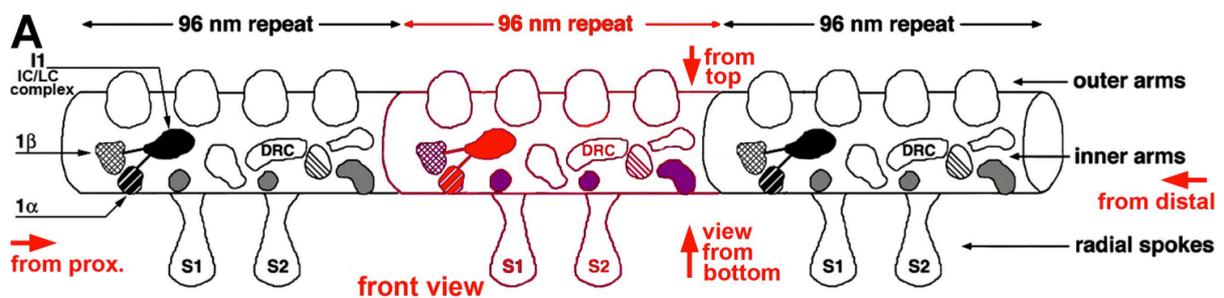


Figure 2: Schéma représentant la répétition périodique des complexes protéiques liés à l'axonème ciliaire. Vue longitudinale d'un doublet de microtubules composé de 3 segments de 96 nm. On peut y observer la présence de 4 BDE, 3 BDI, 1 groupe de crêtes radiales et d'une paire de N-DRC. D'après (Heuser *et al.*, 2009).

Comme le mécanisme moléculaire du mouvement est hautement conservé, le diamètre axonémal, qui dicte la relation entre le glissement des doublets et le ploiement du cil, doit être conservé. La structure axonémale est également hautement conservée.

1.3.2 Structure longitudinale de l'axonème

Longitudinalement, le cil peut être divisé en plusieurs régions : le corpuscule basal, la zone de transition, la zone de doublet et l'extrémité du cil (Figure 3)(Fisch et Dupuis-Williams, 2011).

Le **corpuscule basal**, ne fait pas à proprement parler partie du cil. C'est une structure dérivée du centriole, qui permet la fixation et l'organisation des microtubules. Il est composé de 9 triplets de microtubules, disposés en cercle. Il est situé en périphérie de la cellule ciliée et est entouré par du matériel péricentriolaire (Gerdes *et al.*, 2009). Le corpuscule basal joue également un rôle de site d'amarrage pour le transport intraflagellaire des particules (Deane *et al.*, 2001).

La **zone de transition** fait la liaison entre le cil et le corpuscule basal. Elle prend naissance là où les triplets de microtubules se poursuivent par des doublets et se termine là où la paire centrale de microtubules prend naissance. Bien que ses composants soient conservés, son apparence varie entre les espèces. C'est une région complexe, qui inclut différentes structures telles que des fibres transitionnelles, des « Y-linkers » et les plaques basales et terminales. Elle joue un rôle dans le transport intraflagellaire de molécules (Deane *et al.*, 2001) et pourrait jouer un rôle dans la stabilisation de la paire centrale de microtubules (O'toole *et al.*, 2007).

Elle est suivie de la **zone de doublet** dans laquelle on observe 9 paires de microtubules périphériques. La zone de doublet est celle qui a été le plus étudiée et c'est dans cette zone que l'on retrouve les différents complexes protéiques moteurs.

Finalement, l'**extrémité du cil** est composée d'une zone où les microtubules sont isolés (Fisch et Dupuis-Williams, 2011). La partie distale du cil pourrait également contribuer à la mobilité du cil, notamment pour les cellules respiratoires et celles de l'oviducte. En effet, cette zone serait plus rigide en raison de liens présents entre les tubules A restants, et la membrane ciliaire. Cette rigidité accrue permettrait la propulsion du mucus dans la trachée et de l'ovocyte dans l'oviducte. Une protéine appelée Sentan localisée par immunofluorescence dans cette zone, pourrait faire partie de ces molécules qui forment un pont entre les tubules A et la membrane (Kubo *et al.*, 2008).

Les cils sont des structures polarisées. En effet, les microtubules y sont arrangés avec leur pôle positif à l'extrémité du cil, tandis que le pôle négatif est dirigé vers le corpuscule basal (Yamada *et al.*, 1998).

La **membrane ciliaire** recouvre l'axonème ciliaire. Elle est en continuité avec la membrane plasmatique mais leur composition respective diffère. Chez les organismes unicellulaires, elle contient des canaux Ca^{++} et des récepteurs spécifiques afin de contrôler le battement ciliaire (Satir et Guerra, 2003). Chez *C. reinhardtii*, la membrane ciliaire contient différents canaux et pompes ioniques et des récepteurs sensoriels capables de détecter divers stimuli (Taylor et Zhulin, 1999). On peut supposer que des organismes plus complexes comme les mammifères ont conservé une fonction sensorielle pour les cils mobiles. Dès lors, des récepteurs et des canaux devraient être présents sur la membrane ciliaire. Une étude réalisée sur des cellules respiratoires bovines a mis en évidence que le contrôle de la fréquence du battement ciliaire repose en partie sur des nucléotides cycliques (Wyatt *et al.*, 2005). On pourrait supposer que comme c'est le cas pour des organismes ciliés, l'adenylyl et la guanylyl cyclase sont présentes sur la membrane ciliaire afin de participer à ces changements de fréquence. Certains récepteurs spécifiques, comme des récepteurs à tyrosine kinase, ont été identifiés sur la membrane ciliaire des cellules de l'oviducte. De plus, le niveau de certaines protéines de la membrane ciliaire comme les polycystines augmente avec l'ovulation, ce qui implique que l'activité ciliaire de ces protéines est associée avec la détection de changements physico-chimiques, établissant ainsi un environnement favorable au transport et à la fertilisation de l'ovocyte (Teilmann *et al.*, 2005). La figure 3 illustre la structure normale d'un cil de vertébrés (Gerdes *et al.*, 2009).

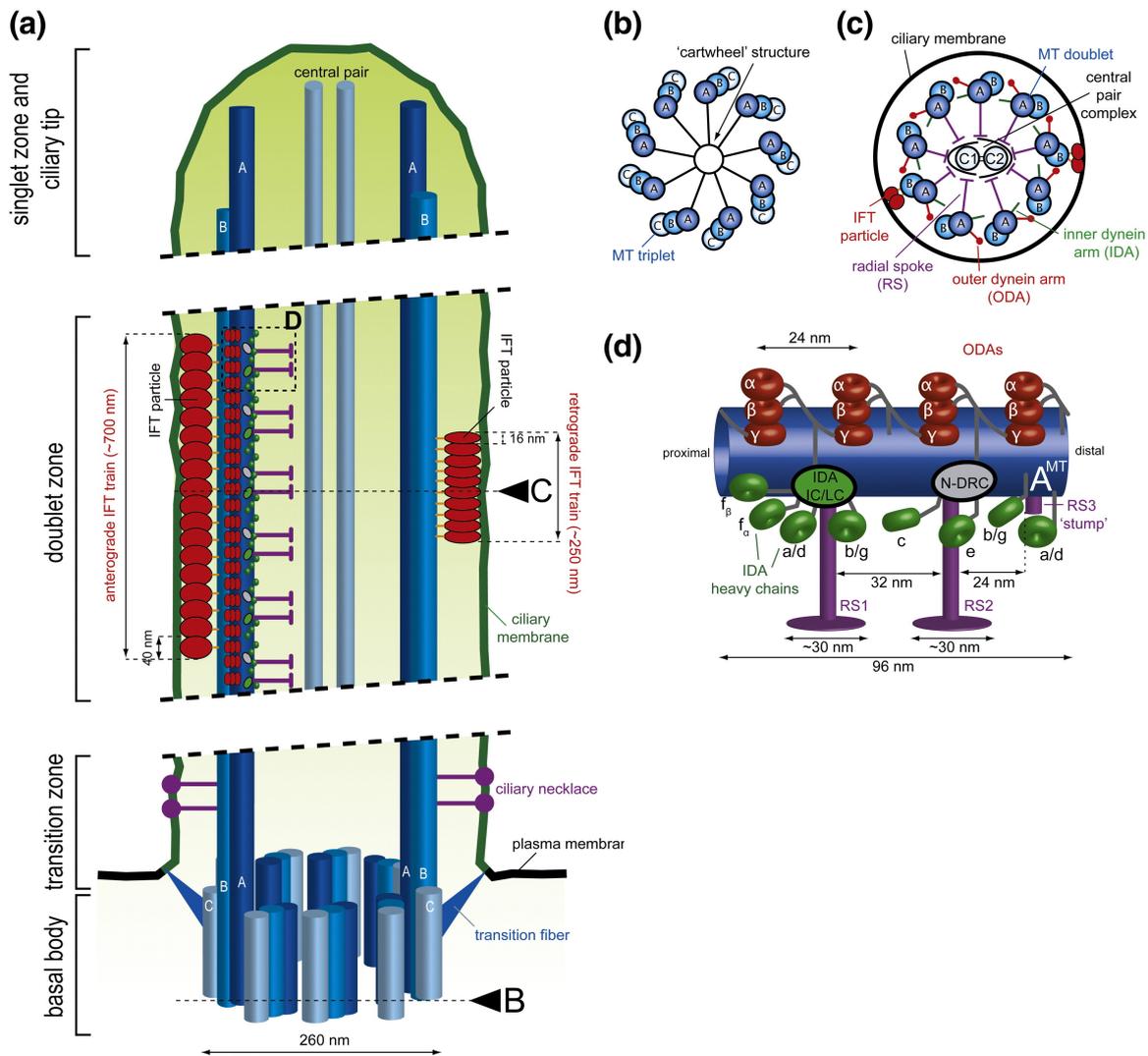


Figure 3 : représentation simplifiée d'un cil mobile et des différentes structures axonémales qui le composent. (a) Section longitudinale. Les différentes régions sont indiquées sur la gauche. Les microtubules A et B prennent naissance au niveau du corpuscule basal où ils forment des triplets avec un microtubule C, et s'étendent tout le long de l'axonème pour former les doublets périphériques. Les structures axonémales motrices sont attachées aux microtubules A. Un convoi d'IFT se déplace par voie antérograde sur la gauche de l'axonème, tandis qu'un autre convoi est visible et se dirige de façon rétrograde. (b) Section transversale dans la portion proximale du corpuscule basal (B). (c) Section transversale au travers de la zone de doublet (C). Les 9 doublets de microtubules forment un anneau, qui est connecté à la paire centrale grâce aux crêtes radiales. La région (d) détaille les différentes structures présentes sur une sous-unité de l'axonème ciliaire et provient de la zone entre les lignes pointillées sur le graphique (a) (Mizuno *et al.*, 2012).

1.3.3 Les dynéines

Les dynéines sont des protéines motrices qui sont responsables de la génération de la force requise par le battement ciliaire. Elles transforment donc l'énergie chimique contenue dans l'ATP en énergie mécanique et sont à l'origine du battement ciliaire en provoquant le glissement des microtubules les uns par aux autres.

Elles sont composées de chaînes lourdes contenant 6 domaines AAA+ (ATPases associated with diverse cellular activities), de chaînes intermédiaires et de chaînes légères. Les chaînes lourdes contiennent les domaines qui génèrent la force motrice, alors que les chaînes intermédiaires et légères ont un rôle de régulation de l'activité et interviennent dans le transport intraflagellaire. Plus de 50 polypeptides différents ont été identifiés chez *C. reinhardtii*, intervenant dans la composition, dans la fonction ou dans l'assemblage des dynéines (Hom *et al.*, 2011). Les dynéines axonémales sont localisées près des doublets de microtubules et sont subdivisées en 2 catégories, les bras de dynéine externes (BDE) et les bras de dynéine internes (BDI) en fonction de leurs localisation et structure.

Les BDE sont localisés à la périphérie externe de l'axonème. Chaque segment est composé de 4 BDE. Ils sont constitués de 2 ou 3 chaînes lourdes (les dynéines α , β , et γ) selon l'espèce, et associés à plusieurs chaînes intermédiaires et légères (Salathe, 2007; Mizuno *et al.*, 2012). Ils sont localisés perpendiculairement à l'axonème ciliaire et sont dirigés vers le microtubule B adjacent (Ishikawa *et al.*, 2007). Durant le battement ciliaire, les chaînes lourdes de dynéines interagissent avec les microtubules adjacents et induisent un mouvement des microtubules les uns par rapport aux autres. Les BDE contrôleraient ainsi la vitesse à laquelle l'axonème ploie pour créer les ondes motrices (Elam *et al.*, 2009).

Les BDI sont, comme leur nom l'indique, localisés à la périphérie interne du doublet. Chez *C. reinhardtii*, il existe 7 types différents dont 6 sont des monomères et possèdent une seule tête tandis que le dernier est un dimère composé de 2 têtes. Ils interviennent dans la régulation de la formation de l'onde et dans la propagation de la courbe le long de l'axonème et donnent la forme finale du battement ciliaire (Brokaw, 1994; Chilvers *et al.*, 2003b).

1.3.4 Les crêtes radiales

Les crêtes radiales sont des structures en forme de T avec une longue tige fixée sur le tubule A d'un doublet périphérique et une tête orthogonale qui est en contact avec la paire centrale de

microtubules (Warner et Satir, 1974). On observe un groupe de crêtes radiales attaché à chaque sous-unité du microtubule A. Chez la plupart des organismes et chez les mammifères, ce groupe est composé d'un triplet de crêtes (RS1, RS2 et RS3). En revanche, *C. reinhardtii* ne possède qu'une paire de crêtes sur chaque segment (Pigino et Ishikawa, 2012).

Les crêtes radiales résultent de l'assemblage de nombreuses protéines. Au moins 23 polypeptides différents ont été identifiés comme étant leurs composants (Yang *et al.*, 2006).

Les crêtes radiales et la paire centrale auxquelles elles sont fixées, régulent ensemble l'activité des dynéines. Le mécanisme de coordination entre la paire centrale, les crêtes radiales et les dynéines a été démontré en étudiant l'orientation de la paire centrale chez *C. Reinhardtii*. Chez les mutants qui possédaient des crêtes radiales, la paire centrale était orientée vers les doublets périphériques en mouvement (Wargo et Smith, 2003). L'orientation de la paire centrale serait une réponse passive au ploiement du cil (Mitchell, 2004).

1.3.5 Les liens de nexine et le complexe régulateur des dynéines (N-DRC)

Le complexe régulateur des dynéines est un complexe qui régulerait l'activité des dynéines. Ce complexe a été identifié comme une structure en forme de croissant qui s'étend sur une large surface entre les doublets de microtubules. Il est localisé à proximité de la deuxième crête radiale et est en connexion avec les BDI (Mastronarde *et al.*, 1992; Gardner *et al.*, 1994; Heuser *et al.*, 2009).

Les liens de nexine sont des structures qui connectent 2 doublets de microtubules adjacents. Ces liens limitent le glissement local des doublets de microtubules généré par les bras de dynéines et transforme le glissement « longitudinal » local en un ploiement axonémal (Summers et Gibbons, 1971). Ces liens de nexine font partie du complexe régulateur des dynéines, c'est pourquoi on parle de N-DRC, pour « Nexin-Dynein Regulatory Complex » (Heuser *et al.*, 2009). Au moins 12 protéines sont impliquées dans la structure du N-DRC (Lin *et al.*, 2011).

Plusieurs enzymes (kinases, phosphatases, et autres enzymes métaboliques) sont associées à la mobilité axonémale et aux structures constituant l'axonème ou proches de celui-ci (Ginger *et al.*, 2008).

1.4 Le battement ciliaire

Les BDE et BDI sont les moteurs moléculaires du cil, qui permettent au doublet de microtubules auxquels ils sont fixés, de glisser par rapport à celui d'à côté. Durant un battement, les bras de dynéines passent par un cycle d'attachement, de rétraction et de détachement au doublet de microtubule adjacent. Il en résulte un mouvement de glissement longitudinal des doublets de microtubules les uns par rapport aux autres qui est transformé en ploiement par les liens de nexines. Les dynéines se déplacent ainsi vers l'extrémité négative de l'axonème ciliaire. Ce mouvement unidirectionnel le long du tubule B, induit un ploiement dans une direction, alors que les dynéines localisées à l'opposé de l'axonème induisent un ploiement dans la direction opposée (Satir, 1989). Si toutes les dynéines étaient actives simultanément, aucun battement ciliaire ne serait généré. Pour générer un battement ciliaire, l'activité des dynéines doit être coordonnée sur la longueur mais aussi sur la circonférence de l'axonème (Satir, 1989) (Smith et Sale, 1992). Le battement ciliaire est donc permis grâce à la coordination de l'activité des dynéines par des structures telles que le N-DRC, les crêtes radiales et la paire centrale (Piperno *et al.*, 1994; Smith, 2002; Bower *et al.*, 2009).

La paire de microtubules centrale s'oriente passivement en fonction de l'activité des dynéines. Ce changement d'orientation transmet un signal via les crêtes radiales et le N-DRC aux bras de dynéine internes qui est ensuite transmis aux bras de dynéine externes (Heuser *et al.*, 2009).

Ces interactions permettent un mouvement de va-et-vient du cil par un contrôle du ploiement du cil. Pendant longtemps, on a cru que le battement des cils se déroulait en deux phases bien distinctes: une phase de battement dite « efficace » et une phase dite de « récupération » (Sanderson et Dirksen, 1985). Les études du pattern du battement ciliaire à l'aide de système de vidéo digitale à haute vitesse et à haute résolution ne semblent pas confirmer cette hypothèse, puisque les cils respiratoires y battent simplement de l'avant vers l'arrière sur un même plan sans mouvement de côté (Chilvers et O'callaghan, 2000). La fréquence maximale des battements ciliaires peut aller jusqu'à 100 Hz, mais la plupart du temps est autour de 10-20 Hz.

Il existe une corrélation entre le nombre de BDE présents et la fréquence du battement ciliaire puisque les patients atteints d'un dysfonctionnement ciliaire montrent une fréquence de battement ciliaire plus faible (Chilvers *et al.*, 2003a). Ces résultats confirment que les BDE contrôlent la fréquence des battement ciliaires en augmentant ou en réduisant la vitesse de glissement des doublets dans l'axonème sans réellement affecter la forme du battement ciliaire. Ces changements de vitesse sont permis principalement par une phosphorylation dépendante

de la concentration en AMPc, des chaînes légères des BDE (Christensen, 2001). Le cGMP joue également un rôle dans ce processus (Salathe, 2007).

Les BDI contrôlent des paramètres qui sont liés à l'amplitude du ploiment du cil et à la forme du battement (Brokaw, 1994). Ce contrôle est effectué au moins en partie via des kinases et des phosphatases qui phosphorylent ou déphosphorylent les protéines de la crête radiale (Porter et Sale, 2000). Ces changements agissent sur la vitesse du glissement des doublets qui sont limités par les BDI.

1.5 Localisation et fonction des cils dans le corps humain

Bien que la structure de l'axonème ciliaire soit hautement conservée au cours de l'évolution, les cils ont néanmoins évolué afin d'accomplir de nombreuses fonctions spécialisées très différentes au sein du corps humain.

1.5.1 Localisation et fonction des cils primaires

Les cils primaires se retrouvent sur la plupart des organes. Ils sont présents sur des cellules épithéliales comme celles des tubules rénaux, du canal biliaire ou encore au niveau du pancréas endocrine ou de la thyroïde. On les retrouve également sur des cellules non-épithéliales comme les chondrocytes, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les neurones ou les cellules de Schwann (Satir *et al.*, 2010).

Les cils primaires sont principalement des senseurs cellulaires et détectent des changements extracellulaires de température, d'osmolalité, de lumière, de tension mécanique, de pression osmotique, de liaison hormonale, etc. et traduisent ces signaux en changements intracellulaires (Schwartz *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 2011).

1.5.2 Localisation et fonction des cils mobiles

Chez les mammifères, on retrouve les cils mobiles à la surface des épithéliums respiratoires, dans le système nerveux central, dans les systèmes reproducteurs mâle et femelle. Le flagelle des spermatozoïdes possède une structure analogue aux cils mobiles. Un autre type de cils mobiles est présent transitoirement à la surface du nœud embryonnaire ventral. Le nombre et la longueur des cils varient considérablement entre ces différents types de tissus (Afzelius, 2004). La figure 4 illustre ces localisations variées.

1.5.2.1 Les cils de l'épithélium respiratoire

Des cils mobiles et un épithélium cilié sont présents au niveau du système respiratoire supérieur. On les retrouve, sur la muqueuse de l'oreille moyenne, au niveau des cavités nasales, des sinus paranasaux, des trompes d'Eustache et dans le naso-pharynx. On les retrouve également au niveau du tractus respiratoire inférieur, dans la trachée, les bronches et les bronchioles respiratoires.

Les cils présents sur le tractus respiratoire sont un des composants clés de la **clairance mucociliaire**. Chaque cellule épithéliale possède environ 200 cils qui se projettent à sa surface. Leur longueur est d'environ 6 μm . La fréquence de battement normale est de 10-12 battements par seconde (Afzelius, 2004).

Leur fonction est de propulser la couche de mucus qui repose à leur extrémité. Les cils respiratoires ont un mouvement principalement vertical pendant la première phase de battement, ce qui leur permet de pénétrer la couche de mucus qui les recouvre, propulsant ainsi le mucus vers le pharynx. Durant la seconde phase, la quasi totalité du cil bouge horizontalement, dans la couche de fluide périciliaire qui est relativement immobile et situé en dessous de la couche de mucus (Boucher, 2004; Braiman et Priel, 2008).

Il existe une coordination des cils d'une même cellule, mais aussi entre les cellules adjacentes afin de propulser le mucus vers l'oropharynx. Tous ensemble, ils génèrent un mouvement métachronal, caractérisé par un mouvement ondulatoire généré par une activation séquentielle, et non synchronisée, des cils présents à la surface de l'épithélium. Le mécanisme de coordination entre les cils qui génère ce mouvement n'est pas encore élucidé. La proximité spatiale des cils jouerait un rôle important pour la coordination (Gheber et Priel, 1989). La coordination du battement ciliaire entre les cellules ciliées pourrait être liée à des flux de calcium au travers de gap junctions (Sanderson *et al.*, 1988). De plus, l'environnement dans lequel les cils battent est constitué de fluide, ce qui implique qu'il existe des forces hydrodynamiques entre les cils. Ces interactions hydrodynamiques pourraient être le facteur le plus important de la coordination ciliaire à la surface de l'épithélium respiratoire et expliqueraient la longueur limitée des ondes métachronales (Gheber *et al.*, 1998).

Une clairance mucociliaire efficace dépend donc de la présence d'un nombre suffisant de cils à la surface de la cellule, de leurs battements à une fréquence appropriée, mais aussi de la forme de leurs battements et de la coordination entre les cellules de l'épithélium respiratoire.

Enfin les cils présents à la surface de cet épithélium jouent également un rôle sensoriel puisque leurs membranes ciliaires possèdent notamment des récepteurs sensibles à l'amertume. L'interaction de composés amers avec ces récepteurs entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium qui induit une augmentation de la fréquence des battements ciliaires. Cette augmentation de fréquence permet une élimination plus rapide des composés toxiques par l'accélération de la clairance muco-ciliaire (Shah *et al.*, 2009).

1.5.2.2 Les cils du système nerveux central

Des cils mobiles sont également retrouvés sur les cellules épendymaires qui tapissent les ventricules cérébraux. Ces cils sont plus longs que ceux de l'épithélium respiratoire. Ils mesurent entre 10 et 15 μm et battent à une fréquence plus élevée. Ils sont également moins nombreux, leur nombre varie entre un seul cil et une douzaine par cellule.

Leur rôle n'est pas clairement identifié, mais ils faciliteraient le mouvement du liquide céphalo-rachidien (LCR). En effet, le développement d'une hydrocéphalie chez des souris possédant des mutations sur des gènes liés aux cils, suggère fortement que les cils épendymaires jouent un rôle dans le transport du LCR (Ibañez-Tallon *et al.*, 2002). Cependant, il est peu probable que le battement ciliaire soit responsable de la majeure partie du mouvement de LCR qui est produit au niveau des plexus choroïdes. En effet, les changements de pression au sein des vaisseaux cérébraux, entre la systole et la diastole, contribuent à la majeure partie du mouvement du LCR (Bradley *et al.*, 1986). Les cils pourraient jouer un rôle particulièrement important dans la circulation du LCR au niveau des portions les plus étroites comme l'aqueduc de Sylvius ou le foramen.

En l'absence de flux correct, l'accumulation de LCR résulte en une augmentation de pression au sein des ventricules cérébraux qui mène à la perte des cellules épendymaires et à la mort cellulaire des neurones du cortex et finalement résulte en un amincissement du cortex cérébral (Del Bigio, 2004).

1.5.2.3 Les cils et le système reproducteur

On retrouve des cellules ciliées au niveau des trompes de Fallope, de l'endomètre et du cervix chez la femelle. Ces cils faciliteraient le transport de l'ovocyte, des ovaires à l'utérus. Les changements hormonaux cycliques induisent des modifications au niveau de l'épithélium des trompes de Fallope qui affectent les cellules ciliées et la fréquence du battement ciliaire (Verhage *et al.*, 1979; Donnez *et al.*, 1985). Le mécanisme par lequel l'épithélium répond à divers stimuli hormonaux n'est pas complètement élucidé, mais le cil pourrait jouer un rôle de fonction sensorielle et de transduction des signaux provenant de l'environnement extracellulaire (Teilmann *et al.*, 2005; Teilmann *et al.*, 2006).

La propulsion des gamètes et des embryons est due à des interactions complexes entre la contraction musculaire, l'activité ciliaire et le courant généré par les sécrétions des trompes de Fallope (Lyons, 2006). Les cils ne seraient donc pas indispensables au transport de l'ovocyte (Halbert *et al.*, 1997).

Les cils mobiles jouent également un rôle dans le système reproducteur masculin, puisqu'ils tapissent une partie de l'épididyme et du canal déférent. Ces cils assisteraient le transport des spermatozoïdes des testicules vers l'urètre. Enfin, le flagelle du spermatozoïde possède une ultrastructure qui s'apparente fortement à l'axonème des cils mobiles. Il est beaucoup plus long que ces derniers et mesure environ 45 μm et possède également des bras de dynéine. Le mouvement qu'il génère est différent de celui des cils mobiles puisque le flagelle développe un mouvement sinusoïdal (Afzelius, 2004).

Chez l'homme, la composition des bras de dynéine varie en fonction du type cellulaire. En effet, Fliegauf *et al.* (Fliegauf *et al.*, 2005) ont démontré, par une analyse histochimique, que la composition des BDE variait entre les cellules respiratoires et le flagelle des spermatozoïdes. Dans les cellules respiratoires, le complexe DNH5 était présent sur toute la longueur de l'axonème ciliaire, tandis que DNAH9 était localisé exclusivement à l'extrémité distale du cil. Par contre, le flagelle des spermatozoïdes montrait une disposition différente de ces composants, avec DNAH5 qui était localisé sur la portion proximale du flagelle et DNAH9 qui était présent sur toute la longueur de l'axonème (Fliegauf *et al.*, 2005).

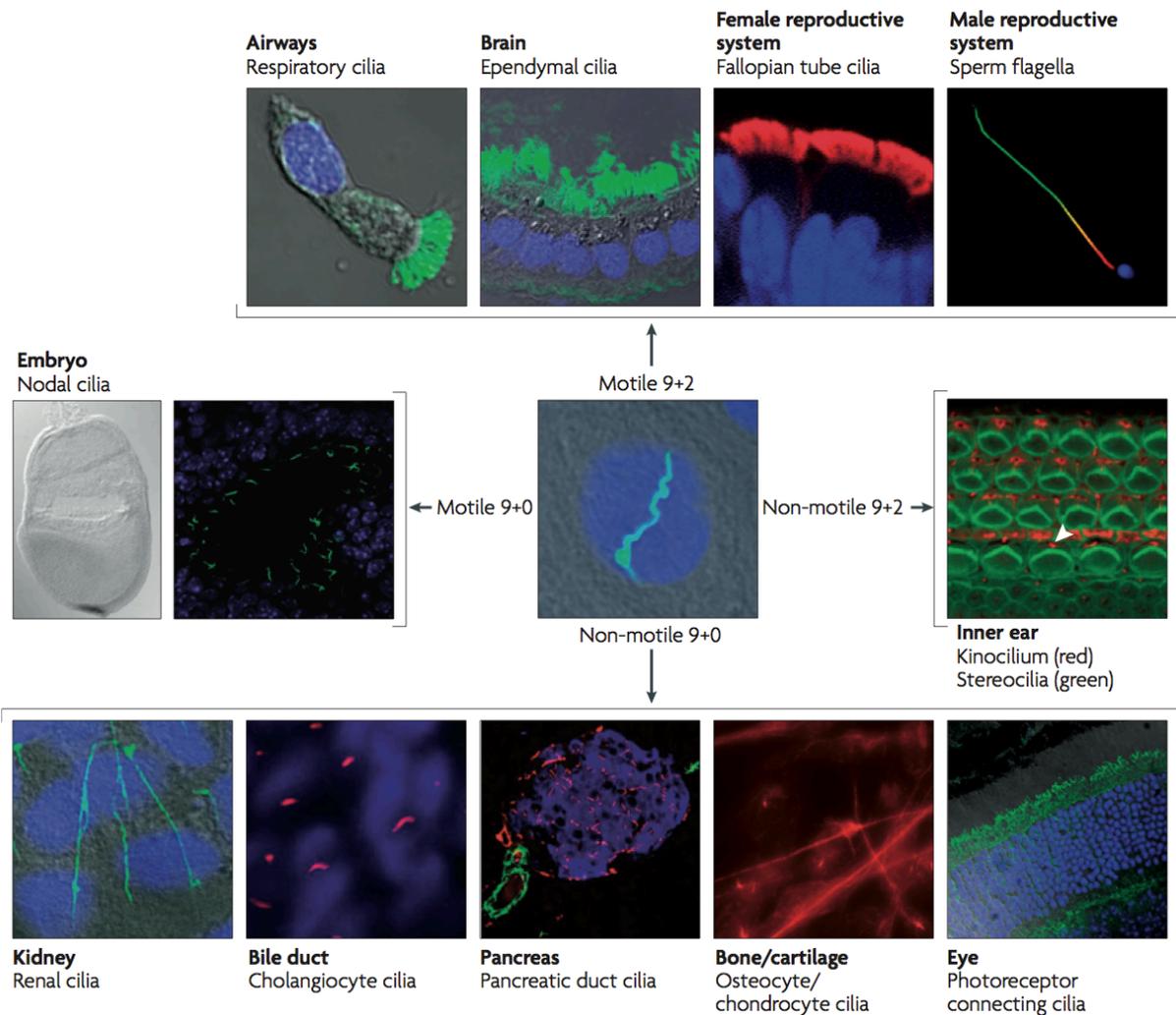


Figure 4 : illustration de la localisation des différents types de cellules ciliées ainsi que leurs structures (Fliegauf *et al.*, 2007).

1.5.3 Cas particulier du nœud embryonnaire

Malgré la symétrie bilatérale externe, le corps des vertébrés possède une asymétrie gauche droite interne. Chez les mammifères, le cœur est classiquement situé à gauche dans la cavité thoracique et le foie est situé à droite dans la cavité abdominale. Dans les 20 dernières années, de nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes qui mènent à l'établissement de l'asymétrie interne.

1.5.3.1 Structure du nœud embryonnaire

Chez les mammifères, le nœud embryonnaire est situé à l'extrémité distale de l'embryon cylindrique. Il est constitué de deux couches cellulaires au sein desquelles 200 à 300 cellules sont ciliées. Chaque cellule possède un seul cil (monocil) qui provient de la face ventrale de l'embryon (Sulik *et al.*, 1994).

Dans la plupart des études chez la souris, les cils du nœud embryonnaire possèdent un arrangement de type 9+0, sans paire de microtubules centrale (Bellomo *et al.*, 1996; Takeda *et al.*, 1999). Toutefois, un arrangement de type 9+2 a été mis en évidence chez le lapin (Feistel et Blum, 2006) et le zebrafish (Kramer-Zucker, 2005) et une étude menée sur le nœud embryonnaire chez la souris a mis en évidence la présence de cils mobiles possédant une paire centrale de microtubules (Caspary *et al.*, 2007).

Ces cils développent une activité motrice rotationnelle, car ils possèdent des bras de dynéine (Nonaka *et al.*, 1998; Okada *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 1999). Chez l'embryon de souris, des mutations dans un gène codant pour une chaîne lourde des BDE étaient associées à l'immobilité des cils présents sur le nœud embryonnaire (Supp *et al.*, 1997).

1.5.3.2 Génération du flux nodal

Certains cils présents au niveau du nœud embryonnaire sont capables de générer un flux nécessaire à l'initiation de la cascade des signaux menant à l'asymétrie gauche-droite (Nonaka *et al.*, 1998). La surface ventrale du nœud embryonnaire chez les mammifères, ou de la structure équivalente chez des autres vertébrés est couverte de monocils qui tournent dans le sens des aiguilles d'une montre, générant ainsi un courant dirigé vers la gauche, dénommé le flux nodal (Essner *et al.*, 2002). Quand les cils du nœud sont immobiles ou absents, le flux nodal n'existe pas, ce qui conduit à une latéralisation aléatoire des différents organes (Supp *et al.*, 1997; Nonaka *et al.*, 1998; Okada *et al.*, 1999). A contrario, la génération d'un flux de fluide artificiel dirigé vers la droite sur des embryons de souris inversait l'asymétrie gauche-droite (Nonaka *et al.*, 2002). Ces résultats indiquent que la génération du flux nodal est un élément clé dans l'établissement de l'asymétrie de nos organes internes.

Deux hypothèses ont été proposées afin d'expliquer la détermination de l'asymétrie par le flux nodal (Figure 5).

La première hypothèse repose sur le « modèle des deux cils ». Dans ce modèle, des cils mobiles localisés au centre du nœud embryonnaire généreraient le flux nodal et des cils « sensoriels » situés à la périphérie du nœud pourraient détecter ce flux et initier la cascade des signaux liée au développement. Ce modèle est principalement basé sur l'observation que l'expression de la polycystine-2, une protéine impliquée dans la mécano-sensation, est limitée à la périphérie du nœud, alors que les cils situés au centre expriment une protéine impliquée dans la structure des dynéines (LRD) mais n'expriment pas la polycystine 2 (Pennekamp *et al.*, 2002; Mcgrath *et al.*, 2003). Cette hypothèse semble être confirmée par une étude réalisée sur le nœud embryonnaire chez la souris, dans laquelle les cils en position centrale contenaient des dynéines et étaient capables de générer un flux, tandis que les cils présents à la périphérie du nœud étaient immobiles (Mcgrath *et al.*, 2003). La coexistence de cils avec un arrangement de type 9+2 et 9+0 au sein du nœud embryonnaire pourrait également étayer cette hypothèse (Caspary *et al.*, 2007).

La deuxième hypothèse postule que des facteurs transportés par le flux nodal pourraient déclencher l'initiation de la régulation de gènes spécifiques au côté gauche. Le flux nodal emporterait des vésicules remplies de morphogènes vers la gauche où ces vésicules seraient brisées et libéreraient leur contenu afin de déclencher l'activation des gènes du côté gauche (Tanaka *et al.*, 2005).

Ces deux hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives et pourraient toutes deux intervenir dans la détermination de l'asymétrie.

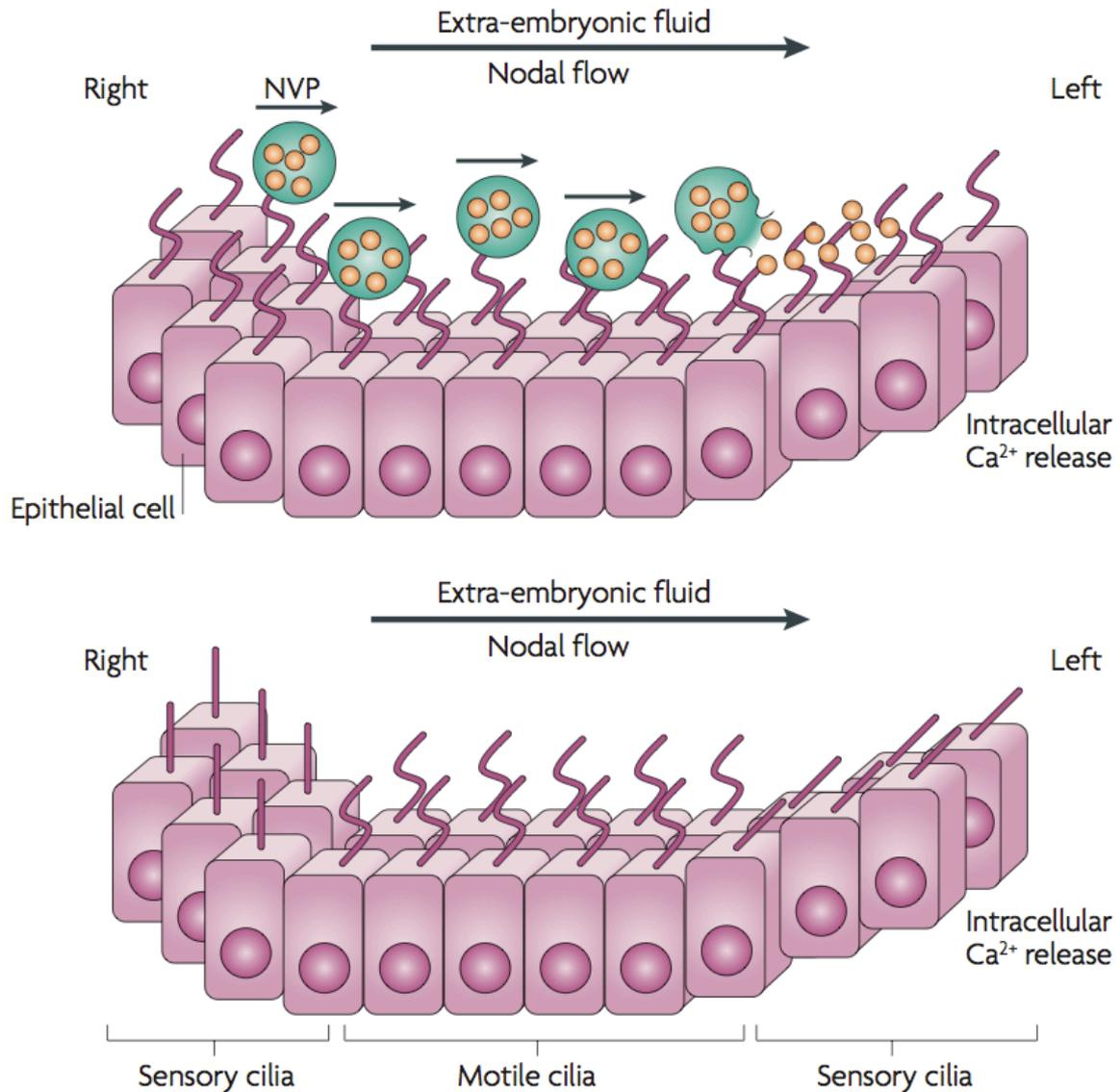


Figure 5 : Illustration des deux mécanismes responsables de la latéralisation des organes internes. En haut, des vésicules remplies de morphogènes sont emmenées du côté gauche par le flux nodal généré par les cellules ciliées où elles s’ouvrent et déversent leur contenu. Les morphogènes se lient alors à des récepteurs spécifiques transmembranaires localisés sur la membrane ciliaire, ce qui induit une libération du Ca²⁺ intracellulaire et des événements en aval qui rompent la bilatéralité.

Le schéma du bas représente le modèle des deux cils. Les cils mobiles du centre génèrent un flux nodal dirigé vers la gauche qui est mécaniquement détecté par le ploiment des cils sensoriels localisés à gauche. Le ploiment des cils déclenche la libération du Ca²⁺ intracellulaire du côté gauche qui initie l’établissement de l’asymétrie (Fliegauf *et al.*, 2007).

2 Ciliogénèse et transport intra-flagellaire

2.1 Les premières étapes de l'assemblage ciliaire

On distingue quatre grandes étapes dans l'assemblage du cil primaire (Sorokin, 1962). Ces différentes étapes sont illustrées dans la figure 6. Les trois premières étapes correspondent au pré-assemblage du cil et la quatrième étape correspond à l'élongation de l'axonème ciliaire via le transport intra-flagellaire des composants de l'axonème ciliaire.

La première étape est caractérisée par l'attachement d'une vésicule provenant de l'appareil de Golgi à l'extrémité distale du centriole « mère ». Lors de cette étape, l'axonème ciliaire naissant émerge et la vésicule s'invagine à cause de l'extension du centriole et de l'accumulation des structures accessoires qui deviendront le corpuscule basal.

La deuxième étape correspond à la fusion des vésicules environnantes avec la nouvelle membrane qui se forme à la base du cil afin de créer une gaine qui entoure l'axonème en construction dans lequel les paires de microtubules sont rapidement assemblées.

Lors de la troisième étape, la membrane entourant l'axonème atteint la surface cellulaire. La membrane ciliaire fusionne alors avec la membrane plasmatique et le corpuscule basal s'arrime à la périphérie de la cellule (Sorokin, 1962).

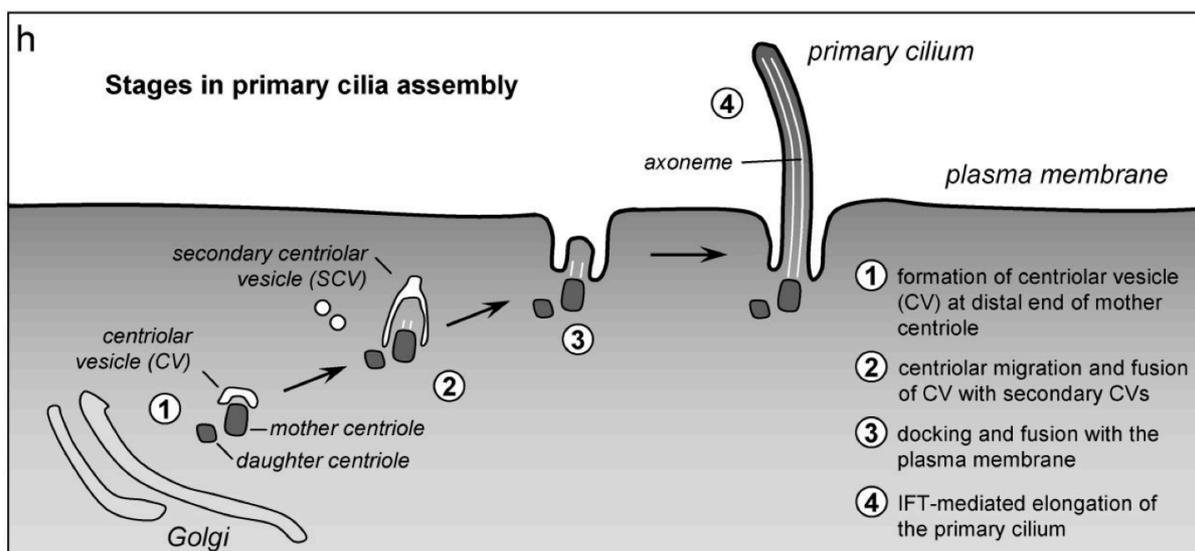


Figure 6 : Schéma reprenant les quatre étapes de la formation du cil primaire (Pedersen *et al.*, 2008).

2.2 Le transport intraflagellaire

Les cils sont assemblés par une voie de transport extrêmement conservée, appelée le transport intraflagellaire (IFT). L'IFT est caractérisé par un mouvement bidirectionnel de macromolécules le long de l'axonème.

Ce transport a été identifié pour la première fois par Kozminski et al. en 1993. Cette équipe a mis en évidence la présence de particules, suffisamment grandes pour être observées en microscopie optique et qui se déplaçaient sous la membrane flagellaire à une vitesse de 2 – 3 $\mu\text{m/s}$. En microscopie électronique, les particules d'IFT apparaissent comme du matériel électron-dense qui occupe l'espace entre les microtubules périphériques et la membrane flagellaire. Les particules sont organisées en convoi (encore appelé « IFT trains ») de longueur variable (Kozminski *et al.*, 1993).

Le transport antérograde est caractérisé par le mouvement de particules de la base vers l'extrémité du cil tandis que le transport rétrograde se fait de l'extrémité du cil à sa base. Les particules propulsées par la voie antérograde sont des précurseurs des structures axonémales, comme la tubuline (Bhogaraju *et al.*, 2013) ou des composants des crêtes radiales, destinées au site d'assemblage à l'extrémité du cil. En revanche, les particules qui se déplacent par voie rétrograde sont associées au turn-over de l'axonème et sont ramenées à la cellule pour y subir un recyclage (Qin, 2004).

Les particules sont propulsées par des moteurs moléculaires. La kinésine 2 est le moteur moléculaire de la voie antérograde puisqu'elle « marche » vers l'extrémité positive des microtubules (Cole *et al.*, 1998). Ce complexe protéique utilise l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP afin de propulser les trains à l'extrémité du cil (Pedersen et Rosenbaum, 2008). Les dynéines cytoplasmiques motrices 2 et 1B fournissent la force du mouvement le long des microtubules de l'axonème de la voie rétrograde (Pazour *et al.*, 1999; Porter *et al.*, 1999; Perrone *et al.*, 2003).

Ce transport est réalisé à l'aide de deux complexes IFT, le complexe IFT A contenant 6 sous-unités et le complexe IFT B qui est constitué de 14 sous-unités. Le rôle de ces complexes serait d'agir en tant qu'adaptateur entre les moteurs (kinésine-2 et dynéine cytoplasmique) et le chargement. Plusieurs études ont démontré que des mutations dans les composants de ces complexes IFT, étaient associées à des ciliopathies (Pazour *et al.*, 1999; Fliegauf *et al.*, 2007).

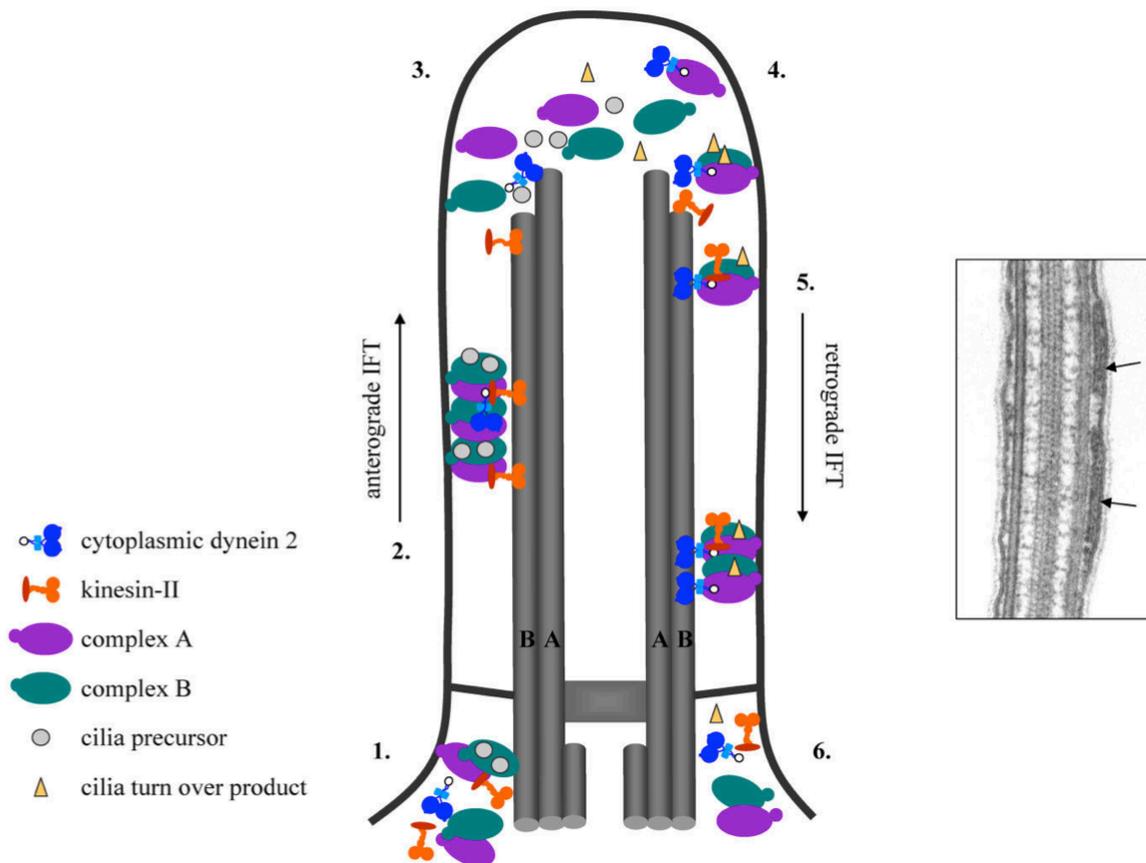


Figure 7 : illustration du transport intraflagellaire.

- Etape 1 : les particules et les moteurs se positionnent en périphérie du corpuscule basal.
- Etape 2 : la kinésine-2 effectue le transport antérograde des complexes A et B, des précurseurs axonémaux et de la dynéine cytoplasmique.
- Etape 3 : libération des différents éléments à l'extrémité du cil
- Etape 4 : les complexes A et B se lient à la dynéine cytoplasmique activée. La kinésine 2 s'attache également à ce « train ».
- Etape 5 : la dynéine cytoplasmique 2 transporte les autres composants de l'IFT, ainsi que les produits du turn-over axonémal vers la cellule.
- Etape 6 : Les composants de l'IFT sont à nouveau dans la cellule.

L'image de droite représente une section longitudinale du flagelle de chlamydomonas en TEM, avec deux groupes de particules d'IFT (Pedersen et Rosenbaum, 2008).

2.3 La différenciation en cils mobiles

Chez les mammifères, seules certaines cellules dans des tissus spécifiques ont la capacité de former des cils mobiles. Ce qui implique l'existence d'un « programme » génétique dédié à la ciliogénèse des cils mobiles, activé uniquement dans certains types cellulaires.

Jain et al. ont démontré qu'un cil primaire était présent transitoirement sur l'épithélium des cellules respiratoires non-différenciées, mais que ce cil primaire disparaissait dans les cellules bien différenciées des voies respiratoires de l'adulte. Leurs résultats suggèrent que les cellules possédant un cil primaire seraient vouées à devenir les cellules ciliées de l'épithélium respiratoire, notamment, parce qu'elles présentent deux marqueurs précoces de la cellule ciliée mobile naissante : des centrioles répliqués et l'expression de Foxj1 (Jain *et al.*, 2010).

Foxj1 est un des acteurs clés dans la formation des cils mobiles puisqu'il est exprimé dans différents tissus possédant des cils mobiles (Hackett *et al.*, 1995; Brody *et al.*, 2000; Jain *et al.*, 2010), que son absence induit l'apparition de défaut de latéralité et d'hydrocéphalie chez la souris {Brody 2000, Jacquet 2009} et que l'expression ectopique de Foxj1 chez le zebrafish et *Xenopus* est suffisante pour induire une croissance de cils mobiles dans des divers tissus (Stubbs *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008).

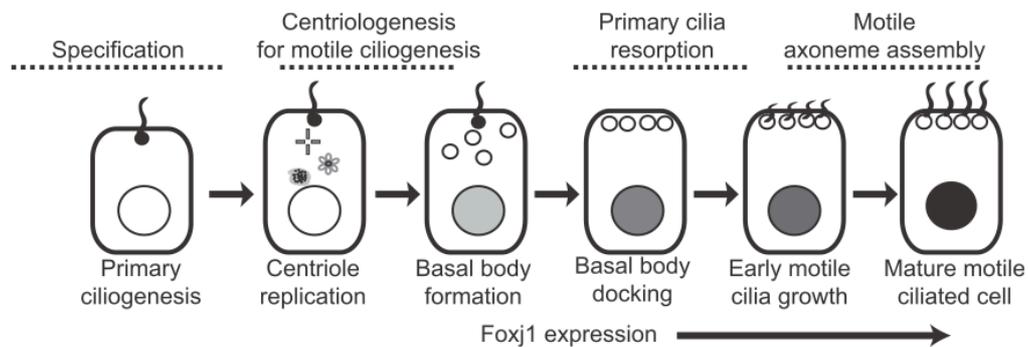


Figure 8 : Proposition de modèle expliquant la différenciation des cellules ciliées mobiles à partir d'un cil primaire. Une cellule épithéliale respiratoire possédant un cil primaire génère une cellule fille qui entre dans la voie de différenciation d'une cellule ciliée. Dans un environnement approprié, la présence d'un cil primaire indique les cellules qui généreront plusieurs centrioles, qui formeront plus tard, les corpuscules basaux, et qui exprimeront Foxj1. Une fois que la cellule exprime Foxj1, elle est destinée à posséder des cils mobiles et le cil primaire disparaît (Jain *et al.*, 2010).

3 L'escalator et la clairance muco-ciliaire

Les voies respiratoires bifurquent 20 à 25 fois entre la trachée et les alvéoles. L'air s'engouffre en premier lieu au niveau d'un passage relativement étroit dans les cavités nasales et la trachée et atteint ensuite une surface totale très importante due au grand nombre de bifurcations au sein des bronches et des bronchioles. Cette forme d'entonnoir pose quelques problèmes en terme de défense pulmonaire puisque, à chaque respiration, les poumons sont exposés à des pathogènes inhalés, tels que des poussières, des bactéries ou encore des toxines. Un système de défense local et complexe s'est progressivement mis en place afin de protéger les voies respiratoires. Ce système de défense contient notamment l'escalator muco-ciliaire dont le rôle est d'éliminer mécaniquement les particules qui se déposent à la surface de l'épithélium. Cet escalator muco-ciliaire représente la première ligne de défense envers le bombardement constant de ces particules inhalées. Il est constitué d'un épithélium cilié et de deux couches de mucus. La toux représente un autre mécanisme de clairance pulmonaire.

3.1 L'épithélium

L'épithélium des voies respiratoires est un épithélium cilié pseudostratifié. Il est composé de différents types de cellules qui sont toutes directement en contact avec la membrane basale. Il est composé d'une seule couche cellulaire, mais les noyaux ne sont pas alignés sur un même plan, ce qui donne cet aspect multi-couches.

La majorité des cellules qui le composent sont de trois types : les cellules ciliées, les cellules sécrétantes et les cellules basales.

Les cellules **ciliées** sont des cellules cylindriques qui possèdent les cils décrits dans le chapitre précédent. Ce sont les cellules prédominantes de l'épithélium respiratoire puisqu'elles représentent plus de 50% des cellules et leur rôle est de propulser le mucus des bronches jusqu'au pharynx.

Les cellules sécrétantes libèrent différentes molécules antimicrobiennes (defensine, lysozyme et IgA), mais aussi des molécules immuno-modulatrices (cytokines) ainsi que de grosses glycoprotéines appelées mucines qui peuvent fixer de grandes quantités d'eau et former ainsi la couche de mucus recouvrant l'épithélium respiratoire (Evans *et al.*, 2010). Parmi les cellules sécrétantes, les **cellules muqueuses** sont relativement nombreuses. Ces cellules contiennent des granules de mucine. Elles sont reconnaissables grâce à leur forme de calice et leurs granules

qui sont relativement clairs en microscopie électronique. Les **cellules séreuses** sont présentes en moins grand nombre. Elles ressemblent aux cellules muqueuses car elles possèdent également des granules mais ceux-ci sont électron-denses. Les cellules de Clara quant à elles, sont responsables de la production du surfactant. On les retrouve dans l'épithélium des bronches et des bronchioles.

Les **cellules basales** sont petites et cuboïdes. Elles ont gardé des capacités de différenciation et sont considérées comme des cellules souches de l'épithélium respiratoire. Ces cellules sont, par exemple, capables de migrer vers une zone lésée de l'épithélium afin de le couvrir et de se différencier ensuite afin de restaurer l'épithélium.

L'épithélium respiratoire contient également un petit nombre de cellules neuroendocrines. Ces cellules sécrètent un certain nombre d'amines biogéniques et de peptides qui joueraient un rôle important dans la croissance foetale pulmonaire. Elles joueraient également un rôle de chémorécepteur en détectant par exemple une hypoxie au niveau des voies respiratoires (Knight et Holgate, 2003).

Le rôle de cet épithélium est de fournir les activités intégrées requises pour le transport du mucus, notamment l'activité ciliaire et la régulation de la quantité en sel et en eau présente à la surface cellulaire via le transport transépithélial d'ions. Il joue également un rôle de bouclier chimique contre les bactéries inhalées par la sécrétion locale de substances antimicrobiennes (Knowles et Boucher, 2002).

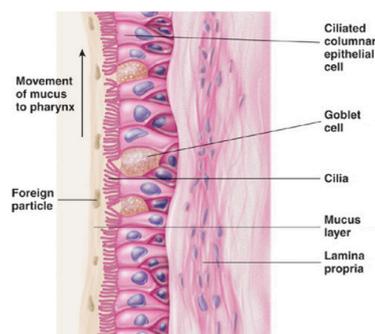


Figure 9 : illustration des différents types cellulaires présents dans l'épithélium respiratoire.

3.1.1 Le liquide présent à la surface de l'épithélium respiratoire

Ce liquide est composé d'au moins deux couches, une couche de mucus et une couche de fluide périciliaire sous-jacente. La couche de mucus est composée d'un réseau de macromolécules de

mucines qui sont particulièrement adaptées pour se lier et retenir les particules inhalées, en partie grâce à la grande diversité de leurs chaînes de carbohydrates. En effet, les mucines présentent un catalogue de toutes les séquences de carbohydrates et peuvent se lier en théorie, à toutes les particules qui se posent sur l'arbre respiratoire et, du coup, les éliminer des voies respiratoires (Lamblin *et al.*, 2001).

La couche de liquide périciliaire possède deux grandes fonctions. La première est de fournir aux cils un environnement peu visqueux qui leur permet de battre rapidement, sans trop de résistance. La seconde est d'empêcher que les glycoprotéines de la couche de mucus n'entrent en contact avec le glycocalyx de la membrane apicale épithéliale (Knowles et Boucher, 2002).

Chez les individus sains, le mucus est constitué de 97% d'eau et seulement de 3% de solides. La portion solide est constituée d'un tiers de mucines, d'autres protéines, de lipides, de sels et de débris cellulaires. Avec cette composition, le mucus a la consistance d'un blanc d'œuf et peut aisément être déplacé par le battement ciliaire. Cependant, ce fragile équilibre peut être compromis soit par une hypersécrétion de mucines, soit par une mauvaise régulation du volume de liquide ce qui peut conduire à un épaississement du mucus qui sera alors beaucoup plus difficile à déplacer (Fahy et Dickey, 2010).

La grande quantité d'eau présente dans la couche de mucus sert de tampon au fluide périciliaire, ce qui permet à cette couche de maintenir un volume suffisant durant des variations physiologiques de l'hydratation des voies respiratoires (Tarran *et al.*, 2001).

Précédemment, on considérait que la couche de liquide périciliaire était constituée principalement d'eau. Cependant une étude récente, suggère que cette couche est constituée d'une grande quantité de mucines et de grandes glycoprotéines qui seraient intimement liées aux cils et formeraient ainsi un fin filet. Ce réseau préviendrait la pénétration de molécules plus grandes comme les particules inhalées et les mucines de la couche de mucus dans le fluide périciliaire. Ce modèle expliquerait pourquoi les deux couches peuvent coexister sans se mélanger (Button *et al.*, 2012).

3.1.2 Mouvement du liquide présent à la surface des voies respiratoires

3.1.2.1 Transport macroscopique

Une approche utile pour quantifier la clairance basale du mucus chez l'homme est de mesurer la clairance de particules radioactives déposées au niveau des poumons en fonction du temps, et ce par scintigraphie. Cette clairance dépend des interactions entre les cils et la couche de mucus les surplombant. La fréquence des battements ciliaires ainsi que l'efficacité des cils sont des déterminants majeurs du taux de clairance, mais la quantité et les propriétés viscoélastiques des mucines ainsi que celles de la couche de fluide périciliaire sont également importantes. Une grande variabilité du taux de clairance existe, même chez des patients sains (Wanner *et al.*, 1996).

3.1.2.2 Transport microscopique

Des interactions complexes existent entre les cils, les mucines mobiles de la couche de mucus et le fluide périciliaire sous-jacent. Par exemple, les deux couches bougent le long de l'épithélium de manière unidirectionnelle, suite à l'action des cils (Matsui *et al.*, 1998). Mais, les cils jouent également un rôle dans le mouvement vertical au sein de la couche de mucus. Les particules qui se déposent à la surface de la couche de mucus sont mélangées à celle-ci et sont alors prises au piège (Worlitzsch *et al.*, 2002). Cette particularité permet à la couche de mucus d'éliminer tous les types de particules inhalées.

Le battement ciliaire agit aussi sur la surface inférieure de la couche de mucus afin de propulser celui-ci vers le pharynx. Ce déplacement entraîne une friction entre la couche de mucus et la couche de fluide périciliaire, qui a pour conséquence un déplacement de cette couche secondaire dans un sens opposé et à la même vitesse que la couche de mucus.

3.2 La toux, second mécanisme de clairance mucociliaire

La toux est le second mécanisme qui permet la clairance du mucus. Par définition, cette clairance est indépendante de l'activité des cils mais son efficacité dépend des propriétés de la couche de mucus et de la couche de fluide périciliaire (Knowles et Boucher, 2002). En effet, l'épaisseur et le volume de liquide présent à la surface des voies respiratoires sont directement corrélés à l'efficacité de la toux, tandis que celle-ci est inversement proportionnelle à sa viscosité.

L'absence de fluide périciliaire permet à la couche de mucus de se lier aux cils et réduit l'efficacité de la toux comme c'est le cas des patients atteints de mucoviscidose.

Les patients atteints d'une dysmotilité ciliaire ne possèdent pas de clairance muco-ciliaire basale. Par contre, la toux en tant que mécanisme de clairance existe bel et bien chez ces patients (Ellerman et Bisgaard, 1997b; Marthin *et al.*, 2010a). Du coup, ces patients peuvent avoir une clairance muco-ciliaire quasiment normale, pourvu qu'ils toussent de manière répétée. Le fait de conserver un mécanisme de clairance grâce à la toux explique probablement pourquoi les patients atteints de dysmotilité ciliaire présentent un phénotype pulmonaire moins grave que celui des patients atteints de mucoviscidose.

4 Ciliopathies

Les ciliopathies représentent un groupe très hétérogène de maladies, tant sur le plan phénotypique que génétique. Elles ont toutes une dysfonction ciliaire à l'origine de leurs mécanismes pathologiques. La découverte que de nombreuses pathologies étaient liées à des gènes codant pour des composants ciliaires a souligné l'intérêt d'une meilleure connaissance de ces structures.

Le seul désordre des cils mobiles bien défini est la dyskinésie ciliaire primaire (DCP), encore appelé le syndrome du cil immobile (Noone *et al.*, 2004). Ce syndrome hétérogène est principalement lié à des mutations dans des gènes codant pour des protéines impliquées dans la génération du battement ciliaire.

Les mutations dans des gènes impliqués dans l'élaboration ou dans la structure du cil primaire sont responsables d'autres syndromes. Parmi ces syndromes, on retrouve des maladies touchant la fonction rénale comme les maladies polykystiques ou la néphrophtisie. On retrouve également de nombreuses maladies de l'œil comme la rétinite pigmentaire ou des syndromes plus complexes, comme le syndrome de Bardet-Biedl, le syndrome de Meckel-Gruber ou encore le syndrome de Joubert (Hildebrandt *et al.*, 2011).

On pourrait s'attendre à ce que les mutations qui affectent la structure ou les processus de ciliogénèse conservés entre le cil primaire et le cil mobile (corpuscule basal, microtubules ou transport intra-flagellaire), soient à l'origine de maladies dont le phénotype reflète la fonction des deux types de cils, et que les mutations affectant des voies spécifiques à un type de cils seraient à l'origine d'un spectre plus restreint de signes cliniques.

Or, beaucoup de maladies classiquement attribuées à une atteinte des cils primaires présentent certaines caractéristiques d'une atteinte des cils mobiles. Il existe un chevauchement entre les phénotypes des différentes ciliopathies. On peut citer, par exemple, des cas de DCP associés à une rétinite pigmentaire (Moore, 2005) ou encore des cas de DCP liés à un syndrome oral-facial-digital (Budny *et al.*, 2006) ainsi que des maladies polykystiques rénales associées à des lésions de bronchiectasie (Driscoll, 2008).

5 Ciliome et organisme modèle

L'identification d'un nombre croissant de ciliopathies a permis d'acquérir une meilleure connaissance des constituants des cils ainsi que des protéines qui interviennent dans son développement. La structure des cils mobiles et des cils primaires étant largement partagée, une grande proportion des constituants se retrouve dans les deux types de cils. Cependant, chacun des types possède des constituants uniques qui sont nécessaires à leur fonction spécifique.

Un certain nombre d'études se sont intéressées aux protéines impliquées dans la structure ou dans la biogénèse des cils chez des différents types d'organismes modèles, depuis un organisme unicellulaire flagellé tel que *Chlamydomonas*, jusqu'à des organismes beaucoup plus complexes tels que la souris. Ces études ont été réalisées à l'aide de différentes approches telles que la protéomique, la bioinformatique, ou encore la génomique comparative. Elles sont la source de deux bases de données relatives aux cils (cilia proteome : <http://v3.ciliaproteome.org/cgi-bin/index.php>; ciliome : http://www.sfu.ca/~leroux/ciliome_home.htm) avec l'identification de plus de 1200 protéines impliquées de près ou de loin dans la structure ou la fonction des cils (Gherman *et al.*, 2006; Inglis *et al.*, 2006). Le paragraphe suivant reprendra une brève présentation des différentes études utilisées afin de générer ces deux bases de données.

5.1 Analyse protéomique de l'axonème

Un moyen efficace d'identifier des protéines ciliaires est de réaliser des analyses de protéomique sur des cils isolés. Ces études ont été réalisées sur différents types d'organismes modèles en utilisant la spectrométrie de masse après digestion, afin de séparer et de caractériser les différentes molécules constituantes du cil.

Certaines de ces études ont été menées sur l'axonème ciliaire de protozoaires flagellés comme *Trypanosoma brucei* (Broadhead *et al.*, 2006) ou *Tetrahymena thermophila* (Smith *et al.*, 2005). Ces études ont permis l'identification de plusieurs centaines de protéines impliquées dans la structure du flagelle. Une autre étude, réalisée sur l'axonème et la membrane ciliaire de flagelles purifiés provenant de l'algue verte, *C. reinhardtii* a permis de mettre en évidence plus de 600 protéines impliquées dans ces structures (Pazour, 2005).

D'autres études de protéomique, ont été réalisées sur des cellules provenant d'organismes beaucoup plus complexes. Par exemple, une analyse a été effectuée sur des cellules épithéliales

respiratoires humaines, mises en culture sur une interface air-liquide. L'isolation d'une quantité suffisante d'axonème ciliaire a permis l'extraction de plus de 200 protéines axonémales. Sans surprise, les isoformes des tubulines α et β ainsi que des constituants des bras de dynéine représentaient la plus grande proportion des protéines extraites (Ostrowski *et al.*, 2002). Enfin, une dernière étude s'est intéressée aux différents constituants du cil sensoriel des photorécepteurs présents sur la rétine des souris. Cette structure représente l'évolution extrême d'un cil primaire. Plus de 1900 protéines différentes ont été identifiées au sein de cette structure complexe comprenant un segment externe incluant l'axonème, le corpuscule basal, la portion transmembranaire ainsi que la portion interne de la cellule. La plupart de ces protéines sont probablement liées à la fonction ultra-spécialisée de ce cil puisque la grande majorité d'entre elles ne se retrouvaient pas chez des organismes ciliés moins complexes (Liu *et al.*, 2007).

5.2 Analyse protéomique du corpuscule basal

Une seule des deux bases de données (ciliary proteome) reprend deux études de protéomique s'intéressant aux constituants du corpuscule basal chez l'homme et chez l'algue verte, respectivement (Gherman *et al.*, 2006). La première étude s'est concentrée sur les constituants du centriole, à partir de cellules humaines, en mitose et durant l'interphase. Plus d'une cinquantaine de protéines différentes ont été identifiées (Andersen *et al.*, 2003). La seconde s'est intéressée aux constituants du centriole de *C. reinhardtii* et a permis d'identifier une petite centaine de protéines.

5.2.1 Utilisation de la bioinformatique à la recherche des séquences X-box

La production d'un cil requiert la coordination de l'expression de plusieurs centaines de protéines, au bon moment et au bon endroit. Lorsque le flagelle ou le cil est retiré, on observe l'émergence rapide de l'expression de gènes flagellaires ainsi que l'assemblage rapide d'un nouveau flagelle. Il existe donc des mécanismes de coordination de l'expression des gènes au niveau de leur transcription. La première preuve de l'existence de facteur de transcription contrôlant l'expression de gènes ciliaires a été mise en évidence chez un nématode possédant des cellules ciliées, *Caenorhabditis elegans* (Swoboda *et al.*, 2000). Swoboda *et al.* ont démontré que beaucoup de gènes impliqués dans la ciliogenèse sont sous le contrôle d'un facteur de transcription de type RFX (regulatory factor X), qui reconnaît un motif régulateur spécifique appelé X-box, situé en amont du codon start de nombreux gènes. Cette découverte a permis de scanner l'ensemble du génome d'organismes ciliés tels que *Caenorhabditis elegans* afin

d'identifier les gènes dont l'expression dépendait d'une séquence X-box. Ces études ont permis d'identifier de nombreux gènes, codant notamment pour des nouvelles protéines du transport intra-flagellaire (Blacque *et al.*, 2005; Efimenko, 2005).

5.2.2 Etude de génomique comparative

L'amélioration des techniques de séquençage a rendu disponible de nombreux génomes d'eucaryotes ciliés et non-ciliés, ce qui a permis la réalisation d'études génomiques comparatives puissantes. En soustrayant le génome d'un organisme non-cilié de celui d'un organisme cilié, on obtient une liste de toute une série de gènes potentiellement impliqués dans la fonction ciliaire. Deux études ont utilisé cette approche. La première a recherché les points communs entre le génome humain et celui de *C. reinhardtii*, pour en soustraire ensuite, celui d'un organisme non-cilié *Arabidopsis thaliana*. Cette approche a permis d'identifier plus de 600 protéines différentes dont la moitié environ n'avait pas de lien connu avec le cil (Li *et al.*, 2004). Une deuxième étude basée sur la même technique a été réalisée en comparant le génome de six ciliés (*Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans*, *Plasmodium falciparum*, *C. reinhardtii* et *Trypanosoma brucei*) avec des organismes non-ciliés (*Arabidopsis thaliana*, *Dictyostelium discoideum* et *Saccharomyces cerevisiae*). La centaine de gènes identifiés par cette méthode a ensuite été séparée en fonction de leur présence ou absence dans certains des organismes ciliés afin d'identifier, par exemple, les gènes impliqués dans la structure ou la fonction des cils mobiles (Avidor-Reiss *et al.*, 2004).

5.2.3 Analyse du transcriptome pendant la régénération flagellaire

Stolc *et al.* ont réalisé une étude génome entier sur les quantités de transcrits d'ARN présents chez *Chlamydomonas* pendant une nouvelle période de flagellation. Le flagelle des algues vertes avait été au préalable détruit. Les auteurs ont ainsi identifié 220 gènes qui étaient exprimés au moins deux fois plus pendant cette régénération flagellaire (Stolc *et al.*, 2005).

L'identification de plusieurs centaines de gènes par des méthodes différentes et chez divers organismes a permis d'élucider en partie, les différentes protéines impliquées dans la construction des cils. L'utilisation de différentes méthodes, puis le croisement des résultats ont permis aussi d'identifier des faux positifs ainsi que des faux négatifs. Un bref résumé des différentes études utilisées dans les deux bases de données relatives aux cils est présenté dans la table 1.

Etude	Méthode	Organisme	Protéines identifiées	Gherman et al. 2006	Inglis et al. 2006
(Li et al., 2004)	Génomique comparative	<i>C. reinhardtii</i>	688	✓	✓
(Efimenko, 2005)	Recherche des X-box	<i>Caenorhabditis elegans</i>	395	✓	✓
(Stolc et al., 2005)	Analyse de transcriptome	<i>C. reinhardtii</i>	220	✓	✓
(Ostrowski et al., 2002)	Spectrométrie de masse	<i>Homo sapiens</i>	165	✓	✓
(Pazour, 2005)	Spectrométrie de masse	<i>C. reinhardtii</i>	652	✓	✓
(Avidor-Reiss et al., 2004)	Génomique comparative	<i>Drosophila melanogaster</i>	183	✓	✓
(Keller et al., 2005)	Spectrométrie de masse	<i>C. reinhardtii</i>	129	✓	✗
(Andersen et al., 2003)	Spectrométrie de masse	<i>Homo sapiens</i>	110	✓	✗
(Blacque et al., 2005)	Recherche des X-box	<i>Caenorhabditis elegans</i>	396	✓	✓
(Broadhead et al., 2006)	Spectrométrie de masse	<i>Trypanosoma brucei</i>	326	✓	✗
(Liu et al., 2007)	Spectrométrie de masse	<i>Mus musculus</i>	1925	✓	✗
(Smith et al., 2005)	Spectrométrie de masse	<i>Tetrahymena thermophila</i>	223	✗	✓

Table 1 : Etudes composant les deux bases de données moléculaires relatives aux cils.

Comme nous venons de le voir, les cils sont des organelles très complexes et les études de génomique comparative et de protéomique présentées ci-dessus suggèrent que les cils des vertébrés requièrent jusqu'à 1000 polypeptides différents (Gherman et al., 2006).

La complexité et le nombre de protéines impliquées dans la formation et fonction ciliaire reflètent les rôles multiples que les cils jouent chez les vertébrés (Gerdes et al., 2009).

6 Les dyskinésies ciliaires primaires chez l'homme

6.1 Définition

Les dyskinésies ciliaires primaires sont des maladies génétiques rares, regroupant des pathologies respiratoires liées à une anomalie constitutionnelle des cils mobiles. Ces anomalies sont responsables d'une dysfonction de la mobilité ciliaire avec pour conséquence une variété de manifestations cliniques, une atteinte des voies respiratoires comprenant des bronchites chroniques qui mènent à de la bronchiectasie et des rhino-sinusites à répétition, mais aussi de l'infertilité, et, dans la moitié des cas environ, des défauts de latéralité.

Les premiers cas ont été décrits au début du 20^{ème} siècle. Ces patients étaient atteints d'un syndrome clinique, appelé **syndrome de Kartagener**, caractérisé par la triade *situs inversus*, sinusite chronique et bronchiectasie (Siewert, 1904; Kartagener, 1933). Dans les années septante, des défauts ultrastructuraux dans l'organisation ciliaire sont mis en évidence chez des patients atteints du syndrome de Kartagener, ainsi que d'autres patients atteints de sinusite chronique et de bronchiectasie. Ce syndrome prend alors le nom **de syndrome d'immobilité ciliaire** (Afzelius, 1976; Eliasson *et al.*, 1977). Par la suite, plusieurs études démontrent que ces cils conservent une activité motrice, mais que leurs battements sont non coordonnés et inefficaces. Ce syndrome prend alors le nom de **dyskinésie ciliaire primaire** qui décrit mieux la dysfonction ciliaire qui caractérise cette maladie. La dyskinésie ciliaire primaire est la première ciliopathie humaine décrite (Afzelius, 1976).

Le mot « primaire » permet de différencier les défauts ciliaires d'origine génétique, des lésions épithéliales acquises à la suite de divers dommages, telles que des infections respiratoires virales ou l'exposition à des agents toxiques (Sleigh, 1981).

Les termes employés pour décrire les anomalies de latéralité sont parfois source de confusion. Un arrangement anatomique gauche-droit normal est nommé *situs solitus*. Une image en miroir de toutes les structures asymétriques est appelée *situs inversus* ou *situs inversus totalis*. Quand l'axe gauche-droit n'est ni normal, ni une image en miroir, on parle de *situs ambiguus*, ou d'hétérotaxie qui signifie en grec autre arrangement, ou encore de syndrome d'Ivemark, d'asplénie ou de polysplénie.

6.2 Epidémiologie

La prévalence des DCP est difficile à estimer de manière précise et varie considérablement d'une étude à l'autre. Les estimations de la prévalence varient entre 1 :4000 et 1 :40.000, avec la prévalence réelle se situant probablement autour de 1 :10.000 dans la population générale (Torgersen, 1947; Katsuhara *et al.*, 1972; Afzelius et Stenram, 2006). La variation observée reflète une véritable variabilité au sein de différentes populations, mais aussi les différences en terme de moyens diagnostiques (Kuehni *et al.*, 2010). De plus, les signes cliniques de patients atteints de DCP varient considérablement en terme de sévérité et le diagnostic final peut être difficile à poser, particulièrement chez les patients atteints de formes légères. L'estimation de 1 :10.000 pourrait donc représenter une sous-estimation de la prévalence réelle de la maladie, particulièrement quand il n'y a pas de défaut de latéralité et/ou lorsque l'axonème ciliaire présente une ultrastructure normale. Chez certains groupes ethniques, où la consanguinité est importante, la prévalence est également plus importante (O'callaghan *et al.*, 2010).

6.3 Phénotypes des dyskinésies ciliaires primaires

Les signes cliniques des patients atteints de DCP sont directement liés aux organes où la mobilité ciliaire est une composante importante de leur fonction normale. Le tractus respiratoire qui possède des cils depuis l'oreille moyenne jusqu'aux bronchioles, est l'appareil le plus touché lors de DCP. Les manifestations cliniques du tractus respiratoire supérieur et inférieur sont donc, une des caractéristiques essentielles des DCP. Elles sont la plupart du temps présentes juste après la naissance.

6.3.1 Atteinte du système respiratoire supérieur

6.3.1.1 Atteinte otologique

L'altération de la clairance muco-ciliaire dans l'oreille moyenne et les trompes d'Eustache induit des manifestations sévères et précoces, dues à une prédisposition aux infections bactériennes répétées. Cliniquement, elles se caractérisent par des otites aiguës à répétition, par des otites effusives, ou encore par des otorrhées récurrentes. Ces modifications peuvent conduire chez le jeune enfant, à des otites chroniques et à des déficits auditifs dus à un défaut de transmission et peuvent mener à des retards de langages (Kennedy *et al.*, 2007a; Campbell *et al.*, 2009; Prulière-Escabasse *et al.*, 2010).

Dans une étude rétrospective évaluant les caractéristiques otologiques des enfants atteints de DCP, tous les enfants des moins de 5 ans ont été diagnostiqués au moins une fois, avec une otite chronique effusive, d'une durée d'au moins 3 mois. Les otites aiguës étaient très fréquentes chez les jeunes enfants et leur fréquence diminuait au cours du temps pour disparaître à l'âge adulte (Prulière-Escabasse *et al.*, 2010). Dès lors, dans un contexte clinique suggérant une DCP chez un enfant, l'absence d'épisode d'otite aiguë ou chronique dans l'anamnèse, ne plaide pas en faveur d'un diagnostic de DCP (Campbell *et al.*, 2009; Prulière-Escabasse *et al.*, 2010).

Les déficits auditifs dus à l'accumulation de sécrétion et à un défaut de transmission sont également très répandus chez les jeunes enfants (64%) et leur fréquence diminue progressivement pour atteindre 15% chez le jeune adulte (Prulière-Escabasse *et al.*, 2010).

La fréquence et la sévérité des troubles otologiques pourraient varier avec le défaut ultra-structural sous-jacent. En effet, dans les cas de DCP où la paire centrale de microtubules est

touchée, la fréquence des otites aiguës et chroniques est plus élevée que dans les cas où les bras de dynéine sont atteints et mènent à une fréquence plus élevée de tympanostomie et de lésions secondaires (Prulière-Escabasse *et al.*, 2010).

6.3.1.2 Atteinte sinonasale

Les rhinites sont présentes dès le plus jeune âge et se caractérisent par de la congestion et du jetage nasal. Elles posent des problèmes tout au long de la vie des patients atteints de DCP. Les sécrétions nasales sont la plupart du temps aqueuses ou mucoïdes, mais peuvent être purulentes durant les épisodes de surinfection bactérienne. Parfois, les rhinites à répétition peuvent conduire à de l'anosmie (Noone *et al.*, 2004).

Les sinusites aiguës et chroniques touchent l'ensemble des sinus paranasaux et sont très fréquentes chez les enfants plus âgés, les adolescents et à l'âge adulte, touchant jusqu'à 60% des patients atteints de DCP (Sommer *et al.*, 2011). Une aplasie ou une hypoplasie des sinus paranasaux est une complication fréquente touchant environ trois quarts des individus atteints de DCP. Les sinus les plus touchés sont ceux qui possèdent une croissance post natale, à savoir les sinus frontaux et sphénoïdaux, ce qui suggère un rôle déterminant des infections à répétition et de l'inflammation chronique de la muqueuse. L'hypoventilation nasale liée à une obstruction nasale précoce chez les jeunes enfants pourrait également jouer un rôle dans le mauvais développement de ces sinus (Pifferi *et al.*, 2011).

Une polypose nasale est identifiée chez 18 à 30% des patients environ.

6.3.2 Atteinte du système respiratoire inférieur

L'atteinte des voies respiratoires inférieures apparaît tôt, durant l'enfance. La progression et la sévérité de l'atteinte pulmonaire varient considérablement d'un individu à l'autre. Les raisons pour lesquelles les DCP mènent irrémédiablement à des dommages structurels pulmonaires et éventuellement à une insuffisance respiratoire, n'ont pas été clairement établies. Cependant la plupart des experts s'accordent sur la cascade d'événements qui mènent à ces lésions. Une mutation délétère dans un gène intervenant dans la structure ou la fonction ciliaire est responsable d'un défaut de la fonction ciliaire, ce qui induit un dysfonctionnement de la clairance muco-ciliaire, suivie d'une infection et d'une inflammation chronique des voies respiratoires. L'inflammation est ensuite responsable de dommages structurels des voies

respiratoires, et induit des lésions de bronchiectasie, qui peuvent mener à terme à une insuffisance respiratoire. Le diagramme suivant reprend la pathogénèse des lésions pulmonaires dans la DCP (Sagel *et al.*, 2011).

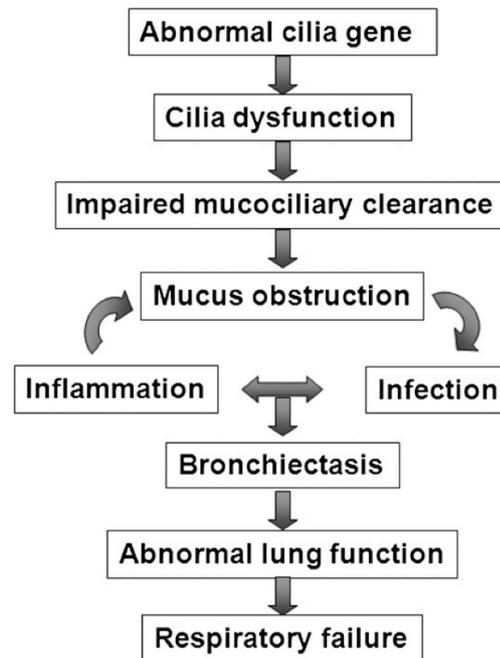


Figure 10 : Pathogénèse supposée des lésions pulmonaires dans les DCP (Sagel *et al.*, 2011).

Quand les lésions de bronchiectasie s’installent, un cercle vicieux apparaît. En effet, cette anomalie structurelle des bronches, favorise la stase du mucus qui, elle-même, entretient l’inflammation chronique. Le diagramme suivant illustre ce cercle vicieux. De plus, la stase du mucus permet la formation de bouchons muqueux qui induisent une obstruction, voire une oblitération des bronches qui aggravent la bronchiectasie (Mcshane *et al.*, 2013).

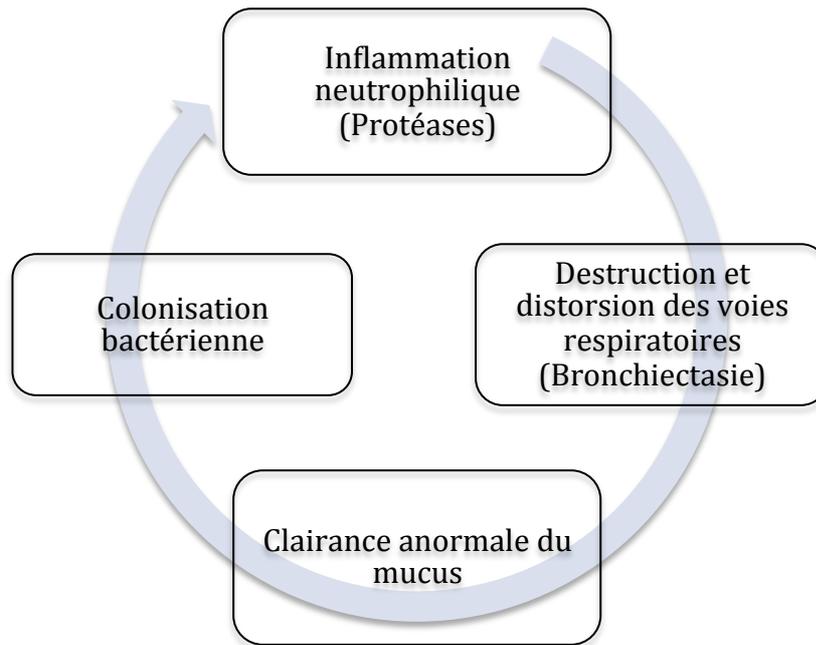


Figure 11 : Cercle vicieux induit par des lésions de bronchiectasie (Mcshane *et al.*, 2013).

6.3.2.1 Le syndrome de détresse respiratoire du nouveau né

L'association entre un syndrome de détresse respiratoire chez le nouveau-né et la DCP suggère que la fonction ciliaire joue un rôle critique dans la clairance des fluides fœtaux pulmonaires (Ferkol et Leigh, 2006). Les poumons du fœtus contiennent un fluide qui est produit en continu et sécrété par le développement des pneumocytes alvéolaires. A la naissance, les poumons du fœtus sont remplis à 40% environ de leur capacité totale, par ce fluide, qui doit être éliminé rapidement pour permettre un échange d'air adéquat pendant la respiration (Jain, 1999).

Plusieurs facteurs sont importants pendant cette transition, notamment la compression mécanique du thorax lors de l'accouchement, mais aussi le déplacement du liquide de l'espace alvéolaire vers l'espace interstitiel qui est ensuite réabsorbé par la circulation pulmonaire et les vaisseaux lymphatiques. Enfin, l'activation du transport de sodium provenant de la lumière entraîne une absorption d'eau concomitante (Jain, 1999). La motilité ciliaire pourrait jouer un rôle sur un de ces facteurs, ou pourrait être un mécanisme de plus, dans la clairance des fluides pulmonaires fœtaux (Ferkol et Leigh, 2006).

Une grande proportion des patients atteints (43% et > 75%), ont un historique de détresse respiratoire du nouveau-né d'origine indéterminée (Noone *et al.*, 2004) (Holzmann et Felix,

2000a) (Whitelaw *et al.*, 1981; Hossain *et al.*, 2003; Jain *et al.*, 2007). Cette atteinte se caractérise par de la congestion, de la toux, de la tachypnée, de l'hypoxie, et moins fréquemment par une insuffisance respiratoire. Ces symptômes sont dus à une mauvaise élimination du mucus foetal pulmonaire, chez un nouveau-né la plupart du temps, né à terme. L'association entre le syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né et la DCP suggère donc que la fonction ciliaire joue un rôle critique dans la clairance des fluides fœtaux pulmonaires (Ferkol et Leigh, 2006). Ces nouveau-nés requièrent une supplémentation en oxygène pendant quelques jours. Dans certains cas, ils nécessitent un support avec une ventilation mécanique prolongé (Holzmann et Felix, 2000b). La présence d'un défaut de latéralité sur les radiographies thoraciques d'un nouveau-né souffrant d'un syndrome de détresse respiratoire doit faire suspecter la présence d'une DCP sous-jacente (Ferkol et Leigh, 2006; Sagel *et al.*, 2011).

Une incidence plus élevée de *pectus excavatum* est reportée chez les patients atteints (9% vs 0,3% pour la population générale)(Kennedy *et al.*, 2007b)}. Le lien entre cette malformation sternale et les DCP n'est pas clair, mais pourrait être lié à l'augmentation des efforts respiratoires en période néonatale.

6.3.2.2 Bronchite chronique, pneumonie récurrente et bronchiectasie

La dysfonction ciliaire provoque une déficience de la clairance muco-ciliaire dans les voies respiratoires inférieures, ce qui provoque une stase du mucus et un risque accru d'infections chroniques. Une toux chronique productive et quotidienne est présente chez tous les sujets atteints. Des sifflements et la production d'expectoration muco-purulente sont très fréquents.

Une progression vers des lésions de bronchiectasie est quasi systématique et débute, en général, chez des enfants en âge de scolarisation. Certains « case reports » mentionnent des lésions de bronchiectasie détectables dans les premières années de vie (Brown *et al.*, 2008). Une étude rétrospective portant sur les lésions radiographiques évaluées par CT-scan à haute résolution, sur 45 patients atteints de DCP, révélait la présence d'une bronchiectasie chez l'ensemble des adultes et chez 56% des enfants (Kennedy *et al.*, 2007b). Une autre étude révélait que jusqu'à trois quarts des enfants présentaient des lésions de bronchiectasie (Jain *et al.*, 2007).

Les lésions de bronchiectasie ne sont pas uniformément distribuées au sein du parenchyme pulmonaire. Une atteinte préférentielle du lobe moyen droit et des lobes pulmonaires inférieurs est remarquée. L'atteinte des lobes pulmonaires supérieurs est exceptionnelle, contrairement à la mucoviscidose qui touche préférentiellement ces lobes. L'atteinte préférentielle des lobes

moyen et inférieurs pourrait être liée à une plus grande difficulté de drainage des sécrétions (Jain *et al.*, 2007). La sévérité des lésions de bronchiectasie est corrélée avec l'âge, la fonction pulmonaire, ainsi qu'avec la présence de pathogènes opportunistes comme les souches mucoïdes de *Pseudomonas aeruginosa* (Kennedy *et al.*, 2007b; Santamaria, 2008). Entre 10 et 27% des patients atteints de bronchiectasie ont subi une lobectomie (Noone *et al.*, 2004; Kennedy *et al.*, 2007b).

Chez des patients âgés, un dépôt de calcium dans les voies respiratoires est possible pouvant mener à l'expectoration de petites pierres de calcium. D'après Kennedy *et al.*, environ un quart des patients de plus de 40 ans présentaient de la lithoptysie. Ces broncholithes sont due à une bio-minéralisation due à l'inflammation chronique des voies respiratoires et aux infections répétées des sécrétions respiratoires (Kennedy *et al.*, 2007a).

Les infections chroniques des voies respiratoires sont fréquentes, notamment par des agents pathogènes opportunistes. *Haemophilus influenzae* est le pathogène le plus fréquemment isolé, dans 37% à 84% des cas (Noone *et al.*, 2004; Jain *et al.*, 2007; Santamaria, 2008). Un autre pathogène fréquemment isolé est *Pseudomonas aeruginosa* que l'on retrouve chez 38% des enfants et jusqu'à 76% des adultes. Différentes souches ont été isolées, avec des souches « lisses », davantage rencontrées chez l'enfant et des souches « mucoïdes » responsables de la formation d'un biofilm et que l'on retrouve chez des patients plus âgés (Noone *et al.*, 2004; Kennedy *et al.*, 2007b; Santamaria, 2008). Les autres pathogènes fréquemment isolés sont *Staphylococcus aureus* dans 10 à 22% des cas, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*. Enfin, des mycobactéries non-tuberculeuses ont été isolées dans 9 à 14% des cas environ (Noone *et al.*, 2004; Kennedy *et al.*, 2007b), et ce chez des patients âgés. Certains patients sont porteurs de plusieurs pathogènes respiratoires (Noone *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2008). Dans peu de cas, environ 15% des sujets, la culture revient négative pour des agents pathogènes (Noone *et al.*, 2004; Santamaria, 2008). Un monitoring régulier de la flore des voies respiratoires inférieures est donc recommandé.

6.3.2.3 Fonction pulmonaire

La fonction pulmonaire évaluée par spirométrie est en général réduite, et ce dès l'enfance (Hellinckx *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2008). En effet, un tiers des enfants de moins de 6 ans atteints présentent déjà une fonction pulmonaire réduite (Marthin *et al.*, 2010a). Typiquement, cette dysfonction pulmonaire est caractérisée par un certain degré d'obstruction au passage de l'air, par de l'emprisonnement d'air et par une capacité pulmonaire totale normale (Hellinckx *et*

al., 1998). *Ellerman et al.* montraient dans une étude prospective que la fonction pulmonaire de patients adultes était diminuée par rapport aux enfants atteints de DCP (*Ellerman et Bisgaard*, 1997b). D'autres études démontrent que plus le diagnostic est posé tardivement, plus les mesures de fonction pulmonaire sont réduites par rapport aux valeurs attendues avec une réduction annuelle de la fraction expiratoire forcée de 0,8% environ (*Noone et al.*, 2004; *Marthin et al.*, 2010b). De plus, certaines études ont montré qu'une réduction de la fonction pulmonaire mesurée à l'aide de la fraction expiratoire forcée sur une seconde, corrélait avec les lésions de bronchiectasie (*Kennedy et al.*, 2007b).

Peu d'études se sont intéressées à l'évolution de la fonction pulmonaire au cours du temps et les données sont contradictoires. Plusieurs études suggèrent que la fonction pulmonaire reste stable, chez la plupart des patients, durant l'enfance et l'adolescence (*Hellinckx et al.*, 1998) (*Ellerman et Bisgaard*, 1997a), mais également chez l'adulte (suivi pendant 14 ans), lorsqu'un traitement adapté est mis en place (*Ellerman et Bisgaard*, 1997b). D'autres suggèrent de grandes variations dans l'évolution de la fonction pulmonaire. *Marthin et al.*, dans une étude portant sur 74 sujets atteints sur une période moyenne de 9,5 ans, montraient qu'environ 1/3 des patients présentaient un déclin de leur fonction pulmonaire, tandis que 57% d'entre eux la conservaient et que 10% montraient une amélioration, et ce après la mise en place d'un traitement adapté (*Marthin et al.*, 2010a). Enfin dans l'étude réalisé par *Noone et al.* environ un quart des patients étaient diagnostiqués avec une insuffisance respiratoire définie par de l'hypoxémie et un volume expiratoire forcé en une seconde, réduit de 40% par rapport aux valeurs attendues (*Noone et al.*, 2004).

6.3.3 Atteinte du système reproducteur

6.3.3.1 Chez l'homme

Le flagelle du spermatozoïde possède une structure similaire, mais pas identique à celle du cil mobile. En conséquence la plupart des hommes atteints de DCP sont infertiles (*Eliasson et al.*, 1977). La principale cause d'infertilité masculine est un défaut de mobilité des spermatozoïdes due à des anomalies structurelles du flagelle (*Eliasson et al.*, 1977; *Munro et al.*, 1994). En général, les anomalies structurelles observées sur le flagelle sont similaires à celles observées sur les cils mobiles, comme l'absence de la paire centrale ou l'absence de bras de dynéine (*Neugebauer et al.*, 1990; *Toyama et al.*, 1996). Dans certains cas, les anomalies structurelles diffèrent entre les cils de l'épithélium respiratoire et le flagelle. Ainsi une diminution des bras de

dynéine responsable d'une immobilité au sein du flagelle peut donner une structure et une mobilité normale au niveau des cils respiratoires ou l'inverse (Jonsson *et al.*, 1982; Walt *et al.*, 1983). Ces différences démontrent que l'axonème des cils respiratoires est proche de celui du spermatozoïde mais que chacun possède néanmoins des caractéristiques propres.

De l'azoospermie et de l'oligozoospermie sont également rapportées dans un certain nombre de cas (Munro *et al.*, 1994; Ichioka *et al.*, 2006; Mittal et Shah, 2012). Cette diminution voir absence de spermatozoïdes pourrait être liée à un défaut de transport entre les testicules et l'urètre. En effet, l'absence ou la dyskinésie des battements ciliaires, dans la portion ciliée du canal déférent pourrait empêcher le transport normal des spermatozoïdes. Philips *et al.* rapportent le cas d'un patient atteint d'un syndrome de Kartagener avec une absence des bras de dynéine au niveau des cils du canal déférent mais qui possédait des spermatozoïdes mobiles (Phillips *et al.*, 1995).

La spermatogénèse pourrait également être compromise comme c'est le cas chez un modèle murin de DCP (Sironen *et al.*, 2011). Néanmoins, certains hommes atteints de DCP ont une analyse de sperme normale et plusieurs cas de fertilité spontanée chez des hommes atteints de DCP ont été décrits (Munro *et al.*, 1994; Noone *et al.*, 2004).

Les hommes non-fertiles peuvent envisager une procréation médicalement assistée en utilisant une injection intracytoplasmique de sperme pour contrecarrer l'absence de motricité des spermatozoïdes (Matsumoto *et al.*, 2010).

6.3.3.2 Chez la femme

Les femmes atteintes de DCP présentent un certain degré d'infertilité et un risque accru de grossesse extra-utérine. Cette infertilité pourrait être une conséquence d'une dysfonction ciliaire au sein des trompes de Fallope (Halbert *et al.*, 1997). Des cas d'infertilité totale, tout comme des cas de grossesse spontanée ont été rapportés (Afzelius et Eliasson, 1983; Noone *et al.*, 2004). Afzelius *et al.* rapportent que sur dix-sept femmes atteintes de DCP, neuf d'entre elles n'ont jamais été enceintes tandis que les huit autres ont réussi à avoir des enfants (Afzelius, 2004). Les cas de grossesse spontanée pourraient s'expliquer par le fait que le transport de l'ovocyte dépend davantage des contractions musculaires au niveau des trompes de Fallope, plutôt que de la coordination des battements ciliaires. Les femmes non fertiles peuvent envisager la fécondation in vitro et le transfert d'embryons (Abu-Musa *et al.*, 2008).

6.3.4 Déficit de latéralité

Bien que le corps humain apparaît symétrique quand on le regarde de l'extérieur, il existe une asymétrie gauche-droite interne dont la disposition est globalement la même chez tous les sujets. Des malformations apparaissent lorsque le processus qui détermine l'axe droite-gauche du corps ne fonctionne pas correctement durant l'embryogénèse (Casey, 1998).

Le défaut de latéralité le plus fréquemment rencontré est le *situs inversus* que l'on retrouve approximativement dans 50% des cas de DCP (Jain *et al.*, 2007)}. Toutefois la prévalence de *situs inversus* est plus élevée dans une population de patients pédiatriques (supérieure à 60%) comparativement à la population adulte. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les défauts de latéralité servent de marqueurs dans le diagnostic de la maladie (Noone *et al.*, 2004; Jain *et al.*, 2007; Pittman, 2011).

Les défauts de latéralité sont liés à une dysfonction du nœud embryonnaire ce qui rend l'orientation thoracoabdominale aléatoire et non prédéterminée génétiquement. En effet, un cas de jumeaux monozygotes a été rapporté dont l'un était atteint de *situs inversus*, tandis que l'autre avait une asymétrie gauche-droite normale (*situs solitus*) (Noone *et al.*, 1999).

Un *situs inversus* peut apparaître en absence de DCP. On considère qu'environ un quart des patients présentant un *situs inversus* sont atteints de DCP (Kroon *et al.*, 1991).

Il existe d'autres défauts de latéralité, moins fréquents, appelés *situs ambiguus* ou encore hétérotaxie. On reconnaît différents sous-types d'hétérotaxie. On parle d'isomérisme lorsque les organes sont disposés symétriquement de façon anormale. Ainsi on parle d'isomérisme gauche quand le cœur présente un atrium gauche et une image en miroir de celui-ci formant l'atrium droit. L'isomérisme gauche est également caractérisé par une polysplénie. Tandis que l'isomérisme droit ou syndrome d'Ivemark est caractérisé par une asplénie (Kim, 2011). Une conséquence importante de l'hétérotaxie est la présence d'anomalies cardiaques congénitales complexes. Une étude réalisée sur 337 patients atteints de DCP révélait la présence d'un *situs solitus* dans 46% des cas, d'un *situs inversus* dans 47,7% et d'un *situs ambiguus* dans 6,3% des cas (Kennedy *et al.*, 2007b).

Afzelius *et al.*, dans une étude rétrospective, ont identifié un *situs inversus* dans un peu plus de 40% des cas (Afzelius *et Stenram*, 2006). Cette valeur est en deçà des 50% attendus par une orientation aléatoire. Cette valeur plus basse peut être expliquée par le fait que certains défauts

ultrastructuraux touchent la paire centrale de microtubules qui ne serait pas présente dans les cils du nœud embryonnaire. Les patients atteints par ce type de défauts ultrastructurels présentent donc les signes typiques respiratoires, mais pas de défaut de latéralité (Stannard *et al.*, 2004; Ferkol et Leigh, 2006; Castleman *et al.*, 2009; Olbrich *et al.*, 2012).

6.3.5 Autres atteintes plus rares :

6.3.5.1 Hydrocéphalie

Etant donné que les cils sont présents sur l'épendyme des ventricules cérébraux et que ceux-ci joueraient un rôle dans le déplacement du LCR, on pourrait s'attendre à ce que les patients atteints de DCP soient également atteints d'hydrocéphalie.

Des souris mutantes ne possédant pas un des composants des bras de dynéine ou une protéine impliquée dans le transport intraflagellaire, développent de l'hydrocéphalie (Chen *et al.*, 1998; Ibañez-Tallon *et al.*, 2004). Deux mécanismes différents peuvent expliquer le développement de l'hydrocéphalie chez la souris. Le premier mécanisme serait que l'absence de flux épendymaire due à l'immobilité ciliaire induit une fermeture de l'aqueduc et par la suite le développement de l'hydrocéphalie (Ibañez-Tallon *et al.*, 2002). Le deuxième mécanisme serait que chez les souris présentant un défaut d'IFT, certaines fonctions mécano-sensorielles seraient déficientes et altéreraient l'activité du transport ionique au sein de l'épithélium du plexus choroïde, ce qui pourrait mener à une augmentation de la production du LCR (Banizs, 2005).

Chez l'homme, un défaut de mobilité des cils épendymaires n'est pas suffisant pour induire une hydrocéphalie et la plupart des patients atteints de DCP ne présentent pas d'anomalies cérébrales (Roth *et al.*, 1988). Cependant ces patients présentent un risque accru de fermeture de l'aqueduc et donc d'hydrocéphalie (Vieira *et al.*, 2012) et de nombreux cas ont été rapportés dans la littérature (Afzelius, 1979; De Santi *et al.*, 1990; Picco *et al.*, 1993). Une mesure de la taille des ventricules cérébraux en période prénatale peut être un marqueur de dépistage intéressant en cas de *situs inversus* ou dans le cadre d'une fratrie où des cas de DCP ont déjà été diagnostiqués (Wessels *et al.*, 2003).

6.3.5.2 Atteinte cardiovasculaire

Bien que la plupart des individus qui présentent des anomalies de latéralité ne présentent pas d'anomalies cardiaques, les DCP sont associées à une prévalence accrue d'hétérotaxie associée

ou non à des anomalies cardiaques ou vasculaires congénitales. Dans une étude rétrospective sur plus de 300 patients atteints de DCP, ces anomalies ont été identifiées dans 3% des cas. La plupart des patients présentant une anomalie cardiaque congénitale étaient également atteints d'hétérotaxie (Kennedy *et al.*, 2007c). Il est actuellement recommandé de dépister les patients présentant une malformation cardiaque et de l'hétérotaxie pour une éventuelle DCP sous-jacente (Nakhleh *et al.*, 2012).

6.4 Diagnostic des dyskinésies ciliaires primaires

Comme beaucoup de maladies rares, la DCP est un diagnostic qui peut être difficile à poser et qui repose sur la présence d'un phénotype clinique typique et sur les résultats de tests diagnostiques appropriés. Le diagnostic final est généralement posé dans des centres spécialisés qui concentrent un haut niveau d'expertise et l'appareillage nécessaire. Un groupe d'experts européens a établi les « guidelines » de la démarche diagnostique à suivre. Cette démarche repose sur une variété de méthodes différentes, puisqu'il n'existe aucun « gold standard » pour poser un diagnostic définitif de DCP (Barbato *et al.*, 2009). Les paragraphes suivants reprennent les différentes étapes et examens complémentaires qui mènent au diagnostic de DCP.

6.4.1 Suspicion clinique

La première étape qui mène au diagnostic de DCP repose sur une anamnèse approfondie et un examen clinique complet. Les caractéristiques cliniques de la DCP sont en général présentes dès le plus jeune âge (Noone *et al.*, 2004). Il est clair qu'une DCP doit être envisagée chez les patients présentant des infections sino-pulmonaires chroniques. Cependant, cette présentation clinique n'est pas pathognomonique des DCP, et les pathologies respiratoires pouvant être à l'origine de symptômes similaires doivent être éliminées. Le diagnostic différentiel de cette symptomatologie reprend notamment une mucoviscidose, un déficit immunitaire, un phénomène allergique ou encore une anomalie anatomique des voies respiratoires.

Certains phénotypes cliniques sont plus subtils et les recommandations actuelles proposent que les patients correspondant aux situations reprises ci-dessous subissent des examens complémentaires pour détecter une éventuelle DCP sous-jacente (Barbato *et al.*, 2009; Lucas *et al.*, 2014):

- La présence d'un *situs inversus* et de symptômes respiratoires
- La présence d'une détresse respiratoire néonatale d'origine indéterminée
- La présence d'un frère ou d'une sœur atteint de DCP surtout si des signes cliniques sont présents
- La présence quotidienne et depuis toujours d'une toux productive
- Si des tests de dépistage sont envisagés pour une éventuelle mucoviscidose, des tests de screening de la DCP devraient également être considérés, surtout en présence de rhinite, sinusite ou d'otite
- La présence d'une bronchiectasie d'origine indéterminée

- La présence d'otite moyenne séreuse associée à une atteinte des voies respiratoires supérieures et/ou inférieures
- La présence d'une pathologie cardiaque congénitale associée à de l'hétérotaxie et en présence de symptômes respiratoires
- La présence d'un défaut de mobilité spermatique chez les hommes

6.4.2 Tests de screening

Les tests de screening précèdent les tests d'analyse fonctionnelle et structurelle des cils. Ils permettent de faire un premier tri parmi les patients et de sélectionner les patients les plus susceptibles d'être atteints de la maladie. Ces tests sont caractérisés par une sensibilité élevée, mais une faible spécificité. Le test le plus utilisé à l'heure actuelle, est la mesure du monoxyde d'azote nasal. D'autres tests sont utilisés afin d'évaluer l'efficacité du transport mucociliaire. Parmi ces tests on retrouve le test à la saccharine et le test de clairance mucociliaire de radioaérosol pulmonaire.

6.4.2.1 Mesure du monoxyde d'azote (NO) nasal

Le monoxyde d'azote est une petite molécule de gaz, qui diffuse facilement et qui contribue à de nombreuses fonctions dans l'organisme. Dans les cavités nasales et les voies respiratoires, les fonctions supposées du NO comprennent la régulation de la mobilité ciliaire (Li *et al.*, 2000; Jiao *et al.*, 2011) et une activité antimicrobienne (Hibbs, 2002). Le NO est formé par des NO synthase en présence de substrat approprié (L-arginine et oxygène) et de cofacteurs (tetrahydrobioptérine). Chez le patient sain, la production nasale de NO est 10 à 50 fois supérieure à celle des voies respiratoires inférieures. C'est pourquoi une estimation précise de la quantité de NO produite ne peut être obtenue qu'en forçant la fermeture du palais ou en bloquant la respiration, et ce afin d'éviter une dilution de la concentration en NO due à une contamination des voies basses. Ces manœuvres ne peuvent donc pas être réalisées chez les jeunes enfants (Lundberg *et al.*, 1994).

Les patients atteints de DCP ont invariablement des concentrations très basses en NO (10 à 20 % des concentrations normales), ce qui fait de ce test un outil diagnostique très utile (Wodehouse *et al.*, 2003; Corbelli *et al.*, 2004; Noone *et al.*, 2004). Cependant, une faible concentration en NO est également rencontrée dans d'autres pathologies respiratoires, telles que la mucoviscidose (Wodehouse *et al.*, 2003; Noone *et al.*, 2004), la panbronchiolite (Nakano *et al.*, 2000), la polypose nasale (Colantonio *et al.*, 2002) ou encore lors d'infections de sinusite chronique

(Lindberg *et al.*, 1997). De plus, des concentrations faibles en NO de manière transitoire sont reportées lors d'infections respiratoires aiguës. Il est donc préférable de réaliser ce test, lors d'une période « saine ». En cas de concentration faible en NO chez un patient avec des signes cliniques compatibles, une analyse fonctionnelle et structurelle des cils peut être envisagée. Il faut toutefois noter que dans de rares cas, des patients atteints de DCP peuvent avoir une mesure de NO normale (Karadag *et al.*, 1999; Marthin et Nielsen, 2011).

Il existe plusieurs analyseurs sur le marché et les centres de référence utilisent ce test en routine. Toutefois, à l'heure actuelle, une standardisation de la méthode ainsi que la définition de valeurs de référence seraient nécessaires afin de pouvoir comparer les résultats de ce test à grande échelle (Lucas *et al.*, 2014).

6.4.2.2 Test à la saccharine

Le test à la saccharine permet une évaluation approximative de la fonction mucociliaire. Lors de ce test, une particule de saccharine est déposée sur un cornet nasal inférieur et le temps pour que le patient détecte le goût sucré est comptabilisé. Un retard important de la perception du goût sucré peut suggérer un problème avec la clairance ciliaire. Les résultats de ce test sont peu fiables et il n'est plus recommandé à l'heure actuelle (Barbato *et al.*, 2009).

6.4.2.3 Test de clairance mucociliaire à l'aide de radioaérosol

L'évaluation de la clairance mucociliaire nasale et pulmonaire en utilisant des traceurs radioactifs est un test réalisé depuis de nombreuses années. Cependant, il existe peu d'études évaluant la clairance mucociliaire chez les patients atteints de DCP. La sensibilité de ce test semble très élevée, et ce même chez les enfants, mais à nouveau, la spécificité est faible (Armengot *et al.*, 1995; De Boeck *et al.*, 2005).

6.4.3 Confirmation du diagnostic

6.4.3.1 Anomalies structurelles : la microscopie électronique

Un des points clés qui mène au diagnostic de la DCP est l'analyse de l'ultrastructure du cil en microscopie électronique. En microscopie optique classique, l'épithélium des patients atteints de DCP présente une apparence normale, tandis que l'examen de l'organisation ultrastructurale du cil en microscopie électronique, permet d'identifier une variété de défauts ciliaires distincts.

6.4.3.1.1 Dyskinésies ciliaires primaires vs secondaires

Les altérations ultrastructurelles peuvent être primaires (liées à une anomalie génétique) ou secondaires. Certaines anomalies ultrastructurelles sont pathognomoniques d'une atteinte primaire. Une absence de bras de dynéine ou des bras de dynéine trop courts, une absence des crêtes radiales, une translocation des doublets de microtubules ou encore l'absence de la paire de microtubules centrale sont autant de défauts qui ne peuvent être retrouvés qu'en cas d'atteinte primaire. D'autres anomalies comme le regroupement de plusieurs axonèmes, l'ajout ou la suppression d'une paire de microtubules périphérique, la présence d'un axonème désorganisé ou d'une mauvaise orientation du cil ou encore d'une interruption de la membrane axonémale sont des anomalies ultrastructurelles secondaires qui ne sont pas spécifiques (Carson *et al.*, 1994; Pizzi *et al.*, 2003; Demarco *et al.*, 2013). Ces défauts secondaires apparaissent généralement suite à des infections respiratoires, à des dommages mécaniques de la muqueuse ou à des toxiques appliqués localement. Ces altérations sont en général réversibles.

6.4.3.1.2 Les différents phénotypes ultrastructuraux des DCP

L'hétérogénéité des phénotypes ultrastructuraux observés chez les patients atteints de DCP est le reflet de la variété des gènes impliqués dans ce syndrome.

- a) **Atteinte des bras de dynéine** : Il s'agit des phénotypes les plus courants. Dans certains cas, il y a une absence totale des bras de dynéine externes et internes. Dans d'autres cas, on observe une absence complète ou partielle soit des BDI, soit des BDE (Chao *et al.*, 1982). Carlen *et al* ont établi des valeurs de référence du nombre moyen de BDE et de

BDI par cil, en analysant l'ultrastructure de 50 cils en coupe transversale de patients atteints de DCP et de patients contrôles. Le nombre moyen de BDE chez les individus contrôles était de 7,5 à 9. Tandis que chez les patients DCP, il était inférieur à 1,6. Le nombre moyen de BDI était de 3 à 6 chez les contrôles tandis qu'il était inférieur à 0,6 chez les DCP (Carlén et Stenram, 2005). Comme le montre ces chiffres, les BDE sont facilement identifiables car ils se situent en périphérie de l'axonème et contiennent une faible quantité de matériel électron-dense. Les BDI, en revanche, posent plus de problèmes lors de l'analyse ultrastructurale (Papon *et al.*, 2010). D'une part, ils se répètent à une fréquence moins élevée le long de l'axonème ciliaire. D'autre part, ils se projettent dans la portion centrale de l'axonème où il y a une quantité de matériel électron-dense importante qui se superpose à ceux-ci, les rendant plus difficilement identifiables. Ce mauvais contraste rend les BDI difficiles à voir et ceux-ci peuvent parfois être faussement absents à cause d'artéfacts biologiques ou techniques. Une étude a récemment démontré que sur 21 patients initialement diagnostiqués avec une absence de BDI, un quart des patients présentait des BDI normaux lorsque ceux-ci étaient retestés (O'callaghan *et al.*, 2011). Dans certains cas, une analyse des images assistée par des outils informatiques peut se révéler utile afin d'améliorer la visualisation des BDI (Escudier *et al.*, 2002).

- b) **Atteinte des crêtes radiales** : Certains phénotypes se caractérisent par une absence complète des crêtes radiales ou de leurs têtes. Ce type d'anomalie est facilement reconnaissable par la position excentrée que prend la paire de microtubules centrale qui est normalement maintenue en position centrale par les crêtes radiales. Un déplacement central d'un des doublets périphériques peut également être présent (Sturgess *et al.*, 1979; Noone *et al.*, 2004). Il faut noter qu'il existe un phénotype ultrastructural particulier, combinant l'absence des BDI, du N-DRC et des crêtes radiales. Ce phénotype particulier représenterait environ 12% de tous les cas de DCP (Jorissen *et al.*, 2000b), (Chilvers *et al.*, 2003a; Papon *et al.*, 2010; Shoemark *et al.*, 2012).
- c) **Transposition microtubulaire / agénésie de la paire centrale**: Cette altération caractéristique de la configuration 9+2 a été décrite dans certaines familles atteintes de DCP. Elle se caractérise par l'absence de la paire de microtubules centrale associée ou non à la transposition d'un doublet périphérique vers le centre de l'axonème (Sturgess *et al.*, 1980; Stannard *et al.*, 2004). Ce phénotype ultrastructural particulier n'est pas associé à des défauts de latéralité. Cette particularité pourrait refléter l'ultrastructure

9+0 des cils du nœud embryonnaire qui ne serait pas modifiée par des mutations qui affectent un élément qu'ils ne possèdent pas (Takeda *et al.*, 1999).

- d) **Désorientation ciliaire** : La plupart des patients atteints de DCP présentent une mauvaise orientation des cils. Or, l'orientation ciliaire est un facteur important de la clairance mucociliaire, puisque les cils doivent battre dans une même direction pour pouvoir propulser la couche de mucus vers l'oropharynx. Une étude rétrospective comparant l'orientation des cils de 15 patients atteints de DCP et de 15 patients atteints de dyskinésies ciliaires secondaires révélait une désorientation plus importante chez les patients atteints de DCP (Rayner *et al.*, 1996; Roomans *et al.*, 2006).
- e) **Autres phénotypes** : Un certain nombre d'autres anomalies ont été identifiées chez des patients présentant une dysmotilité ciliaire. Parmi celles-ci, on peut citer une aplasie ciliaire (Jorissen *et al.*, 2000b; Carlén et Stenram, 2005), caractérisée par l'absence de cils et l'absence de ciliogénèse, une absence du complexe régulateur des dynéines (Carlén *et al.*, 2003) et une agénésie de la paire de microtubules centrale (Stannard *et al.*, 2004).
- f) **Absence d'anomalie structurelle** : Un dernier phénotype est présent chez certains patients atteints de DCP. Il s'agit de patients qui possèdent une ultrastructure tout à fait normale et qui pourtant présentent des symptômes cliniques caractéristiques et une dysmotilité ciliaire. L'absence d'anomalies structurelles chez ces patients suggère l'atteinte d'une protéine qui affecte la fonction du cil (Schwabe *et al.*, 2008; Boon *et al.*, 2014) ou une désorientation des cils (Biggart *et al.*, 2001).

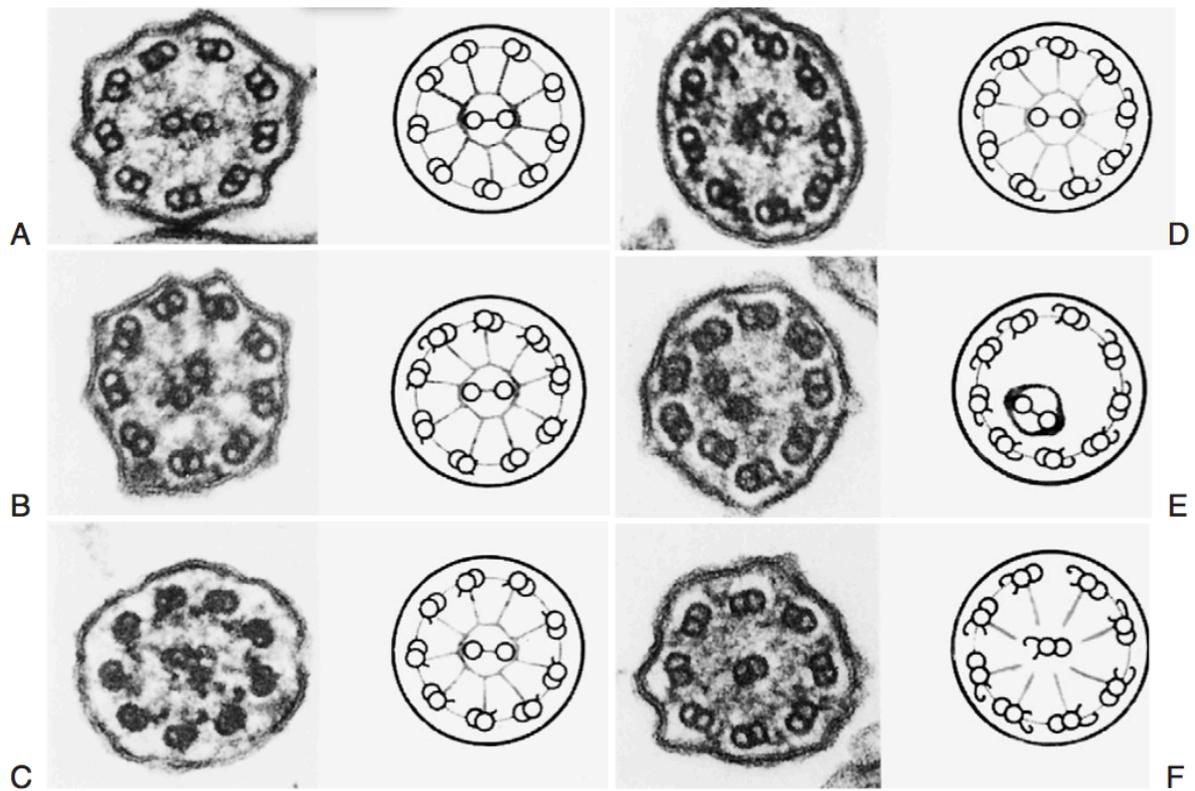


Figure 12 : Illustration des anomalies ultrastructurelles les plus fréquemment rencontrées lors de DCP. Coupe transversale de l'axonème en microscopie électronique à gauche et représentation schématique à droite. **A :** Absence complète des BDE et BDI. **B :** Absence partielle des BDE et BDI. **C :** Absence des BDE. **D :** Absence des BDI. **E :** Absence des crêtes radiales et localisation excentrique de la paire de microtubules centrale. **F :** Transposition microtubulaire (Leigh, 2006).

6.4.3.1.3 Prévalence des défauts ultrastructuraux

De nombreuses études se sont intéressées aux différents phénotypes ultrastructuraux des DCP.

La table 2 ci dessous résume le résultat de ces différentes études.

Etude	Nombre de patients	Absence des BDE + BDI	Absence des BDE	Absence des BDI	Anomalie de la paire centrale	Autres anomalies	Ultra-structure normale
<i>(Jorissen et al., 2000b)</i>	84	7%	42%	10% (+ CR absentes)	7 % (absence)	4% aplasie	28%
<i>(Chilvers et al., 2003b)</i>	56	36%	29%	14% 7% (+ CR absentes)		14 % transposition	/
<i>(Noone et al., 2004)</i>	76	24%	43%	29%	4%		/
<i>(Carlén et Stenram, 2005)</i>	38	45%	24%	21%	/	8% absence N-DRC 3% aplasie	/
<i>(Papon et al., 2010)</i>	245	23-32%	32-41%	4% 13% (+ CR absentes)	19%	/	/
<i>(Shoemark et al., 2012)</i>	242	24%	43%	12%	9% (absence des crêtes radiales)	12% transposition	3%
<i>(Vallet et al., 2013)</i>	60	18%	25%	17% (+ CR absentes)	40%	/	/
<i>(Demarco et al., 2013)</i>	35	17%	17%	20%	9% (absence des crêtes radiales)	17% absence axonème 14% aplasie 6% transposition	/
<i>(Boon et al., 2014)</i>	199		45%		21%		34%

Table 2 : proportion des différents défauts ultrastructurels dans 9 études reprenant des patients atteints de DCP.

6.4.3.1.4 Limites de la microscopie électronique

Il existe plusieurs facteurs qui limitent l'utilisation de la microscopie électronique dans le cadre des défauts ciliaires.

- 1) Il est impératif de pouvoir distinguer les défauts primaires des défauts secondaires à des dommages répétés de l'épithélium respiratoire.
- 2) Les méthodes de prélèvement, de fixation et de préparation des cellules ciliées sont délicates et requièrent un certain degré d'expertise.
- 3) Une bonne évaluation nécessite un nombre adéquat d'images interprétables
- 4) L'interprétation des images nécessite une connaissance parfaite de la variabilité normale et des changements non spécifiques.

Une étude récente reprenant les résultats de l'analyse en microscopie électronique de plus de 1400 prélèvements montrait qu'une analyse n'était réalisable que dans 71% des cas. Les prélèvements réalisés chez des enfants posaient plus de problème que ceux réalisés chez des adultes (60 % des échantillons étaient adéquats chez les enfants versus 87% chez les adultes) (Papon *et al.*, 2010).

L'utilisation de la microscopie électronique en tant que test diagnostique de la DCP a récemment été évaluée par un groupe d'experts (genetic disorders of mucociliary clearance consortium). Sur les 394 biopsies nasales de bonne qualité, réalisées selon des procédures standardisées, 155 prélèvements avaient les caractéristiques de défauts ciliaires en microscopie électronique, mais 43 patients avaient des résultats indéterminés. De plus, chez certains patients référés au consortium avec un diagnostic de DCP posé préalablement sur base d'une analyse en microscopie électronique, le diagnostic n'était pas confirmé lors de l'analyse du second prélèvement (Daniels, 2011).

6.4.3.2 Anomalies fonctionnelles : analyse de la fonction ciliaire

Nous avons vu plus haut qu'un certain nombre de patients atteints de DCP présentaient une motilité ciliaire anormale en présence d'une ultrastructure normale (Jorissen *et al.*, 2000a; Boon *et al.*, 2014). De plus, nous venons de voir que l'analyse en microscopie électronique n'est pas toujours réalisable et facile. Le développement d'outils permettant d'analyser la fonction ciliaire a permis de pallier certains de ces problèmes et représente une approche complémentaire au diagnostic de confirmation des DCP. Une évaluation complète de la fonction ciliaire comprend une mesure de la fréquence du battement ciliaire, du pattern de battement et de la coordination

de l'activité ciliaire. Peu d'études se sont intéressées à la coordination de l'activité ciliaire qui peut être évaluée en regardant le mouvement de fluide ou de débris autour des cellules ciliées. Il semblerait que la coordination de l'activité ciliaire soit invariablement altérée lors de DCP (Jorissen *et al.*, 2000a).

6.4.3.2.1 Mesure de la fréquence du battement ciliaire

Historiquement, on évaluait la fréquence du battement ciliaire (CBF) en microscopie optique afin de dépister les DCP. Une fréquence de battement ciliaire inférieure à 11 battements par seconde, soit 11Hz, était considérée comme anormale et déterminait quels échantillons devaient être analysés en microscopie électronique (Bush *et al.*, 1998). Différentes études ont maintenant démontré que l'utilisation de cette méthode pouvait mener à de nombreux faux négatifs car certains phénotypes ultrastructuraux de DCP sont associés à une CBF normale (Chilvers *et al.*, 2003a; Stannard *et al.*, 2010). L'analyse du pattern du battement ciliaire en utilisant un système de vidéo digitale à haute vitesse est la méthode la plus utilisée à l'heure actuelle et permet d'obtenir beaucoup plus d'informations.

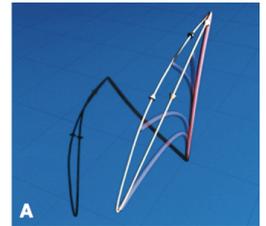
6.4.3.2.2 Analyse du pattern du battement ciliaire

Des morceaux d'épithélium cilié d'une longueur minimale de 50µm sont observés à l'aide d'une caméra haute résolution et au grossissement 100x. Le bord de l'épithélium est divisé en zones adjacentes de 10 µm. Cet enregistrement permet de calculer la fréquence du battement ciliaire, mais aussi un index d'immobilité qui reflète le pourcentage de cils immobiles au sein de l'échantillon (Greenstone *et al.*, 1988). Enfin ce système permet d'évaluer le pattern du battement ciliaire en regardant 3 plans différents :

- Vue latérale qui permet de visualiser le mouvement complet du cil
- Vue du dessus
- Vue du battement vers l'observateur

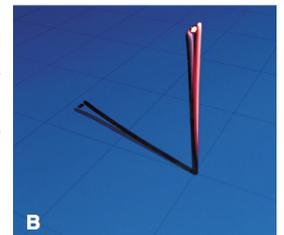
La voie ainsi empruntée par le cil peut-être analysée image par image.

Des valeurs de référence chez des adultes et des enfants sains ont été établies, permettant ainsi de comparer les résultats obtenus chez des patients atteints de DCP (Chilvers et O'callaghan, 2000). Le schéma **A** représente un pattern de battement ciliaire normal où le cil présente un mouvement de l'avant vers l'arrière sur un même plan sans mouvement de côté

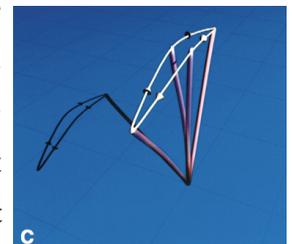


Plusieurs études ont ainsi démontré la présence d'un pattern de battement ciliaire anormal chez des patients atteints de DCP. De plus, les types de pattern ciliaires identifiés étaient associés à des défauts ultrastructuraux différents (Chilvers *et al.*, 2003a).

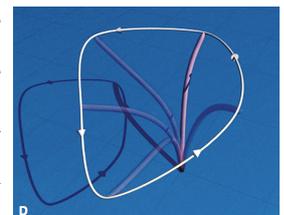
a) **Des cils pratiquement immobiles** : les cils présentant une anomalie des BDE associée ou non à une atteinte des BDI présentent de larges zones d'immobilité ciliaire. Quand un mouvement ciliaire est présent, il est restreint à un mouvement, lent, court et rigide (Schéma B). Chez les patients présentant une atteinte des BDE et BDI, en moyenne 80% des cils sont immobiles avec une CBF moyenne de $0,8 \pm 1,7$ Hz. Pour les patients présentant uniquement une atteinte des BDE, une plus faible proportion des cils sont immobiles (55%) avec une CBF moyenne de $2,3 \pm 2,6$ Hz (Chilvers *et al.*, 2003a).



b) **Des cils avec un pattern de battement trop rigide** : les cils présentant une anomalie des BDI associée ou non à une atteinte des crêtes radiales présentent un pattern très anormal qui se caractérise par des cils très rigides et une amplitude de mouvement très réduite. Il n'y a plus de ploiement du cil (Schéma C). L'index d'immobilité, en revanche est plus faible, puisque seulement 10% des cils sont immobiles en cas d'atteinte des BDI uniquement, et 30% en cas d'absence des BDI et des crêtes radiales. La CBF moyenne de ces 2 phénotypes ultrastructuraux est plus proche des valeurs normales, et de $9,3 \pm 4$ Hz et $6 \pm 3,3$ Hz, respectivement (Chilvers *et al.*, 2003a).



c) **Des cils avec un pattern de battement circulaire** : ce battement est observé chez les patients présentant une transposition microtubulaire (absence de paire centrale). Sur la vue de profil, ces cils présentent un mouvement de va-et-vient qui ressemble à celui d'un fouet. Par contre, vue du dessus, ces cils présentent un important mouvement circulaire et giratoire (Schéma D). Aucun de ces cils n'est immobile et la CBF est normale : $10,7 \pm 1,6$ Hz (Chilvers *et al.*, 2003a; Stannard *et al.*, 2010).



d) **Des cils hyperkinétiques avec une capacité de ploiment réduite** : ce pattern est observé chez des patients présentant un phénotype ultrastructurel normal. L'amplitude des battements ciliaires est réduite mais la mesure de la CBF est augmentée chez ces patients : 12 à 16 Hz (Schwabe *et al.*, 2008; Pifferi *et al.*, 2010) (Horani *et al.*, 2013a).

Plusieurs études ont démontré que l'évaluation du pattern du battement ciliaire était une méthode plus sensible et plus spécifique pour diagnostiquer les cas de DCP que l'utilisation de la mesure de la CBF (Stannard *et al.*, 2010; Shoemark *et al.*, 2012).

6.4.3.3 Ciliogénèse

Il n'est pas toujours facile de distinguer les anomalies ultrastructurelles primaires, des anomalies secondaires. De plus, les DCP prédisposent le patient aux infections récurrentes. Les désordres fonctionnels et structurels ainsi engendrés peuvent rendre l'interprétation des défauts primaires délicate. Jorissen *et al.* ont mis au point un système de régénération ciliaire ou ciliogénèse *in vitro*. Les cellules épithéliales respiratoires sont d'abord mises en culture sur une monocouche d'un gel de collagène, ce qui provoque une dédifférenciation et une disparition des cils. Ensuite, ces cellules cubiques sont placées en culture de suspension, ce qui induit une régénération du cil *de novo* (Jorissen *et al.*, 1989a). Ces cils possèdent une structure et une fonction normale (Jorissen *et al.*, 1989b; Jorissen et Bessems, 1995). De cette façon, les anomalies secondaires disparaissent, ce qui permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité du diagnostic des DCP après ciliogénèse (Jorissen *et al.*, 2000b).

Dans leur étude, Boon *et al.* ont illustré l'importance de la ciliogénèse dans la démarche diagnostique de la DCP. En effet, cette étude démontre clairement que certains cas de DCP peuvent être manqués, notamment ceux présentant une ultrastructure normale. De plus, chez certains patients, la dysmotilité ciliaire n'est apparue qu'après la ciliogénèse en culture. Dans cette étude, 16% des cas de DCP avec ultrastructure normale auraient été manqués sans la réalisation de la ciliogénèse en culture. Cette méthode est donc un outil supplémentaire intéressant dans le diagnostic des DCP (Boon *et al.*, 2014).

Cette méthode est particulièrement intéressante lors de phénotypes ultrastructuraux moins courants : désorientation ciliaire, aplasie ciliaire, transposition microtubulaire, ou encore absence de BDI (Barbato *et al.*, 2009).

Cette méthode présente cependant certains désavantages. Tout d'abord, elle requiert une expertise importante et n'est disponible que dans certains centres très spécialisés. De plus, la procédure de culture ne fonctionne pas toujours, soit parce que les cellules épithéliales sont en nombre insuffisant soit parce que la culture est contaminée par une bactérie ou des levures. Enfin, cette méthode est longue, puisque la procédure prend un minimum de 6 semaines (Jorissen *et al.*, 2000b).

6.4.3.4 Analyse par immunofluorescence

Des techniques de localisation intracellulaire de certaines sous-unités protéiques peuvent également contribuer au diagnostic des DCP. Cette méthode utilise des techniques d'immunofluorescence en microscopie optique et utilise des anticorps dirigés notamment contre des sous-unités des BDE. Dans une étude réalisée en aveugle, cette technique a permis de confirmer une anomalie des BDE chez des patients présentant un défaut de BDE en microscopie électronique (Fliegau *et al.*, 2005). Cette méthode est intéressante car elle n'est pas affectée par les anomalies ciliaires secondaires (Olbrich *et al.*, 2006). Un panel d'anticorps dirigés contre diverses structures ciliaires est aujourd'hui disponible ce qui permet un screening d'une grande variété d'échantillons (Moore, 2005; Omran *et al.*, 2008).

6.4.3.5 Analyse génétique

Le chapitre suivant s'intéresse au génotype des DCP. Nous allons voir que les bases génétiques des DCP sont de plus en plus connues. Plusieurs gènes ont ainsi été identifiés ouvrant la possibilité au clinicien d'utiliser le test génétique comme outil diagnostique. Les recommandations actuelles suggèrent le recours au test génétique uniquement lorsque le phénotype ultrastructurel a été identifié (Barbato *et al.*, 2009).

6.5 Génotypes des dyskinésies ciliaires primaires

6.5.1 Mode de transmission génétique

La DCP est un désordre rare qui ségrége dans la population sous un **mode autosomique récessif**. Cependant, certaines études rapportent quelques cas avec un mode de transmission différent. Narayan *et al.* rapportent le cas d'une mère atteinte de DCP qui a eu cinq enfants de trois pères différents, tous présentant des signes cliniques compatibles avec une DCP. Cette étude suggère que la mutation dans cette famille se transmettrait sous un mode autosomique dominant ou lié au chromosome X (Narayan *et al.*, 1994). Un mode de transmission différent est également rapporté pour des cas de DCP associés à d'autres syndromes rares. C'est le cas pour des patients atteints de DCP et de rétinite pigmentaire où un mode de transmission récessif lié au chromosome X a été identifié (Krawczy Ski et Witt, 2004; Moore, 2005). C'est également le cas pour une famille atteinte du syndrome oral-facial-digital 1, caractérisé par un retard mental, une macrocéphalie et de la DCP qui se transmet aussi sous un mode récessif lié à l'X (Budny *et al.*, 2006).

6.5.2 Différents gènes identifiés

La grande variété de phénotypes cliniques et ultrastructuraux des DCP est le reflet de la diversité des gènes responsables de ces phénotypes. Il existe donc une hétérogénéité de locus qui rend la réalisation d'analyses génétiques difficile (Blouin *et al.*, 2000). Le premier gène responsable de DCP chez l'homme a été identifié en 1999 chez un patient présentant une absence de BDE (Pennarun *et al.*, 1999). Depuis, une vingtaine de gènes responsables et plusieurs dizaines de mutations différentes ont été identifiés par des méthodes variées. Les paragraphes ci-dessous reprennent tous les gènes identifiés, jusqu'à la découverte du gène de cette étude, en les présentant selon leur méthode d'identification. Ensuite les gènes identifiés plus récemment seront recensés avec les nouvelles méthodes qui ont permis l'identification de certains d'entre eux.

6.5.2.1 Clonage positionnel : analyse de liaison génétique

L'analyse de liaison permet de tester si des marqueurs en déséquilibre de liaison avec le gène causal ségrégent au sein d'une famille, avec le phénotype étudié. On parle de déséquilibre de liaison lorsqu'il existe une ségrégation non indépendante entre allèles de deux locus proches

l'un de l'autre. L'un des locus peut donc servir de marqueur pour l'autre. Cette approche permet d'identifier des régions chromosomiques ou haplotypes susceptibles de contenir le gène d'intérêt. Plusieurs études ont pratiqué cette analyse de liaison afin d'identifier un ou des gènes impliqués dans les DCP. Quelques régions chromosomiques ont pu être identifiées mais cette méthode employée seule n'a jamais permis d'identifier un gène responsable (Blouin *et al.*, 2000; Meeks *et al.*, 2000; Jeganathan, 2004; Geremek, 2005).

Des stratégies alternatives existent et se basent sur le fait que la structure axonémale du cil est hautement conservée au travers des espèces et que les composants protéiques de l'axonème des organismes modèles présentent une homologie de séquence très importante avec ceux de l'homme. Ces caractéristiques permettent d'utiliser une approche par gènes candidats qui consiste à étudier des gènes impliqués dans la fonction ou la structure des cils chez des animaux/plantes qui représentent des modèles de la maladie.

6.5.2.2 Approche par gène candidat en utilisant des organismes modèles

Cette approche vise des gènes codant pour des sous-unités des bras de dynéine ou bien impliqués dans l'assemblage de l'axonème. Elle a permis l'identification de plusieurs gènes responsables de DCP, en utilisant différents organismes modèles.

DNAI1 est le premier gène identifié comme responsable de DCP. Ce gène code pour une chaîne intermédiaire des dynéines axonémales. Il s'agit d'un orthologue d'une protéine impliquée dans la structure des BDE chez l'algue verte *C. reinhardtii* (*IC78*). Ce gène a été sélectionné car les mutants de *C. reinhardtii* ne possédant pas cet *IC78*, présentaient une diminution de mobilité de 70% avec un phénotype ultrastructurel proche des patients atteints de DCP, soit une absence de BDE (Wilkerson *et al.*, 1995). Pennarun *et al.* ont dans un premier temps cloné puis séquencé le gène *DNAI1* en utilisant des primers choisis au niveau des séquences les plus conservées de *IC78*. Ensuite, ce gène constitué de 20 exons, a été séquencé chez 6 patients atteints de DCP et sans lien de parenté. Ces patients ont été sélectionnés car ils possédaient le même défaut ultrastructurel que les mutants de l'algue verte, à savoir une absence de BDE. Ce séquençage a permis l'identification de deux mutations du cadre de lecture, chez un des patients. Chacune de ces mutations provenait d'un des deux parents (Pennarun *et al.*, 1999). Par la suite, deux autres études ont identifié des mutations bialléliques chez cinq autres patients (Guichard *et al.*, 2001; Zariwala *et al.*, 2001). Puis, une large étude reprenant 179 patients atteints de DCP avec divers phénotypes ultrastructuraux, a permis d'identifier des mutations dans ce gène chez 9% d'entre eux. Cette étude identifia de nouvelles mutations ainsi qu'un effet fondateur pour une des

mutations décrites dans la première étude. On parle d'effet fondateur lorsqu'un groupe restreint d'individus d'une population déjà existante forme une nouvelle population dont le pool génétique est moins diversifié et concentre certaines mutations délétères. Cet effet fondateur a pu être mis en évidence parce que la mutation était plus fréquemment rencontrée et pouvait être confirmée en utilisant des marqueurs microsatellites à proximité de *DNAI1* (Zariwala *et al.*, 2006). Enfin, une étude réalisée sur 104 patients n'a permis d'identifier une mutation sur les deux allèles de *DNAI1* que dans 2% des cas (Faily *et al.*, 2008).

Un second gène a été identifié en utilisant la même approche. Bartoloni *et al.* ont caractérisé le transcrit et l'organisation génomique de la chaîne lourde des dynéines axonémales de type 11, *DNAH11* (Bartoloni *et al.*, 2002). Ce gène a été choisi car il codait pour une sous structure des bras de dynéine et qu'une lignée de souris présentaient des défauts de latéralité lorsqu'il était muté (Supp *et al.*, 1997). Les 82 exons de ce gène ont été séquencés chez un patient atteint de *situs inversus*, sélectionné car il possédait une disomie du chromosome portant le gène d'intérêt (Pan, 1998). Le séquençage a permis d'identifier une mutation « non sens » homozygote (Bartoloni *et al.*, 2002). Quelques études ont démontré l'implication de ce gène dans des cas de DCP avec un phénotype ultrastructurel normal (Schwabe *et al.*, 2008; Pifferi *et al.*, 2010; Knowles *et al.*, 2012). *DNAH11* serait responsable de 22% des cas de DCP présentant une ultrastructure normale (Knowles *et al.*, 2012).

TXNDC3 a été identifié comme étant responsable de rares cas de DCP caractérisés par une absence des BDE. Duriez *et al.* se sont intéressés à ce gène car son orthologue codait pour un composant des BDE présents dans le sperme des oursins de mer. Ils ont dans un premier temps, testé l'expression de ce gène dans les cellules respiratoires humaines. Ils ont ensuite séquencé les portions codantes et les sites d'épissage de ce gène et ont identifié une patiente présentant 2 mutations différentes (hétérozygote composite) (Duriez *et al.*, 2007).

De manière similaire, *DNAAF1* a été identifié comme responsable de rares cas de DCP, grâce à l'identification de mutants medaka (poisson) présentant des défauts de latéralité secondaire à une dysmotilité ciliaire. Deux mutations responsables d'une perte de fonction ont été identifiées à l'état homozygote dans deux familles différentes présentant des cas de DCP avec absence des deux types de bras de dynéine. *DNAAF1* jouerait un rôle dans le pré-assemblage des sous-unités des bras de dynéine avant leur mise en place le long de l'axonème par le transport intraflagellaire (Omran *et al.*, 2008).

Nous venons de voir que l'approche par gène candidat a été couronnée de succès dans certains cas. Toutefois, elle a également été plusieurs fois infructueuse (Maiti *et al.*, 2000; Bartoloni *et al.*, 2001; Pennarun *et al.*, 2002; Zariwala *et al.*, 2004).

De plus, il est intéressant de souligner que le gène ***DNAI2***, avait dans un premier temps été testé comme gène candidat car il codait pour une chaîne intermédiaire des dynéines, mais qu'aucune mutation n'avait pu être identifiée (Pennarun *et al.*, 2000). Huit ans plus tard, Loges *et al.* démontraient que ce gène était tout de même responsable de cas de DCP en appliquant une analyse de liaison dans une famille consanguine avec l'identification d'une région unique d'homozygotie par descendance (les deux copies de l'allèles mutés proviennent d'un ancêtre commun) chez les individus atteints, suivie d'une approche par gène candidat. Le séquençage de ce gène a permis d'identifier 3 mutations différentes responsables d'une absence de BDE en microscopie électronique (Loges *et al.*, 2008).

Ce dernier illustre l'intérêt d'utiliser une approche combinée se basant sur plusieurs méthodes : un clonage positionnel grâce à une analyse de liaison ou une cartographie par homozygotie, une approche par gènes candidats via des organismes modèles ou via des analyses informatiques comparatives incluant des études de génomique comparative, de protéomique ou de transcriptomique.

6.5.2.3 Approche combinant clonage positionnel et organismes modèles

DNAH5 a été identifié en utilisant une approche en deux étapes. La première étape consistait en une stratégie de cartographie de l'homozygotie dans une grande famille où la consanguinité était importante. Le génome des membres de cette famille a été caractérisé à l'aide de 340 microsatellites hautement polymorphiques. Une région présentant une homozygotie par descendance a été identifiée sur le chromosome 5 comme étant significativement associée au phénotype étudié (Omran *et al.*, 2000). Au sein de cette région, se trouvait un orthologue humain d'un gène codant pour des chaînes lourdes des BDE chez l'algue verte, *C. reinhardtii*. Des mutations de ce gène produisent un mutant caractérisé par une nage lente et des anomalies des BDE. Ce gène comprend 80 exons et s'étend sur 250 kb et son séquençage a permis d'identifier de nombreuses mutations responsables de perte de fonction chez des patients atteints de DCP avec absence ou raccourcissement des BDE. Ce gène est à ce jour le plus fréquemment identifié comme responsable de DCP chez l'homme (Olbrich *et al.*, 2002; Fliegau *et al.*, 2005; Hornef *et al.*, 2006; Faily *et al.*, 2009).

DNAAF2 a été identifié selon une approche similaire, mais en utilisant une technique de génotypage plus récente avec une densité de marqueurs plus importante tout au long du génome (analyse de liaison génome entier). Ce génotypage a été réalisé sur sept familles de DCP, présentant une consanguinité importante et une atteinte des BDE et des BDI. Au sein d'une de ces familles, quatre régions identiques par descendance ont été identifiées contenant environ 770 gènes. *DNAAF2* faisait partie de ces gènes et représentait un excellent candidat puisque des mutations présentes dans les orthologues de ce gène chez *Chlamydomonas* et chez le zebrafish sont responsables d'une anomalie structurale caractérisée par une atteinte des BDE et BDI. Plusieurs mutations ont été identifiées dont certaines impliquent une délétion de très grande taille. Tout comme *DNAAF1*, ce gène joue un rôle dans l'assemblage des bras de dynéine (Loges *et al.*, 2009).

6.5.2.4 Approche combinant clonage positionnel et l'utilisation d'outil informatique d'analyses comparatives

Une analyse de liaison génome entier réalisée dans deux familles où ségrégeaient des cas de DCP a permis d'identifier deux nouveaux gènes. Ces familles ont été sélectionnées sur base d'un défaut ultrastructurel similaire, soit une transposition microtubulaire, soit une agénésie de la paire de microtubule centrale. Le génotypage de plusieurs milliers de SNP répartis tout le long du génome a été réalisé grâce à une puce illumina. Les régions d'homozygotie identique par descendance ont été identifiées dans les deux familles. Ensuite, une approche par gènes candidats utilisant des outils informatiques comparant le génome d'organismes ciliés à celui d'organismes non ciliés a permis d'identifier les quelques gènes candidats. Le séquençage des parties codantes a permis d'identifier une mutation homozygote dans les deux gènes suivants : ***RSPH9*** et ***RSPH4***. Ces deux gènes codent pour des protéines impliquées dans la structure de la tête des crêtes radiales. Castleman *et al.* ont ensuite voulu déterminer l'impact fonctionnel d'une mutation dans *RSPH9* chez différents organismes modèles, en étudiant l'expression du transcrit par hybridation in situ chez la souris, par l'utilisation de morpholinos (oligonucléotides qui bloquent l'accès des autres molécules à de petites régions de la surface d'appariement des bases des ARNm) chez le zebrafish et enfin en étudiant la mobilité de *Chlamydomonas* mutant pour ce gène, lorsqu'il était réparé avec l'allèle sauvage. L'ensemble de ces manipulations a confirmé l'impact de ces gènes dans la DCP (Castleman *et al.*, 2009). Une étude réalisée sur une large population des patients DCP provenant d'Europe de l'est a permis d'identifier de nouvelles mutations au sein de *RSPH4* (Ziętkiewicz *et al.*, 2012).

OFD1, un gène impliqué dans un syndrome rare responsable d'un retard mental, une macrocéphalie et de la DCP. Ce gène a été identifié au sein d'une famille atteinte par analyse de liaison en utilisant des marqueurs situés sur le chromosome X. En effet, le mode de transmission suggérait un mode de transmission récessif lié à l'X. Une approche gène candidat a été utilisée dans une seconde étape en utilisant les études de génomique comparative disponibles (Budny *et al.*, 2006).

Une mutation du gène **RPGR** a été identifiée au sein d'une famille atteinte de rétinite pigmentaire et d'un phénotype compatible avec une DCP. Le pattern de ségrégation au sein de cette famille était également compatible avec une mode de transmission lié au chromosome X. Le séquençage du gène **RPGR** connu pour son implication dans les rétinites pigmentaires a mis en évidence une mutation du cadre de lecture qui est vraisemblablement à l'origine du phénotype respiratoire présenté par certains membres de cette famille (Moore, 2005).

En 2011, avant la parution de l'article présenté dans la suite de ce manuscrit, onze gènes avaient été identifiés et expliquaient entre 30 et 45 % des cas de DCP. Depuis en l'espace de trois ans, 14 gènes supplémentaires ont été identifiés, notamment grâce à l'essor des techniques de séquençage haut débit. Ces gènes sont brièvement présentés dans les paragraphes suivants.

6.5.2.5 Gènes identifiés après la découverte de *CCDC39*

CCDC40 a été identifié en parallèle de *CCDC39* par l'équipe du Pr. Omran. Ce gène a été identifié grâce à une approche de gènes candidats via des organismes modèles. Des souris homozygotes présentant des défauts de latéralité et une mortalité précoce ont permis d'identifier une mutation non sens au sein de *CCDC40*. L'impact fonctionnel de *CCDC40* a ensuite été confirmé chez des zebrafish à l'aide de morpholinos dirigés contre ce gène. Ensuite, sur base d'un phénotype ultrastructurel similaire (diminution des BDI, déplacement ou une absence de la paire centrale et un déplacement d'un doublet périphérique), des patients humains ont été sélectionnés. Le séquençage a permis d'identifier plusieurs mutations délétères au sein de ce gène (Becker-Heck *et al.*, 2010).

DNAL1 a été identifié grâce à une étude de liaison au sein de deux familles consanguines puis par une approche gène candidat en utilisant la base de donnée du « cilia proteome ». Ce gène est responsable d'une absence des BDE (Mazor *et al.*, 2011). Ce gène avait pourtant été séquencé quelques années plus tôt, chez 86 patients atteints, mais aucune mutation significative n'avait été identifiée (Horvath *et al.*, 2005).

La découverte de **DNAAF3** a été réalisée grâce à un mutant immobile de *C. reinhardtii* présentant une atteinte des BDE et BDI. Ce gène a été identifié chez ce mutant par une cartographie moléculaire suivie d'un sauvetage phénotypique. Ce gène était situé au niveau d'un locus de DCP précédemment cartographié au sein de trois familles consanguines présentant un phénotype ultrastructurel semblable (Meeks *et al.*, 2000). Plusieurs mutations dans différentes familles ont ainsi été identifiées (Mitchison *et al.*, 2012).

Suivant la même méthode, **CCDC103** a été identifié grâce à une lignée mutante de zebrafish présentant des défauts de latéralité et une absence complète ou partielle des BDE et une diminution des BDI. Une analyse de liaison génome entier réalisée sur quelques familles atteintes, puis un séquençage d'une centaine de patients atteints a permis d'identifier 10 patients humains présentant des mutations au sein de ce gène (Panizzi *et al.*, 2012).

LRRC6 a été mis en évidence à quelques mois d'intervalle par deux équipes différentes. Ces deux équipes ont utilisé la même approche à savoir un clonage positionnel au sein de familles présentant une atteinte des BDE et BDI, puis une approche par gène candidat en utilisant notamment des études de génomiques comparatives. Ce gène est impliqué dans le processus d'assemblage des bras de dynéine (Kott *et al.*, 2012; Horani *et al.*, 2013b).

CCDC65 est le dernier gène identifié par les approches présentées ci-dessus. Une analyse de liaison génome entier a permis d'identifier 2 régions d'intérêt contenant 172 gènes. 17 étaient présents dans les bases de données du « ciliary proteome » mais un seul était conservé au sein des organismes ciliés. Ce gène est responsable d'un phénotype ultrastructurel normal en microscopie électronique (Horani *et al.*, 2013a).

6.5.2.6 Gènes identifiés récemment grâce au séquençage à haut débit

HYDIN est le premier gène identifié grâce à une technique de séquençage à haut débit. Dans un premier temps, une analyse de liaison génome entier a été réalisée au sein d'une famille consanguine, ce qui a permis d'identifier un locus d'intérêt. Dans la région de ce locus, un gène était particulièrement prometteur puisqu'il était responsable d'une lignée mutante de souris hydrocéphales suite à une dysmotilité ciliaire épendymaire. Contrairement aux lignées de souris présentées plus haut, ces souris ne présentaient pas de défaut de latéralité, tout comme les patients étudiés. Le séquençage de ce gène a permis d'identifier une première mutation au sein de **HYDIN**. Puis, de nouvelles mutations ont été identifiées chez d'autres patients en utilisant un

séquençage de toutes les parties codantes du génome. Ces mutations sont responsables d'une fonction ciliaire anormale mais, la structure ciliaire en microscopie électronique est conservée (Olbrich *et al.*, 2012).

HEATR2 a été identifié uniquement en utilisant une technique de capture et de séquençage des parties codantes du génome. Le génome de deux patients provenant d'une famille consanguine ainsi que celui de leurs parents respectifs ont été séquencés. Ce séquençage a permis d'identifier plus de 15.000 variants au sein des régions codantes. Une stratégie de filtration a ensuite été utilisée, en comparant les variants identifiés à ceux déjà connus et repris dans la base de donnée « 1000 genomes project » et en éliminant ceux qui n'était pas à l'état hétérozygote chez les parents et homozygotes chez les enfants atteints. Cette stratégie a permis de réduire le nombre de 15.000 à 56. Parmi ces variants, 55 étaient déjà connus et possédaient une fréquence allélique mineure relativement élevée, ce qui ne plaidait pas en faveur de la mutation causale. Par contre, le dernier variant n'avait pas encore été rapporté et était responsable d'une mutation « faux sens » dans le gène **HEATR2**. Des études fonctionnelles réalisées sur *Chlamydomonas* et sur des cellules épithéliales respiratoires ont confirmé que ce gène était bien impliqué dans la fonction ciliaire et jouait un rôle dans l'assemblage ou le transport des bras de dynéine (Horani *et al.*, 2012).

Zariwala *et al.* dans une étude récente, ont développé une stratégie qui combinait un séquençage exome entier suivi d'une cartographie des régions homozygotes au sein de 31 familles différentes. Cette approche permet de diminuer le nombre de variants faux positifs et de confirmer la ou les mutations causales de gènes déjà identifiés dans 16 familles des 31. Dans une famille, cette approche a permis d'identifier un nouveau gène : **ZMYND10** responsable d'une absence des BDE et BDI chez les patients mutés (Zariwala *et al.*, 2013). Cette même technique a aussi permis d'identifier des mutations au sein de **CCDC151** (Alsaadi *et al.*, 2014; Hjeij *et al.*, 2014).

Très récemment, une puce spécifiquement dirigée contre 772 gènes présents dans le « ciliary proteome » a été mise au point. Cette puce a permis d'identifier un nouveau gène responsable d'une anomalie des BDE : **ARMC4**. Des mutations dans ce gène ont été identifiées dans 10 familles différentes (Hjeij *et al.*, 2013). Enfin, **SPAG1** et **CCDC114** ont été identifiés grâce à un séquençage exome entier de patients présentant le même type de défaut ultrastructuraux : une absence des deux bras de dynéine pour le premier et une absence des BDE, pour le second (Knowles *et al.*, 2013a; Knowles *et al.*, 2013b; Onoufriadis *et al.*, 2013).

L'ensemble des études présentées ci-dessus, permet de reprendre quelques points clés :

- La plupart des gènes ont été identifiés en recherchant les régions homozygotes par descendance au sein de famille consanguine ou en utilisant des lignées mutantes de certains organismes modèles, par définition consanguins.
- Le succès de l'identification des bases moléculaires d'une maladie hétérogène comme la DCP repose sur une combinaison de technique de clonage positionnel suivie d'une approche par gène candidat.
- Une meilleure caractérisation des anomalies structurelles / fonctionnelles a permis d'identifier des groupes de patients avec un phénotype homogène, ce qui a ensuite facilité les études génétiques.

La figure 13 ci dessous, reprend les 26 gènes identifiés, ainsi que l'impact d'une déficience de ce gène sur l'ultrastructure ciliaire. La table 3, ci-dessous reprend un résumé des différents gènes identifiés.

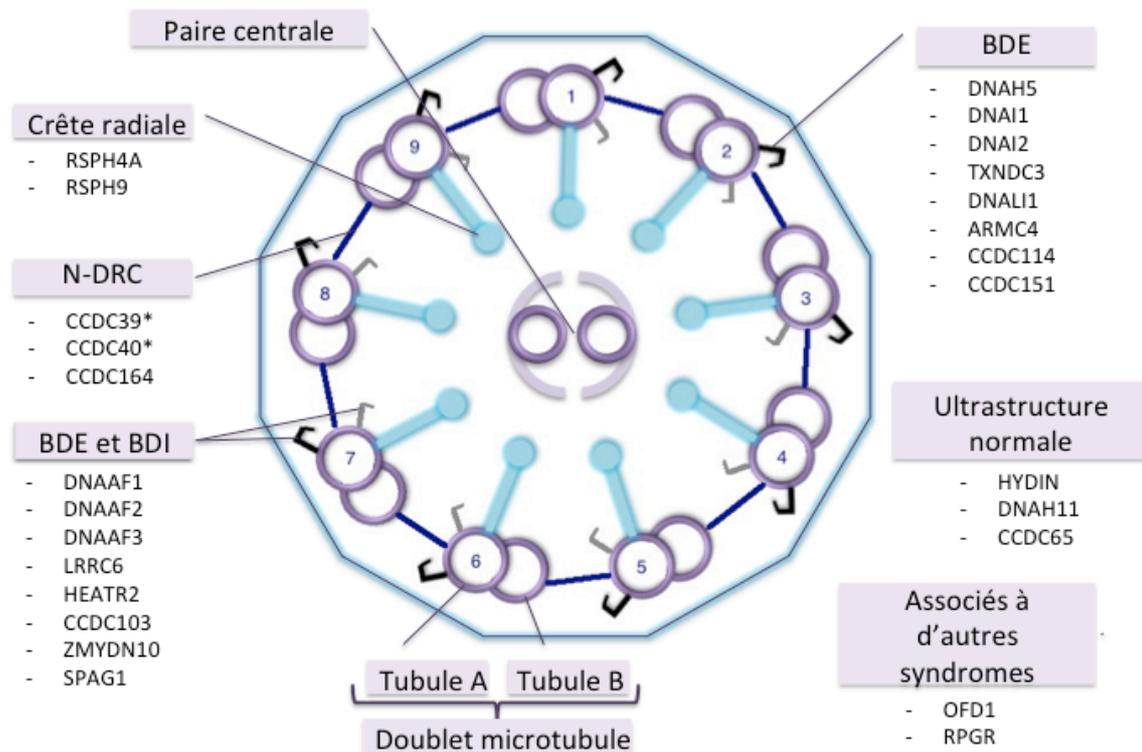


Figure 13 : Schéma représentant une coupe transversale de l'axonème ciliaire et ses différents composants, ainsi que les 26 gènes impliqués dans les DCP humaines.

* gènes responsables d'une atteinte du N-DRC et d'une atteinte des BDI.

Gène	Localisation	Site d'expression	Fonction de la protéine	Défaut ultrastructurel	Défaut fonctionnel	Association	Prévalence dans la population des DCP	Réf.
<i>DNAI1</i>	9p13-21	Chaîne intermédiaire des BDE	Assemblage des BDE, attache aux paires de microtubules périphériques	Atteinte des BDE	Absence de mouvement, un petit mouvement résiduel est parfois présent.	/	2-10%	(Pennarun <i>et al.</i> , 1999; Guichard <i>et al.</i> , 2001; Zariwala <i>et al.</i> , 2001; Zariwala <i>et al.</i> , 2006; Faily <i>et al.</i> , 2008)
<i>DNAH5</i>	5p15	Chaîne lourde γ des BDE	Assemblage des BDE proximaux et distaux	Atteinte des BDE	Absence de mouvement	/	15-28%	(Omran <i>et al.</i> , 2000; Olbrich <i>et al.</i> , 2002; Fliegau <i>et al.</i> , 2005; Hornef <i>et al.</i> , 2006; Faily <i>et al.</i> , 2009)
<i>DNAH11</i>	7p21	Chaîne lourde des BDE	Indéterminé	Ultrastructure normale	Battement hyperkinétique, ploïement réduit	/	Min. 6-9%	(Bartoloni <i>et al.</i> , 2002; Schwabe <i>et al.</i> , 2008; Pifferi <i>et al.</i> , 2010; Knowles <i>et al.</i> , 2012)
<i>TXNDC3</i>	7p15	Chaîne légère et intermédiaire des BDE	Liaison aux microtubules	Atteinte des BDE	Combinaison de battement normal et de cils immobiles	/	Rare	(Duriez <i>et al.</i> , 2007)
<i>RPGR</i>	Xp11-21	Base ciliaire	Transport des protéines le long de l'axonème ?	Anomalies complexes	Absence de mouvement	Rétinite pigmentaire	Rare	(Moore, 2005)
<i>DNAI2</i>	17q23	Chaîne intermédiaire des BDE	Assemblage des BDE proximaux et distaux	Atteinte des BDE	?	/	2%	(Loges <i>et al.</i> , 2008)
<i>DNAAF2</i>	14q21	Cytoplasme	Pré-assemblage cytoplasmique des BDE et BDI	Atteinte des BDE et BDI	Absence de mouvement	/	12% si atteinte des BDE et BDI	(Loges <i>et al.</i> , 2009)

RSPH9	6p21	Tête des crêtes radiales	Transduction des signaux entre la paire centrale et les bras de dynéine	Transposition microtubulaire	CBF normale Mouvement rotatoire	Absence de défaut de latéralité	Rare	(Castleman <i>et al.</i> , 2009; Ziętkiewicz <i>et al.</i> , 2012)
RSPH4A	6q22	Tête des crêtes radiales	Transduction des signaux entre la paire centrale et les bras de dynéine	Agénésie de la paire centrale	CBF normale Mouvement rotatoire	Absence de défaut de latéralité	2-3%	(Castleman <i>et al.</i> , 2009; Ziętkiewicz <i>et al.</i> , 2012)
OFD1	Xp22	Centrosome et corpuscule basal	Assemblage du cil, rôle dans l'IFT ?	?	CBF normale, désorganisation du pattern de battement	Retard mental, malformations craniofacial et digital, maladie rénale polykystique	Rare	(Budny <i>et al.</i> , 2006)
DNAAF1	16q24	Cytoplasme	Assemblage des BDE et BDI proximaux et distaux	Atteinte des BDE et BDI	Absence de mouvement	/	4-5%	(Omran <i>et al.</i> , 2008)
CCDC39	3q26	Axonème ciliaire	Assemblage des BDI, crêtes radiales et N-DRC	Atteinte des BDI et désorganisation microtubulaire	Petits mouvements très rapides, axonèmes rigides	/	2-5%	(Merveille <i>et al.</i> , 2010; Blanchon <i>et al.</i> , 2012; Antony <i>et al.</i> , 2013)
CCDC40	17q25	Cytoplasme apical et axonème	Assemblage des BDI, crêtes radiales et N-DRC	Atteinte des BDI déplacement de la paire centrale	Petits mouvements très rapides, axonèmes rigides	/	3-8%	(Becker-Heck <i>et al.</i> , 2010; Blanchon <i>et al.</i> , 2012; Antony <i>et al.</i> , 2013)
DNAL1	14q24	Chaîne légère des BDE	Interaction avec DNAH5 and α -tubulin	Atteinte des BDE	Diminution de la CBF Absence de coordination	/	Rare	(Horvath <i>et al.</i> , 2005)
DNAAF3	19q13	Cytoplasme	Assemblage des BDE et BDI	Atteinte des BDE et BDI	Absence de mouvement	/	Rare	(Mitchison <i>et al.</i> , 2012)
CCDC103	17q12-22	Cytoplasme	Assemblage des BDE et BDI	Atteinte des BDE et BDI	Absence ou réduction des	/	Rare	(Panizzi <i>et al.</i> , 2012)

					mouvements			
HEATR2	7p22	Cytoplasme	Assemblage des bras de dynéine	Atteinte des BDE et BDI	Diminution de la mobilité	/	Rare	(Horani <i>et al.</i> , 2012)
HYDIN	1q21	Paire centrale de microtubules	Indéterminé	Ultrastructure normale	Absence de coordination, diminution de l'amplitude de ploïement	Absence de défaut de latéralité	Rare	(Olbrich <i>et al.</i> , 2012)
LRRC6	8q24	Cytoplasme et cils	Assemblage des bras de dynéine	Atteinte des BDE et BDI	Absence de mouvement	/	11 % si atteinte des BDE et BDI	(Kott <i>et al.</i> , 2012; Horani <i>et al.</i> , 2013b)
CCDC65	12q13	Cytoplasme et cils	Assemblage et maintenance du N-DRC	Ultrastructure normale	Battement hyperkinétique, ploïement réduit	/	Rare	(Horani <i>et al.</i> , 2013a)
ARMC4	10p11-12	Cytoplasme et axonème ciliaire	Assemblage des BDE distaux	Réduction du nombre de BDE	Diminution de la CBF. Absence de mouvement ou petit mouvement résiduel.	/	<10% si atteinte BDE	(Hjeij <i>et al.</i> , 2013)
ZMYDN10	3p21	Cytoplasme	Interagit avec LRCC6	Atteinte des BDE et BDI	Absence de mouvement.	/	4-5%	(Zariwala <i>et al.</i> , 2013)
SPAG1	8q22	Cytoplasme	Assemblage ou transport des bras de dynéine	Atteinte des BDE et BDI	?	/	Rare	(Knowles <i>et al.</i> , 2013b)
CCDC114	19q13	Axonème ciliaire	Assemblage des BDE	Atteinte des BDE	Absence de mouvement	/	6% si atteinte des BDE	Onoufriadis 2013(Knowles <i>et al.</i> , 2013a)
CCDC151	19p13	Axonème ciliaire	Assemblage des BDE	Atteinte des BDE	Absence de mouvement	/	Rare	(Alsaadi <i>et al.</i> , 2014; Hjeij <i>et al.</i> , 2014)
CCDC164	2p23	?	Assemblage du N-DRC	Atteinte du N-DRC	Diminution de l'amplitude de ploïement	/	Rare	(Wirschell <i>et al.</i> , 2013)

7 Les dyskinesies ciliaires primaires dans l'espèce canine

Les données relatives aux DCP chez le chien sont beaucoup moins nombreuses que chez l'homme. On compte un peu plus d'une trentaine de cas décrits dans l'espèce canine et ce, dans 20 races différentes. La plupart des publications rapportent des cas isolés. Toutefois, plusieurs publications concernent des fratries de chiens atteints (Randolph et Castleman, 1984; Morrison *et al.*, 1987; Edwards *et al.*, 1989; Watson *et al.*, 1998). Dans ces études, le diagnostic est posé suite à la présence de signes cliniques compatibles associés à des défauts de latéralité ou à des défauts ultrastructuraux en microscopie électronique (Edwards *et al.*, 1992).

7.1 Présentation clinique

Les signes apparaissent en général très tôt dans la vie du chien, dès les premiers jours dans la plupart des cas. Toutefois, certains chiens sont restés asymptomatiques pendant quelques temps (Edwards *et al.*, 1989; Hoover *et al.*, 1989). Il existe même la description d'un dalmatien qui serait resté asymptomatique pendant 10 ans avant de montrer des signes cliniques respiratoires (Killingsworth *et al.*, 1987). La véracité du diagnostic chez ce dalmatien pourrait être mise en doute étant donné l'absence de signes cliniques pendant une très longue période, l'absence de défaut de latéralité et le faible pourcentage de cils présentant des défauts ultrastructuraux.

Les signes cliniques présentés par l'espèce canine sont très similaires à ceux présentés par l'homme. Les symptômes respiratoires incluent la présence d'un jetage nasal mucoïde à mucopurulent, des éternuements et une toux humide et productive. Une détresse respiratoire peut être présente dans certains cas (Foodman Ms, 1989; Watson *et al.*, 1998). L'auscultation de ces chiens révèle une augmentation diffuse des bruits pulmonaires, la présence de crépitements et dans certains cas avancés, une diminution des bruits respiratoires en région ventrale. (Clercx *et al.*, 2000)

Les examens post-mortem réalisés chez certains de ces chiens révèlent des lésions de rhinite chronique, caractérisées histologiquement par un infiltrat plasmocytaire, et d'un plus faible nombre de neutrophiles, ainsi que par la présence d'une hyperplasie des glandes muqueuses (Randolph et Castleman, 1984; Foodman Ms, 1989; JI, 2014). D'autres lésions du tractus respiratoire ont été décrites incluant des cornets nasaux hypoplastiques (Carrig *et al.*, 1974;

Clercx *et al.*, 2000; JI, 2014), la présence de sinusite frontale (Carrig *et al.*, 1974; Randolph et Castleman, 1984) et la présence de rhinolithes (Edwards *et al.*, 1992).

Les voies respiratoires inférieures sont également touchées. Les lésions peuvent se présenter sous forme de bronchite et de bronchiolite ou encore de bronchopneumonie sévère, de bronchiectasie et de consolidation des lobes pulmonaires ventraux. On observe habituellement une quantité variable de matériel muqueux à mucopurulent dans les voies respiratoires. Les surinfections bactériennes sont très fréquentes et les bactéries les plus fréquemment isolées sont *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma species*, *Pseudomonas species*, *Streptococcus epidermicus* (Edwards *et al.*, 1992; Watson *et al.*, 1998).

Les lobes crâniiaux et moyen droit sont les plus souvent et les plus sévèrement atteints. Les portions dorsales des poumons sont relativement épargnées. Deux tiers des chiens présentent des lésions de bronchiectasies et la plupart de ceux qui n'en présentent pas sont des chiens jeunes où le remodelage n'a vraisemblablement pas eu le temps de se mettre en place (Edwards *et al.*, 1992; Neil *et al.*, 2002; Beck *et al.*, 2014). Une leucocytose neutrophilique est fréquemment rencontrée, particulièrement lors de surinfection bactérienne.

L'analyse des spermatozoïdes de chiens mâles atteints révèle une diminution de la mobilité progressive (Edwards *et al.*, 1989; Watson *et al.*, 1998), voir une immobilité totale (Morrison *et al.*, 1987), une diminution du nombre de spermatozoïdes et des anomalies de conformation des spermatozoïdes (Watson *et al.*, 1998).

Un peu plus de la moitié des cas décrits chez le chien présentaient un *situs inversus*, un seul cas de *situs ambiguus* au niveau du thorax est rapporté chez le pointer anglais (Morrison *et al.*, 1987).

La plupart des chiens pour lesquels une hydrocéphalie a été recherchée présentaient un certain degré de dilatation des ventricules cérébraux. Toutefois, aucun d'entre eux ne présentait des déficits neurologiques associés.

7.2 Anomalies ultrastructurelles

Les défauts ultrastructurels sont similaires à ceux observés dans l'espèce humaine.

Une analyse en microscopie électronique des défauts ultrastructurels ciliaires n'est détaillée que dans 13 des 20 races identifiées. Comme chez l'homme, les anomalies des bras de dynéine sont les plus fréquentes, que ce soit une atteinte des BDE (Morrison *et al.*, 1987; Edwards *et al.*, 1989; Hoover *et al.*, 1989), des BDI (Randolph et Castleman, 1984; De Scally *et al.*, 2004) ou des deux (Watson *et al.*, 1998; Beck *et al.*, 2014). Une transposition microtubulaire est également rapportée dans quelques races (Morrison *et al.*, 1987; Beck *et al.*, 2014). Certaines études en microscopie électronique démontrent une désorganisation axonémale (Afzelius *et al.*, 1984; Dhein *et al.*, 1990). Une absence des BDI, des crêtes radiales et du N-DRC est rapportée chez deux bobtails et chez un American Staffordshire (Randolph et Castleman, 1984; De Scally *et al.*, 2004). Enfin, une ultrastructure normale est rapportée chez un Chow-chow et chez un Golden retriever. Ces deux chiens présentaient des signes cliniques compatibles avec une DCP et un *Situs inversus*.

Cette dernière race est intéressante car c'est la seule dans laquelle sont rapportés trois cas distincts avec des résultats différents en microscopie électronique (Afzelius *et al.*, 1984; Morrison *et al.*, 1987; Reichler *et al.*, 2001). Un des chiens présentait une ultrastructure normale tandis qu'un autre présentait une désorganisation axonémale et que le troisième présentait une transposition microtubulaire et une absence des BDE. On s'attend, au sein d'une population consanguine, comme c'est le cas de nos races de chiens, à observer les mêmes défauts ultrastructuraux, liés à un seul gène responsable. Toutefois, il faut noter que le Golden Retriever est une race possédant une population d'effectifs efficaces assez importante (Lindblad-Toh *et al.*, 2005) et que chez l'homme, même dans des populations relativement isolées, plusieurs variants responsables de DCP ont été identifiés (Casey *et al.*, 2014).

L'analyse ultrastructurelle peut se faire après ciliogénèse comme chez l'homme afin de se « débarrasser » des défauts ultrastructurels secondaires (Clercx *et al.*, 2000).

Le tableau ci-dessous reprend les différents cas de DCP identifiés chez le chien et leurs principales caractéristiques.

Races	Nbre	Age au diagnostic	Sexe	Défaut de latéralité	Bronchiectasie	Hydrocéphalie	Autres	TEM	Référence
Alaskan Malamute	1	8 mois	F	SS	+	+		Transposition microtubulaire + absence des BD	(Beck <i>et al.</i> , 2014)
Cavalier King Charles	1	3 mois	F	SI	-	ND		/	(Durant, 2008)
American Staffordshire	1	3 mois		SS	-	ND		Absence des BDI et des crêtes radiales. Absence de la paire centrale.	(De Scally <i>et al.</i> , 2004)
Teckel	1	4 ans	MC	SI	+	+		/	(Neil <i>et al.</i> , 2002)
Bullmastiff	1	2,5 ans	M	SS			Ciliogénèse	Agénésie de la paire centrale CBF réduite	(Clercx <i>et al.</i> , 2000)
Golden Retriever	3	9 mois	F	SI	-	+	Dysplasie tricuspide	CBF réduite et pattern Dyskinétique. US normale	(Reichler <i>et al.</i> , 2001)
		14 mois	M		+	ND	Sperme immobile	Atteinte des BDE et transposition microtubulaire	(Morrison <i>et al.</i> , 1987)
		7 mois	M		-	-		Désorganisation axonémale	(Afzelius <i>et al.</i> , 1984)
Terre-neuve	3	1-3,5 ans	1 M, 2F	SS	-	ND	Faible mobilité progressive et nombreuses anomalies des spermatozoïdes	Atteinte des BDE et BDI	(Watson <i>et al.</i> , 1998)
Border Collie	1	7 semaines	M	SI	+	ND		/	(Carrig <i>et al.</i> , 1974)
Setter Anglais	1	8 mois	F	SI	+	ND		/	(Jl, 1976)
Doberman	1	7 semaines	M	SI	-	ND		/	(August Jr, 1982)

Chihuahua	1	15 mois	F	SI	ND	ND		/	(B, 1983)
Springer Spaniel	5	1 sem. - 4 mois	3 M / 2 F	4SI / 1SS	+	+		Atteinte des BDE	(Edwards <i>et al.</i> , 1989) (Edwards <i>et al.</i> , 1983)
Pointer Anglais	4	3 mois	4 F	1 SA (thorax) 1 SI 2 SS	+	1+ / 3 ND		Atteinte des BDE et transposition microtubulaire	(Morrison <i>et al.</i> , 1987)
Bobtail	2	2 mois	1M/1 F	1 SI	+	1+		Atteinte des BDI, Transposition microtubulaire et déplacement de la paire centrale	(Randolph et Castleman, 1984)
Bichon frisé ?	2	2 mois	1M/1 F	SS	+	+		Mauvaise orientation ?	(Edwards Df, 1987)
Dalmatien ?	1	11 ans	FS	SS	+	ND	Pas de signes cliniques avant 10 ans	20% des cils présentaient une absence de BDE et BDI	(Killingsworth <i>et al.</i> , 1987)
Chow-Chow	1	2 ans	M	SI	+	+	Oligoazoospermie et mobilité progressive réduite Clairance mucociliaire réduite	CBF normale Ultrastructure normale	(Edwards <i>et al.</i> , 1989)
Caniche nain	1	12 ans	MC	SI	+	ND		/	(Foodman Ms, 1989)
Rottweiler	1	2 ans	M	SS	+	ND		Atteinte des BDE, désorganisation axonémale	(Hoover <i>et al.</i> , 1989)
Shar Pei	4	2 mois		SS	ND	+	Clairance mucociliaire réduite	Désorganisation axonémale	(Dhein <i>et al.</i> , 1990)

7.3 Mode de transmission génétique

Un mode de transmission autosomique récessif est également suspecté chez le chien (Edwards *et al.*, 1989; Watson *et al.*, 1998). Plusieurs éléments sont en faveur de ce mode de transmission. Premièrement, les parents de chiots atteints ne présentent pas de symptômes. Deuxièmement, les cas rapportés sont toujours des chiens de race, ce qui augmente la probabilité de consanguinité. Troisièmement, les deux sexes sont atteints de manière similaire. Enfin, Edwards *et al.* obtiennent environ un atteint sur trois en croisant le père de chiots atteints avec une de ses filles asymptomatique (Edwards *et al.*, 1989). Avant la réalisation de ce travail de recherche, aucun gène responsable n'avait été identifié dans l'espèce canine.

Objectifs

Pour comprendre les objectifs de ce travail de recherche, il faut préciser le contexte dans lequel il a débuté. En 2006, une éleveuse de bobtail s'est présentée à la consultation de médecine interne de la faculté de médecine vétérinaire avec trois jeunes femelles, âgées de 8 mois, montrant des signes cliniques respiratoires évoluant depuis leur naissance. Rapidement, une dyskinésie ciliaire primaire a été suspectée, car l'une des chiennes présentait également un *situs inversus*. L'analyse ultrastructurale réalisée avant et après ciliogénèse sur l'une d'entre elles a permis d'identifier un phénotype ultrastructurel similaire à celui de certains cas de DCP humaine, à savoir une absence des BDI, des crêtes radiales et du N-DRC. Au moment de la réalisation de cette recherche, aucun gène n'avait été identifié pour ce phénotype particulier, tandis que l'ensemble des gènes identifiés n'expliquait qu'environ 35% des cas de DCP chez l'homme. A la même époque, le génome du chien venait d'être séquencé (Lindblad-Toh *et al.*, 2005) et l'intérêt du chien comme organisme modèle afin d'identifier des gènes responsables de caractère monogénique venait d'être démontré (Karlsson *et al.*, 2007). Suite au séquençage du génome du chien, plus de deux millions de polymorphismes avaient été identifiés permettant la génération de puces de génotypage génome entier. Les outils nécessaires à la réalisation d'une étude de liaison génome entier et d'une approche par gène candidat étaient donc disponibles. Ce travail s'inscrivait dans le cadre d'un projet de recherche européen, le projet « LUPA » (Lequarré *et al.*, 2011), impliquant une vingtaine de facultés vétérinaires provenant de douze pays européens. Le but de ce projet était d'étudier des pathologies d'origine génétique chez le chien, afin d'identifier des gènes qui pourraient être impliqués dans des pathologies similaires chez l'homme. Ce projet comportait cinq axes de recherche différents ; les pathologies cardiovasculaires, les cancers, les pathologies neurologiques, les désordres inflammatoires et les pathologies monogéniques. L'étude des DCP faisait partie de cette dernière catégorie.

La première partie de ce travail s'est axée autour de l'identification d'un nouveau gène responsable de DCP tant chez l'homme que chez le chien, tandis que la seconde partie s'est principalement intéressée à la caractérisation du phénotype clinique de la maladie chez le bobtail ainsi qu'à la fréquence de la mutation identifiée au sein de la population de bobtails.

Le premier objectif de ce travail était d'identifier **les bases génétiques** de la dyskinésie ciliaire primaire ségrégant au sein des bobtails. Nous avons voulu déterminer le mode de transmission génétique et identifier le gène responsable du phénotype clinique. Une fois ce gène identifié,

nous avons voulu déterminer si celui-ci était également **impliqué dans des cas de DCP chez l'homme**. C'est pourquoi nous avons pris contact avec différents centres de référence travaillant sur les DCP en France et en Allemagne afin de tester des patients humains présentant des défauts ultrastructuraux similaires à ceux de nos chiens.

Ensuite, nous avons voulu déterminer les conséquences qu'une dysfonction de ce gène pouvait entraîner, pour d'une part, mieux comprendre le rôle de la protéine déficiente au sein de la cellule ciliée, et d'autre part confirmer que les mutations identifiées étaient bien à l'origine du phénotype clinique observé. **L'impact fonctionnel** a été étudié au niveau de la cellule (profil d'expression, immunomarquage des certains constituants des cils) ainsi qu'au niveau de l'embryogénèse en utilisant des morpholinos sur des zebrafish. Ensuite, nous avons voulu déterminer si ce gène était impliqué dans d'autres cas de DCP et si il pouvait avoir **un impact dans d'autres ciliopathies**, comme des défauts de latéralité.

L'objectif de la seconde étude était de **caractériser le phénotype clinique** des chiens atteints. Cette étude clinique s'est principalement axée sur l'atteinte respiratoire que présentaient ces chiens, mais également sur les défauts de latéralité et sur les anomalies spermatiques. Un second objectif était de confirmer les conséquences moléculaires de *CCDC39* au sein de la cellule ciliée chez le chien. Enfin, nous avons voulu déterminer **la fréquence de la mutation au sein de la population de bobtails** en testant des chiens originaires d'Europe mais aussi d'Amérique du Nord.

ETUDES

ETUDE 1 : Identification de CCDC39, un gène impliqué dans les DCP chez le bobtail et dans l'espèce humaine.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à un pedigree de chiens de race Bobtail, race dans laquelle ségrégeait une maladie présentant un phénotype clinique de DCP. Les chiens atteints présentaient depuis la naissance des symptômes respiratoires compatibles et certains étaient atteints de *situs inversus*. Le diagnostic final de DCP a pu être posé, grâce à l'identification en microscopie électronique d'anomalies ultrastructurelles primaires typiques de DCP : une absence des BDI et une désorganisation axonémale. L'analyse du pedigree de ces chiens faisait suspecter un mode de transmission autosomique récessif.

Afin d'identifier l'origine génétique de cette DCP, nous nous sommes basés sur une stratégie en deux étapes ; une étude d'association génome entier afin de cartographier la zone d'intérêt puis une approche par gène candidat. L'analyse d'association a été réalisée à l'aide de deux programmes développés par l'université de Liège, ASSHOM et ASSIST (Charlier *et al.*, 2008). Dans un premier temps, nous avons exploré l'hypothèse d'un mode de transmission autosomique récessif. Selon cette hypothèse, les individus atteints devraient être tous homozygotes pour un même haplotype, alors que les individus sains devraient soit être hétérozygotes, soit homozygotes pour l'allèle sauvage. Afin de localiser les loci correspondant à la maladie, nous avons utilisé les programmes ASSHOM et ASSIST reposant sur le principe de cartographie par homozygotie et par autozygotie. Nous avons obtenu, pour ces 2 programmes, un signal unique significatif ($p < 0.002$ pour 1000 permutations) sur le chromosome 34.

La région homozygote identifiée était malheureusement très étendue et comprenait plus de 150 gènes. Afin de réduire le nombre de candidats potentiels, nous avons sélectionné les gènes présents dans les bases de données relatives aux cils, ce qui a permis de réduire le nombre de gènes candidats de 151 à 10. Les parties codantes et les jonctions intron-exon de ces candidats ont ensuite été séquencées par une méthode classique (Sanger). Une mutation non-sens a été identifiée dans le troisième exon de *CCDC39*, un gène comprenant 20 exons. Cette mutation était à l'état homozygote chez tous les individus malades et suivait le pattern de ségrégation adéquat au sein du pedigree de bobtails.

Plusieurs éléments plaidaient en faveur de cette mutation comme étant la cause de la DCP. Tout d'abord, les DCP étant une maladie rare, on ne s'attend pas à retrouver le variant responsable de la maladie dans une population contrôle. Le séquençage d'une population de 80 chiens issus de 9

racés différentes, n'a pas permis d'identifier une seule fois cette mutation. Deuxièmement, le séquençage de l'ARNm des cellules trachéales d'un chien porteur a permis de mettre en évidence un phénomène de dégradation des ARNm non-sens, un mécanisme spécial de contrôle qualité de la cellule qui vise à éliminer les ARNm anormaux. De plus, l'expression de *CCDC39*, détectée par hybridation in situ chez la souris à différents stades de développement, mais aussi par qRT-PCR dans des tissus humains d'adultes, était localisée préférentiellement au sein de tissus contenant des cils mobiles (voies respiratoires, ependymes, etc...). Enfin, pour confirmer définitivement que *CCDC39* joue un rôle important dans la mobilité ciliaire, nous avons supprimé son expression à l'aide de morpholinos dans des embryons de zebrafish. L'injection provoquait l'apparition de défauts de latéralité, dose-dépendants. Ce phénotype était bien spécifique puisqu'il disparaissait lorsque les embryons étaient co-injectés avec ARNm sauvage.

L'étape suivante était de déterminer si ce gène pouvait jouer un rôle dans des cas de DCP humaines. Nous avons sélectionné 53 patients humains issus de 50 familles différentes présentant les mêmes anomalies ciliaires que celles observées chez le bobtail. Les 20 exons ainsi que les jonctions intron-exon ont été séquencés chez tous ces patients. Ce séquençage a permis d'identifier 14 mutations associées à une perte de fonction dans 19 familles. Le mode de transmission des mutations était compatible avec un mode autosomique récessif. Quinze patients présentaient une mutation à l'état homozygote tandis que cinq étaient des hétérozygotes composites. Une quinzième mutation a été identifiée par la suite, chez un des deux patients qui ne présentaient initialement qu'une seule mutation. Celle-ci se caractérise par une insertion d'une centaine de paires de bases, secondaire à l'activation d'un pseudo-exon. La plupart de ces mutations étaient privées, mais certaines étaient partagées par plusieurs familles. Nous avons pu démontrer un effet fondateur pour trois d'entre elles, en génotypant 10 microsatellites qui flanquaient la région.

Nous avons voulu ensuite déterminer si des mutations de *CCDC39* pouvaient être à l'origine de DCP avec un phénotype ultrastructurel différent ou à l'origine de défauts de latéralité chez des patients ne présentant pas de symptômes respiratoires. Une fois de plus nous nous sommes intéressés aux portions codantes en utilisant une technique de séquençage massif en parallèle. A l'opposé des cas précédents, aucune mutation non-sens, du site d'épissage ou du cadre de lecture n'a été identifiée chez les 24 patients DCP ou les 216 patients hétérotaxiques.

Afin de mieux comprendre la fonction de *CCDC39* et l'impact de sa dysfonction sur la structure ciliaire, nous avons analysé son expression au niveau protéique. Un western blot réalisé sur des cellules épithéliales respiratoires a permis de mettre en évidence une bande de la taille attendue

chez un individu sain mais pas chez un individu déficient pour *CCDC39*. En utilisant des techniques d'immunofluorescence haute résolution, nous avons pu démontrer que *CCDC39* se localisait principalement au niveau de l'axonème ciliaire chez l'individu sain mais pas chez l'individu atteint. Afin de caractériser l'impact d'une déficience de *CCDC39*, nous avons étudié les autres composants de l'axonème ciliaire en utilisant des anticorps dirigés spécifiquement sur des sous-unités des BDE, BDI et du N-DRC. Nous avons ainsi pu démontrer que les sous unités des BDE n'étaient pas affectées par une déficience de *CCDC39*. Par contre, un composant des BDI, DNALI1, était complètement absent et GAS8, un composant du N-DRC, était anormalement localisé dans le cytoplasme des cellules mutées.

Enfin, nous avons étudié l'impact d'une déficience en *CCDC39* sur la fonction ciliaire. Les analyses en vidéomicroscopie haute résolution sur des cellules nasales obtenues par un frottis brosse chez un patient atteint ont permis d'identifier le pattern de battement ciliaire lié à une déficience en *CCDC39*. Celui-ci se caractérise par une amplitude réduite, avec des axonèmes rigides qui présentent des petits mouvements rapides, tremblotants. Ce pattern est différent de celui observé dans les atteintes de BDE qui se caractérise par des cils paralysés.

En conclusion, cette étude a donc permis d'identifier *CCDC39*, une protéine axonémale dont l'absence est responsable d'une atteinte des BDI et d'une désorganisation axonémale liée à une atteinte du N-DRC et des crêtes radiales, mais aussi d'un battement dyskinétique.

Cette étude est le fruit d'une collaboration entre plusieurs centres de recherche. Le laboratoire de génomique animale de l'université de Liège a dirigé les travaux de recherche et a réalisé le clonage positionnel ainsi que le séquençage de tous les patients humains. L'équipe du Professeur Amselem de l'hôpital Armand Trousseau de Paris a fourni une partie des ADN des patients humains atteints de DCP et a caractérisé le défaut ultrastructurel dont souffraient ces patients. De plus, cette équipe a réalisé certaines des expérimentations (identification de la mutation p.Glu390SerfsX6, analyse des haplotypes, analyse de l'expression de *CCDC39* chez des patients humains). L'équipe du Professeur Omran de l'université Albert Ludwigs a posé le diagnostic de DCP de l'autre partie des patients humains atteints et fourni leurs ADN à notre laboratoire. Ils ont également apporté leurs pierres à l'édifice en réalisant les études d'hybridation *in situ* chez la souris, les études d'immunofluorescence et la vidéomicroscopie du battement ciliaire. Enfin, le Professeur Katsanis et Erica Davis ont réalisé les expérimentations chez le zebrafish et nous ont donné accès à l'ADN des patients hétérotaxiques.

CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs

Anne-Christine Merveille^{1,24}, Erica E Davis^{2,24}, Anita Becker-Heck^{3-5,24}, Marie Legendre^{6,24}, Israel Amirav^{7,8}, Géraldine Bataille¹, John Belmont⁹, Nicole Beydon¹⁰, Frédéric Billen¹¹, Annick Clément¹², Cécile Clercx¹¹, André Coste¹³, Rachelle Crosbie¹⁴, Jacques de Blic¹⁵, Stéphane Deleuze¹¹, Philippe Duquesnoy⁶, Denise Escalier⁶, Estelle Escudier⁶, Manfred Fliegeauf³, Judith Horvath³, Kent Hill¹⁴, Mark Jorissen¹⁶, Jocelyne Just¹⁷, Andreas Kispert¹⁸, Mark Lathrop¹⁹, Niki Tomas Loges^{3,5}, June K Marthin²⁰, Yukihide Momozawa¹, Guy Montantin⁶, Kim G Nielsen²¹, Heike Olbrich^{3,6}, Jean-François Papon^{6,13}, Isabelle Rayet²⁰, Gilles Roger²², Miriam Schmidts³, Henrique Tenreiro⁶, Jeffrey A Towbin⁹, Diana Zelenika¹⁹, Hanswalter Zentgraf²³, Michel Georges¹, Anne-Sophie Lequarré^{1,25}, Nicholas Katsanis^{2,25}, Heymut Omran^{3,5,25} & Serge Amselem^{6,25}

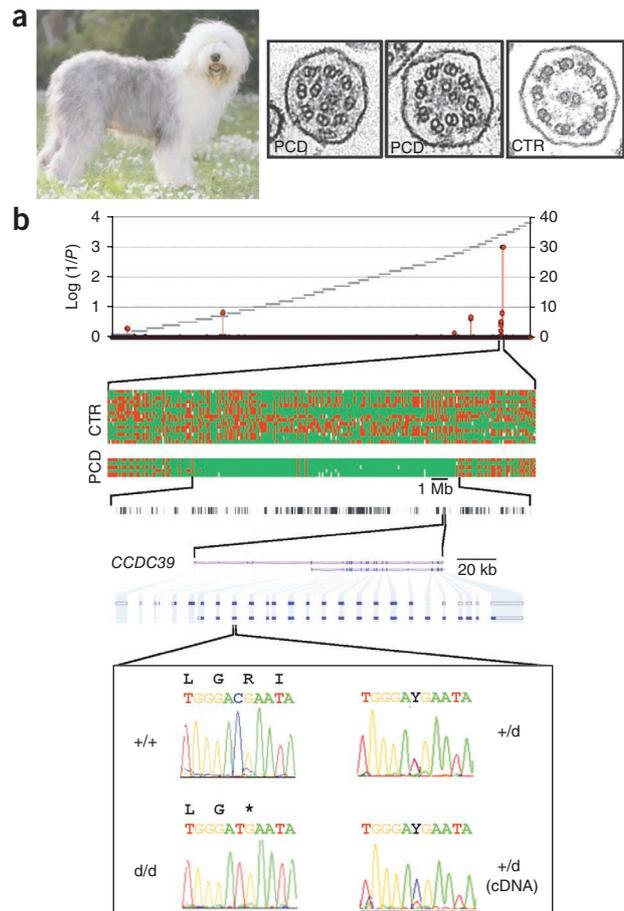
Primary ciliary dyskinesia (PCD) is an inherited disorder characterized by recurrent infections of the upper and lower respiratory tract, reduced fertility in males and *situs inversus* in about 50% of affected individuals (Kartagener syndrome). It is caused by motility defects in the respiratory cilia that are responsible for airway clearance, the flagella that propel sperm cells and the nodal monocilia that determine left-right asymmetry¹. Recessive mutations that cause PCD have been identified in genes encoding components of the outer dynein arms, radial spokes and cytoplasmic pre-assembly factors of axonemal dyneins, but these mutations account for only about 50% of cases of PCD. We exploited the unique properties of dog populations to positionally clone a new PCD gene, *CCDC39*. We found that loss-of-function mutations in the human ortholog underlie a substantial fraction of PCD cases with axonemal disorganization and abnormal ciliary beating. Functional analyses indicated that *CCDC39* localizes to ciliary axonemes and is essential for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex.

Between December 2006 and November 2007, we examined five Old English Sheepdogs (Bobtails aged 8–15 months and 3 littermates) suffering from chronic airway inflammation. Radiography revealed *situs inversus* in one, which suggested PCD². This was confirmed by identifying ciliary defects in nasal and tracheal biopsies and in respiratory epithelial cell cultures using transmission electron microscopy (TEM). We noted absent or eccentric central pairs, occasional displacement of outer doublets, reductions in the mean number of inner dynein arms, and abnormal radial spokes and nexin links (Fig. 1a), reminiscent of an earlier report of PCD in Bobtails³. Pedigree analysis indicated that the parents of the five probands traced back to the same female champion. Interviews with breeders and veterinarians led to the identification of ten additional Bobtail litters with PCD. All parents were descended from the same founder female. For litters with complete records, parents were reported healthy, the proportion of affected offspring was 21 out of 65 (32%) and the male:female ratio among cases was 9:14, which suggests autosomal recessive inheritance (Supplementary Fig. 1). *Situs inversus* was confirmed in three out

¹Unit of Animal Genomics, Groupe Interdisciplinaire de Genomique Appliquee-Recherche (GIGA-R) and Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège (B34), Liège, Belgium. ²Center for Human Disease Modeling, Department of Cell Biology, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA. ³Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, University Hospital Freiburg, Freiburg, Germany. ⁴Faculty of Biology, Albert-Ludwigs-University, Freiburg, Germany. ⁵Department of General Pediatrics, University Children's Hospital Münster, Münster, Germany. ⁶Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U.933, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6 and Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Armand-Trousseau, Paris, France. ⁷Department of Pediatrics, Ziv Medical Center, Safed, Israel. ⁸Rapaport Faculty of Medicine, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel. ⁹Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA. ¹⁰AP-HP, Hôpital Armand-Trousseau, Service d'explorations fonctionnelles respiratoires, Paris, France. ¹¹Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Belgium. ¹²AP-HP, Hôpital Armand-Trousseau, Unité de pneumologie pédiatrique, Centre de Référence des Maladies Respiratoires Rares, Paris, France. ¹³AP-HP, Hôpital Intercommunal et Groupe Hospitalier Henri Mondor-Albert Chenevier, Service d'ORL et de chirurgie cervico-faciale, Créteil, France. ¹⁴Department of Microbiology, Immunology and Molecular Genetics, University of California, Los Angeles, California, USA. ¹⁵AP-HP, Groupe Hospitalier Necker-Enfants Malades, Service de pneumologie et d'allergologie pédiatriques, Paris, France. ¹⁶Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium. ¹⁷AP-HP, Hôpital Armand-Trousseau, Centre d'investigation de l'asthme et des allergies, Paris, France. ¹⁸Institut für Molekularbiologie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Germany. ¹⁹Centre National de Génotypage, Evry, France. ²⁰Hôpital Nord, Service de réanimation pédiatrique, Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France. ²¹Copenhagen University Hospital, Rigshospitalet, Danish Primary Ciliary Dyskinesia Center, Pediatric Pulmonary Service, Copenhagen, Denmark. ²²AP-HP, Hôpital Armand-Trousseau, Service d'ORL et de chirurgie cervico-faciale pédiatrique, Paris, France. ²³Department of Tumor Virology, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany. ²⁴These authors contributed equally to this work. ²⁵These authors jointly supervised this work. Correspondence should be addressed to M.G. (michel.georges@ulg.ac.be).

Received 4 June; accepted 10 November; published online 5 December 2010; doi:10.1038/ng.726

Figure 1 Positional identification of *CCDC39* as the gene that underlies PCD in Bobtails. (a) Old English Sheepdog (Bobtail). Representative TEM images of disorganized cilia identified in nasal mucosal biopsies of cases (PCD) and normal cilia from a healthy dog (CTR). (b) Positional identification of the p.Arg96X alteration in *CCDC39*. Homozygosity mapping identified a genome-wide significant signal on chromosome CFA34, corresponding to a 15-Mb segment shared homozygously-by-descent by 5 affected animals and encompassing 151 annotated protein-coding genes, of which 10 were included in the ciliome or cilia proteome database (or both). Sequencing *CCDC39* in affected individuals revealed a C>T transition in the third exon of the main isoform, creating a stop codon that causes nonsense-mediated RNA decay. d, disease.



of nine cases examined. A spermogram conducted on one affected male revealed oligoasthenospermia. The midpiece was narrowed in around one-third of sperm cells and the flagellum was shortened in around one-fifth.

We genotyped 5 cases and 15 controls with the Affymetrix v2 Canine array. We found a 15-Mb segment of autozygosity on chromosome 34 that was shared by all cases (genome-wide $P < 0.001$; **Fig. 1b**). The shared region contained 151 genes. We mined the ciliary proteome⁴ and ciliome⁵ databases and identified ten proteins that had been discovered in at least two independent genomic or proteomic studies of cilia enrichment. We sequenced the coding exons and intron-exon boundaries of six of these candidates in cases and controls and identified a stop codon (p.Arg96X) in *CCDC39* (Gene ID: 488089) in the affected dogs that was predicted to truncate 90% of the 976-amino acid *CCDC39* protein (**Fig. 1b**). All of 10 additional cases were homozygous for the p.Arg96X alteration, all of 10 obligate carriers were heterozygous for it and 8 of 102 randomly sampled healthy Bobtails were heterozygous for it; we did not find the alteration in 80 healthy animals from 9 other breeds. We sequenced *CCDC39* RT-PCR products from the tracheal RNA of a carrier and found a mutant to wildtype allelic ratio of about 0.25, compatible with nonsense-mediated RNA decay of transcripts containing the p.Arg96X alteration (**Fig. 1b**).

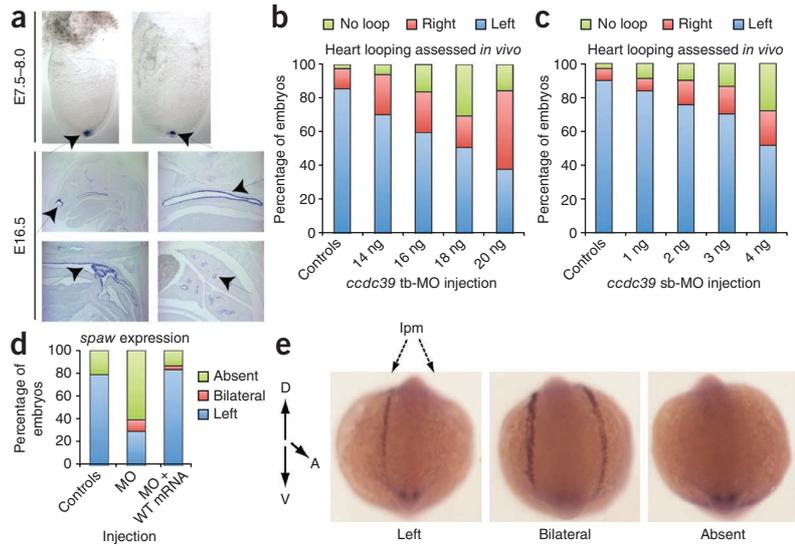
FAP59, the *Chlamydomonas* ortholog of *CCDC39*, was predicted to be essential for motile ciliary function, as orthologs do not occur in nonciliated organisms ('CiliaCut') or in *Caenorhabditis elegans* ('MotileCut')⁶. *FAP59* was also among the top 50 of the 650 proteins that were detected by mass spectrometry in purified flagella of *Chlamydomonas*, consistent with ciliary localization⁷. Mouse *Ccdc39* was predicted to be present in cilia because *Ccdc39* is strongly expressed in tissues rich in ciliated cells; *Ccdc39* was also shown by *in situ* hybridization to be expressed in olfactory and vomeronasal sensory neurons and the respiratory epithelium⁸. To extend these findings, we performed *in situ* hybridization at different stages of mouse development and identified specific expression of *Ccdc39* in node cells carrying motile cilia, in upper and lower airways, and in ependymal and choroid plexus cells, consistent with *Ccdc39* having a functional role in motile cilia (**Fig. 2a**). In tissue from adult humans, quantitative RT-PCR (qRT-PCR) showed predominant expression of *CCDC39* in nasal brushings and, to a lesser extent, in lungs and testes. However, this expression was systematically lower than that of other PCD genes (expression of *DNAI1* > *DNAI2* > *LRR50* ≈ *C14orf104* (also called *KTU*) > *CCDC39*; **Supplementary Fig. 2a,b**).

To provide further support for the role of *CCDC39* in ciliary motility, we used morpholino-based suppression of *ccdc39* in zebrafish embryos. Using reciprocal BLAST, we identified the only *Danio rerio* ortholog of *CCDC39* (LOC555319; 53% identity and 73% similarity). We amplified this transcript readily from embryonic complementary DNA (cDNA) as early as the shield stage (data not shown).

Injection of either a translation-blocking or a splice-blocking morpholino at the two-cell stage caused a dose-dependent increase in heart-looping defects at 36 hours post-fertilization (rightward or absent looping; **Fig. 2b,c** and **Supplementary Fig. 3**) and bilateral or lack of *spaw* expression at the left lateral plate mesoderm in 14 somite embryos (**Fig. 2d,e**). These phenotypes were likely specific, as they were reproduced at similar frequencies by both morpholinos and were rescued by co-injection with wildtype human *CCDC39* mRNA (**Fig. 2d**). These findings recapitulate laterality defects seen in other PCD morphants (for example, *C14orf104*, also known as *ktu*, and *lrrc50*)^{9,10}, consistent with compromised fluid flow at the Kupffer's vesicle due to impaired ciliary motility.

These findings prompted us to screen for mutations in unresolved human PCD cases (**Supplementary Note**). We sequenced the 20 coding exons and intron-exon boundaries of human *CCDC39* (Gene ID: 339829) in 53 cases (from 50 families) with axonemal defects reminiscent of those observed in Bobtails, that is, the absence of inner dynein arms in all examined cilia and coexistence of axonemes with various ultrastructural defects within the same section (**Fig. 3a** and **Supplementary Fig. 4**). This group accounts for 5–15% of PCD cases¹¹. We detected 14 unambiguous loss-of-function mutations in 19 of the 50 families (38%): four nonsense mutations, six frameshifts leading to premature stop codons and four splice-site variants (located within 3 bp of an intron-exon boundary) (**Fig. 3b** and **Table 1**). Notably, no nonsense or frameshift mutations in *CCDC39* were reported in the latest 1000 Genomes Project data release (see URLs) for 60 sequenced individuals. Transmission of mutations was consistent with autosomal recessive inheritance (**Table 1** and **Supplementary Fig. 5**). Fifteen cases

Figure 2 Expression and functional studies in mouse and zebrafish. (a) Whole-mount *in situ* hybridization analysis of mouse *Ccdc39* in mouse embryos. *Ccdc39* expression is restricted to the node in embryos at embryonic day (E) 7.75–8.0 (arrowheads). In E16.5 mouse embryonic sections, *Ccdc39* (arrowheads) is expressed in ciliated cells of the upper and lower airways. (b) Dose-response curve of *ccdc39* translation-blocking morpholino (tb-MO). Wildtype zebrafish embryos were injected with increasing concentrations of tb-MO and were scored live at 36 h post fertilization for heart looping (left, right, no loop). (c) Dose-response curve of *ccdc39* splice-blocking MO. Scoring was conducted as in b. (d) Quantification of *spaw* staining in embryo batches injected with 4 ng *ccdc39* morpholino or 4 ng *ccdc39* morpholino plus 25 pg wildtype (WT) human *CCDC39* mRNA ($n = 24\text{--}30$ embryos per injection). (e) Representative *spaw* RNA *in situ* staining in 14 somite-stage embryos. In wildtype embryos, *spaw* is expressed in the left lateral plate mesoderm (lpm; left); however, *ccdc39* morphant embryos showed bilateral (center) or, in most cases, undetectable *spaw* expression (right).



(ten of whom were consanguineous) were homozygous and five were compound heterozygous. Two cases carried only one pathogenic allele (DCP580 and DCP481). Nasal epithelial cells were available for DCP580, allowing us to investigate the integrity of the *CCDC39*

mRNA by RT-PCR. One primer pair yielded a unique 537-bp amplicon in control subjects as well as an additional 644-bp product in DCP580 because of a 116-bp insertion between exons 9 and 10. Sequencing of the corresponding genomic region showed that this insertion resulted

Figure 3 Ultrastructural and mutational analysis of human PCD cases with axonemal disorganization. (a) Electron microscopy of respiratory cilia from an individual (DCP85) who is homozygous for the *CCDC39* mutation resulting in the p.Glu731AsnfsX31 alteration. It shows the absence of inner dynein arms in all ciliary sections, associated with a range of other, heterogeneous defects: isolated absence of the nine inner dynein arms (1), axonemal disorganization with mislocalized peripheral doublet associated with either a displacement of the central pair (2), an absence of the central pair (3), or supernumerary central pairs (4). Magnification of the axoneme from a normal cilium is shown in the upper right panel with presence of inner dynein arms (black arrow), nexin links (white arrow) and radial spokes (short arrow). The axonemal disorganization found in cases is associated with defects of inner dynein arms (black flash), nexin links (white flash) and radial spokes (star) that are better seen after magnification (lower right panel). Scale bar, 0.2 μm . (b) Unambiguous disease-causing *CCDC39* mutations detected in PCD cases with axonemal disorganization. Exonic organization of the human *CCDC39* cDNA (top) and domain organization model of the corresponding protein (bottom). The 20 coding exons are indicated by empty or hashed boxes, depicting translated or untranslated sequences, respectively. 'SMC_N' and 'SMC_Prok_B' refer to domains homologous to the N terminus of SMC (structural maintenance of chromosomes) proteins and to the common bacterial type SMC protein, respectively. The predicted coiled-coil domains of the protein are indicated by green rectangles. The canine p.Arg96X alteration is shown in green. The splice mutation leading to the inclusion of pseudo-exon 9 is underlined.

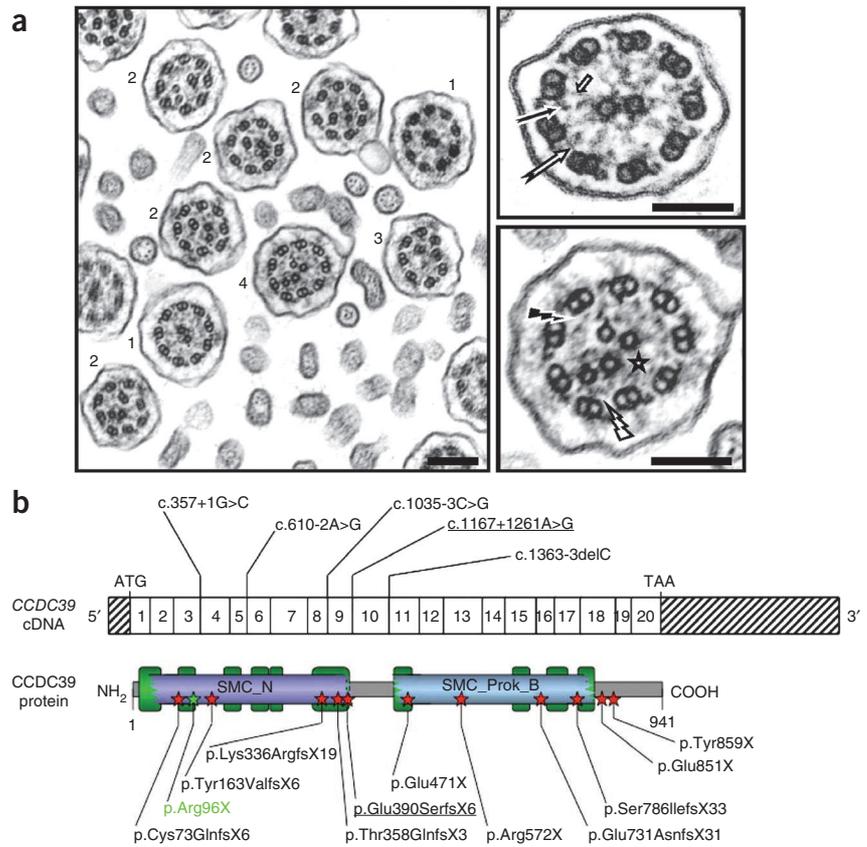


Table 1 *CCDC39* mutations in PCD cases with axonemal disorganization

Subject	Origin	Sex	Consanguineous	Laterality defects	Sperm defects	Alteration and mutation 1	Alteration and mutation 2
DCP85 ^a	Algeria	F	Y	–	–	p.Glu731AsnfsX31 c.2190delA	p.Glu731AsnfsX31 c.2190delA
DCP91 ^a	Unknown	F	Y	–	–	p.Glu731AsnfsX31^c c.2190delA	p.Glu731AsnfsX31 c.2190delA
DCP413 ^a	Northern Africa	M	Y	Kartagener	NA	p.Glu731AsnfsX31	p.Glu731AsnfsX31
DCP414 ^a		M	Y	Kartagener	NA	c.2190delA	c.2190delA
DCP532	Tunisia	M	N	Kartagener	NA	p.Glu731AsnfsX31 c.2190delA	p.Glu731AsnfsX31 c.2190delA
DCP554	Algeria	M	N	–	OAS	p.Thr358GlnfsX3 c.1072delA	p.Thr358GlnfsX3 c.1072delA
DCP384	Unknown	F	Y	–	–	p.Thr358GlnfsX3 c.1072delA	p.Thr358GlnfsX3 c.1072delA
OP122 ^b	Germany	M	N	Ivemark	OAS	p.Thr358GlnfsX3 c.1072delA	p.Lys336ArgfsX19 c.1007-1010delAGAA
DCP552 ^a	Turkey	M	N	Kartagener	NA	c.357+1G>C	c.357+1G>C
DCP553 ^a		M	N	Ivemark	NA		
DCP274 ^b	France	M	N	Kartagener	NA	c.357+1G>C	c.610-2A>G
OP736 II1 ^b	Denmark	F	N	–	–	c.357+1G>C	p.Glu851X
OP736 II2 ^b		M	N	–	–		c.2551G>T
DCP158 ^a	France	M	N	–	NA	c.357+1G>C	p.Ser786IlefsX33 c.2357_2359delinsT
DCP580 ^b	West Indies/Senegal	M	N	Kartagener	OAS	p.Ser786IlefsX33 c.2357_2359delinsT	p.Glu390SerfsX6 c.1167+1261A>G
DCP533	Tunisia	F	Y	Heterotaxia	–	p.Tyr859X c.2577C>A	p.Tyr859X c.2577C>A
DCP528 ^a	Egypt	F	Y	Kartagener	–	p.Cys73GlnfsX6 c.216_217delTT	p.Cys73GlnfsX6 c.216_217delTT
DCP323	Unknown	F	N	Kartagener	–	c.1035-3C>G	c.1035-3C>G
DCP181 ^a	Algeria	F	Y	–	–	p.Arg572X c.1714C>T	p.Arg572X c.1714C>T
OP18 II1 ^a	Turkey	F	Y	Kartagener	–	p.Tyr163ValfsX6 c.485-486insA	p.Tyr163ValfsX6 c.485-486insA
O15 II1 ^a	Israel	F	Y	Kartagener	–	p.Glu471X c.1410G>T	p.Glu471X c.1410G>T
DCP481	Algeria	M	N	–	OAS	c.1363-3delC	Unknown

For subjects, DCPXXX, French cohort; OXXX, German cohort. Pairs of individuals in the same row are siblings. For sperm defects, OAS, oligoasthenospermia; NA, not analyzed. Founder mutations are shown in bold.

^aIndividuals for whom homozygosity (versus hemizygoty) could be confirmed by parental DNA analysis. ^bCompound heterozygotes for whom transconfiguration could be confirmed either by parental DNA analysis or by sequencing of cloned PCR products. ^cp.Glu731AsnfsX31 is embedded in a distinct haplotype in DCP91 and is therefore assumed to be a recurrent event (see also Supplementary Fig. 7).

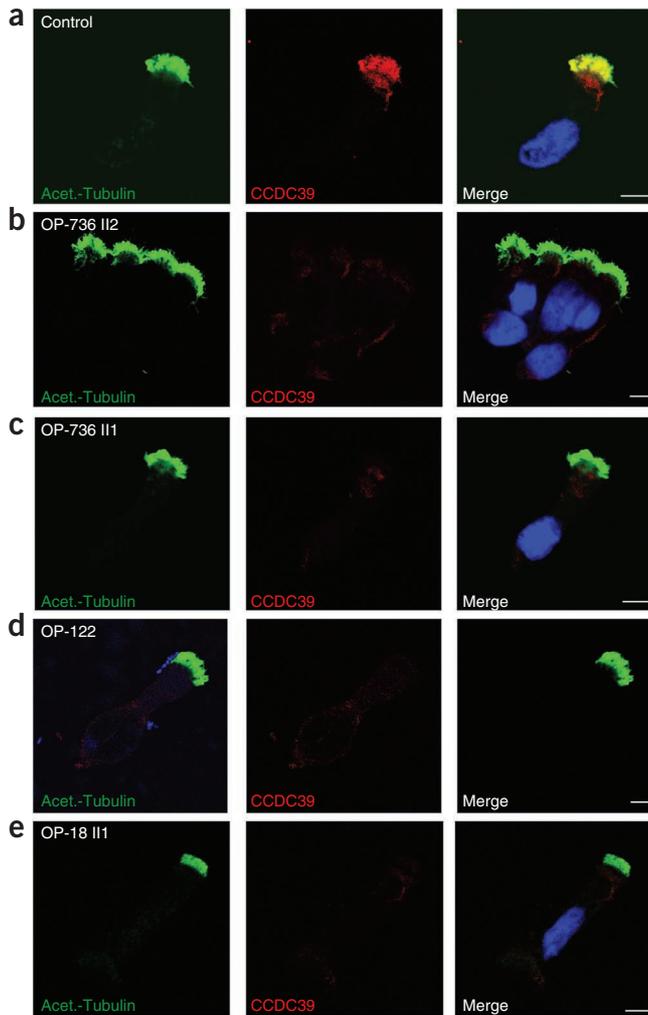


Figure 4 Subcellular localization of CCDC39 in respiratory epithelial cells from individuals with PCD carrying *CCDC39* mutations. Axoneme-specific antibodies against acetylated α -tubulin (green) were used as the control. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). (a) In respiratory epithelial cells from healthy probands, CCDC39 (red) localized predominantly along the entire length of the axonemes, as well as to the apical cytoplasm. (b–e) In respiratory epithelial cells from individuals OP-736 II2 (b), OP-736 II1 (c), OP-122 (d) and OP-18 II1 (e) carrying *CCDC39* loss-of-function mutations, CCDC39 was absent from the axoneme and markedly reduced in the apical cytoplasm. White scale bars, 5 μ m.

severe morbidity. Nine cases (41%) showed *situs solitus* and ten cases (45%) had *situs inversus*, whereas three cases (14%) had heterotaxia. Two of the cases with heterotaxia had documented polysplenia (Ivemark syndrome; MIM208530). This is consistent with previous reports that randomization of left-right asymmetry not only results in *situs solitus* or *situs inversus* but can also cause *situs ambiguus*, including Ivemark syndrome^{12,13}. Four affected males had oligoasthenospermia.

To determine whether *CCDC39* mutations underlie PCD with distinct ultrastructural defects or heterotaxia in the absence of respiratory symptoms, we used massive parallel sequencing to scan the 20 coding exons for mutations in 24 independent cases of PCD with absence of inner dynein arms only (6 cases) or absence of both inner and outer dynein arms (18 cases) without axonemal disorganization, and in 216 sporadic heterotaxia cases and 216 ethnically matched controls from the United States (Supplementary Note). We amplified 25 ~250-bp amplicons that spanned the 20 *CCDC39* exons from DNA pools of ~20 cases or controls, mixed and sequenced on a Roche FLX instrument. The sensitivity and specificity of a similar protocol have been estimated at 83% and 98%, respectively (Y.M. & M.G., unpublished data). Contrary to PCD cases with absence of inner dynein arms and axonemal disorganization, we detected no nonsense, frameshift or splice site variants in *CCDC39* in these cohorts.

To gain insights into *CCDC39* function, we analyzed its expression at the protein level. In protein blotting, antibodies to *CCDC39* recognized a band of the expected size (~110 kD) in extracts from respiratory epithelial cells of a control subject but not of a *CCDC39*-deficient individual (Supplementary Fig. 8). High-resolution immunofluorescence analysis of respiratory cells showed predominant axonemal staining in controls (in agreement with the mass spectrometry analyses of purified flagella of *Chlamydomonas*⁷) but not in cells containing mutations in *CCDC39* (Fig. 4).

We used immunofluorescence to characterize the effect of *CCDC39* deficiency on cilia structure. TEM analysis pointed toward defective inner dynein arms, nexin links and radial spokes but normal outer dynein arms (Fig. 3a). Because outer dynein arm complexes (ODA type 1 and type 2) vary along the length of ciliary axonemes and TEM cannot easily identify incomplete or regional outer dynein arm defects^{9,13}, we used antibodies to the outer dynein arm components DNAH5 (type 1 and 2), DNAI2 (type 1 and 2) and DNAH9 (type 2) in five *CCDC39*-deficient individuals. The localization of outer dynein arm components was normal in *CCDC39*-deficient cilia (shown for DNAH5; Fig. 5). We then analyzed inner dynein arm components using antibodies to DNALI1. DNALI1, which is normally found throughout respiratory axonemes, was completely absent from *CCDC39*-deficient cilia (Fig. 5). The nexin links correspond to the dynein regulatory complex (DRC)¹⁴. Using antibodies to GAS11 (also known as GAS8), the human ortholog of the trypanin or DRC4 subunit of the protist DRC^{15–18}, we found that GAS11 was localized along the whole axoneme in controls but was confined to the cytoplasm and ciliary base in *CCDC39*-deficient cilia (Fig. 5). qRT-PCR and protein blot analysis showed that the levels of GAS11 transcripts and protein were unaffected in individuals with PCD (Supplementary Fig. 9).

from activation of a pseudo-exon in intron 9 (designated ψ Exon9). The sequence 5' of ψ Exon9 matches a perfect acceptor splice site, and its 3' boundary contains a near-perfect splice donor site that is activated by an AT>GT transition involving nucleotide c.1167+1261 (Supplementary Fig. 6). This mutation (which, if translated, would lead to the frameshift alteration p.Glu390SerfsX6) was not found in any other case. A second loss-of-function mutation has not yet been identified for DCP481, but two previously unknown candidate variants are worth mentioning: a missense variation involving a highly conserved residue (p.Thr594Ile) and a putative branch site variant in intron 9 (c.1168-32A>G). We also detected two rare missense variations in the heterozygous state among the 31 remaining cases (p.Cys803Tyr and p.Thr182Ser), but their effect on *CCDC39* function is unknown.

Of the 15 unambiguous disease-causing mutations, 11 were private, whereas 4 were shared by several families not known to be related (Table 1). Genotyping of ten microsatellites that flank *CCDC39* and span ~9 Mb of the disease locus supports a founder effect for three of the mutations and/or alterations (p.Thr358GlnfsX3, p.Ser786IlefsX33 and c.357+1G>C). We found the p.Glu731AsnfsX31 alteration on a shared haplotype in three families, but on a distinct haplotype in the fourth family (DCP91), which suggests a recurrent event (Supplementary Fig. 7).

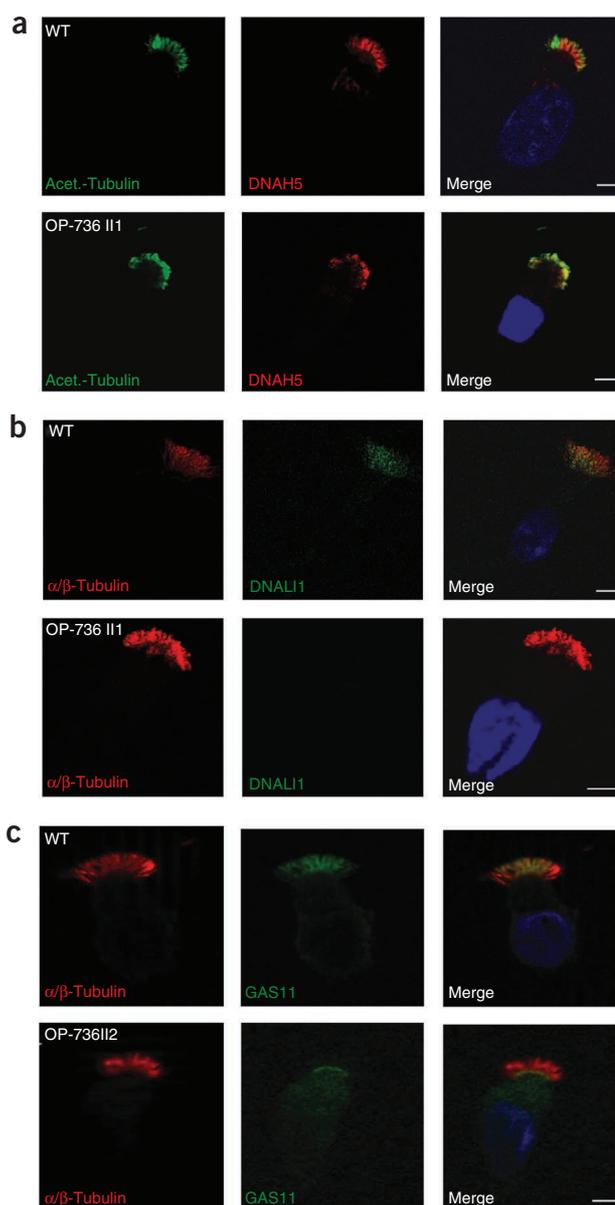
The PCD phenotype of individuals with recessive *CCDC39* mutations is characterized by chronic upper and lower airway infections that cause

Figure 5 Subcellular localization of DNAH5, DNALI1 and GAS11 in respiratory epithelial cells from individuals with PCD carrying *CCDC39* mutations. Immunofluorescence analyses of human respiratory epithelial cells using antibodies to the outer dynein arm heavy chain DNAH5 (a), the inner dynein arm component DNALI1 (b) and the DRC component GAS11 (c). Axoneme-specific antibodies to acetylated α -tubulin (a) or α/β -tubulin (b,c) were used as controls. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). The localization of DNAH5 (red) in respiratory epithelial cells from case OP-736 II1 was unchanged (a). DNALI1 (green) localized along the entire length of the axonemes of respiratory epithelial cells from healthy probands (b). In epithelial cells from case OP-736 II1, DNALI1 (green) was absent from the ciliary axonemes (b). In respiratory epithelial cells from healthy probands, GAS11 (green) localizes along the entire length of the axonemes (c). In respiratory epithelial cells from case OP-736 II1, GAS11 (green) was targeted to the ciliary base, where it accumulated (c). White scale bars, 5 μ m.

We investigated the effect of *CCDC39* deficiency on ciliary function. Optic microscopy on nasal or bronchial biopsies showed ciliary immotility in 17 of 22 cases with *CCDC39* mutations and residual dyskinetic motility in the other 5 cases (DCP414, DCP323, DCP481, DCP552 and OP122). High-speed videomicroscopy analyses of respiratory cells obtained by nasal brushing biopsy (OP122) identified a beating pattern characterized by reduced amplitude with rigid axonemes that showed fast, flickery movements, which suggests defective beat regulation (Supplementary Videos 1 and 2). This pattern differs from that imparted by PCD variants (*DNAH5*, *DNAI1*, *DNAI2*, *LRRCS50* and *C14orf104* (*KTU*)) that cause defects in the dynein arms and enable beat generation. In these cases, the cilia appear paralyzed but not rigid.

In summary, we have shown that *CCDC39* is an axonemal protein whose absence results in failure to correctly assemble DNALI1-containing inner dynein arm complexes, the DRC and the radial spokes, thereby causing axonemal disorganization and dyskinetic beating. Loss-of-function mutations in *CCDC40*, which encodes another axonemal protein with coiled-coil domains, cause PCD with identical ultrastructural and biochemical defects (including ciliary depletion of *CCDC39* and *GAS11*)¹⁹. Both *CCDC39* and *CCDC40* may be integral components of the DRC, whose precise composition remains to be defined¹⁴. Mutations in the *Chlamydomonas* *PF2* gene (which encodes the coiled-coil domain-containing DRC4 component) also cause structural defects of both the DRC and inner dynein arms, with failure to assemble DRC components 3–7 (refs. 20–22). Therefore, as was proposed for *PF2*, *CCDC39* could encode a protein that contributes to the stability of the DRC by interacting with one or several DRC subunits¹⁸. Alternatively, *CCDC39* could participate in the transport of the inner dynein arms and DRC. Although the intraflagellar transport mechanism for components located at the interior of the axonemal shaft remains poorly understood, studies in *Chlamydomonas* have shown that components of the axonemal matrix are required for positioning inner axonemal components but not the outer dynein arms²³. *CCDC39*, mutations of which affect the internal part of the axoneme with no apparent deleterious effect on outer dynein arms, could therefore be involved in this process. In support of this, several ciliary and centrosomal proteins involved in intraflagellar transport contain SMC-like domains, as does *CCDC39* (Fig. 3b). As previously suggested²⁴, SMC-like domains might represent signature sequences that are recognized during these transport processes.

We have also shown that dogs are useful for accelerating the identification of genes in which mutations cause inherited diseases in humans. Diseases that are characterized by locus heterogeneity in humans will almost always involve a single founder mutation in a



given dog breed, which facilitates mapping. The highly inbred structure of the domestic dog population, combined with increasingly attentive medical care, has resulted in a long list of breed-specific inherited conditions that advantageously complements phenotype-driven screens in model organisms, including mice. Our results provide useful information for the counseling of previously orphan PCD families and open possibilities for the study of new PCD therapies in the dog model.

URLs. 1000 Genomes Project, <http://www.1000genomes.org/>.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/naturegenetics/>.

Accession codes. All accession codes are available in GenBank under the following accession codes: dog *CCDC39* cDNA, XM_545213.2; human *CCDC39* cDNA, NM_181426.1; mouse *Ccdc39* cDNA, NM_026222.2; and zebrafish *ccdc39* cDNA, XM_677617.4.

Note: Supplementary information is available on the Nature Genetics website.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the European Union (LUPA IP) and from the Police Scientifique Fédérale de Belgique (GENFUNC PAI) (to M.G.), from the Legs Poix from the Chancellerie des Universités, the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (PHRC AOM06053, P060245) and the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-05-MRAR-022-01) (to S.A.), the US National Institutes of Health (HD04260, DK072301 and DK075972 (to N.K.) and DK079541 (to E.E.D.)) and by grants from the “Deutsche Forschungsgemeinschaft” DFG Om 6/4, GRK1104, SFB592, and the European Community (EU-CILIA; SYS-CILIA) (to H.O.). A.C.M. is a fellow from the FRIA. N.K. is the Jean and George W. Brumley Professor. Y.M. benefits from a postdoctoral fellowship to study abroad from the Japanese Society for the Promotion of Science (JSPS). We thank the Bobtail breeders for assistance; patients and their family members whose cooperation made this study possible; all referring physicians; the German patient support group “Kartagener Syndrom und Primaere Ciliaere Dyskinesie e.V.”; K. Nakamura and the GIGA-R genomics platform for their contribution to sequencing; E. Ostrander for samples from healthy Old English Sheepdogs; the Unité de Recherche Clinique (URC) Est (AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France) for support; and A. Heer, C. Reinhard, C. Kopp, K. Sutter, M. Petry, C. Tessmer, A.-M. Vojtek and S. Franz for technical assistance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The positional cloning of *CCDC39* in the dog was performed by A.-C.M. and G.B. Genome-wide SNP genotyping was conducted at CNG under supervision of M. Lathrop and D.Z. Mining the ciliome databases was conducted by E.E.D. Experiments in the zebrafish were conducted by E.E.D. *In situ* hybridization in the mouse was conducted by A.K. and H.O. qRT-PCR on human samples was conducted by M. Legendre, P.D., G.M. and H.T. Sequencing of *CCDC39* in human subjects, including high-throughput sequencing, was conducted by A.-C.M., G.B., Y.M., A.B.-H., M. Legendre, E.E., P.D., G.M. and H.T. Identifying the p.Glu390SerfsX6 mutation was realized by M. Legendre, P.D., G.M. and H.T. Haplotype analysis to determine founder status of *CCDC39* mutations was conducted by M. Legendre and P.D. TEM analysis was conducted by M.J. (dog), E.E. and D.E. (French cohort), and by K.G.N., J.K.M., H.O. and routine laboratories (German cohort). High-resolution immunofluorescence analyses were done by A.B.-H., M.F., J.H. and N.T.L. Immunoblotting analyses were done by A.B.-H. High-speed video analyses were conducted by H.O., N.T.L. and A.B.-H. Monoclonal anti-GAS11 antibody was produced by A.B.-H. and H.Z. Polyclonal anti-GAS11 antibodies were provided by K.H. and R.C. Clinical examination and collection of the canine PCD cases was conducted by F.B., C.C. and S.D. M.G., A.-S.L., N.K., H.O. and S.A. designed experiments, analyzed data and wrote the manuscript. All remaining authors as well as H.O., K.G.N. and J.K.M. examined and contributed samples from individuals with PCD or heterotaxia.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/naturegenetics/>.

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>.

- Zariwala, M.A. *et al.* Genetic defects in ciliary structure and function. *Annu. Rev. Physiol.* **69**, 423–450 (2007).
- Cavrenne, R. *et al.* Primary ciliary dyskinesia and *situs inversus* in a young dog. *Vet. Rec.* **163**, 54–55 (2008).
- Randolph, J.F. & Castleman, W.L. Immotile cilia syndrome in two Old-English sheep dog littermates. *J. Small Anim. Pract.* **25**, 679–686 (1984).
- Gherman, A. *et al.* The ciliary proteome database: an integrated community resource for the genetic and functional dissection of cilia. *Nat. Genet.* **38**, 961–962 (2006).
- Inglis, P.N. *et al.* Piecing together a ciliome. *Trends Genet.* **22**, 491–500 (2006).
- Merchant, S.S. *et al.* The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* **318**, 245–250 (2007).
- Pazour, G.J. *et al.* Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *J. Cell Biol.* **170**, 103–113 (2005).
- McClintock, T.S. *et al.* Tissue expression patterns identify mouse cilia genes. *Physiol. Genomics* **32**, 198–206 (2008).
- Omran, H. *et al.* Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature* **456**, 611–616 (2008).
- Baker, K. *et al.* Direct and indirect roles for Nodal signaling in two axis conversions during asymmetric morphogenesis of the zebrafish heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 13924–13929 (2008).
- Papon, J.F. *et al.* A 20-year experience of electron microscopy in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur. Respir. J.* **35**, 1057–1063 (2010).
- Kennedy, M.P. *et al.* Congenital heart disease and other heterotaxic defects in a large cohort of patients with primary ciliary dyskinesia. *Circulation* **115**, 2814–2821 (2007).
- Fliegau, M. *et al.* Mislocalization of DNAH5 and DNAH9 in respiratory cells from patients with primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **171**, 1343–1349 (2005).
- Heuser, T. *et al.* The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella. *J. Cell Biol.* **187**, 921–933 (2009).
- Colantonio, J.R. *et al.* The dynein regulatory complex is required for ciliary motility and otolith biogenesis in the inner ear. *Nature* **457**, 205–209 (2009).
- Hill, K.L. *et al.* T lymphocyte-triggering factor of African trypanosomes is associated with the flagellar fraction of the cytoskeleton and represents a new family of proteins that are present in several divergent eukaryotes. *J. Biol. Chem.* **275**, 39369–39378 (2000).
- Ralston, K.S. *et al.* Flagellar motility contributes to cytokinesis in *Trypanosoma brucei* and is modulated by an evolutionarily conserved dynein regulatory system. *Eukaryot. Cell* **5**, 696–711 (2006).
- Rupp, G. & Porter, M.E. A subunit of the dynein regulatory complex in *Chlamydomonas* is a homologue of a growth arrest-specific gene product. *J. Cell Biol.* **162**, 47–57 (2003).
- Becker-Heck, A. *et al.* The coiled-coil domain containing protein CCDC40 is essential for motile cilia function and left-right axis formation. *Nat. Genet.* published online, doi: 10.1038/ng.727 (5 December 2010).
- Huang, B., Ramanis, Z. & Luck, D.J. Suppressor mutations in *Chlamydomonas* reveal a regulatory mechanism for flagellar function. *Cell* **28**, 115–124 (1982).
- Piperno, G., Mead, K. & Shestak, W. The inner dynein arms I2 interact with a “dynein regulatory complex” in *Chlamydomonas* flagella. *J. Cell Biol.* **118**, 1455–1463 (1992).
- Piperno, G., Mead, K., LeDizet, M. & Moscatelli, A. Mutations in the “dynein regulatory complex” alter the ATP-insensitive binding sites for inner arm dyneins in *Chlamydomonas* axonemes. *J. Cell Biol.* **125**, 1109–1117 (1994).
- Piperno, G., Mead, K. & Henderson, S. Inner dynein arms but not outer dynein arms require the activity of kinesin homologue protein KHP1 (FLA10) to reach the distal part of flagella in *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* **133**, 371–379 (1996).
- Chang, B. *et al.* In-frame deletion in a novel centrosomal/ciliary protein CEP290/NPHP6 perturbs its interaction with RPGR and results in early-onset retinal degeneration in the rd16 mouse. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1847–1857 (2006).

ONLINE METHODS

Positional identification of the PCD locus in dogs. We conducted SNP genotyping of 5 affected and 15 healthy dogs with the Affymetrix v2.0 Canine array using standard procedures. We performed autozygosity mapping with ASSIST software²⁵. We conducted mutation scanning by direct Sanger sequencing of amplicons spanning the *CCDC39* exons and intron-exon boundaries obtained from genomic DNA using standard procedures and primers, provided in **Supplementary Table 1**. The relative abundance of mutant versus wildtype *CCDC39* transcripts was measured by direct sequencing of RT-PCR products obtained from total RNA extracted from tracheal samples of a heterozygous animal using standard procedures and analysis of the sequence traces using PeakPicker²⁶.

Morpholino-based *ccdc39* suppression and *in vivo* rescue assay in zebrafish. Morpholinos targeting either the translation initiation AUG (tb-MO) or the splice donor site of *D. rerio ccdc39* exon 9 (sb-MO; Gene Tools) were diluted to the appropriate concentrations using sterile, deionized water. We subsequently injected wildtype zebrafish embryos at the 1–2-cell stage with morpholino injection cocktails (batches of 50–100 embryos; the investigator was masked to injection) and reared them at 28 °C until fixation (14-somite embryos for RNA *in situ* hybridization) or live scoring for heart looping phenotypes at 36-h post fertilization. Embryos scored live were reared in N-phenylthiourea. For rescue experiments, the *CCDC39* open reading frame (ORF) was PCR amplified from cDNA generated with oligo-dT-primed total RNA isolated from HEK293T cells and subsequently cloned into the pCR8/GW/TOPO vector (Invitrogen). pCR8/GW/TOPO vectors were then shuttled into the pCS2+ Gateway destination vector using LR clonase II mediated recombination (Invitrogen). Capped mRNA was *in vitro* transcribed from linearized pCS2+ *CCDC39* using the SP6 mMessage mMachine kit (Ambion) according to the manufacturer's instructions and injected with sb-MO. RNA *in situ* experiments were conducted with embryos fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde and hybridized with digoxigenin-labeled *spaw* riboprobe according to standard procedures. Images were captured at ×8 magnification using a Nikon SMZ1500 stereoscope equipped with a Digital Sight camera. For RT-PCR experiments, to show *ccdc39* expression and knockdown efficiency of the sb-MO, we extracted total RNA from whole zebrafish embryos using Trizol (Invitrogen) primed with oligo-dT and performed reverse transcription with SuperScriptIII reverse transcriptase (Invitrogen) to generate cDNA for subsequent PCR amplification.

Analyses of human *CCDC39*. Primers for (i) PCR and sequencing of the 20 coding exons and splice junctions of *CCDC39*, (ii) microsatellite haplotype analysis and (iii) identification of the c.1167+1261A>G mutation are available in **Supplementary Table 1**. For qRT-PCR analysis, 2 µg of total RNA from different human tissues (Takara Bio Europe/Clontech) were primed with 2.5 mM of oligo-dT and then subjected to reverse transcription with the Reverse Transcriptase kit from Roche following the manufacturer's instructions. cDNAs were amplified in the light Cyler LC480 (Roche/Boehringer Mannheim) with the LC480 probe master mix (Roche) using a forward primer in exon 6 and a reverse primer in exon 7. The primers used to amplify transcripts from other PCD genes expressed in nasal brushing samples (*C14orf104* (*KTU*), *LRRC50*, *GAS11*, *DNAI1* and *DNAI2*) are available on request. The ubiquitously expressed *ERCC3* gene was used as an internal control.

Transmission electron microscopy. The biopsies were taken from the middle turbinate (for human tissue). The sample of nasal mucosa was fixed in 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer at 4 °C, washed overnight and postfixed in 1% (v/v) osmium tetroxide. After dehydration, the samples were embedded in a mixture of propylene oxide and epoxy resin. After polymerization, several resin sections were cut using an ultra-microtome. The sections were picked up onto copper grids. The sections were then stained with Reynold's lead citrate. TEM was performed with a Philips CM10.

***In situ* hybridization.** We used a 1,272-bp probe mainly comprising the 3' untranslated region of *Ccdc39* (NM_026222.2) that we obtained by cDNA

amplification from a mouse lung cDNA library (Marathon cDNA amplification kit, Clontech) and cloning into pBluescript. *In situ* hybridization analyses of whole mouse embryos (E7.5–E11.5) and embryonic (E14.5 and E16.5) and adult kidney sections were performed using a digoxigenin-labeled antisense riboprobe derived from mouse *Ccdc39* cDNA as described in a published modification^{27,28}. Color reactions were extended up to 4 d to visualize the weak expression in the node. Specimens were transferred into 80% glycerol and photographed using a Leica DC200 digital camera on a Leica M420 photomicroscope or under Nomarski optic using a Fujix digital camera HC300Z on a Zeiss Axioplan.

Generation of GAS11-specific antibodies. Antibodies were raised against the full-length protein of GAS11 (NP_001472.1). The corresponding cDNA fragment, which we obtained by cDNA amplification on a human testis cDNA library (Marathon cDNA amplification kit, Clontech), was cloned into pET-21a(+) (Novagen) and expressed as a HIS fusion protein in *Escherichia coli*. The purified protein was used to immunize mice. The monoclonal antibody was affinity column purified using protein G columns (Prochem).

Immunofluorescence analyses. Respiratory epithelial cells were obtained by nasal brush biopsy (Engelbrecht Medicine and Laboratory Technology) and suspended in cell culture medium. Samples were spread onto glass slides, air dried and stored at –80 °C until use. Cells were treated with 4% paraformaldehyde, 0.2% Triton-X 100 and 1% skim milk (all percentages are v/v) before incubation with primary (at least 3 h at room temperature (18–20 °C) or overnight at 4 °C) and secondary (30 min at room temperature) antibodies. Appropriate controls were performed omitting the primary antibodies. Monoclonal anti-DNAL1 antibody and polyclonal anti-DNAH5 antibodies were as reported^{9,13}. Polyclonal rabbit CCDC39 was from Sigma. Polyclonal rabbit anti- α/β -tubulin was from Cell Signaling Technology, and monoclonal mouse anti-acetylated- α -tubulin antibody and polyclonal rabbit anti-CCDC39 antibodies were from Sigma. Highly cross-adsorbed secondary antibodies (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546) were from Molecular Probes (Invitrogen). DNA was stained with Hoechst 33342 (Sigma). Immunofluorescence images were taken with a Zeiss Apotome Axiovert 200 and processed with AxioVision 4.7.2.

Immunoblotting. Protein extracts were prepared from human respiratory epithelial cell cultures as described¹³. Proteins were separated on a NuPAGE 4–12% bis-tris gel (Invitrogen) and blotted onto a PVDF membrane (Amersham). The blot was processed for ECL plus (GE Healthcare) detection using GAS11 (1:200), CCDC39 (1:250; Atlas Antibodies), GAPDH (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology), rabbit-HRP (1:3,000) and mouse-HRP (1:5,000) antibodies (GE Healthcare).

High-speed video analyses of ciliary beat in human cells. Ciliary beat was assessed with the SAVA system (Sisson-Ammons Video Analysis of ciliary beat frequency)²⁹. Trans-nasal brush biopsies were rinsed in cell culture medium and immediately viewed with an Olympus IMT-2 inverted phase-contrast microscope with a Redlake ES-310 Turbo monochrome high-speed video camera and a ×40 objective. Digital image sampling was performed at 125 frames per second and at 640 × 480 pixel resolution. The ciliary beat pattern was evaluated on slow motion playbacks.

- Charlier, C. *et al.* Highly effective SNP based association mapping and management of recessive defects in livestock. *Nat. Genet.* **40**, 449–454 (2008).
- Ge, B. *et al.* Survey of allelic expression using EST mining. *Genome Res.* **15**, 1584–1591 (2005).
- Olbrich, H. *et al.* Mutations in *DNAH5* cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. *Nat. Genet.* **30**, 143–144 (2002).
- Olbrich, H. *et al.* Axonemal localization of the dynein component DNAH5 is not altered in secondary ciliary dyskinesia. *Pediatr. Res.* **59**, 418–422 (2006).
- Sisson, J.H., Stoner, J.A., Ammons, B.A. & Wyatt, T.A. All-digital capture and whole-field analysis of ciliary beat frequency. *J. Microsc.* **211**, 103–111 (2003).



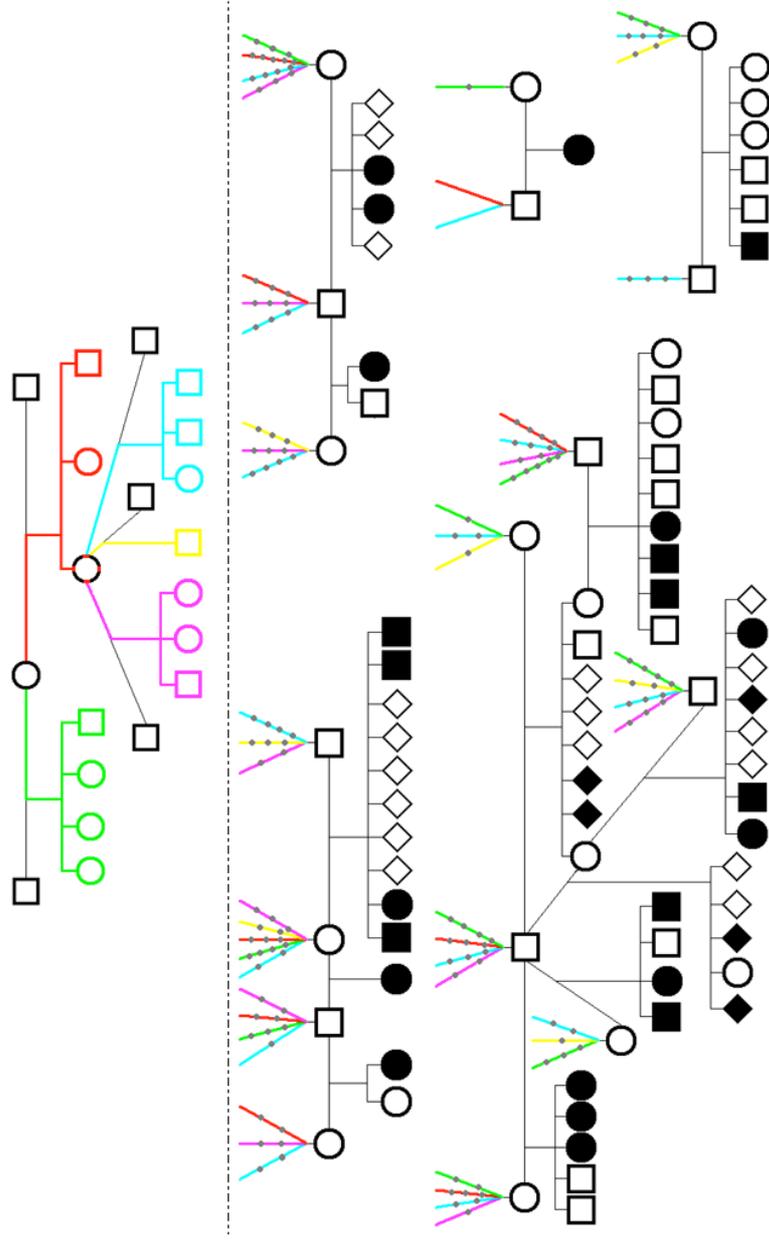
CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex as well as normal ciliary motility in human and dogs.

Anne-Christine Merveille^{1,}, Erica E. Davis^{2,*}, Anita Becker-Heck^{3,4,5*}, Marie Legendre^{6,*}, Israel Amirav⁷, Géraldine Bataille¹, John Belmont⁸, Nicole Beydon⁹, Frédéric Billen¹⁰, Annick Clément¹¹, Cécile Clercx¹⁰, André Coste¹², Rachelle Crosbie¹³, Jacques de Blic¹⁴, Stephane Deleuze¹⁰, Philippe Duquesnoy⁶, Denise Escalier⁶, Estelle Escudier⁶, Manfred Fliegau², Judith Horvath³, Kent Hill¹³, Mark Jorissen¹⁵, Jocelyne Just¹⁶, Andreas Kispert¹⁷, Mark Lathrop¹⁸, Niki Tomas Loges^{3,5}, June K. Marthin¹⁹, Yukihide Momozawa¹, Guy Montantin⁶, Kim G. Nielsen²⁰, Heike Olbrich^{3,6}, Jean-François Papon^{6,12}, Isabelle Rayet¹⁹, Gilles Roger²¹, Miriam Schmidts³, Henrique Tenreiro⁶, Jeffrey A. Towbin⁸, Diana Zelenika¹⁸, Hanswalter Zentgraf²², Michel Georges¹, Anne-Sophie Lequarré^{1,#}, Nicholas Katsanis^{2,#}, Heymut Omran^{3,5,#}, Serge Amselem^{6,#}.*

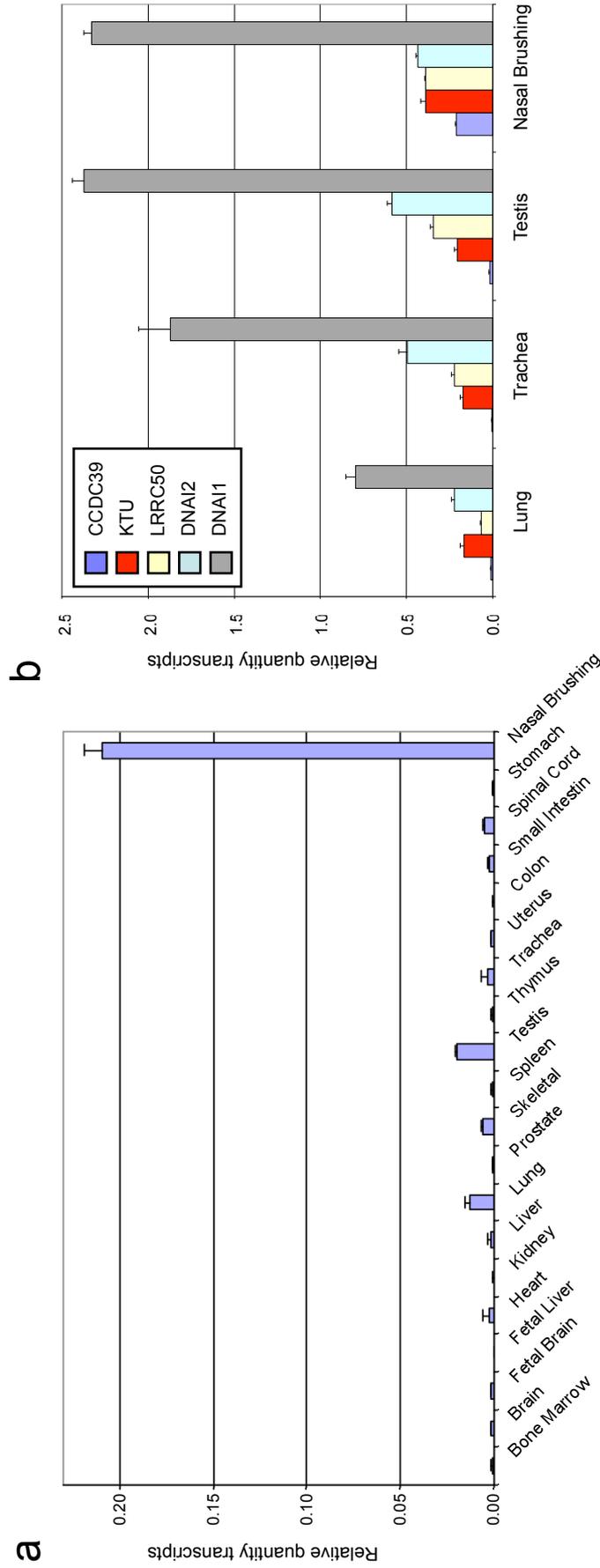
SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary note

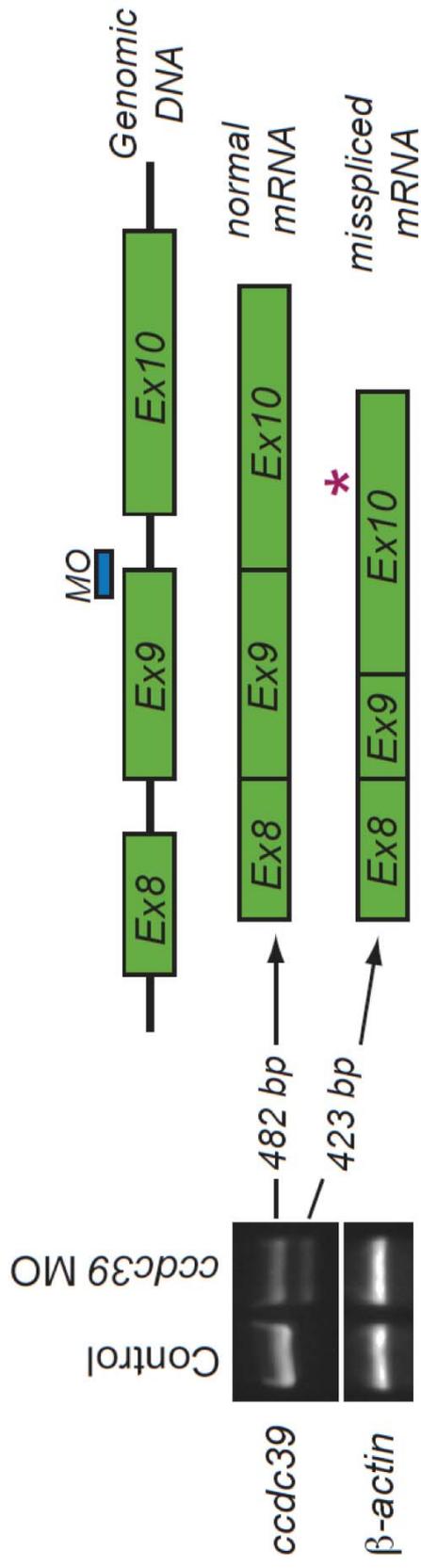
Patients. French cohort: 50 patients from 48 unrelated families suffering from chronic upper and lower airway infections related to PCD were investigated. The diagnosis of PCD was confirmed in all patients by classic optic microscopy analysis of nasal or bronchial biopsies as well as by TEM analysis. With consent, blood samples for genetic studies were obtained from all individuals. The PCD genetic study was approved by the local ethics committee (CPP Henri-Mondor, Créteil, France). German cohort: We studied DNA from a total of 27 PCD patients originating from 26 unrelated families originating from Denmark, France, Germany, Hungary, Israel and Turkey. Signed and informed consent was obtained from patients fulfilling diagnostic criteria of PCD¹³ (confirmed by TEM and/or immunofluorescence analysis) and from family members using protocols approved by the Institutional Ethics Review Board at the University of Freiburg and collaborating institutions. American cohort: We extracted DNA from blood collected from sporadic heterotaxia patients (134 N. European and 82 Hispanic) and an equal number of ethnically matched controls (134 and 82 respectively) upon informed consent using a human subjects protocol approved by the Baylor College of Medicine Institutional Review Board.



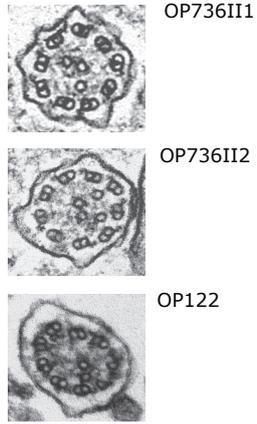
Supplementary Figure 1: Pedigree relationships between affected dogs. All parents trace back to the same founder bitch shown at the top of the pedigree with her close descendants. The paths between the founder bitch and carrier parents are indicated by the lines which are coloured according to the descendant to which they connect. The dots on the lines count the number of intervening generations.



Supplementary Figure 2: (a) Expression analysis of the human *CCDC39* gene, as assessed by quantitative RT-PCR. *CCDC39* transcripts are found at the highest levels in nasal brushings and to a lesser extent in lung and testis. **(b)** Expression of *CCDC39* transcripts, as compared with that of four other PCD genes (i.e. *KTU*, *LRRC50*, *DNAI2* and *DNAI1*) in nasal brushings. Values are the mean \pm SD of three independent experiments. The ubiquitously expressed *ERCC3* gene was used as an internal control to normalize the data.



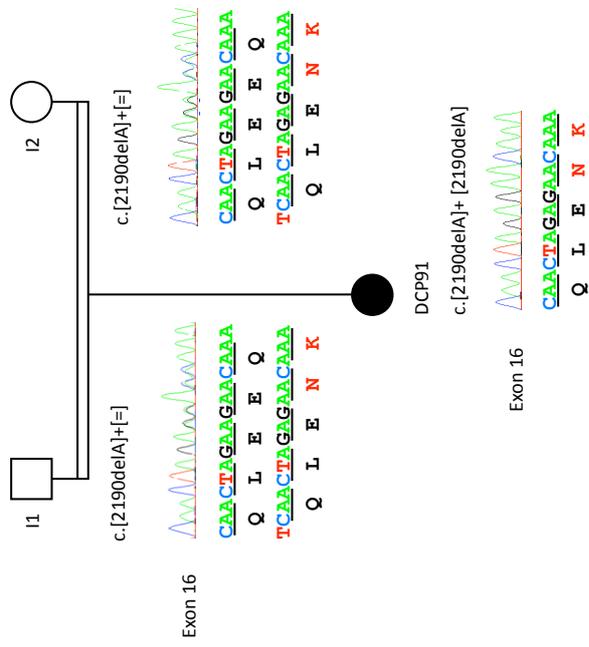
Supplementary figure 3: Knockdown efficiency of *ccdc39* sb-MO. Total RNA was extracted from embryos injected with 4ng sb-MO and harvested at 36hpf. Following cDNA synthesis, *ccdc39* was amplified with primers flanking the sb-MO target site at the splice donor of exon 9. Agarose gel electrophoresis shows the presence of two amplification products in morphants; the correctly spliced transcript at diminished levels compared to controls (~50% decrease), and the product of a 59bp deletion of exon 9 resulting from aberrant splicing induced by the sb-MO which introduces a premature stop codon (asterisk). Schematic of the genomic locus and mRNA splicing is shown to the right. β -actin was used to control for total RNA quantity and integrity.



Supplementary Figure 4: The ultrastructural phenotype found in patient DCP85 is representative of that found in all patients with *CCDC39* mutations. Similar defects are observed in patients OP-736 II1, OP-736 II2 and OP-122 as shown.

DCP91

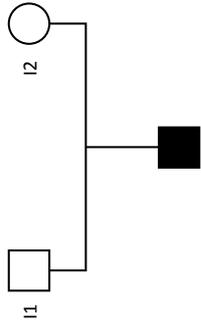
Exon 16: c.2190delA (p.Glu731AsnfsX31)



Nature Genetics: doi: 10.1038/ng.726

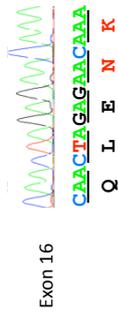
DCP532

Exon 16: c.2190delA (p.Glu731AsnfsX31)



DCP532

c.[2190delA]+ [2190delA]
or c.[2190delA]+ [del]



DCP554

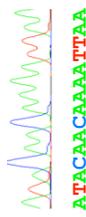
Exon 9: c.1072delA (p.Thr358GlnfsX3)



DCP554

c.[1072delA]+ [1072delA]

or c.[1072delA]+ [del]

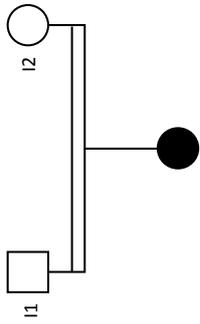


Exon 9

I Q Q N *

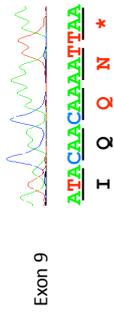
DCP384

Exon 9: c.1072delA (p.Thr358GlnfsX3)



DCP384

c.[1072delA]+ [1072delA]
or c.[1072delA]+ [del]

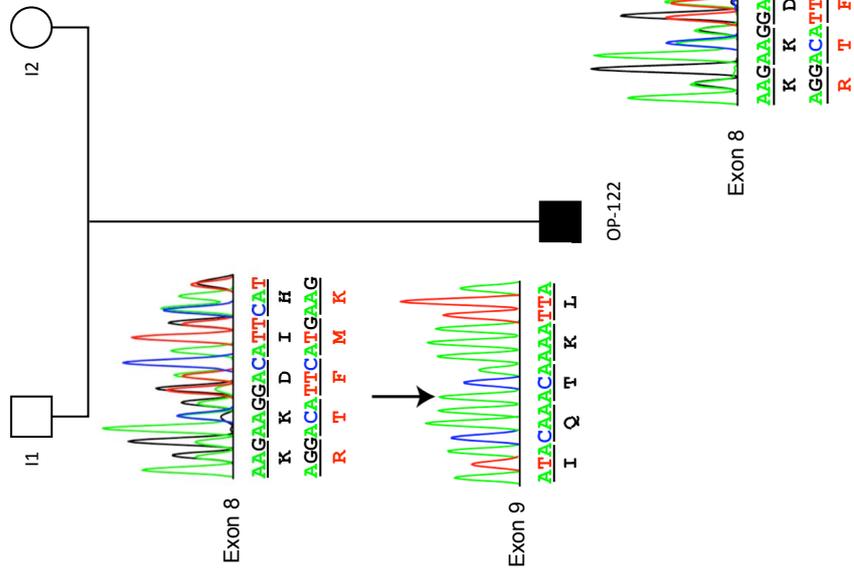


Nature Genetics: doi: 10.1038/ng.726

OP-122

Exon 8: c.1007_1010delAGAA (p.Lys336Argfs19)

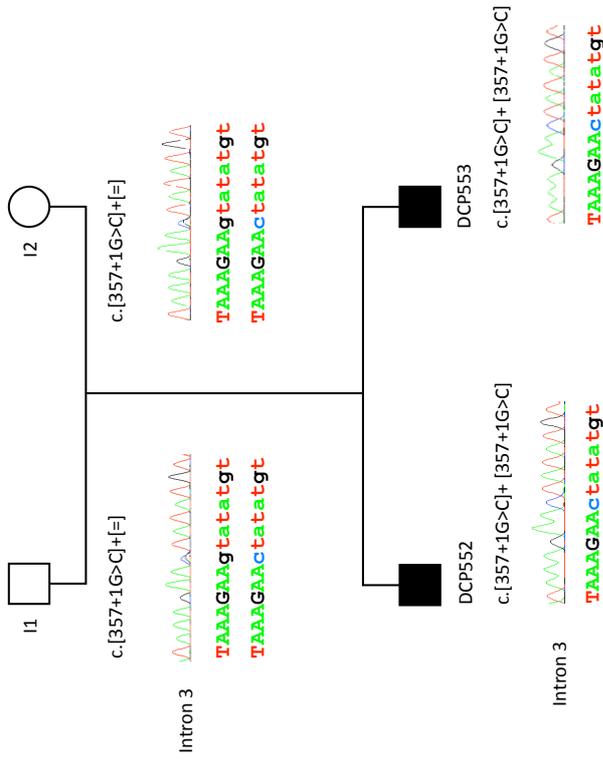
Exon 9: c.1072delA (p.Thr358GlnfsX3)



Nature Genetics: doi: 10.1038/ng.726

DCP552/553

Intron 3: c.357+1G>C

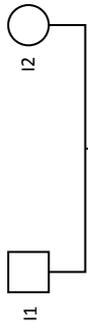


Nature Genetics: doi: 10.1038/ng.726

DCP274

Intron 3: c.357+1G>C

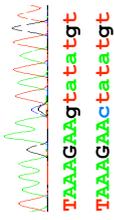
Intron 5: c.610-2A>G



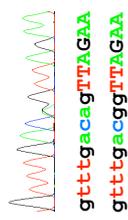
DCP274

c.[357+1G>C]+ [610-2A>G]

Intron 3



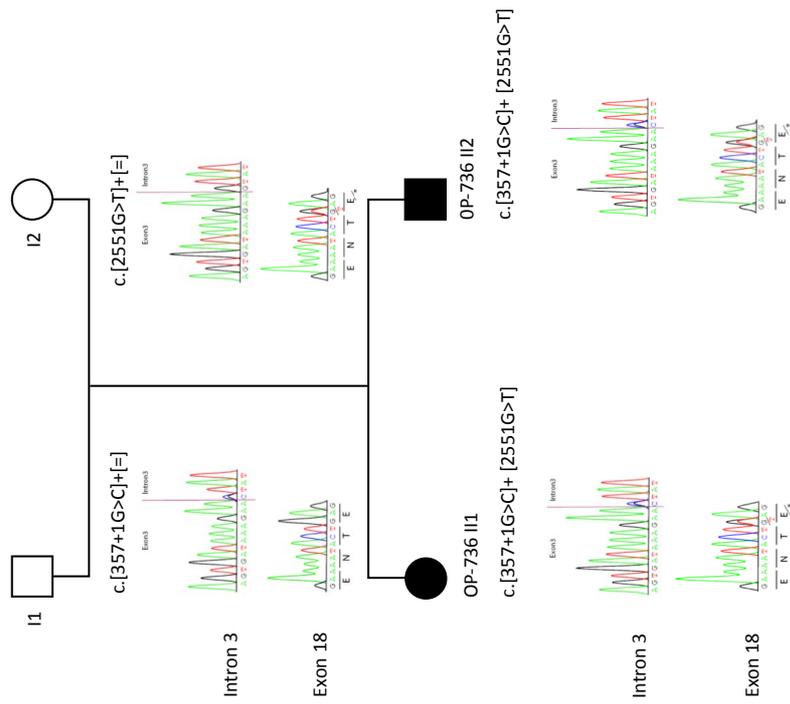
Intron 5



OP-736 II1 + II2

Intron 3: c.357+1G>C

Exon 18: c.2551G>T (p.Glu851X)

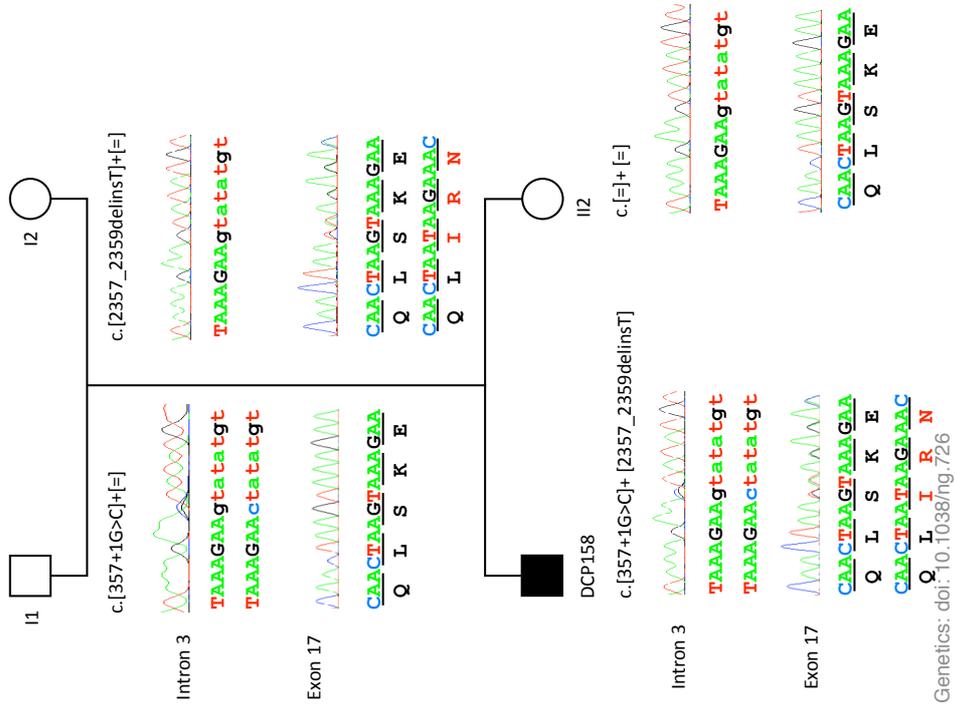


Nature Genetics: doi: 10.1038/ng.726

DCP158

Intron 3: c.357+1G>C

Exon 17: c.2357_2359delinsT (p.Ser786IlefsX33)

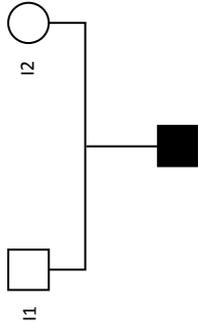


Nature Genetics: doi:10.1038/ng.726

DCP580

Intron 9: c.1167+1261A>G (p.Glu390SerfsX6)

Exon 17: c.2357_2359delinsT (p.Ser786IlefsX33)



DCP580

c.[1167+1261A>G]+ [2357_2359delinsT]

Intron 9



tgaactataagtg

TGAAC**Tgtg**

Exon 17



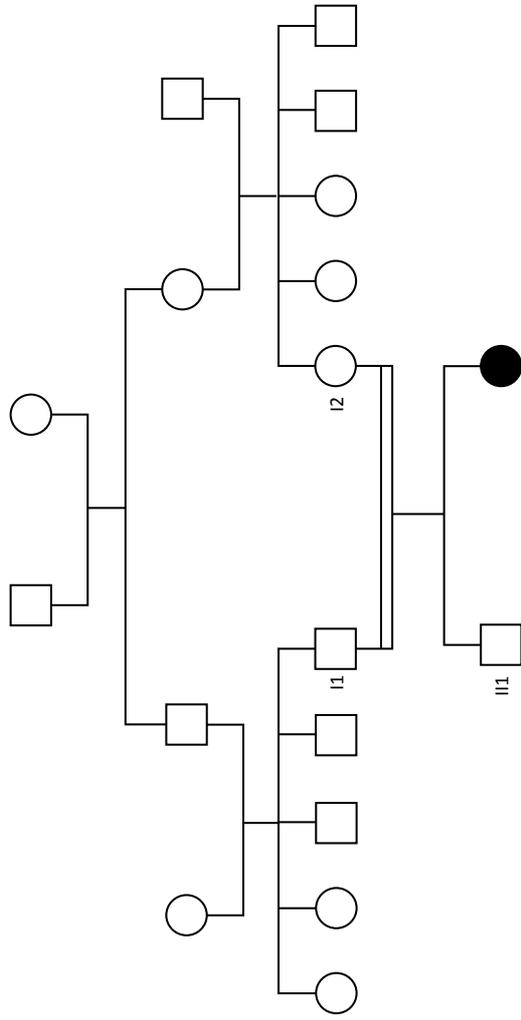
CAA**CTAAGAA**

Q **L** **S** **K** **E**

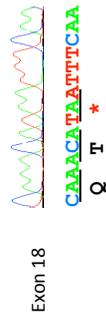
CAA**CTAATAGAA****C**

Q **L** **I** **R** **N**

DCP533
Exon 18: c.2577C>A (p.Tyr859X)



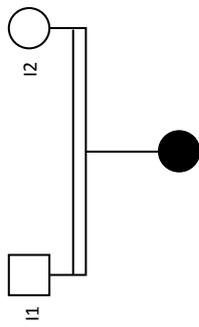
DCP533
c.[2577C>A]+ [2577C>A]
or c.[2577C>A]+ [del]



Nature Genetics: doi: 10.1038/ng.726

DCP528

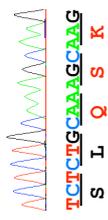
Exon 3: c.216_217delTT (p.Cys73GlnfsX6)



DCP528

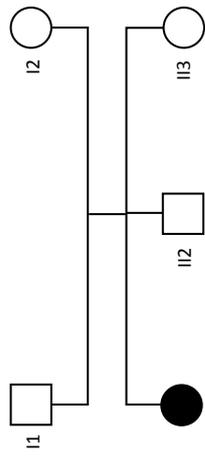
c.[216_217delTT]+ [216_217delTT]

or c.[216_217delTT]+ [del]



Nature Genetics: doi: 10.1038/ng.726

DCP323
Intron 8: c.1035-3C>G



DCP158
c.[1035-3C>G]+ [1035-3C>G]
or c.[1035-3C>G]+ [del]

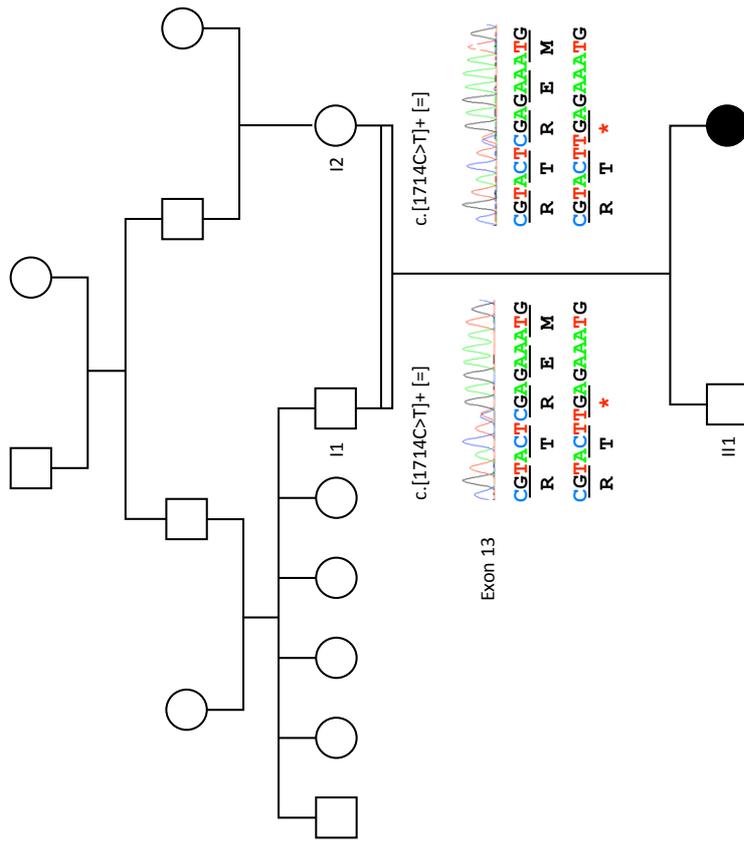
Intron 8

ccctctgagTAC

Nature Genetics: doi: 10.1038/ng.726

DCP181

Exon 13: c.1714C>T (p.Arg572X)



DCP181

c.[1714C>T]+ [1714C>T]

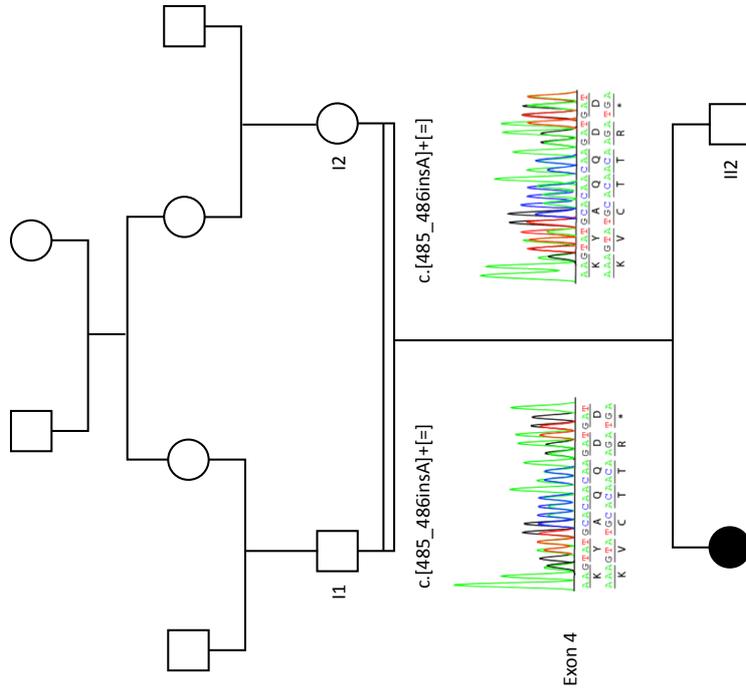
Exon 13

CGTACTTGGAGAAATG
R T *

Nature Genetics: doi: 10.1038/ng.726

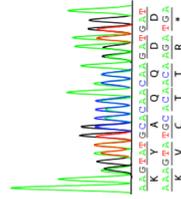
OP-18

Exon 4: c.485_486insA (p.Tyr163ValfsX6)

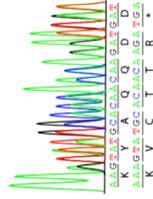


Exon 4

c.[485_486insA]+[=]

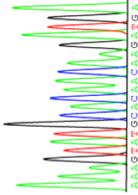


c.[485_486insA]+[=]



OP-18 II1

c.[485_486insA]+[485_486insA]



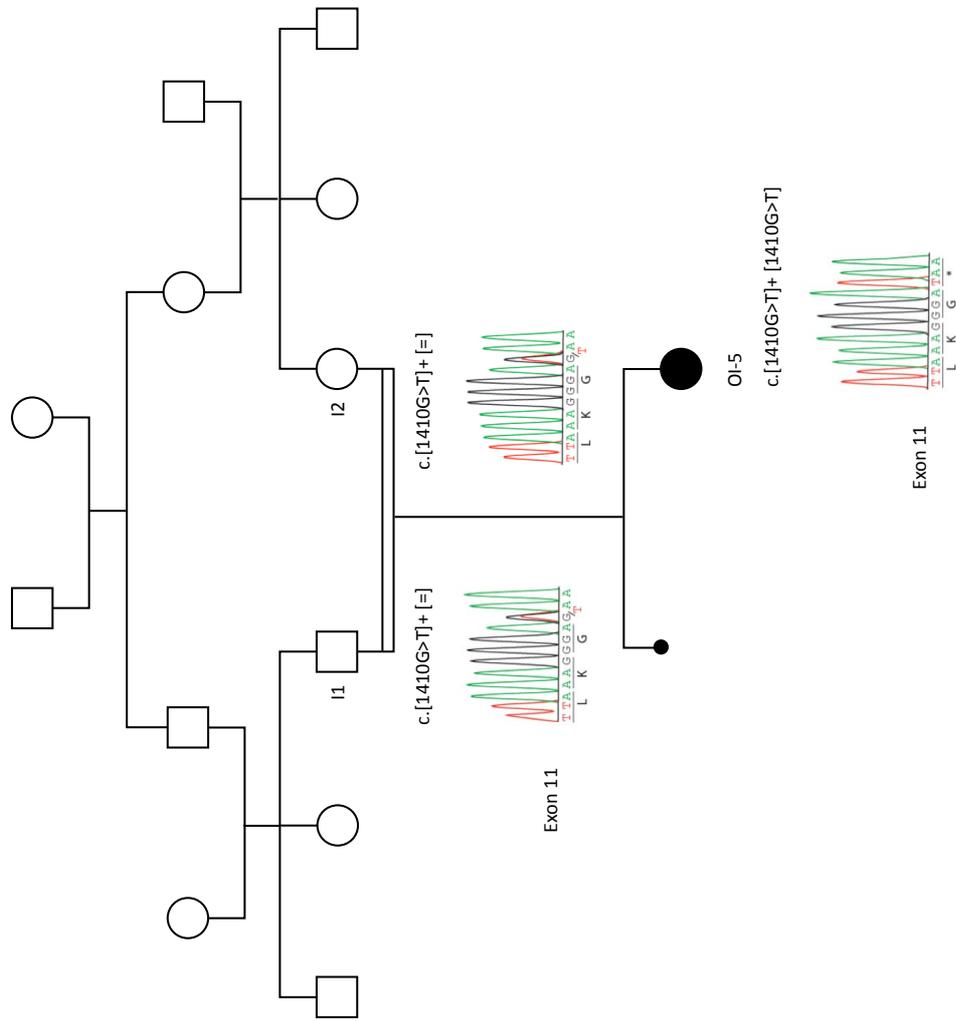
Exon 4

c.[485_486insA]+[485_486insA]



Nature Genetics: doi: 10.1038/ng.726

OI-5
Exon 11: c.1410G>T (p.Glu471X)



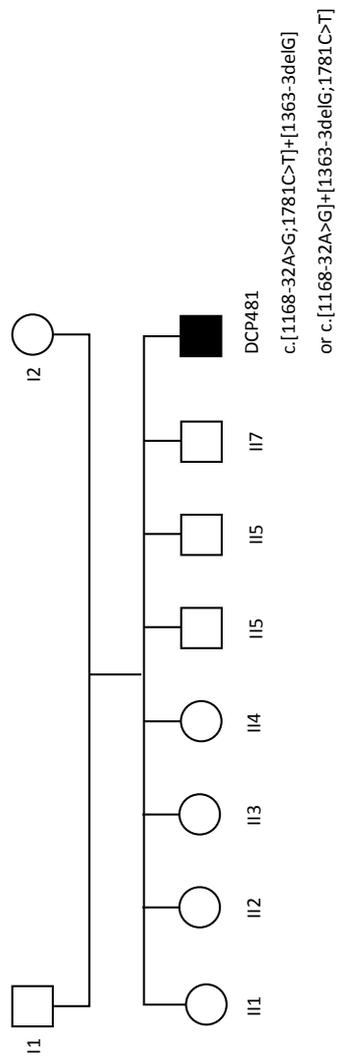
Nature Genetics: doi: 10.1038/ng.726

DCP481

Intron 9: c.1168-32A>G

Intron 10: c.1363-3delC

Exon 13: c.1781C>T (p.Thr594Ile)



DCP481

c.[1168-32A>G;1781C>T]+[1363-3delG]

or c.[1168-32A>G]+[1363-3delG;1781C>T]

Intron 9


ata t t t a a t t c c a t t

a t a t t t a g t t c c a t t

Intron 10


a c t g t a a c c a g G A T T T T T

a a c t g t a a a g G A T T T T T

Exon 13

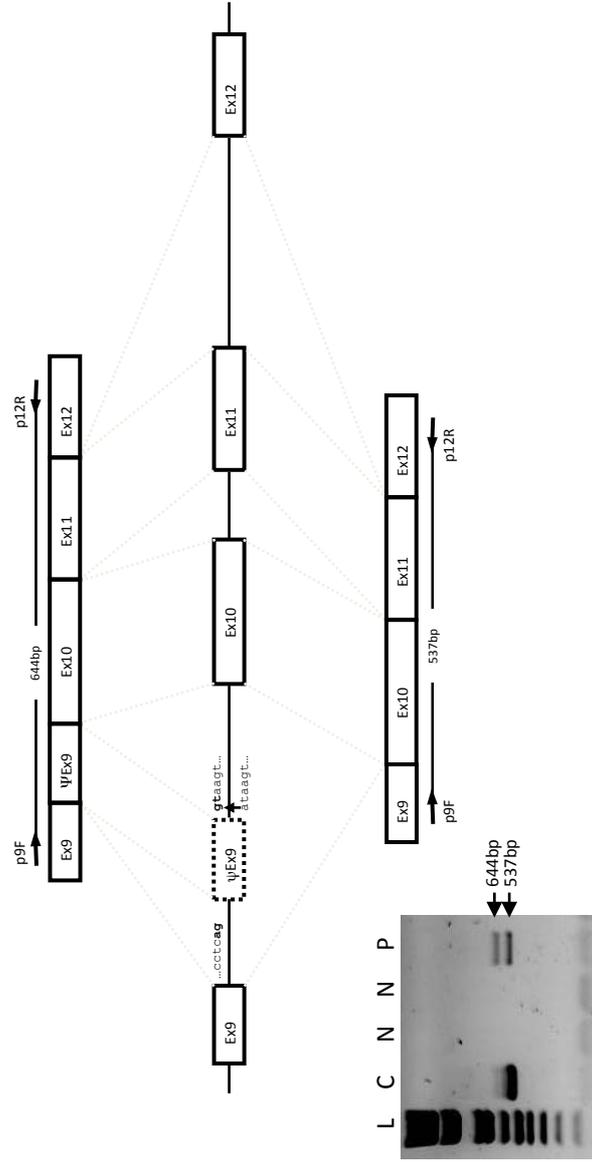

T T T A T A C A C A G C A A T G

L Y T A M

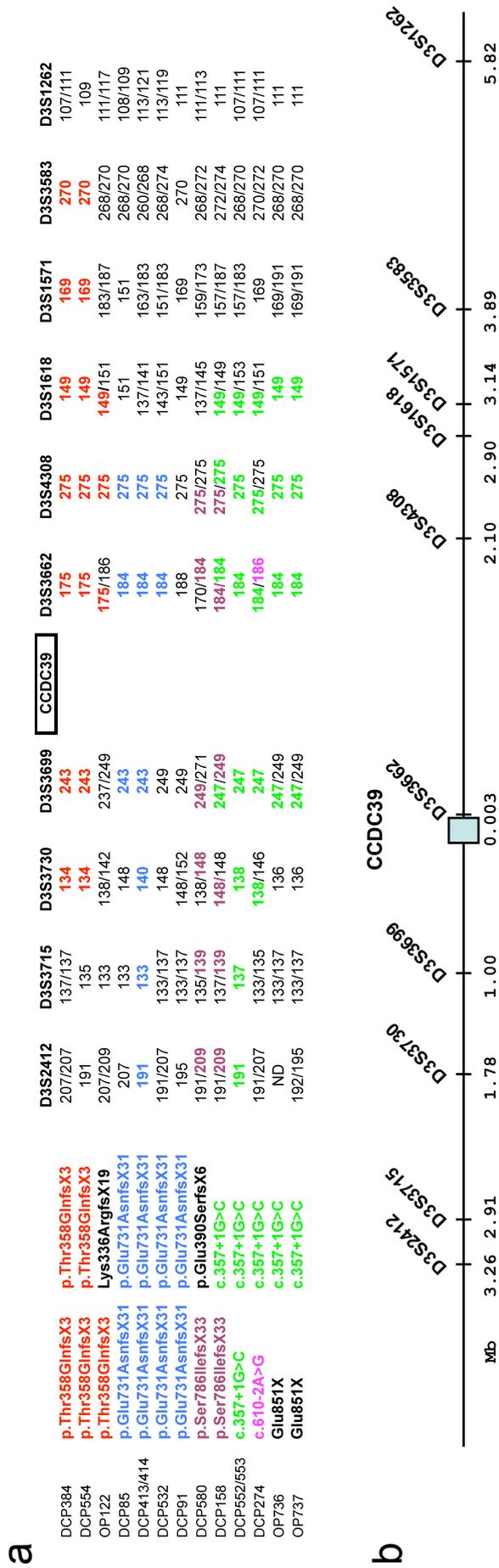
T T T A T A C A T A C C A A T G

L Y I A M

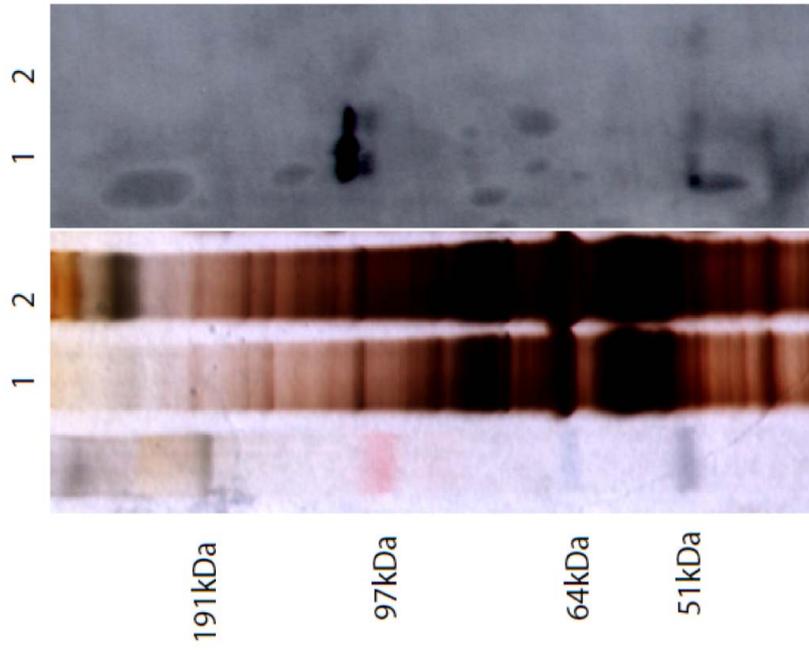
Nature Genetics: doi: 10.1038/ng.726



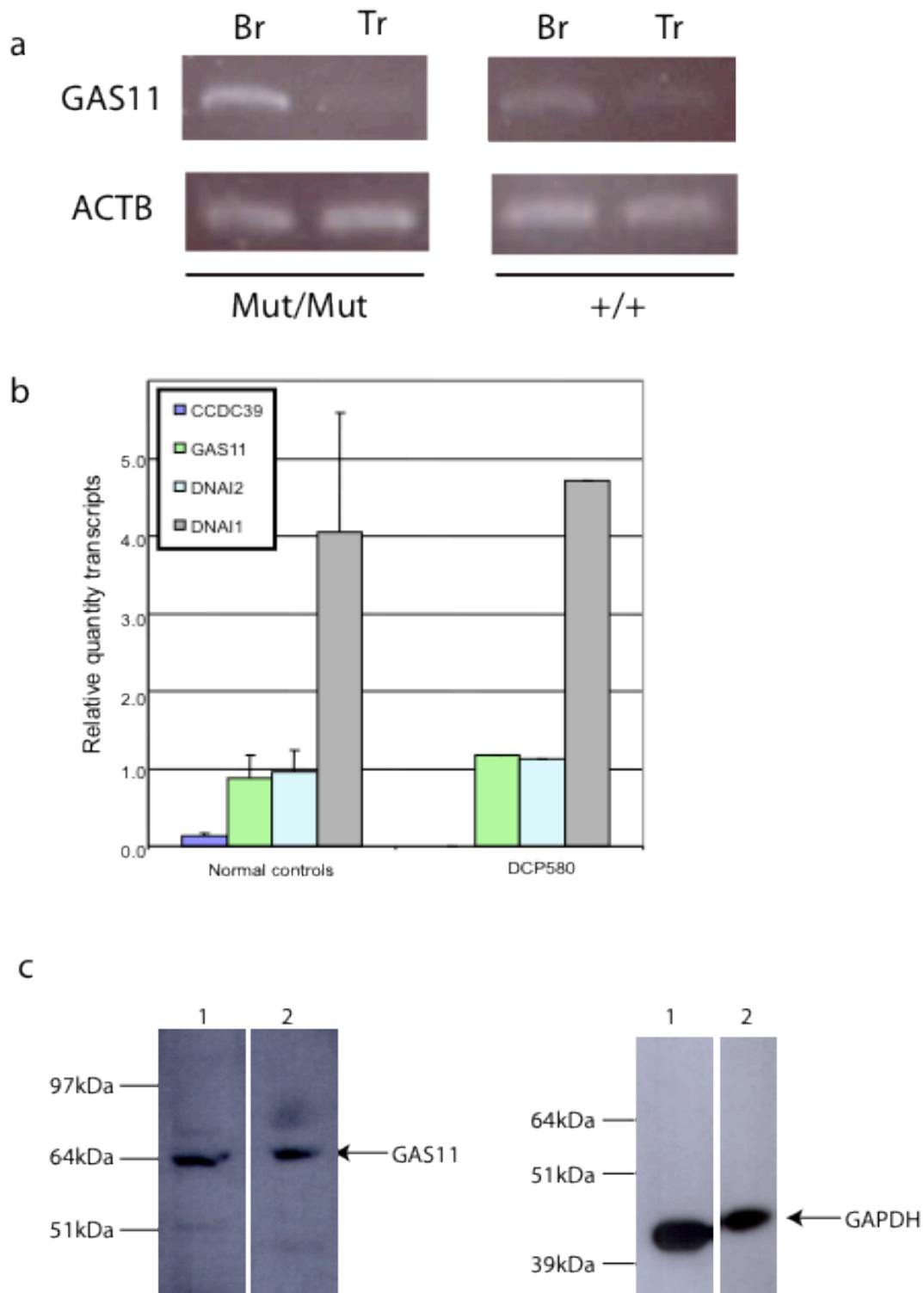
Supplementary figure 6: Inclusion of pseudo-exon 9 (Ψ Exon9) caused by the c.1167+1261A>G mutation. Schematic representation of the splicing events leading to normal (bottom) and abnormal (top) *CCDC39* transcripts. Solid boxes indicate exons. Pseudo-exon 9, depicted by a dashed box, is flanked by a perfect splice donor site and a near-perfect splice acceptor site (invariant dinucleotides are in bold characters) that is activated by the A>G mutation (vertical arrow). **Inset:** RT-PCR products generated from total RNA obtained from nasal cells from a control subject (lane C) and from patient DCP580 (lane P). Both samples were amplified with primers p9F and p12R located in exons 9 and 12 respectively. Lanes N correspond to negative controls (PCR without RNA sample).



Supplementary figure 7: Haplotypes associated with CCDC39 mutations shared by several patients. **(a)** Genotyping of microsatellites (D3S numbers) flanking the CCDC39 gene. **(b)** Physical map of the CCDC39 region showing positions of microsatellites. Solid horizontal lines show the minimal founder disease haplotype associated with each CCDC39 mutation.



Supplementary figure 8: Demonstration of specificity of the polyclonal rabbit antibodies targeting CCDC39. Anti-CCDC39 detects a specific band of the expected size (~109 kDa) on Western blot (right lane) of lysates from human control respiratory cells (1) and is missing in lysates of patient OP-122 (2) carrying *CCDC39* mutations (left lane shows silver staining).



Supplementary Fig. 9: (a) RT-PCR analysis of canine *GAS11* transcripts in broncheal (Br) and tracheal (Tr) RNA. Comparable amounts of *GAS11* product were obtained from affected (Mut/Mut) and healthy (+/+) tissue. ACTB: housekeeping control gene. (b) QRT-PCR analysis of *CCDC39*, *GAS11*, *DNAI2* and *DNAI1* in nasal brushings from patient DCP580 and three healthy controls. Errors bars correspond to SD. The ubiquitously expressed ERCC3 gene as used as internal normalization control. (c) LEFT: Western blot analysis showing expression of *GAS11* in lysate from respiratory cells of a healthy control (1) and of patient OP-122 (compound *CCDC39* heterozygote)(2); RIGHT: Western blot against *GAPDH* as loading control.

Supplementary Table 1

DOG CCDC39			PCR	SEQ
EXON 1	UP	GAGCACTTCCTGTTTGTAACCTAAGG	1	1
	DOWN	CAAACAACGTGTGCTACGAGAAAGAA	1	1
EXON 2	UP	GTTGACTGTTTCAGCTTGCCCTAAAT	1	1
	DOWN	AGTGGGTTGCAATGAAAAAGTAAAAA	1	1
EXON 3	UP	TTGAGCAAAACGAACTACACTGAATC	1	1
	DOWN	TCAGGAAACTAATGAATGCCTTTCTC	1	1
EXON 4	UP	TTGCTCTGAATGACTTTCCCTAAAC	1	1
	DOWN	TCATTTCAGGATTTTTAACCTGGAGTC	1	1
EXON 5-6	UP	TAGAAGCAATTGAGTTTTTCATTGCAG	1	1
	DOWN	TAGGTTTCTTTCTGACTCTCCCTTT	1	1
EXON 7	UP	TTTCTTTTTGTTGTTTTGTTTCATCG	1	1
	DOWN	CATGATTTTCAGTCTAGACGCTTTCA	1	1
EXON 8-9	UP	GCCAATATCATGCAATAGGTCATTTA	1	1
	DOWN	ATGGGCATTTTTCAAGATGTGTCTAT	1	1
EXON 10-11	UP	AATTGTGGGAAGGGCATTCTTATATT	1	1
	DOWN	ATATATGCAGGTAGCTTGGCAATCAT	1	1
EXON 12	UP	ATTCCTGGAATTATTGAACCCAAAC	1	1
	DOWN	TGATTTTACGGTACCTGTTTCAAAGC	1	1
EXON 13	UP	AGTAAAGGAACCGAAAGTCCTCATTC	1	1
	DOWN	AACCTCCAGTCAATTCTTCTGACATC	1	1
EXON 14	UP	ACCTGTTTGAATTCAGTAGTCATCAA	1	1
	DOWN	GGTTGTTAAAGAGCAGACCAAAAAGA	1	1
EXON 15-16	UP	ATCAAGTGCAGAGAAATAATGCCTAA	1	1
	DOWN	ATGGTTTTCTCTTCAATGATGTGGT	1	1
EXON 17-19	UP	AAAATGGCAAGCTTGTTAAGTTTCTG	1	1
	DOWN	GTCAGCAAAGCACAAGAGTGATTAAA	1	1
EXON 20	UP	GCGAGGGGGTCTCTACTAATAACAAT	1	1
	DOWN	TAAACTCCGTTTTACATTTTCCACT	1	1

HUMAN CCDC39			PCR	SEQ
EXON 1	UP	AACACAGCAAACACACCTTGAAAA	1	1
	DOWN	TAAGTAAGAGGAGTGGGCATGAGG	1	1
EXON 2	UP	ATCTGCTACCGCTGCAAACTAAG	1	0
	DOWN	ATAGCCATCATTTCTCACCACCAT	1	1
EXON 3	UP2	TCTTTGATTTTAGGTCCTTCATATGGT	0	1
	UP	TCCTAGACCAGCGTAGTATCTGAAAA	1	0
	DOWN	ATGGAAGAATGAGCAGTAGCACAG	1	1
EXON 4	UP2	TTTTCTCCTAGCACAGTTCATTGAC	0	1
	UP	AAAGCAAGCTTTGGCTCAACTACT	1	1
	DOWN	CTTCTGAAATGCTTTTGAGCATCC	1	1
EXON 5-6	UP	TGCAGCTATATGCAAACACATTAGA	1	1
	DOWN	ATGTGTAAGTCAGGGCATTGGTTT	1	1
EXON 7	UP	GTGAAAGGCCTGAGTGAAGACATT	1	0
	DOWN	GGGTTTAAATCAGAGTATCCAAAAG	1	1
	UP2	TCTCATCTCTTTAGCAAAATCCAGA	0	1
EXON 8-9	DOWN2	GTTGACATACCTCACCCCTTCAG	0	1
	UP	TGGCTACTACTTTTGTGGGTGTGA	1	0
EXON 8	DOWN	TTCAGAAGCAATGCATGAGAAGAG	1	0
	UP	TGGGCAGAATAAACTCAGAAATG	0	1
EXON 9	DOWN	CTTACCTTGCTGTTTCTTCATG	0	1
	UP	GTGATAAACCTCTTCAGGTTAC	0	1
EXON 10	DOWN	TCTTACAAGACCTCCTCGTCCTCT	0	1
	UP	TGGGATGAAATTAAGACGACAGGT	1	1
EXON 11	DOWN	TAACATGATGTCTCACCTTCAGCA	1	1
	UP	TAATGTGCCCTCAGAAATCCAAAT	1	1
EXON 12	DOWN	GGCAGTCACCCTATCCAAAGTAGT	1	1
	UP2	AACTGTAACAGGATTTTCACATTC	0	1
	UP	ATGAACTGGTGTATGCTCCCATCT	1	1
EXON 13	DOWN	ATGGTTTTCAATACTACATATGCATACAA	1	1
	UP2	TGAACTCATACTACATCCAAAACATCAA	0	1
	UP	TGAAAAGCCACGTTTATGAAACAA	1	0
EXON 13	DOWN	TTCGAATGAGTAAAAACGATGCAC	1	1
	UP2	AGTCAATGGTTAAATTGGAAAAAGG	0	1

EXON 14	UP	CATGAGTTTGTAGCAGGCAGTTGA	1	1
	DOWN	TGGCCTTTGTTAAGTGTAAATAGTG	1	1
EXON 15-16	UP2	TATTAGCACTGAGTTTCGCGAG	0	1
	UP	CAGGCCAGAAACATTCTTCTGATT	1	1
	DOWN	GTCTTCTTGGTGGAAGAGCAAGAG	1	1
EXON 17-19	DOWN2	TTGTTTTGTCAACATAGAGCAGCA	0	1
	UP	CTTCAGGGTCAGTAACATGAATGG	1	0
	DOWN	TAACAGCTGCGGTGATGTAGAAGT	1	0
	UP2	CCTGCCTGAGGCTGTTTTATAGTT	0	1
	UP3	ATGACATTCATCATGAAGTGAAAG	0	1
EXON 20	DOWN2	TTAGTGACAGCTGTGAGAGTTAAGCA	0	1
	UP	CTTTTGCCAATAATGAGAGGGTCT	1	1
	DOWN	CAAACACTAGCACAGGGCTGAGAATAA	1	1
ψ EXON 9	UP	GGACATTCATGAAGAAACAGCAAG	1	1
	DOWN	CTCTGATCTGTGATGAAAAGG	1	1
RTPCR	UP	TGGGAGAACACAATAGAACAGATG	1	0
	DOWN	TCGTTTCCTGCTTTATCCTTG	1	0

HUMAN MICROSATELLITES

D3S2412	FW	CAGACCATGCCTACTCTGCT
	RV	TGCTGAGTGCAAGAAGTCTG
D3S3715	FW	TGGTAATCCAGCCAAAGAG
	RV	AGCAGATAAGAATAGTCATTTCCC
D3S3730	FW	GA CTGGAAAATTCAGCCTCTA
	RV	AAGATGAGTCCTGAGCATGT
D3S3699	FW	GACCTTTGTTAGATACATAGTTTGC
	RV	CCAGCCAACCCTGTCT
D3S3662	FW	TTCTGAGGTGTGTATGGC
	RV	AGAGATTAAGGCTAAATTC
D3S4308	FW	CGGCGCTTCTCCGTTACTTC
	RV	CTCGGGAATCAACACAGCTC
D3S1618	FW	TGGA ACTGCGGACCAA
	RV	TTATTGAGTTATAGCAGTGCTTTC
D3S1571	FW	ACAGTGGCTGATGCCTT
	RV	CACAGGTGGGCACTACAT
D3S3583	FW	TGCAAAGTCACAGATGTCCA
	RV	CGAGAGGCACCAGAGTGTT
D3S1262	FW	CGGCCCTAGGATATTTTCAA
	RV	CCAGTTTTTATGGACGGGGT

ETUDE 2: Phénotype clinique de la DCP et prévalence de la mutation au sein de la race bobtail

Les premiers bobtails atteints de DCP ont été identifiés lors d'une consultation référée à la clinique vétérinaire universitaire de Liège. En interrogeant ensuite différents éleveurs, nous avons pu identifier 28 cas présentant des signes cliniques compatibles avec le diagnostic de DCP et obtenir des données cliniques pour onze d'entre eux. Parallèlement à la recherche d'individus atteints, nous avons également récolté de l'ADN d'individus sains. Une partie de ces échantillons a été recueillie pendant un dog show, une autre a été envoyée par des éleveurs dans le but de dépister leurs chiens pour la mutation identifiée. Une dernière partie provenait d'une banque d'ADN américaine.

D'un point de vue clinique, tous les chiens atteints présentaient des symptômes très tôt dans leur vie. Dès lors, la DCP a été diagnostiquée chez des chiens en croissance ou de jeunes adultes. Les symptômes les plus souvent rapportés par les propriétaires étaient un jetage nasal bilatéral et une toux productive quotidienne. Afin de mieux caractériser le phénotype clinique des atteints, différents examens complémentaires ont été réalisés. Les changements hématologiques observés comme la leucocytose neutrophilique et monocyttaire étaient présents chez la plupart des patients suite aux infections respiratoires récurrentes. Les séquelles de ces dernières étaient bien visibles sur les radiographies thoraciques qui présentaient toutes des changements sévères avec des lésions de bronchopneumonie touchant les lobes crâniaux et moyen droit. La plupart des chiens atteints présentaient également de la bronchiectasie, et ce, malgré leur jeune âge. Comme dans les DCP humaines, d'autres organes étaient atteints. Ainsi, un tiers des chiens atteints présentaient un *situs inversus* et le résultat de l'analyse du sperme d'un mâle a permis d'identifier une réduction de la mobilité et un pourcentage important d'anomalie primaire en microscopie optique.

Les différentes données cliniques de ces chiens sont reprises dans le tableau 4 en annexe.

Les analyses moléculaires réalisées sur l'épithélium respiratoire confirmaient les résultats de l'étude précédente chez le chien, en démontrant une nette diminution de l'expression de *CCDC39* et une absence de la protéine chez les individus atteints par rapport aux individus sains.

Afin de génotyper un grand nombre d'individus, nous avons mis au point un test Taqman.

La mise en œuvre de la technologie TaqMan nécessite la conception de quatre amorces. Ces dernières sont composées de deux primers et de deux sondes contenant le SNP cible à savoir la mutation (C ou T). On adjoint un fluorophore différent à chaque type de sondes (sauvage vs mutée) permettant ainsi d'obtenir un signal lumineux distinct pour les deux génotypes homozygotes correspondant, et un mélange de ces deux couleurs pour le génotype hétérozygote

(Bustin, 2000). Le test mis au point dans notre étude possédait un très bon taux de génotypage et une excellent sensibilité et spécificité. Le développement de ce test a permis de calculer la fréquence de la mutation au sein des différentes populations de bobtails. L'allèle muté se retrouvait plus fréquemment dans la population européenne avec une fréquence d'hétérozygotes autour de 19%. Les hétérozygotes étaient plus rares chez les chiens provenant d'Amérique du nord avec une fréquence d'hétérozygotes de 7%. Une partie de cette différence peut être expliquée par la méthode de recrutement des chiens. En effet, l'ADN des chiens européens était récolté dans le but de dépister ces chiens pour la DCP. Cependant, nous pensons qu'une autre partie de l'explication est liée à un effet fondateur puisque nous avons pu démontré que tous les porteurs obligatoires de la mutation, à savoir les parents d'atteints, étaient au moins reliés une fois au même ancêtre commun (cfr illustration p 108). Ce phénomène est une bonne illustration de l'impact négatif que peut entraîner l'usage intensif d'un champion. Le développement de ce test n'a pas uniquement permis de réaliser ce calcul de fréquence. Il représente aussi un outil formidable pour les éleveurs afin de dépister les chiens et de détecter les porteurs pour prévenir la naissance de tout chien atteint.

Clinical Findings and Prevalence of the Mutation Associated with Primary Ciliary Dyskinesia in Old English Sheepdogs

A.-C. Merveille, G. Battaille, F. Billen, S. Deleuze, M. Fredholm, A. Thomas, C. Clercx, and A.-S. Lequarré

Background: Primary ciliary dyskinesia (PCD) is generally a recessively inherited disorder characterized by dysfunction of motile cilia. A mutation in a new causative gene (*CCDC39*) has been identified in the Old English Sheepdog (OES).

Objectives: To describe the clinical findings and the molecular changes of affected dogs and estimate the worldwide prevalence of the mutation in a large cohort of OES.

Animals: 578 OES, including 28 affected and 550 clinically healthy dogs.

Methods: This retrospective study reviewed the data of OES diagnosed with PCD and OES tested for the mutation. Clinical data including results of physical examination and further investigations were obtained on 11/28 dogs. *CCDC39* expression was assessed by qRT-PCR and Western blot analysis in affected dogs and healthy dogs. DNA was extracted on 561/578 dogs and a genetic test by Taqman technology was developed to genotype the *CCDC39* mutation in these dogs.

Results: Clinical findings were recurrent nasal discharge and cough, pyrexia, leucocytosis, and bronchopneumonia. Ultrastructural defects were characterized by central microtubular abnormalities and decreased number of inner dynein arms (IDAs). Molecular analysis revealed a reduced expression of *CCDC39* RNA and an absence of *CCDC39* protein in affected dogs compared to healthy dogs. The mutation was more frequent in nonrandomly selected European OES population with a higher proportion of carriers (19%) compared to non-European dogs (7%).

Conclusion and Clinical Importance: *CCDC39* mutation is dispersed in a worldwide population and is responsible for PCD in this breed. Genetic testing might enable control of this disease.

Key words: Bronchopneumonia; *CCDC39*; Ciliary dysfunction; Dog; Genetic.

Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a genetically heterogeneous disorder characterized by abnormally functioning cilia. The main clinical signs are recurrent or persistent respiratory infections because of the lack of effective ciliary motility causing abnormal mucociliary clearance.¹ The dysfunction of the monocilia of the embryonic node might also lead to the randomization of the left-right body asymmetry and transposition of the thoracic and abdominal organs in 50% of the cases called the Kartagener's syndrome.² Male fertility can be impaired because of defects of the spermatozoa flagella. Disorders such as hydrocephalus or serous otitis have occasionally been reported.

This condition has been described in human beings as well as in different animals and in particular within 19 breeds of dog.^{3–8} Dog cases reported often focus on 1 individual from a specific breed, but sometimes littermates are affected^{9–11} or different cases are segregating

Abbreviations:

BALF	bronchoalveolar lavage fluid
DNA	deoxyribonucleic acid
IDAs	inner dynein arms
ODAs	outer dynein arms
OES	Old English Sheepdog
PCD	primary ciliary dyskinesia
PCR	polymerase chain reaction
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RNA	ribonucleic acid
SNP	single nucleotide polymorphism
TEM	transmission electron microscopy

within the same breed.^{7,12} This genetic disease is usually inherited in an autosomal recessive mode.^{7,12}

Motile cilia are composed of a microtubule backbone, the axonema, consisting of 9 microtubule doublets surrounding a central pair. Inner and outer dynein arms extend from each outer microtubule doublet and generate the force needed for motility in an ATP-dependent process. Ciliary dysmotility or immotility is often associated with ultrastructural defects of the cilia such as total or partial absence of the outer dynein arms (ODAs), inner dynein arms (IDAs), or both, defects of radial spokes or nexin links, and general axonemal disorganization with microtubular transposition.¹ There are a large number of genes involved in the molecular complexity of the cilium¹³ and until now only a few have been implicated in the etiology of PCD mostly through human family based linkage studies or by candidate gene approach with information from genes known to cause specific ultrastructural and functional defects in model ciliated species such as *Chlamydomonas*¹⁴ or mouse.¹⁵

From the Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium (Merveille, Battaille, Billen, Deleuze, Clercx, Lequarré); the Department of Veterinary Clinical and Animal Sciences, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Frederiksberg, Denmark (Fredholm); and the Antagene, Animal Genetics Laboratory, Limonest, France (Thomas). Part of this work was presented as an abstract at the 20th ECVIM-CA Annual Congress 2010, Toulouse, France.

Corresponding author: Anne-Christine Merveille, Department of Companion Animal and Equine Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine B44, Boulevard de Colonster 20, 4000 Liege, Belgium; e-mail: acmerveille@ulg.ac.be.

Submitted July 14, 2013; Revised October 18, 2013; Accepted January 23, 2014.

Copyright © 2014 by the American College of Veterinary Internal Medicine

DOI: 10.1111/jvim.12336

The first objective of the study is to detail several PCD clinical cases segregating within a pedigree of Old English Sheepdogs (OES). Thanks to this pedigree a new gene involved in the motility of cilia was discovered: this *CCDC39* gene once mutated is responsible for PCD both in OES and in human.¹⁶ The other objectives of this study are to gain further information on the molecular consequences of the *CCDC39* mutation in the dog and to describe the prevalence of the mutation in a large cohort of OES.

Materials and Methods

In total, 578 OES were involved in this study, 28 affected and 550 clinically healthy dogs. Among the affected dogs, we obtained complete clinical data for 5 of them and partial clinical data or postmortem data for 6 others. The remaining 17 affected dogs had compatible clinical signs and were identified based on interviews with breeders and owners. These dogs were only included in the pedigree analysis as no DNA was available for them.

Fifteen healthy dogs were collected from the 2 kennels where affected dogs were identified. Dogs were considered as healthy based on physical examination, if they were older than 7 months, and if they had no persistent history of signs of respiratory disease. They were primarily used for the genotyping and the identification of the mutation. For the remaining 535 healthy dogs, 427 were collected during an exhibition show or directly sent by breeders or owners and 108 dogs came from a US canine DNA bank.⁴ DNA samples of American dogs were randomly collected from various American Kennel Club registered dogs and were not collected for the study. All these samples have been used to study the worldwide prevalence of the mutation within the breed.

Pedigrees of affected dogs and details of their littermates and parents were obtained when available. Litter analysis of the dogs was performed to confirm the recessive mode of inheritance.

The 5 affected dogs for which we obtained complete clinical data were investigated at the small animal clinic of the University of Liège. Blood samples for hematology, biochemistry, and DNA extraction were obtained from all of them. Thoracic radiographs (left lateral, right lateral, and dorso-ventral views) were taken.

Rhinoscopy and bronchoscopy were performed on 3 of these dogs under anesthesia with the animals breathing spontaneously. Bronchoscopy^b allowed macroscopic evaluation of pharynx, larynx, and trachea as well as primary and secondary bronchi of each lung lobe. Bronchoalveolar lavages were cultured for bacteria and examined cytologically. Cell cultures were performed on nasal and bronchial mucosal biopsies according to previously described method (ciliogenesis).³ The percentage of transverse sections of cilia showing abnormalities was determined from each biopsy on the basis of the examination of 121–249 cilia.

A semen sample obtained from 1 dog by manual ejaculation was immediately analyzed by light microscopy. Sperm cells were fixed and stained with a Diff-Quick protocol.

For genotyping, DNA was extracted from 1 mL of total blood with EDTA. To identify the mutation, SNP genotyping of 5 affected and 15 healthy dogs was performed on canine array.^{b,16} Briefly, genome-wide association study allowed the identification of one and only 1 region of homozygosity shared by all cases on chromosome 34 and absent in healthy animals indicating a simple recessive disease. Statistical analysis demonstrated a highly significant association ($P < .001$ genome-wide). This shared segment was 15 Mb long containing 151 annotated genes. By mining 2

cilioma databases 10 candidate genes were selected as they are implied in the structure or in the function of the cilium. Sequencing the coding exons and the intron-exon boundaries of 6 of them in 1 affected dog, 1 obligate carrier, and 1 healthy dog allows the identification of one single mutation associated with a loss of function of the *CCDC39* gene. A premature stop codon predicted to truncate 90% of the protein in the affected dogs. No other disruptive mutation was detected. Furthermore, 10/10 additional cases were homozygous for the mutation, 10/10 obligate carriers were heterozygous, whereas the mutation was not found in 80 healthy animals from 9 other breeds.^c

Small pieces of bronchial tissues from affected and healthy animals were flash-frozen. Total RNA was extracted using commercial RNA purification kit.^d cDNA was synthesized using commercial kit^e and a mixture of random hexamer and oligo (dT)20 primers according to the instructions of the manufacturer. Real-time PCR was performed with the 7900HT Real-Time PCR system.^f *CCDC39* and internal control genes were detected by 20 ng template cDNA, 1× Absolute Blue QPCR SYBR Green Mix^g, and 0.1 μM primers in a total volume of 15 μL with a PCR condition of 15 minutes at 95°C and 40 cycles of 95°C for 15 seconds, and 60°C for 1 minute, followed by a dissociation curve analysis. Each assay was duplicated and analyzed with commercial software.^h We used 2 amplicons per gene. Data were normalized using 3 housekeeping genes (HPRT1, ACTB, and HMBS).

Crude protein extracts of testis, bronchial tissues, and lung were obtained after disruption and homogenization with a tissue lyserⁱ and total protein concentrations determined by a colorimetric test.^j Fifteen milligrams were diluted in 15 mL final volume (16 SDS gel-loading buffer) and loaded on a 5% stacking—10% resolving Tris-glycine SDS-Polyacrylamide gel. Proteins were separated by electrophoresis at 120 V–250 mA during 3 hours, visualized by Coomassie blue staining, and electro-transferred overnight to Hybond P PVDF membranes.^k Membranes were blocked with 5% skim milk in PBS-Tween 20 followed by incubation with polyclonal *CCDC39* antibody^l (1 : 200) in a total volume of 3 mL for 1 hour 30 min. After washing, the specific signal was detected by 1 : 1,500 conjugated secondary rabbit antibodies^m following the instructions of the manufacturer. Membranes were blocked with 5% skim milk in PBS-Tween 20.

A Taqman assay was developed to genotype the *CCDC39* mutation, with AGCATTTTAAGATCATTGCTGAGAGAGA as up PCR primer and TCCCGTATTGAAGTCATTTTCATTT TCCA as down PCR primer, and CTGGGATGAATAAAG GATGAAAT (Affected), CTGGGACGAATAAAGGATGAA AT (Wild type), and TCATCCTTTATTCATCCAG (quencher) as Taqman probes. Reactions were carried out on 7900HT instrument^e by standard procedures. The percentage of genotyping as well as the sensitivity and the specificity of the Taqman assay were determined by comparison between Taqman genotyping results and traditional sequencing method on 191 dogs.

Prevalence of the mutation among OES was determined by including most of the OES samples collected. In order to minimize bias that could lead to an overestimation of the prevalence of the mutation within European population, dogs used in the initial genotyping study as well as dogs that were closely related to the aforementioned were not included in the prevalence study. The percentages of negative, carrier, and affected dogs were also calculated. Dogs were recorded as negative (homozygous wild type) if only cytosine was present at codon 96 in exon 3 of the *CCDC39* gene. Dogs were recorded as carrier (heterozygous) if both cytosine and thymine were present in that position and samples were recorded as affected (mutated homozygous) if only thymine was present in that position. We also collected data regarding country of origin of the dog (breeder localization).

Results

History and Clinical Findings

Among the 5 initially identified dogs, 3 (dog 1–3) were 8-month-old females from the same litter containing 5 puppies, 1 (dog 4) was an 8-month-old male from another litter containing 9 puppies also including 2 other affected siblings. The last 1 (dog 5) came from another litter including 8 puppies and was diagnosed at 3 years old and 10 months.

All dogs presented few days after their birth recurrent chronic mucoid to mucopurulent bilateral nasal discharge, moist productive cough with intermittent episodes of dyspnea, pyrexia, and anorexia, resolving only transiently with various treatments (antibiotics, mucolytics, and nebulization). All dogs were in good body condition, bright, alert, and responsive.

On presentation, clinical signs included hyperthermia, tachypnea, bilateral mucopurulent nasal discharge, and positive tracheal pinch, inducing moist productive cough. Thoracic auscultation revealed pulmonary crackles in some dogs. Complete blood count revealed leukocytosis in all dogs, mainly neutrophilic and monocytic. Packed cell volume and biochemistry did not reveal abnormalities in any dog.

Further Investigations

Thoracic radiographs revealed severe bronchointerstitial pattern in all affected dogs, associated with

cranial bronchiectasis, alveolar pattern in cranial lung lobes compatible with bronchopneumonia or lung consolidation. The cardiac silhouette and the gastric fundus were in dextroposition on the ventro-dorsal projection because of situs inversus in 1 dog. Situs inversus was also identified on 2 additional affected dogs.

Direct rhinoscopy revealed hyperemic mucosa, moderate to large amounts of mucopurulent secretions, and moderate turbinate lysis. During bronchoscopy, hyperemic mucosa and large amounts of foamy mucoid secretions were observed along all the upper and lower airway tracts. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) analysis was compatible with acute bronchopneumonia in 3 cases and BALF culture were positive for different microorganism.

Spermogram conducted on 1 affected male revealed reduced number of sperm cells (78×10^6 , normal value: $>200 \times 10^6$) with reduced motility suggesting oligoasthenospermia. Sperm cells morphologic primary anomalies were identified in 55% including narrowed midpiece (32%) and shortened flagellum (22%) (Fig 1). 28% of sperm cells were normal whereas 19% of them had secondary anomalies.

Ultrastructural analysis of the ciliary epithelium of 3 affected dogs revealed large numbers of central microtubular pair abnormalities (37.4, 37.6, and 22.5%, respectively) compared to control dogs. The most prominent defect included absent or eccentric central pairs and occasional central displacement of

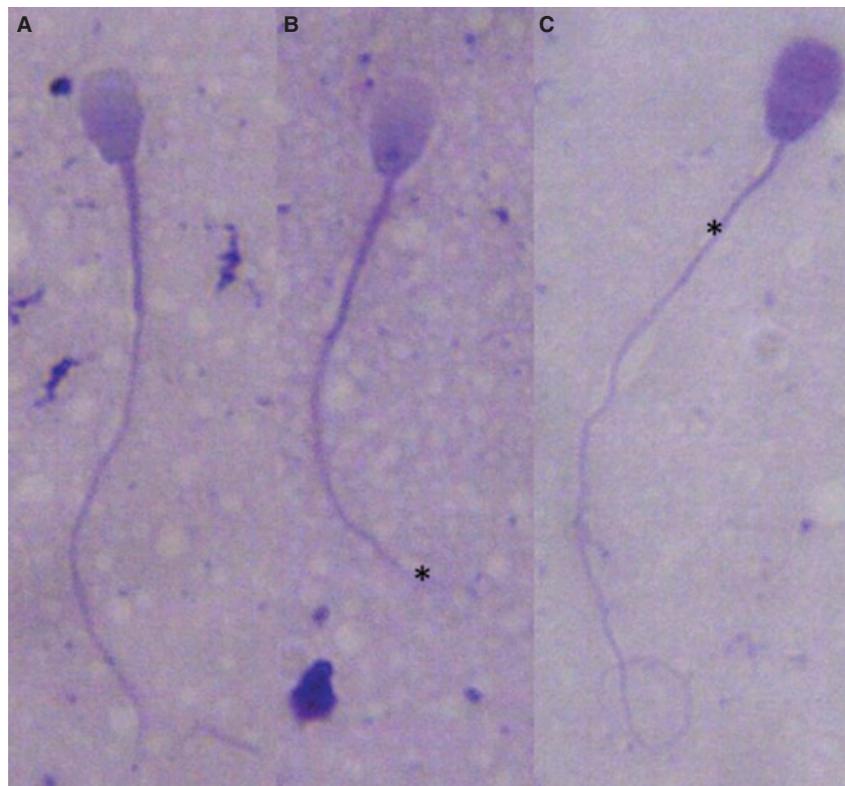


Fig 1. Spermatozoa from an affected dog after Diff-quick protocol staining, showing normal morphology (A), shortened flagella (B), and narrowed midpiece (C).

outer doublets. Electron microscopy also revealed reduction in the mean number of IDAs and high percentage of total secondary ciliary abnormalities (72.9, 61.5, and 52.3%, respectively) were also observed. Ciliogenesis of 1 dog confirmed central pair anomalies with eccentric location associated to peripheral doublet transposition into the middle of the axonema (Fig 2).

Pedigree Analysis

The pedigrees of all affected dogs were analyzed at least up to 4 generations (Fig 3). Pedigree analysis of the affected litters indicated a common closest ancestor to all parents and all affected dogs. This female lived in the eighties. This common ancestor won several dog shows and was used in Europe for breeding purpose. Interestingly, both parents of this female are coming from American line of OES. Litter analysis showed 28 affected dogs of 66 (42%) total offspring in 13 litters from phenotypically normal parents. Using Lenz-Hogben correction for bias of ascertainment, Chi-squared analysis confirmed that the litter analysis was consistent with a fully penetrant simple autosomal recessive mode of inheritance ($\chi^2 = 0.74$, $df = 1$, $P = .3871$).

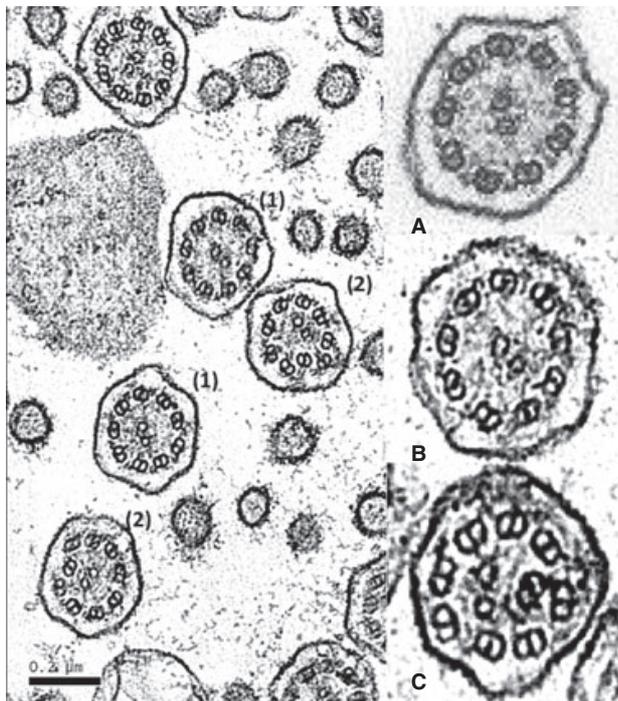


Fig 2. Electron microscopy of respiratory cilia from an affected OES showing the absence of IDAs (1) in all ciliary sections, and axonemal disorganization with mislocalized peripheral doublet and displacement of the central pair (2). Magnification of the axoneme showing a normal ciliary axonema (A), isolated absence of IDAs (B), and axonemal disorganization with mislocalized peripheral doublet and displacement of the central pair (C), suggesting a loss of nexin links and radial spokes.

Molecular Analysis

qRT-PCR analysis revealed a marked reduction in *CCDC39* mRNA within bronchial tissue from affected dogs compare to control dogs (Fig 4).

Western blot analysis revealed the presence of the *CCDC39* protein in tracheal and bronchial samples from healthy patient with the expected size of 110.4 kDa, whereas the protein was not present in tracheal and bronchial samples from affected dogs (Fig 5). This confirms the functional impact of the mutation with a complete loss of the protein in affected individuals.

The Taqman assay developed to genotype a large number of individuals to assess the prevalence of the mutation in OES population showed a good genotyping rate (98.45%) and a specificity and sensitivity of 100% by comparison with traditional sequencing method.

Prevalence of the Mutation

In total, the 561 OES DNA samples collected originated from 26 countries; 446 European samples from 22 countries, 110 samples from North America, and 5 samples from other countries. Forty-eight dogs were not included in the prevalence study because of close relationship with known affected dogs. Within these dogs, the proportion of negative dogs (wild type homozygous), carriers (heterozygous), and affected dogs (mutated homozygous) were 27% (13/48), 50% (24/48), and 23% (11/48), respectively. Among the remaining 513 dogs, the proportion of negative dogs (wild type homozygous) was 81% (321/398) in the European population and 93% (107/115) in the other countries. The proportion of carriers (heterozygous) were respectively 19% (76/398) and 7% (8/115), whereas affected dogs (mutated homozygous) were only identified in the European OES population (1/398; <1%). The prevalence of the mutation within European dogs and non-European dogs was 10 and 3.5%, respectively. Table 1 summarized the number of wild type homozygous, heterozygous, and mutated homozygous per country.

Discussion

This study focused on the clinical findings observed in OES diagnosed with PCD and on the prevalence of the causative mutation within a large population of OES. As expected, the most common clinical signs were nasal discharge, cough, pyrexia, bronchopneumonia, and leukocytosis. A subset of affected dogs also showed organ laterality defects. The final diagnosis was achieved through electron microscopy study and revealed an uncommon phenotype for PCD patients, characterized by central microtubular abnormalities and reduced number of dynein arms. The molecular analysis reported in this study confirmed the functional impact of the mutation with a reduced expression of *CCDC39* RNA and the absence of the

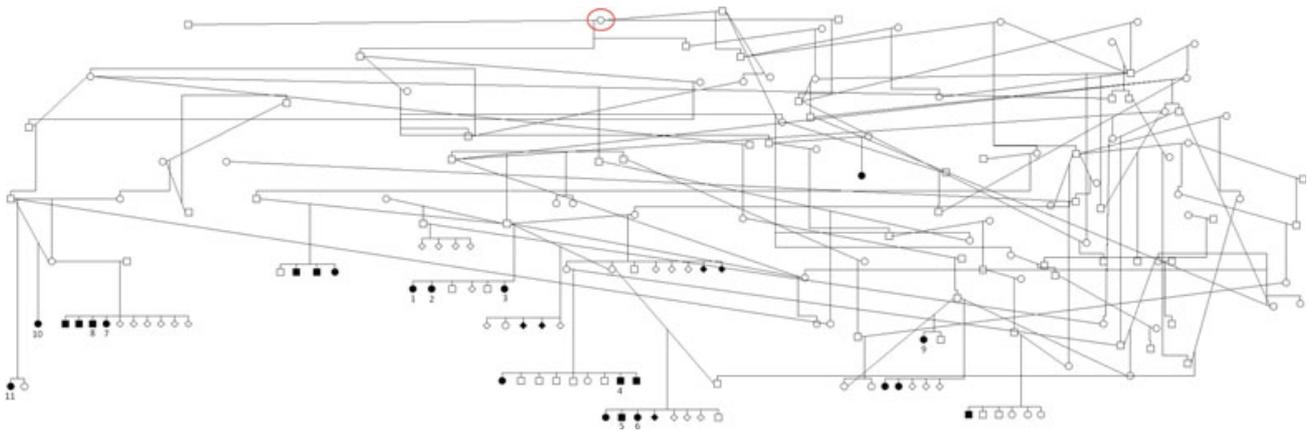


Fig 3. Pedigree of affected OES including 13 affected litters and 28 dogs with compatible clinical signs. The pedigree analysis was compatible with an autosomal recessive inherited pattern. All affected dogs and all their parents (obligated carriers) were at least linked once with the same common ancestor bitch (circled). Dogs 1–11 are dogs subsequently confirmed with the homozygous mutation in *CCDC39*.

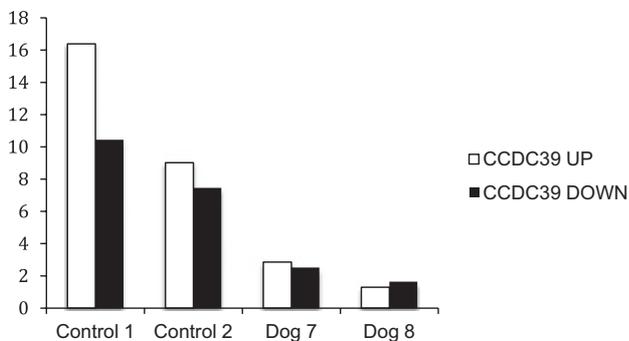


Fig 4. qRT-PCR showing marked reduction in *CCDC39* expression within bronchial tissue from 2 affected dogs compared to 2 control dogs. Two different amplicons were used.

protein in affected OES. A main finding of this study was a heterogeneous worldwide distribution of the mutation. Indeed, *CCDC39* mutation was more prevalent in the European OES population compared to non-European dogs. However, European dogs were not randomly selected which might contribute to an overestimation of the mutation prevalence in this subset of dogs.

PCD is a rare, heterogeneous group of inherited structural or functional abnormalities of cilia. It occurs in people with a frequency varying from 1/15,000 to 1/20,000.^{1,17,18} There is no sex, racial, or geographic bias but certain isolated communities might have a higher prevalence of PCD because of inbreeding. Therefore, it is not surprising that inbred population such as dog breeds tend to develop this disease and that PCD has been reported in more than 19 different breeds^{3–8} and PCD might even occur more frequently but may not be correctly diagnosed nor publicly reported.

As genetically heterogeneous PCD might vary in severity and the organ systems affected according to the gene implicated. In this pedigree, young onset, constant rhinosinusitis, and bronchopneumonia with recurrent acute episodes are typical of PCD as the ineffective

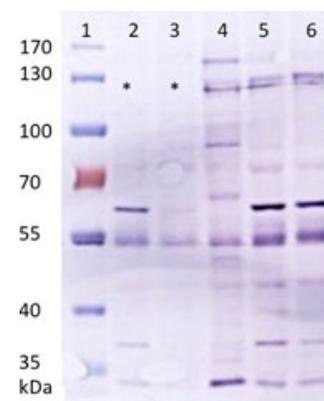


Fig 5. Western blot showing the presence of the *CCDC39* protein in tracheal, bronchial, and testicular samples from healthy patient with the expected size of 110.4 kDa and the absence of the protein in tracheal and bronchial samples (*) from affected dog. (1) Colored Ladder, (2) Bronchi (Affected), (3) Trachea (Affected), (4) Testis (Healthy), (5) Bronchi (Healthy), and (6) Trachea (Healthy).

ciliary beat results in an impaired mucociliary clearance. All the affected dogs had chronic bilateral nasal discharge and productive cough that had started few days after their birth as expected for a hereditary defect. The early onset is a key feature of this disease, but affected dogs might be misdiagnosed as cases of aspiration pneumonia, or neonatal respiratory virus infection and might contribute to an underestimation of the disease. All dogs were bright with only 1 pyrexia despite the severe respiratory disease. The hematologic changes were typical of recurrent airway infection and were characterized by neutrophilic and monocytic leukocytosis present in 4 of 5 dogs. Thoracic radiographs revealed severe changes in all cases with typical bronchopneumonia lesions affecting the cranial and middle lung lobes. Bronchoscopy and bronchoalveolar lavage confirmed bronchopneumonia. Four of 5 affected dogs

Table 1. Number of dogs and percentage of wild type homozygous, heterozygous, and mutated homozygous in 561 dogs from 26 different countries. Mutated homozygous were identified in 5 countries (Belgium, Denmark, France, Spain, and United Kingdom).

Country	Dogs Number	Healthy	Carrier	Affected
Austria	5	5		
Belgium	67	42 (63)	21 (31)	4 (6)
Canada	2	2		
Croatia	4	2 (50)	2 (50)	
Czech Republic	7	4 (57)	3 (42)	
Denmark	32	19 (59)	11 (34)	2 (6)
Estonia	2	2		
Finland	23	18 (78)	5 (22)	
France	74	54 (73)	17 (23)	3 (4)
Germany	28	27 (96)	1 (4)	
Greece	5	5		
Hungary	3	2 (67)	1 (33)	
Ireland	10	4 (40)	6 (60)	
Italy	11	10 (91)	1 (9)	
Japan	2	2		
Netherlands	27	22 (81)	5 (19)	
Norway	10	10		
Poland	12	9 (75)	3 (25)	
Portugal	1	1		
Russia	5	5		
South Africa	3	3		
Spain	24	16 (67)	6 (25)	2 (8)
Sweden	14	12 (86)	2 (14)	
Switzerland	27	23 (85)	4 (15)	
United Kingdom	55	42 (76)	12 (22)	1 (2)
United States	108	100 (93)	8 (7)	
Total	561	441	108	12

had bronchiectasis lesions suggesting continuous progression of the disease in older dogs. In human, this disease typically progresses to bronchiectasis during late childhood or early adulthood and can ultimately cause chronic respiratory failure.¹⁸

The diagnosis of PCD was strengthened by the identification of several cases of situs inversus. Situs inversus totalis, the complete transposition of the thoracic and abdominal organs, occurs in 50% of PCD cases in human and occurs in dogs.^{6,8,19} Situs inversus is an incidental finding which causes in the majority of cases no clinical problems. It is because of dismotility of cilia on the embryonic node, responsible for visceral orientation. The result is a visceral orientation determined by chance, explaining the 50% incidence.² We have identified situs inversus in one-third of these OES cases (data not shown). Discrepancy between this result and the expected 50% is most likely because of the small number of dogs studied.

The results of the semen analysis of 1 affected dog were typical of PCD with marked reduction in motility and high percentage of sperm cells morphologic primary anomalies visible under the light microscope and affecting sperm flagella. Semen analysis might contribute to the PCD diagnosis. However, the young onset of the disease makes its usefulness less obvious in affected puppies.

The diagnosis of PCD was definitely confirmed by defective ciliary ultrastructure under TEM. Those defects included loss of IDAs, displacement of the central pair of microtubules, and some peripheral doublets displaced centrally suggesting loss of radial spokes and nexin links. This ultrastructural phenotype is quite unusual as most of affected human beings and dogs show a loss of ODAs. It is worth mentioning that the ultrastructural findings identified in affected dogs were similar to those reported by Randolph et al, in 2 OES siblings.¹¹

Identifying the genes responsible for PCD is challenging because of locus and allelic heterogeneity. Currently, PCD-causing mutations have been identified in 20 human genes^{15,20–25} encoding a variety of axonemal components such as dynein arms, radial spoke, or dynein regulatory complex. A typical and common cause of motility defects is a reduction or loss of axonemal dyneins which provide the motility to the cilia, because of a mutation in one of the component of dynein arms (heavy, intermediate, or light chains). Each causative gene can be associated with particular ultrastructural ciliary defects and it is possible that a mutation in the orthologue genes might lead to the same ultrastructural defect in specific dog breeds. Therefore, careful ultrastructural analysis should be a first step to determine the best candidate genes and unravel eventually the genetic basis of PCD in various dog breeds.

These 20 genes only explain 50% of human PCD cases, more genes need to be identified. The dog is an ideal animal model to identify new causative genes.²⁶ First, it is a spontaneous model of the disease. Second, the ciliary structure is highly conserved across species and finally, purebred dogs represent populations with little genetic diversity that have arisen over a short period of time making genetic dissection potentially easier in dogs than in human. Indeed, this study has shown that only few dogs are required to identify a locus significantly associated with a recessive monogenic disease. Some other genetic studies in dogs have led to the identification of genes responsible for the corresponding monogenic disorder in human^{26,27} demonstrating that the dog is a useful model to elucidate genetic defect, especially monogenic recessive defect.

The functional impact of the mutation has been definitely confirmed by qRT-PCR and Western blot analysis showing reduced gene expression and absence of the corresponding protein in affected tissue compared to healthy individuals.

CCDC39 has been the first gene identified in canine PCD cases allowing for the development of a genetic test specifically designed for OES. This test not only gave us an idea of the prevalence of the mutation within the breed but also allowed to start a breeding program detecting silent carriers and preventing the birth of affected individuals. A Taqman assay was developed for this purpose with excellent sensitivity and specificity. The mutated allele was found both in European and in American OES, suggesting a worldwide distribution. However, the mutation has a higher frequency among European dogs with 19% heterozy-

gous individuals and a few homozygous only detected in European countries. The mutation shows a lower frequency in North America where we have tested more than 100 individuals with only 7% of heterozygous. The discrepancy between European and American populations might be partly explained by the nonrandom sampling of European OES. We tried to correct the nonrandom sampling for European OES by removing dogs used for the original genotyping study and dogs that were closely related to these affected dogs. However, European canine samples were not collected in a blind fashion as the American dogs. It is possible that breeders already exposed to the disease were more interested by a genetic test than other breeders inducing an overestimation of the mutation within the European OES population. This recruitment bias represents one of the limitations of our study.

The higher frequency in the European population might also be because of a founder effect as a result of the intensive use of a few champion dogs in Europe. Indeed, we were able to show that all affected dogs and their parents were at least related once to the same common ancestor. This could illustrate the negative impact of an intensive use of a champion dog responsible for spreading a rare variant within a breed. However, this finding does not confirm her as a carrier of the defective gene, but identifies the minimum age of the defective gene in the population studied. Interestingly, both parents of this female ancestor are coming from an American line of OES at the same period that Randolph et al¹¹ described the 2 affected OES with identical ciliary ultrastructural changes in the United States, suggesting that this genetic defect might segregate in the breed for at least 30 years. Because of the higher prevalence of the mutation in Europe, we recommend the systematic use of genetic test for avoiding breeding carriers and the birth of affected dog with associated economic loss for breeders.

In conclusion, this study reports the clinical manifestations of PCD on a significant number of OES. *CCDC39* is the first gene identified in dogs with PCD, and this study showed that the mutation of this gene is frequent in the OES population, especially in Europe. Furthermore, this study allowed the development of a simple genetic test (Taqman assay), which is currently available for breeding purpose.ⁿ The frequencies of the mutation reported in this study will need to be updated based on worldwide genetic screening of breeding populations. Finally, we believe that this approach might be used for PCD in other breeds to identify underlying genetic defect and should encourage us to collect data on all dogs affected by this disease.

Footnotes

^a Canine DNA bank from National Human Genome Research Institute, NIH

^b Paediatric bronchoscope, external diameter 4.8 mm, Fujinon EB-410S videoendoscope, ONYS
^c Affymetrix v2.0 Canine array, Santa Clara, CA
^d Canine DNA bank for University of Copenhagen
^e Promega Maxwell16 Total RNA Purification Kit, Madison, WI
^f Invitrogen SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR, Merelbeke, Belgium
^g Applied Biosystems, Foster City, CA
^h Thermo Fisher Scientific, Aalst, Belgium
ⁱ Biogazelle NV qBase plus software, Zwijnaarde, Belgium
^j Qiagen Tissue lyser system II, Venlo, Netherlands
^k Thermo Fisher Scientific Pierce BCA Protein Assay kit, Aalst, Belgium
^l GE Healthcare, Diegem, Belgium
^m Sigma-Aldrich, Diegem, Belgium
ⁿ Antagene. Veterinary genetic tests (<http://www.antagene.com>), Limonest, France

Acknowledgments

This work could not have been completed without the help of veterinarians and Old English Sheepdog breeders and owners. Special acknowledgment is given to Elaine Ostrander for providing supplementary canine DNA samples. This work was supported by grants from the European Union (FP7-LUPA, GA-201370) and from «Fonds de la Recherche Scientifique» (FRIA fellowship).

Conflict of Interest Declaration: Anne Thomas works in Antagene, Animal Genetics Laboratory, Limonest, France, which provided the genetic test.

References

- Zariwala MA, Knowles MR, Omran H. Genetic defects in ciliary structure and function. *Annu Rev Physiol* 2007;69:423–450.
- Ibanez-Tallon I, Heintz N, Omran H. To beat or not to beat: Roles of cilia in development and disease. *Hum Mol Genet* 2003;12:R27–R35.
- Clercx C, Peeters D, Beths T, et al. Use of ciliogenesis in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 2000;217:1681–1685, 1659.
- Edwards DF, Patton CS, Kennedy JR. Primary ciliary dyskinesia in the dog. *Probl Vet Med* 1992;4:291–319.
- De Scally M, Lobetti RG, Van Wilpe E. Primary ciliary dyskinesia in a Staffordshire Bull Terrier. *J S Afr Vet Assoc* 2004;75:150–152.
- Neil JA, Canapp SO Jr, Cook CR, et al. Kartagener's syndrome in a Dachshund dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 2002;38:45–49.
- Watson PJ, Herrtage ME, Sargan D. Primary ciliary dyskinesia in Newfoundland dogs. *Vet Rec* 1998;143:484.
- Durant AM. What is your diagnosis? Thoracic and abdominal situs inversus totalis. *J Am Vet Med Assoc* 2008;232:197–198.
- Dhein CR, Prieur DJ, Riggs MW, et al. Suspected ciliary dysfunction in Chinese Shar Pei pups with pneumonia. *Am J Vet Res* 1990;51:439–446.
- Morrison WB, Wilsman NJ, Fox LE, et al. Primary ciliary dyskinesia in the dog. *J Vet Intern Med* 1987;1:67–74.
- Randolph JF, Castleman WL. Immotile cilia syndrome in two Old English Sheepdog litter-mates. *J Small Anim Pract* 1984;25:679–686.

12. Edwards DF, Kennedy JR, Patton CS, et al. Familial immotile-cilia syndrome in English Springer Spaniel dogs. *Am J Med Genet* 1989;33:290–298.
13. Gherman A, Davis EE, Katsanis N. The ciliary proteome database: An integrated community resource for the genetic and functional dissection of cilia. *Nat Genet* 2006;38:961–962.
14. Pennarun G, Escudier E, Chapelin C, et al. Loss-of-function mutations in a human gene related to *Chlamydomonas reinhardtii* dynein IC78 result in primary ciliary dyskinesia. *Am J Hum Genet* 1999;65:1508–1519.
15. Olbrich H, Schmidts M, Werner C, et al. Recessive HYDIN mutations cause primary ciliary dyskinesia without randomization of left-right body asymmetry. *Am J Hum Genet* 2012;91:672–684.
16. Merveille AC, Davis EE, Becker-Heck A, et al. CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs. *Nat Genet* 2011;43:72–78.
17. Escudier E, Duquesnoy P, Papon JF, et al. Ciliary defects and genetics of primary ciliary dyskinesia. *Paediatr Respir Rev* 2009;10:51–54.
18. Morillas HN, Zariwala M, Knowles MR. Genetic causes of bronchiectasis: Primary ciliary dyskinesia. *Respiration* 2007;74:252–263.
19. Piantedosi D, Cortese L, Meomartino L, et al. Situs inversus totalis associated with subaortic stenosis, restrictive ventricular septal defect, and tricuspid dysplasia in an adult dog. *Can Vet J* 2011;52:1237–1242.
20. Zariwala MA, Omran H, Ferkol TW. The emerging genetics of primary ciliary dyskinesia. *Proc Am Thorac Soc* 2011;8:430–433.
21. Mitchison HM, Schmidts M, Loges NT, et al. Mutations in axonemal dynein assembly factor DNAAF3 cause primary ciliary dyskinesia. *Nat Genet* 2012;44:381–389, S381–S382.
22. Horani A, Ferkol TW, Shoseyov D, et al. LRRC6 mutation causes primary ciliary dyskinesia with dynein arm defects. *PLoS ONE* 2013;8:e59436.
23. Knowles MR, Leigh MW, Ostrowski LE, et al. Exome sequencing identifies mutations in CCDC114 as a cause of primary ciliary dyskinesia. *Am J Hum Genet* 2013;92:99–106.
24. Panizzi JR, Becker-Heck A, Castleman VH, et al. CCDC103 mutations cause primary ciliary dyskinesia by disrupting assembly of ciliary dynein arms. *Nat Genet* 2012;44:714–719.
25. Horani A, Druley TE, Zariwala MA, et al. Whole-exome capture and sequencing identifies HEATR2 mutation as a cause of primary ciliary dyskinesia. *Am J Hum Genet* 2012;91:685–693.
26. Karlsson EK, Lindblad-Toh K. Leader of the pack: Gene mapping in dogs and other model organisms. *Nat Rev Genet* 2008;9:713–725.
27. Grall A, Guaguere E, Planchais S, et al. PNPLA1 mutations cause autosomal recessive congenital ichthyosis in Golden Retriever dogs and humans. *Nat Genet* 2012;44:140–147.

Table 4. Clinical data and samples collected on 11 affected dogs. (BI: Broncho-interstitial; BP: Bronchopneumonia).

dog	sex	Age	Physical Exam	Haematology	Thoracic radiographs	Bronchoscopy	BALF analysis and culture	<i>Situs Inversus</i>	Sampling
1	F	8 m	Hyperthermia (40,2°C), crackles, Tracheal mucus	Leucocytosis Neutrophilia Monocytosis	Severe BI pattern, Cranial bronchi bronchiectasy, alveolar pattern in cranial lung lobes and right medial lung lobe	Mucus +++	Acute BP (Neutrophilia +++) Culture : < 10000 - Streptococcus viridans - Serratia marcescens	Confirmed (X-rays)	Tracheal and bronchial biopsies (TEM) DNA
2	F	8 m	Tracheal mucus, positive tracheal pinch	Leucocytosis Neutrophilia Monocytosis	Severe BI pattern, Cranial bronchi bronchiectasy	/	Acute BP (Neutrophilia +++) Culture : < 10000 - Serratia marcescens	Exclusion (X-rays)	Tracheal and bronchial biopsies (TEM) EDTA (DNA)
3	F	8 m	Crackles, + tracheal pinch	Leucocytosis Neutrophilia Lymphocytosis	Severe BI pattern, Cranial bronchi bronchiectasy, alveolar pattern in ventral part of cranial lung lobes.	/	/	Exclusion (X-rays)	EDTA (DNA)
4	M	7 m	Hyperthermia (39,5°C), + tracheal pinch	Mild monocytosis	Severe BI pattern	Mucus +, Bronchial mucosal oedema	(Leucocytes ++) Culture : < 10000 - Pseudomonas aeruginosa	Exclusion (X-rays)	Tracheal and bronchial biopsies (TEM) EDTA (DNA)
5	F	18 m	Unremarkable	/	/	/	/	Undetermined	EDTA (DNA)
6	M	3 y 10 m	Unremarkable	Leucocytosis Neutrophilia	Severe BI pattern, Cranial bronchi bronchiectasy, alveolar pattern in cranial lung lobes	/	/	Exclusion (X-rays)	Sperm EDTA (DNA)
7	F	8 d	/	/	/	/	/	Exclusion (necropsy)	Nose, Trachea, Bronchia (DNA, RNA)
8	M	8 d	/	/	/	/	/	Exclusion (necropsy)	Nose, Trachea, Bronchia (DNA, RNA)
9	F	7 d	/	/	/	/	/	Confirmed (necropsy)	Tongue (DNA)
10	F	18 m	/	/	/	/	/	Confirmed (X-rays)	EDTA (DNA)
11	F	18 m	/	/	/	/	/	Undetermined	EDTA (DNA)

Discussion et perspectives

L'objectif de ce travail était d'identifier les bases génétiques de la DCP chez le bobtail. L'analyse du pedigree a permis de suspecter un mode de transmission autosomique récessif. Par la suite, l'analyse d'association génome entier combinée à une approche par gène candidat a permis de restreindre drastiquement le nombre de gènes candidats. Le séquençage de ces quelques gènes candidats a mené à l'identification d'une mutation non-sens au sein de *CCDC39* à l'état homozygote chez les chiens atteints, confirmant ainsi le mode de transmission autosomique récessif.

L'impact fonctionnel de la mutation a été démontré à l'aide de différentes techniques. L'identification d'un phénomène de dégradation de l'ARNm anormal, la démonstration de l'expression de *CCDC39* dans des tissus ciliés, tant chez la souris que chez l'homme, et l'absence de la protéine au sein des cellules ciliées atteintes, sont autant d'éléments en faveur d'un impact fonctionnel de cette mutation. La démonstration de l'apparition de défauts de latéralité suite à l'injection de morpholinos dans des embryons de zebrafish et surtout leur disparition lors de co-injection de mRNA sauvage a définitivement confirmé l'importance de ce gène dans la fonction ciliaire. Par la suite, notre étude a démontré l'implication de ce gène dans les cas de DCP humaines, grâce à l'identification d'une quinzaine de mutations associées à des pertes de fonction. Par contre, le séquençage d'une cohorte de patients présentant un phénotype ultrastructurel différent et d'une importante cohorte de patients hétérotaxiques n'a pas permis d'impliquer *CCDC39* dans ces autres formes de ciliopathies. Quant au phénotype clinique présenté par les chiens atteints, nous avons pu démontrer qu'il était remarquablement similaire à celui de l'homme, avec une atteinte importante des voies respiratoires, mais également des anomalies spermatiques chez le mâle et l'existence de *situs inversus* chez certains des chiens atteints. Enfin, nous avons démontré que la fréquence de la mutation n'était pas répartie uniformément, avec une prévalence plus importante au sein de la population européenne de bobtail, comparativement à la population américaine.

Une protéine riche en domaine « coiled-coils »

La première étude a permis de mettre en évidence une nouvelle protéine impliquée dans les DCP. Cette protéine a pour particularité d'être enrichie en domaine « coiled-coils » puisqu'elle en contiendrait jusque dix. Un « coiled-coil », que l'on pourrait traduire par « super-hélice », est un motif structurel d'une protéine dans lequel 2 à 5, et parfois 7 hélices alpha sont regroupées

ensemble comme les différents brins d'une corde. Ces « coiled-coils » sont relativement fréquents et représentent de 3 à 5% de la totalité des acides aminés. Ils sont habituellement composés d'un ensemble de 7 résidus, *abcdefg*, qui se répètent, incluant des acides aminés apolaires en position *a* et *d* que l'on retrouve à l'interface des hélices, alors que *e* et *g* sont des résidus chargés qui donne la spécificité entre les différentes hélices grâce aux interactions électrostatiques (Burkhard *et al.*, 2001; Mason et Arndt, 2004). La stabilité des « coiled-coils » est obtenue grâce à une structure dite de « bouton dans le trou » où les résidus apolaires se regroupent au milieu et sont maintenus grâce à un noyau hydrophobique (Crick, 1953) (Figure 13). Leur forme varie en fonction de la séquence des acides aminés, mais peut également être modulée par le pH ou par des phénomènes de phosphorylation ou d'interactions ioniques. En conséquence, les protéines possédant des domaines « coiled-coils » peuvent être changeantes et « pliables » ce qui les rend adaptables à de nombreuses fonctions biologiques. On les retrouve en tant que constituant du cytosquelette, protéines motrices, mais également dans des systèmes de reconnaissance moléculaire, notamment lors de la transcription.

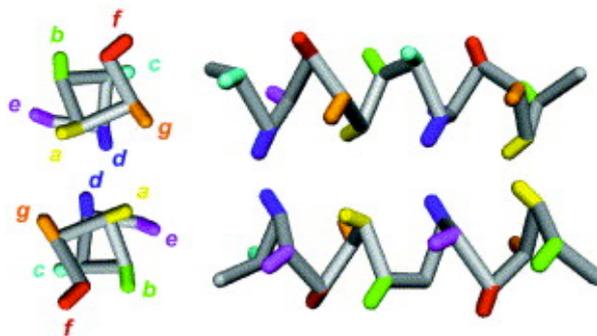


Figure 14 : Deux vues perpendiculaires d'un « coiled-coil » à deux hélices. Les résidus en position *a* et *d* représentent l'interface des 2 hélices et sont entourés des résidus en position *e* et *g* (Burkhard *et al.*, 2001).

Les bases de données relatives aux cils reprennent de nombreuses protéines riches en domaines « coiled-coils », notamment au niveau du N-DRC (Lin *et al.*, 2011) et au niveau des bras de dynéine (Gee *et al.*, 1997). Cependant, *CCDC39* a été la première protéine de ce type à être impliquée dans les DCP. Depuis lors, six autres gènes codant pour des protéines riches en « super-hélices » ont été impliqués ; *CCDC40*, *CCDC65*, *CCDC103*, *CCDC114*, *CCDC151* et *CCDC164*. L'identification de plusieurs gènes codant pour des protéines riches en domaine « coiled-coils » souligne l'importance de celles-ci dans la fonction du cil mobile. La fonction exacte de ces protéines est encore à préciser. Elles semblent toutefois jouer un rôle prépondérant dans la structure du N-DRC {*CCDC65*, *CCDC164*, *CCDC40*, *CCDC39*} (Becker-Heck *et al.*, 2010; Merveille

et al., 2010; Horani *et al.*, 2013a; Wirschell *et al.*, 2013) et dans l'ancrage des bras de dynéine aux microtubules {CCDC103, CCDC151, CCDC114}(Panizzi *et al.*, 2012; Knowles *et al.*, 2013a; Hjeij *et al.*, 2014). Certaines de ces protéines interagissent entre elles. C'est le cas de CCDC151 qui est indispensable au bon positionnement de CCDC114 (Alsaadi *et al.*, 2014)}, mais également de CCDC39 et CCDC40 (Becker-Heck *et al.*, 2010).

CCDC39 et CCDC40, deux protéines qui partagent de nombreux points communs

Parallèlement à la découverte de *CCDC39*, l'équipe du Professeur Omran a mis en évidence que des mutations au sein de *CCDC40* étaient responsables d'un phénotype ultrastructurel similaire à celui de *CCDC39*, à savoir une absence de BDI associée à une désorganisation axonémale (Becker-Heck *et al.*, 2010). En immunofluorescence, les cellules mutées se caractérisent par une absence de DNALI1, un composant des BDI et une absence de GAS8, une sous-unité du N-DRC. De plus, l'absence de *CCDC40* affecte la localisation axonémale de *CCDC39*. En effet, on observe au sein des cellules mutées pour *CCDC40*, que *CCDC39* est absent de l'axonème ciliaire et que la protéine s'accumule dans la portion apicale du cytoplasme, à la base du cil. Cette découverte suggère que *CCDC40* joue un rôle dans le recrutement axonémal de *CCDC39*. Les anomalies observées en microscopie électronique et en immunofluorescence suggèrent que ces deux protéines pourraient être des constituants du N-DRC, dont la composition précise reste à déterminer (Heuser *et al.*, 2009). Toutefois, le fait qu'aucune de ces protéines n'apparaisse dans les études de protéomiques s'intéressant à la composition du N-DRC, n'est pas en faveur de cette hypothèse. *CCDC39* et *CCDC40* pourraient plutôt jouer un rôle dans l'assemblage ou le transport des sous-unités du N-DRC et/ou des BDI. Cette hypothèse est renforcée par le fait que ces deux protéines contiennent deux larges domaines conservés SMC, pour « Structural Maintenance of Chromosomes », que l'on retrouve dans plusieurs protéines ciliaires. Ces domaines SMC joueraient un rôle dans le transport intraflagellaire et pourraient représenter des séquences signatures qui seraient reconnues pendant le processus de transport (Chang *et al.*, 2006).

CCDC39 : nombreuses mutations, un seul phénotype

Dans la première étude, nous avons identifié 15 mutations différentes, toutes associées à une perte de fonction. En effet, les mutations identifiées étaient soit liées à un codon stop prématuré, soit liées à une insertion ou une délétion d'un ou plusieurs acides aminés, soit liés à une mutation au niveau des sites obligatoires d'épissage. Toutes ces mutations sont

vraisemblablement responsables d'une absence de production de la protéine, secondaire à un phénomène de dégradation de l'ARNm (mRNA decay), comme nous avons pu le mettre en évidence chez le chien. Cela signifie que l'atteinte des BDI et la désorganisation axonémale observées sont liées à une absence totale de cette protéine.

Ce constat a été confirmé par la suite par deux études différentes portant sur deux cohortes de patients humains atteints de DCP présentant un phénotype ultrastructurel similaire ou approchant (absence de BDI uniquement). Dans ces deux études, les portions codantes ainsi que les jonctions intron-exon de *CCDC39* et *CCDC40* ont été séquencées. La première étude comportait 40 familles différentes (Blanchon *et al.*, 2012), dont 15 faisaient déjà partie de notre étude. La seconde, comprenait 54 patients provenant de familles non apparentées (Antony *et al.*, 2013). Comme dans notre étude, les mutations étaient présentes soit à l'état homozygote, soit à l'état d'hétérozygote composite, confirmant le mode de transmission autosomique récessif. Ces deux études ont permis de mettre en évidence 17 nouvelles mutations au sein de *CCDC39*, pratiquement toutes liées à une perte de fonction. Enfin, trois mutations dont deux nouvelles ont également été mises en évidence en utilisant des techniques de séquençage à haut débit dans une cohorte de patients atteints de DCP (Zariwala *et al.*, 2013). A l'heure actuelle, 34 mutations différentes de *CCDC39* ont été rapportées.

Toutes les mutations identifiées au sein de *CCDC39* sont systématiquement associées à un phénotype ultrastructurel bien particulier. En effet, dans notre étude, aucune mutation n'a été identifiée chez des patients atteints de DCP avec un autre phénotype ultrastructurel (atteinte unique des BDI ou atteinte des deux types de bras de dynéine). De même, Zariwala *et al.* en séquençant toutes les portions codantes du génome de 31 familles de patients DCP avec divers phénotypes ultrastructuraux, n'ont pas mis en évidence de mutations au sein de *CCDC39* pour d'autres types de phénotypes ultrastructuraux (Zariwala *et al.*, 2013). De plus, les mutations identifiées dans les autres études étaient systématiquement présentes chez des patients présentant le même phénotype. La contribution de *CCDC39* à d'autres ciliopathies reste à explorer, toutefois, nous avons pu démontrer qu'il ne joue pas un rôle majeur dans le développement des défauts de latéralité, puisqu'aucune mutation n'a été identifiée chez plus de 200 patients hétérotaxiques.

CCDC39 et *CCDC40* représentent les gènes responsables de la grande majorité des cas de DCP présentant une absence de BDI et une désorganisation axonémale puisqu'ils expliquent à eux seuls entre 69% et 88% des patients présentant ce type d'anomalie (Blanchon *et al.*, 2012; Antony *et al.*, 2013). Pour ce phénotype particulier, il existe donc une corrélation importante

entre le génotype et le phénotype ultrastructurel. Ce qui permet de souligner une fois de plus, l'importance de la microscopie électronique dans la sélection des gènes candidats lors du dépistage. Il est intéressant de noter que la prévalence de l'atteinte de *CCDC39* varie en fonction de l'étude et donc de l'origine de la population étudiée, allant de 17 à 65 %. Une partie de cette variation pourrait être liée à un effet fondateur pour certaines des mutations observées.

Chez le chien

Notre seconde étude s'est intéressée au phénotype clinique et à la prévalence de la mutation au sein de la race bobtail. Sans surprise, les signes cliniques présentés par les chiens atteints étaient remarquablement similaires à ceux décrits dans les autres races de chiens, mais également à ceux décrits dans l'espèce humaine (Noone *et al.*, 2004; Jain *et al.*, 2007). En effet, l'atteinte prédominante, comme chez l'homme, était celle des voies respiratoires. Nous avons pu également démontré l'atteinte du système reproducteur chez un des mâles affectés ainsi que l'existence de défauts de latéralité chez une certaine proportion des individus atteints. Le diagnostic de DCP a été définitivement établi par l'étude en microscopie électronique réalisée sur des cellules respiratoires prélevées chez des chiens atteints. Cet examen a permis de mettre en évidence un phénotype ultrastructurel identique à celui de certaines DCP humaines mais relativement rares dans l'espèce canine.

L'identification de la mutation causale dans *CCDC39* a permis de développer par la suite, un test génétique rapide, basé sur la technique Taqman et destiné aux éleveurs. L'usage de ce test a permis de déterminer la prévalence de la mutation au sein de la race. Nous avons observé une fréquence plus importante de la mutation au sein de la population européenne par rapport au reste du monde. Cette différence pourrait être liée en partie à un effet fondateur suite à l'usage intensif de certains « grands champions » et illustrer ainsi l'impact négatif de l'utilisation d'un pool limité de gènes, qui donne lieu à une dissémination de rares variants délétères. La disponibilité de ce test permet d'apporter dès aujourd'hui un conseil génétique aux éleveurs. On peut déjà souligner que l'usage de ce test et le dépistage systématique des porteurs ne devrait pas être associé à un retrait de ces animaux du pool des reproducteurs. En effet, même si à terme le retrait de ces chiens porteurs permettra d'éradiquer la mutation au sein de la race, il sera à l'origine d'une perte de diversité génétique (Proschowsky *et al.*, 2003) et potentiellement responsable d'une augmentation de la fréquence d'autres allèles délétères. L'objectif du conseil génétique devrait être plutôt d'éviter la survenue de nouveaux chiens atteints tout en préservant la diversité génétique. Si un animal est porteur de la mutation, on conseillera alors de le croiser avec des chiens homozygotes sauvages et de génotyper systématiquement les descendants pour

la mutation. Ces mesures permettront non seulement d'éviter l'apparition de nouveaux atteints mais également d'améliorer la qualité globale de la race (Traas *et al.*, 2006). La fréquence de l'emploi de ce test génétique est difficilement calculable. En comparant le nombre de naissance pour la race par an et le nombre de chiens testés, on observe que en Belgique, sur les nichées des quatre dernières années, environ un quart des chiens ont été testés. Tandis qu'en France, le test génétique n'a été réalisé que sur 1/8 des chiens. La fréquence de l'emploi de ce test varie probablement beaucoup de pays en pays, et reflète vraisemblablement des différences en matière de fréquence de la mutation au sein de ces populations.

Le chien un bon modèle pour l'homme ?

La première étude réalisée permet de souligner l'intérêt du chien en tant qu'organisme modèle pour identifier les bases moléculaires de certaines pathologies chez l'homme.

Pourquoi le chien est-il un bon modèle ? Une première explication est la place privilégiée qu'occupe le chien dans notre société où il fait souvent partie de la cellule familiale. Ce changement de statut a permis d'améliorer les connaissances des différentes pathologies qui touchent l'espèce canine ainsi que les moyens mis en œuvre pour les diagnostiquer et les soigner (Case, 2008; Haimowitz, 2012). La domestication du chien et la création par l'homme de très nombreuses races, à la recherche de standards de beauté ou de comportements particuliers, a malheureusement eu un impact extrêmement négatif sur la santé des animaux, en concentrant de façon involontaire, des allèles morbides ou des combinaisons non adéquates d'allèles. Ainsi, plusieurs centaines de maladies héréditaires ont été identifiées dans l'espèce canine, dont beaucoup présentent de grandes similarités avec des pathologies humaines (Tsai *et al.*, 2007). Dans la base de données OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals, <http://omia.angis.org.au/home/>, accès le 09 décembre 2014) 352 maladies génétiques canines étaient considérées comme des modèles potentiels pour l'espèce humaine, et le chien représentait la première espèce d'animaux domestiques, en terme du nombre de pathologies potentiellement intéressantes pour l'homme. Les deux espèces ont également un autre point commun d'importance : elles partagent une plus grande partie de leur répertoire génétique que d'autres organismes modèles comme la souris (Lindblad-Toh *et al.*, 2005; Derrien *et al.*, 2009), rendant l'identification de gènes d'intérêt chez le chien particulièrement importante pour des maladies similaires chez l'homme (Lin *et al.*, 1999; Van De Sluis *et al.*, 2002; Grall *et al.*, 2012), et inversement (Mellersh *et al.*, 2006).

Cet enrichissement en allèles délétères est la conséquence de la création des races modernes. Premièrement, un faible nombre de chiens est à l'origine de chaque race. De plus, certaines races

ont subi des goulots de population, notamment pendant la seconde guerre mondiale. Enfin, l'utilisation intensive de certains « champions » a réduit la population d'effectifs efficaces au sein de certaines races (Asher *et al.*, 2009; Chase *et al.*, 2009). L'origine de la race Bobtail n'est pas bien définie, mais la seconde étude suggère que l'usage intensif de certains chiens (grands champions) a pu être un des facteurs à l'origine de la « dissémination » de la mutation au sein de la population européenne de Bobtails.

Les races de chiens représentent donc des isolats génétiques possédant une hétérogénéité génétique et phénotypique limitée, similaires à des populations humaines isolées géographiquement (Parker et Ostrander, 2005). Les isolats génétiques représentent depuis longtemps des populations très intéressantes pour disséquer les origines génétiques de certaines pathologies et mieux comprendre le génome des mammifères (Alkuraya, 2010).

Un autre atout du chien, est sa structure génétique particulière. L'histoire de la domestication et de la création des races modernes est à l'origine de cette structure particulièrement intéressante. Le déséquilibre de liaison est très grand au sein d'une race, comparativement à l'homme (2 Mb vs 0,28 Mb), par contre la diversité haplotypique est limitée. De plus, les différentes races de chiens partagent un nombre important d'haplotypes entre elles et le déséquilibre de liaison entre races est très court (10 Kb). En fait, les deux tailles de déséquilibre de liaison sont la conséquence de deux goulots d'étranglements distincts dans l'histoire de la population canine. Le déséquilibre de liaison court est la conséquence de la sélection du chien domestique à partir du loup, il y a plusieurs dizaines de milliers d'années (et par conséquent du nombre de génération depuis lors). Le déséquilibre de liaison long provient de la création récente des races modernes de chiens. En conséquence, comparativement à l'homme, un plus faible nombre de marqueurs, ainsi qu'un faible nombre d'individus sont souvent suffisants pour mener une étude d'association. Ces caractéristiques en font un modèle idéal pour disséquer génétiquement des caractères mendéliens, mais aussi des caractères complexes (Lindblad-Toh *et al.*, 2005).

Afin d'exploiter au mieux la structure génétique particulière des races de chiens, une stratégie de cartographie en deux étapes peut être utilisée. La première étape met à profit le long déséquilibre de liaison au sein d'une race pour identifier l'haplotype d'intérêt, tandis que la seconde étape de cartographie fine repose sur le déséquilibre de liaison court entre les races. C'est en utilisant cette stratégie que le gène responsable de la robe blanche des boxers a été identifié, ou encore celui de la crête dorsale du Rhodesian Ridgeback (Karlsson *et al.*, 2007). Les DCP ne se prêtent pas très bien à ce type de stratégie. D'une part, parce qu'il s'agit d'une

ciliopathie relativement rare qui touche très peu de chiens. D'autre part, parce que les DCP regroupent des phénotypes ultrastructurels variés qui sont la conséquence de mutations dans différents gènes. La seconde étape de la stratégie décrite ci dessus, à savoir une étude d'association entre différentes races souffrant de la même pathologie, est particulièrement difficile à réaliser. En effet, aucune des races atteintes par une DCP ne présente un défaut ultrastructurel comparable à celui des bobtails.

En l'absence de cette étape de cartographie fine, la région homozygote identifiée chez les chiens atteints était très grande (15 Mb) et contenait plus de 150 gènes. Par analogie aux méthodes utilisées pour identifier des gènes impliqués dans les DCP, nous avons combiné l'étape de cartographie avec une approche par gène candidat en utilisant les deux bases de données disponibles reprenant les gènes impliqués, de près ou de loin, dans la structure et / ou la fonction des cils. Cette approche a permis de réduire drastiquement le nombre de candidats potentiels à séquencer et illustre l'importance des bases de données et des outils de bio-informatiques qui facilitent l'identification de nouveaux variants génétiques.

L'identification de gènes responsables de certaines pathologies chez le chien peut apporter un éclairage sur la pathogénèse de ces maladies. En effet, l'identification de *CCDC39* a permis de mieux comprendre la composition de l'axonème ciliaire et a permis de souligner l'importance des protéines riches en domaine « coiled-coils » dans la composition et l'assemblage de l'axonème ciliaire.

Développement de nouvelles thérapies ?

Le but ultime de l'identification de nouveaux gènes responsables de certaines maladies est de développer de nouvelles cibles thérapeutiques prenant en compte les caractéristiques uniques de chaque individu. Le chien souffrant des mêmes pathologies que l'homme représente une opportunité unique pour tester et développer de nouvelles thérapies comme la thérapie génique (Switonski, 2014) ou des thérapies visant à corriger la protéine défectueuse. Il représente un meilleur organisme modèle que la souris à plusieurs égards. Tout d'abord par son métabolisme et sa taille, le chien est plus proche de l'espèce humaine que la souris. De plus, sa longévité permet de tester les effets à long terme d'un traitement, ce qui n'est pas possible chez les rongeurs. Le chien a par exemple été utilisé avec succès, comme modèle expérimental pour une thérapie génique, dans plusieurs pathologies monogéniques. C'est le cas de l'amaurose congénitale de Leber, une dystrophie rétinienne présente chez l'homme et chez le Briard pour laquelle une thérapie génique a été mise au point chez le chien. Pour cette pathologie, le cDNA « sauvage » du gène déficient, a été incorporé dans un vecteur, un virus adéno-associé, puis

cloné et injecté sous la rétine des chiens atteints. Ce traitement a permis la restauration de la fonction visuelle de ces chiens (Acland *et al.*, 2005). Quelques années plus tard, des essais thérapeutiques chez des enfants atteints ont été réalisés, avec des résultats très encourageants, puisque la fonction visuelle de ces enfants était améliorée et que le traitement était bien toléré (Hufnagel *et al.*, 2012). Très récemment, des essais thérapeutiques ont été réalisés chez des chiens atteints de muchopolysaccharidose (Xing *et al.*, 2013) ou de dystrophie musculaire de Duchenne (Le Guiner *et al.*, 2014), et les premiers résultats semblent prometteurs.

Les bobtails atteints de DCP pourraient servir de modèle expérimental pour mettre au point de nouvelles thérapies. Les thérapies disponibles pour les patients DCP visent à réduire l'inflammation et à améliorer la clairance des voies respiratoires. A l'heure actuelle, il n'existe pas de thérapie ciblée visant à corriger la fonction ciliaire anormale de ces patients. D'une part, parce que les DCP présentent une complexité génétique importante et d'autre part parce que la prévalence de la maladie est faible dans la population générale. En revanche, de nombreux essais thérapeutiques ciblés ont été réalisés et sont en cours chez des patients atteints de mucoviscidose (Kumar *et al.*, 2014). Les cellules ciblées par la thérapie génique dans le cadre de la mucoviscidose, sont les mêmes que celles des DCP, à savoir les cellules ciliées de l'épithélium respiratoire. Dès lors, les connaissances et techniques acquises dans le cadre des essais thérapeutiques de la mucoviscidose peuvent être aisément extrapolées aux DCP. Dans le cadre de ce type de maladie, deux approches visant à corriger le défaut moléculaire sous-jacent sont possibles, la thérapie génique ou la réparation de la protéine anormale.

Le but de la première approche est de corriger l'altération génétique en introduisant des copies du gène sauvage dans les cellules respiratoires des patients atteints. La thérapie génique implique l'insertion d'une copie sauvage du gène dans un vecteur viral ou non. Le vecteur sert alors de véhicule afin d'insérer le nouvel ADN dans la cellule cible. Il existe des vecteurs viraux comme des adénovirus, ou adénovirus associés ou encore des lentivirus. Il existe également des vecteurs non-viraux comme des lipides cationiques qui pénètrent la membrane cytoplasmique grâce à un phénomène d'endocytose. La thérapie génique dans le cadre des pathologies respiratoires comporte un certain nombre de difficultés (Griesenbach et Alton, 2013). La plus importante est sans doute de franchir les différentes barrières de protection de l'épithélium respiratoire pour délivrer l'ADN au sein du noyau des cellules cibles. Le vecteur ainsi employé doit tout d'abord traverser la couche de mucus présente à la surface de l'épithélium respiratoire, sans être éliminé par les mécanismes de clairance (toux). Cette barrière est encore plus difficile à franchir lorsque de l'inflammation ou des infections sont présentes, ce qui est une constante dans les cas de mucoviscidose ou de DCP. En plus de cette barrière physique, une surveillance

immunitaire est présente dans les poumons et est susceptible d'arrêter certains de ces vecteurs, notamment les vecteurs viraux. L'existence d'anticorps liés à des infections virales respiratoires précédentes peuvent être à l'origine d'une neutralisation des vecteurs (Chirmule *et al.*, 1999). En plus des anticorps préexistants, une réponse immunitaire cellulaire et humorale peut se développer après l'administration de vecteurs viraux, rendant les administrations suivantes inefficaces. L'étape suivante est de traverser la membrane cytoplasmique de la cellule cible, soit par fusion, soit par endocytose, ce qui peut représenter une étape limitante, notamment pour les vecteurs non-viraux. Enfin, dans la plupart des cas, les vecteurs doivent encore traverser la membrane nucléaire qui est une barrière importante, notamment pour les vecteurs non-viraux (Griesenbach et Alton, 2013). Une autre difficulté de la thérapie génique est une capacité de stockage limitée de certains vecteurs empêchant l'insertion de gène de grande taille (Duan *et al.*, 2001). C'est l'ensemble de ces difficultés qui expliquent le succès limité des différents essais de thérapies géniques dans la mucoviscidose (Kumar *et al.*, 2014).

La seconde approche vise à corriger le défaut fonctionnel au niveau de la protéine en utilisant des substances spécifiques en fonction du type de mutation présente dans le gène responsable afin de « corriger » la protéine anormale. Pour la mucoviscidose, les traitements varient en fonction du type de mutation causale et de l'impact fonctionnel des différentes mutations. Dans le cadre d'un codon stop prématuré, comme c'est le cas pour la mutation identifiée chez le bobtail, on utilise des médicaments qui préviennent l'identification de ce stop prématuré pour que la synthèse de la protéine puisse continuer. Ces molécules sont appelées des supprimeurs de codon stop. Parmi ces molécules, on peut citer les aminoglycosides qui ont la capacité de « masquer » un codon stop prématuré en insérant un acide aminé qui permet au ribosome de poursuivre la lecture du gène d'intérêt. Une étude réalisée chez la souris, démontrait que la protéine pouvait être synthétisée et que 35% de la fonction de la protéine pouvaient être retrouvés (Howard *et al.*, 1996). Les correcteurs de *CFTR* ont pour but de corriger un défaut de transport de la protéine formée tandis que les potentiateurs ciblent la protéine à la surface de la cellule pour améliorer sa fonction. Cette seconde approche semble plus prometteuse et un premier médicament (ivacaftor) a récemment été mis sur le marché afin de traiter des patients atteints de mucoviscidose, portant une mutation faux sens (Van Goor *et al.*, 2009).

Dans un futur plus ou moins proche, les patients atteints de DCP pourraient eux aussi bénéficier du développement d'une médecine personnalisée, propre à leurs mutations causales. Cependant, le développement de ces nouvelles modalités thérapeutiques est compliqué par le grand nombre de gènes et de mutations impliqués dans les DCP, la faible prévalence de cette pathologie et passera obligatoirement par une meilleure compréhension de la fonction des différentes

protéines impliquées dans cette pathologie. Le recours à des organismes modèles, comme le chien, peut certainement apporter un éclairage nouveau sur cette pathologie et contribuer au développement de nouvelles thérapies.

Références bibliographiques :

ABU-MUSA A., NASSAR A., USTA I. In vitro fertilization in two patients with Kartagener's syndrome and infertility. *Gynecologic and obstetric investigation*, 2008, **65**, 29-31.

ACLAND G.M., AGUIRRE G.D., BENNETT J., ALEMAN T.S., CIDECIYAN A.V., BENNICELLI J., DEJNEKA N.S., PEARCE-KELLING S.E., MAGUIRE A.M., PALCZEWSKI K., HAUSWIRTH W.W., JACOBSON S.G. Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2005, **12**, 1072-1082.

AFZELIUS B.A. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science (New York, N.Y.)*, 1976, **193**, 317-319.

AFZELIUS B.A. The immotile-cilia syndrome and other ciliary diseases. *International review of experimental pathology*, 1979, **19**, 1-43.

AFZELIUS B.A., ELIASSON R. Male and female infertility problems in the immotile-cilia syndrome. *European journal of respiratory diseases. Supplement*, 1983, **127**, 144-147.

AFZELIUS B.A., CARLSTEN J., KARLSSON S. Clinical, pathologic, and ultrastructural features of situs inversus and immotile-cilia syndrome in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1984, **184**, 560-563.

AFZELIUS B.A. Cilia-related diseases. *The Journal of Pathology*, 2004, **204**, 470-477.

AFZELIUS B.A., STENRAM U. Prevalence and genetics of immotile-cilia syndrome and left-handedness. *The International Journal of Developmental Biology*, 2006, **50**.

ALKURAYA F.S. Autozygome decoded. *Genetics in Medicine*, 2010, **12**, 765-771.

ALSAADI M.M., ERZURUMLUOGLU A.M., RODRIGUEZ S., GUTHRIE P.A.I., GAUNT T.R., OMAR H.Z., MUBARAK M., ALHARBI K.K., AL-RIKABI A.C., DAY I.N.M. Nonsense Mutation in Coiled-Coil Domain Containing 151 Gene (CCDC151) Causes Primary Ciliary Dyskinesia. *Human Mutation*, 2014, **35**, 1446-1448.

ANDERSEN J.S., WILKINSON C.J., MAYOR T., MORTENSEN P., NIGG E.A., MANN M. Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature*, 2003, **426**, 570-574.

ANTONY D., BECKER-HECK A., ZARIWALA M.A., SCHMIDTS M., ONOUFRIADIS A., FOROUHAN M., WILSON R., TAYLOR-COX T., DEWAR A., JACKSON C., GOGGIN P., LOGES N.T., OLBRICH H., JASPERS M., JORISSEN M., LEIGH M.W., WOLF W.E., DANIELS M.L.A., NOONE P.G., FERKOL T.W., SAGEL S.D., ROSENFELD M., RUTMAN A., DIXIT A., O'CALLAGHAN C., LUCAS J.S., HOGG C., SCAMBLER P.J., EMES R.D., UKK, CHUNG E.M.K., SHOEMARK A., KNOWLES M.R., OMRAN H., MITCHISON H.M. Mutations in CCDC39 and CCDC40 are the Major Cause of Primary Ciliary Dyskinesia with Axonemal Disorganization and Absent Inner Dynein Arms. *Human Mutation*, 2013, **34**, 462-472.

- ARMENGOT M., ESCRIBANO A., CARDA C., BASTERRA J. Clinical and ultrastructural correlations in nasal mucociliary function observed in children with recurrent airways infections. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 1995, **32**, 143-151.
- ASHER L., DIESEL G., SUMMERS J.F., MCGREEVY P.D., COLLINS L.M. Inherited defects in pedigree dogs. Part 1: disorders related to breed standards. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 2009, **182**, 402-411.
- AUGUST JR T.P., BARTELS JE. Kartagener's syndrome in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 1982, **18**, 822-826.
- AVIDOR-REISS T., MAER A.M., KOUNDAKJIAN E., POLYANOVSKY A., KEIL T., SUBRAMANIAM S., ZUKER C.S. Decoding cilia function: defining specialized genes required for compartmentalized cilia biogenesis. *Cell*, 2004, **117**, 527-539.
- B M. What's your diagnosis. *Bulletin of the Comparative Respiratory Society*, 1983, **1**, 2-3.
- BANIZS B. Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development*, 2005, **132**, 5329-5339.
- BARBATO A., FRISCHER T., KUEHNI C.E., SNIJDERS D., AZEVEDO I., BAKTAI G., BARTOLONI L., EBER E., ESCRIBANO A., HAARMAN E., HESSELMAR B., HOGG C., JORISSEN M., LUCAS J., NIELSEN K.G., O'CALLAGHAN C., OMRAN H., POHUNEK P., STRIPPOLI M.-P.F., BUSH A. Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children. *European Respiratory Journal*, 2009, **34**, 1264-1276.
- BARTOLONI L., BLOUIN J.-L., MAITI A.K., SAINSBURY A., ROSSIER C., GEHRIG C., SHE J.X., MARRON M.P., LANDER E.S., MEEKS M., CHUNG E., ARMENGOT M., JORISSEN M., SCOTT H.S., DELOZIER-BLANCHET C.D., GARDINER R.M., ANTONARAKIS S.E. Axonemal beta heavy chain dynein DNAH9: cDNA sequence, genomic structure, and investigation of its role in primary ciliary dyskinesia. *Genomics*, 2001, **72**, 21-33.
- BARTOLONI L., BLOUIN J.-L., PAN Y., GEHRIG C., MAITI A.K., SCAMUFFA N., ROSSIER C., JORISSEN M., ARMENGOT M., MEEKS M. Mutations in the DNAH11 (axonemal heavy chain dynein type 11) gene cause one form of situs inversus totalis and most likely primary ciliary dyskinesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, **99**, 10282-10286.
- BECK J.A., ARD M., HOWERTH E.W. Pathology in practice. Primary ciliary dyskinesia (PCD) with associated bronchopneumonia, bronchiectasis, and hydrocephalus in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2014, **244**, 421-423.
- BECKER-HECK A., ZOHN I.E., OKABE N., POLLOCK A., LENHART K.B., SULLIVAN-BROWN J., MCSHEENE J., LOGES N.T., OLBRICH H., HAEFFNER K., FLIEGAUF M., HORVATH J., REINHARDT R., NIELSEN K.G., MARTIN J.K., BAKTAI G., ANDERSON K.V., GEISLER R., NISWANDER L., OMRAN H., BURDINE R.D. The coiled-coil domain containing protein CCDC40 is essential for motile cilia function and left-right axis formation. *Nature Publishing Group*, 2010, **43**, 79-84.
- BELLOMO D., LANDER A., HARRAGAN I., BROWN N.A. Cell proliferation in mammalian gastrulation: the ventral node and notochord are relatively quiescent. *Developmental Dynamics*, 1996, **205**, 471-485.

BHOGARAJU S., CAJANEK L., FORT C., BLISNICK T., WEBER K., TASCHNER M., MIZUNO N., LAMLA S., BASTIN P., NIGG E.A., LORENTZEN E. Molecular Basis of Tubulin Transport Within the Cilium by IFT74 and IFT81. *Science (New York, N.Y.)*, 2013, **341**, 1009-1012.

BIGGART E., PRITCHARD K., WILSON R., BUSH A. Primary ciliary dyskinesia syndrome associated with abnormal ciliary orientation in infants. *The European respiratory journal*, 2001, **17**, 444-448.

BLACQUE O.E., PERENS E.A., BOROEVICH K.A., INGLIS P.N., LI C., WARNER A., KHATTRA J., HOLT R.A., OU G., MAH A.K., MCKAY S.J., HUANG P., SWOBODA P., JONES S.J.M., MARRA M.A., BAILLIE D.L., MOERMAN D.G., SHAHAM S., LEROUX M.R. Functional Genomics of the Cilium, a Sensory Organelle. *Current Biology*, 2005, **15**, 935-941.

BLANCHON S., LEGENDRE M., COPIN B., DUQUESNOY P., MONTANTIN G., KOTT E., DASTOT F., JEANSON L., CACHANADO M., ROUSSEAU A., PAPON J.F., BEYDON N., BROUARD J., CRESTANI B., DESCHILDRE A., DESIR J., DOLLFUS H., LEHEUP B., TAMALET A., THUMERELLE C., VOJTEK A.M., ESCALIER D., COSTE A., DE BLIC J., CLEMENT A., ESCUDIER E., AMSELEM S. Delineation of CCDC39/CCDC40 mutation spectrum and associated phenotypes in primary ciliary dyskinesia. *Journal of Medical Genetics*, 2012, **49**, 410-416.

BLOODGOOD R.A. Sensory reception is an attribute of both primary cilia and motile cilia. *Journal of cell science*, 2010, **123**, 505-509.

BLOUIN J.-L., MEEKS M., RADHAKRISHNA U., SAINSBURY A., GEHRING C., SAÏL G.D., BARTOLONI L., DOMBI V., O&APOS;RAWA A., WALNE A., CHUNG E., AFZELIUS B.A., ARMENGOT M., JORISSEN M., SCHIDLOW D.V., VAN MALDERGEM L., WALT H., GARDINER R.M., PROBST D., GUERNE P.A., DELOZIER-BLANCHET C.D., ANTONARAKIS S.E. Primary ciliary dyskinesia: a genome-wide linkage analysis reveals extensive locus heterogeneity. *European Journal of Human Genetics*, 2000, **8**, 109-118.

BOON M., SMITS A., CUPPENS H., JASPERS M., PROESMANS M., DUPONT L.J., VERMEULEN F.L., VAN DAELE S., MALFROOT A., GODDING V., JORISSEN M., DE BOECK K. Primary ciliary dyskinesia: critical evaluation of clinical symptoms and diagnosis in patients with normal and abnormal ultrastructure. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2014, **9**, 1-10.

BOUCHER R.C. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *European Respiratory Journal*, 2004, **23**, 146-158.

BOWER R., VANDERWAAL K., O'TOOLE E., FOX L., PERRONE C., MUELLER J., WIRSHELL M., KAMIYA R., SALE W.S., PORTER M.E. IC138 defines a subdomain at the base of the I1 dynein that regulates microtubule sliding and flagellar motility. *Molecular biology of the cell*, 2009, **20**, 3055-3063.

BRADLEY W.G., KORTMAN K.E., BURGOYNE B. Flowing cerebrospinal fluid in normal and hydrocephalic states: appearance on MR images. *Radiology*, 1986, **159**, 611-616.

BRAIMAN A., PRIEL Z. Efficient mucociliary transport relies on efficient regulation of ciliary beating. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2008, **163**, 202-207.

BROADHEAD R., DAWE H.R., FARR H., GRIFFITHS S., HART S.R., PORTMAN N., SHAW M.K., GINGER M.L., GASKELL S.J., MCKEAN P.G., GULL K. Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature*, 2006, **440**, 224-227.

- BRODY S.L., YAN X.H., WUERFFEL M.K., SONG S.K., SHAPIRO S.D. Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2000, **23**, 45-51.
- BROKAW C.J. Control of flagellar bending: a new agenda based on dynein diversity. *Cell motility and the cytoskeleton*, 1994, **28**, 199-204.
- BROWN D.E., PITTMAN J.E., LEIGH M.W., FORDHAM L., DAVIS S.D. Early lung disease in young children with primary ciliary dyskinesia. *Pediatric Pulmonology*, 2008, **43**, 514-516.
- BUDNY B., CHEN W., OMRAN H., FLIEGAUF M., TZSCHACH A., WISNIEWSKA M., JENSEN L.R., RAYNAUD M., SHOICHET S.A., BADURA M., LENZNER S., LATOS-BIELENSKA A., ROPERS H.-H. A novel X-linked recessive mental retardation syndrome comprising macrocephaly and ciliary dysfunction is allelic to oral-facial-digital type I syndrome. *Human Genetics*, 2006, **120**, 171-178.
- BURKHARD P., STETEFELD J., STRELKOV S.V. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol*, 2001, **11**, 82-88.
- BUSH A., COLE P., HARIRI M., MACKAY I., PHILLIP G., O'CALLAGHAN C., WILSON R., WARNER J.O. Primary ciliary dyskinesia: diagnosis and standards of care. *European Respiratory Journal*, 1998, **12**, 982-988.
- BUSTIN S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 2000, **25**, 169-193.
- BUTTON B., CAI L.H., EHRE C., KESIMER M., HILL D.B., SHEEHAN J.K., BOUCHER R.C., RUBINSTEIN M. A Periciliary Brush Promotes the Lung Health by Separating the Mucus Layer from Airway Epithelia. *Science (New York, N.Y.)*, 2012, **337**, 937-941.
- CAMPBELL R.G., BIRMAN C.S., MORGAN L. Management of otitis media with effusion in children with primary ciliary dyskinesia: A literature review. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2009, **73**, 1630-1638.
- CARLÉN B., LINDBERG S., STENRAM U. Absence of nexin links as a possible cause of primary ciliary dyskinesia. *Ultrastructural Pathology*, 2003, **27**, 123-126.
- CARLÉN B., STENRAM U. Primary Ciliary Dyskinesia: A Review. *Ultrastructural Pathology*, 2005, **29**, 217-220.
- CARRIG C.B., SUTER P.F., EWING G.O., DUNGWORTH D.L. Primary dextrocardia with situs inversus, associated with sinusitis and bronchitis in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1974, **164**, 1127-1134.
- CARSON J.L., COLLIER A.M., FERNALD G.W., HU S.-C.S. Microtubular discontinuities as acquired ciliary defects in airway epithelium of patients with chronic respiratory diseases. *Ultrastructural Pathology*, 1994, **18**, 327-332.
- CASE L. ASAS CENTENNIAL PAPER: Perspectives on domestication: The history of our relationship with man's best friend. *Journal of Animal Science*, 2008, **86**, 3245-3251.
- CASEY B. Two rights make a wrong: human left-right malformations. *Human molecular genetics*, 1998, **7**, 1565-1565.

CASEY J.P., MCGETTIGAN P.A., HEALY F., HOGG C., REYNOLDS A., KENNEDY B.N., ENNIS S., SLATTERY D., LYNCH S.A. Unexpected genetic heterogeneity for primary ciliary dyskinesia in the Irish Traveller population. *European Journal of Human Genetics*, 2014.

CASPARY T., LARKINS C.E., ANDERSON K.V. The Graded Response to Sonic Hedgehog Depends on Cilia Architecture. *Developmental Cell*, 2007, **12**, 767-778.

CASTLEMAN V.H., ROMIO L., CHODHARI R., HIRST R.A., DE CASTRO S.C.P., PARKER K.A., YBOT-GONZALEZ P., EMES R.D., WILSON S.W., WALLIS C., JOHNSON C.A., HERRERA R.J., RUTMAN A., DIXON M., SHOEMARK A., BUSH A., HOGG C., GARDINER R.M., REISH O., GREENE N.D.E., O'CALLAGHAN C., PURTON S., CHUNG E.M.K., MITCHISON H.M. Mutations in radial spoke head protein genes RSPH9 and RSPH4A cause primary ciliary dyskinesia with central-microtubular-pair abnormalities. *American journal of human genetics*, 2009, **84**, 197-209.

CHANG B., KHANNA H., HAWES N., JIMENO D., HE S., LILLO C., PARAPURAM S.K., CHENG H., SCOTT A., HURD R.E. In-frame deletion in a novel centrosomal/ciliary protein CEP290/NPHP6 perturbs its interaction with RPGR and results in early-onset retinal degeneration in the rd16 mouse. *Human molecular genetics*, 2006, **15**, 1847-1857.

CHAO J., TURNER J.A., STURGESS J.M. Genetic heterogeneity of dynein-deficiency in cilia from patients with respiratory disease. *The American review of respiratory disease*, 1982, **126**, 302-305.

CHARLIER C., COPPIETERS W., ROLLIN F., DESMECHT D., AGERHOLM J.S., CAMBISANO N., CARTA E., DARDANO S., DIVE M., FASQUELLE C., FRENNET J.-C., HANSET R., HUBIN X., JORGENSEN C., KARIM L., KENT M., HARVEY K., PEARCE B.R., SIMON P., TAMA N., NIE H., VANDEPUTTE S., LIEN S., LONGERI M., FREDHOLM M., HARVEY R.J., GEORGES M. Highly effective SNP-based association mapping and management of recessive defects in livestock. *Nature genetics*, 2008, **40**, 449-454.

CHASE K., JONES P., MARTIN A., OSTRANDER E.A., LARK K.G. Genetic mapping of fixed phenotypes: disease frequency as a breed characteristic. *The Journal of heredity*, 2009, **100 Suppl 1**, S37-41.

CHEN J., KNOWLES H.J., HEBERT J.L., HACKETT B.P. Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. *Journal of Clinical Investigation*, 1998, **102**, 1077-1082.

CHILVERS M.A., O'CALLAGHAN C. Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods. *Thorax*, 2000, **55**, 314-317.

CHILVERS M.A., RUTMAN A., O'CALLAGHAN C. Ciliary beat pattern is associated with specific ultrastructural defects in primary ciliary dyskinesia. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2003a, **112**, 518-524.

CHILVERS M.A., RUTMAN A., O'CALLAGHAN C. Functional analysis of cilia and ciliated epithelial ultrastructure in healthy children and young adults. *Thorax*, 2003b, **58**, 333-338.

CHIRMULE N., PROPERT K., MAGOSIN S., QIAN Y., QIAN R., WILSON J. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene therapy*, 1999, **6**, 1574-1583.

CHRISTENSEN S.T. A Regulatory Light Chain of Ciliary Outer Arm Dynein in Tetrahymena thermophila. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**, 20048-20054.

CLERCX C., PEETERS D., BETHS T., MCENTEE K., VOTION D., SNAPS F., HENROTEAUX M., JORISSEN M. Use of ciliogenesis in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2000, **217**, 1681-1685.

COLANTONIO D., BROUILLETTE L., PARIKH A., SCADDING G.K. Paradoxical low nasal nitric oxide in nasal polyposis. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 2002, **32**, 698-701.

COLE D.G., DIENER D.R., HIMELBLAU A.L., BEECH P.L., FUSTER J.C., ROSENBAUM J.L. Chlamydomonas kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons. *The Journal of Cell Biology*, 1998, **141**, 993-1008.

CORBELLI R., BRINGOLF-ISLER B., AMACHER A., SASSE B., SPYCHER M., HAMMER J. Nasal Nitric Oxide Measurements To Screen Children for Primary Ciliary Dyskinesia. *CHEST Journal*, 2004, **126**, 1054-1059.

CRICK F. The packing of [alpha]-helices: simple coiled-coils. *Acta Crystallographica*, 1953, **6**, 689-697.

DANIELS The diagnostic dilemma of primary ciliary dyskinesia: findings and experience of the genetic disorders of mucociliary clearance consortium. In, *Am J Respir Crit Care Med*, 2011,

DE BOECK K., PROESMANS M., MORTELMANS L., VAN BILLOEN B., WILLEMS T., JORISSEN M. Mucociliary transport using 99mTc-albumin colloid: a reliable screening test for primary ciliary dyskinesia. *Thorax*, 2005, **60**, 414-417.

DE SANTI M.M., MAGNI A., VALLETTA E.A., GARDI C., LUNGARELLA G. Hydrocephalus, bronchiectasis, and ciliary aplasia. *Archives of Disease in Childhood*, 1990, **65**, 543-544.

DE SCALLY M., LOBETTI R.G., VAN WILPE E. Primary ciliary dyskinesia in a Staffordshire bull terrier. *Journal of the South African Veterinary Association*, 2004, **75**, 150-152.

DEANE J.A., COLE D.G., SEELEY E.S., DIENER D.R., ROSENBAUM J.L. Localization of intraflagellar transport protein IFT52 identifies basal body transitional fibers as the docking site for IFT particles. *Current biology : CB*, 2001, **11**, 1586-1590.

DEL BIGIO M.R. Cellular damage and prevention in childhood hydrocephalus. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 2004, **14**, 317-324.

DEMARCO R.C., TAMASHIRO E., ROSSATO M., FERREIRA M.D.S., VALERA F.C.P., ANSELMO-LIMA W.T. Ciliary ultrastructure in patients with chronic rhinosinusitis and primary ciliary dyskinesia. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 2013, **270**, 2065-2070.

DERRIEN T., THEZE J., VAYSSE A., ANDRE C., OSTRANDER E.A., GALIBERT F., HITTE C. Revisiting the missing protein-coding gene catalog of the domestic dog. *BMC genomics*, 2009, **10**, 62.

DHEIN C.R., PRIEUR D.J., RIGGS M.W., POTTER K.A., WIDDERS P.R. Suspected ciliary dysfunction in Chinese Shar Pei pups with pneumonia. *American journal of veterinary research*, 1990, **51**, 439-446.

DONNEZ J., CASANAS-ROUX F., CAPRASSE J., FERIN J., THOMAS K. Cyclic changes in ciliation, cell height, and mitotic activity in human tubal epithelium during reproductive life. *Fertility and Sterility*, 1985, **43**, 554-559.

DRISCOLL J.A. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Is Associated With an Increased Prevalence of Radiographic Bronchiectasis. *CHEST Journal*, 2008, **133**, 1181.

DUAN D., YUE Y., ENGELHARDT J.F. Expanding AAV packaging capacity with trans-splicing or overlapping vectors: a quantitative comparison. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2001, **4**, 383-391.

DURANT A.M. What is your diagnosis? Thoracic and abdominal situs inversus totalis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2008, **232**, 197-198.

DURIEZ B., DUQUESNOY P., ESCUDIER E., BRIDOUX A.-M., ESCALIER D., RAYET I., MARCOS E., VOJTEK A.M., BERCHER J.-F., AMSELEM S. A common variant in combination with a nonsense mutation in a member of the thioredoxin family causes primary ciliary dyskinesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, **104**, 3336-3341.

DUTCHER S.K. Flagellar assembly in two hundred and fifty easy-to-follow steps. *Trends in genetics : TIG*, 1995, **11**, 398-404.

EDWARDS D.F., PATTON C.S., BEMIS D.A., KENNEDY J.R., SELCER B.A. Immotile cilia syndrome in three dogs from a litter. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1983, **183**, 667-672.

EDWARDS D.F., KENNEDY J.R., PATTON C.S., TOAL R.L., DANIEL G.B., LOTHROP C.D. Familial immotile-cilia syndrome in English springer spaniel dogs. *American journal of medical genetics*, 1989, **33**, 290-298.

EDWARDS D.F., PATTON C.S., KENNEDY J.R. Primary ciliary dyskinesia in the dog. *Problems in veterinary medicine*, 1992, **4**, 291-319.

EDWARDS D.F., BARNHILL M.A., TOAL R.L., KENNEDY J.R. Congenital ciliary dyskinesia in two Bichon Frise littermates. In: *Medicine A. C. O. V. (Ed.)*, Annual Veterinary Medical Forum, Madison, 1987,

EFIMENKO E. Analysis of *xbx* genes in *C. elegans*. *Development*, 2005, **132**, 1923-1934.

ELAM C.A., SALE W.S., WIRSHELL M. The regulation of dynein-driven microtubule sliding in *Chlamydomonas* flagella by axonemal kinases and phosphatases. *Methods Cell Biol*, 2009, **92**, 133-151.

ELIASSON R., MOSSBERG B., CAMNER P., AFZELIUS B.A. The immotile-cilia syndrome: a congenital ciliary abnormality as an etiologic factor in chronic airway infections and male sterility. *The New England journal of medicine*, 1977, **297**, 1-6.

ELLERMAN A., BISGAARD H. Longitudinal study of lung function in a cohort of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*, 1997a, **10**, 2376-2379.

ELLERMAN A., BISGAARD H. Longitudinal study of lung function in a cohort of primary ciliary dyskinesia. *European Respiratory Journal*, 1997b, **10**, 2376-2379.

- ESCUDIER E., COUPRIE M., DURIEZ B., ROUDOT-THORAVAL F., MILLEPIED M.-C., PRULIÈRE-ESCABASSE V., LABATTE L., COSTE A. Computer-assisted Analysis Helps Detect Inner Dynein Arm Abnormalities. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2002, **166**, 1257-1262.
- ESSNER J.J., VOGAN K.J., WAGNER M.K., TABIN C.J., YOST H.J., BRUECKNER M. Conserved function for embryonic nodal cilia. *Nature*, 2002, **418**, 37-38.
- EVANS S.E., XU Y., TUVIM M.J., DICKEY B.F. Inducible Innate Resistance of Lung Epithelium to Infection. *Annual review of physiology*, 2010, **72**, 413-435.
- FAHY J.V., DICKEY B.F. Airway Mucus Function and Dysfunction. *New England Journal of Medicine*, 2010, **363**, 2233-2247.
- FAILLY M., SAITTA A., MUÑOZ A., FALCONNET E., ROSSIER C., SANTAMARIA F., DE SANTI M.M., LAZOR R., DELOZIER-BLANCHET C.D., BARTOLONI L., BLOUIN J.-L. DNAI1 mutations explain only 2% of primary ciliary dyskinesia. *Respiration; international review of thoracic diseases*, 2008, **76**, 198-204.
- FAILLY M., BARTOLONI L., LETOURNEAU A., MUNOZ A., FALCONNET E., ROSSIER C., DE SANTI M.M., SANTAMARIA F., SACCO O., DELOZIER-BLANCHET C.D., LAZOR R., BLOUIN J.-L. Mutations in DNAH5 account for only 15% of a non-preselected cohort of patients with primary ciliary dyskinesia. *Journal of Medical Genetics*, 2009, **46**, 281-286.
- FEISTEL K., BLUM M. Three types of cilia including a novel 9+4 axoneme on the notochordal plate of the rabbit embryo. *Developmental Dynamics*, 2006, **235**, 3348-3358.
- FERKOL T., LEIGH M. Primary Ciliary Dyskinesia and Newborn Respiratory Distress. *Seminars in Perinatology*, 2006, **30**, 335-340.
- FISCH C., DUPUIS-WILLIAMS P. Ultrastructure of cilia and flagella - back to the future! *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 2011, **103**, 249-270.
- FLIEGAUF M., OLBRICH H., HORVATH J., WILDHABER J.H., ZARIWALA M.A., KENNEDY M., KNOWLES M.R., OMRAN H. Mislocalization of DNAH5 and DNAH9 in Respiratory Cells from Patients with Primary Ciliary Dyskinesia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2005, **171**, 1343-1349.
- FLIEGAUF M., BENZING T., OMRAN H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, **8**, 880-893.
- FLOCK Å., DUVALL A.J. The ultrastructure of the kinocilium of the sensory cells in the inner ear and lateral line organs. *The Journal of Cell Biology*, 1965, **25**, 1-8.
- FOODMAN MS G.U., STEBBINS K, KNIGHT D. Kartagener's syndrome in an old miniature poodle. *Journal of Small Animal Practice*, 1989, **30**, 96-100.
- GARDNER L.C., O'TOOLE E., PERRONE C.A., GIDDINGS T., PORTER M.E. Components of a "dynein regulatory complex" are located at the junction between the radial spokes and the dynein arms in *Chlamydomonas* flagella. *The Journal of Cell Biology*, 1994, **127**, 1311-1325.
- GEE M.A., HEUSER J.E., VALLEE R.B. An extended microtubule-binding structure within the dynein motor domain. *Nature*, 1997, **390**, 636-639.

- GERDES J.M., DAVIS E.E., KATSANIS N. The Vertebrate Primary Cilium in Development, Homeostasis, and Disease. *Cell*, 2009, **137**, 32-45.
- GEREMEK M. Linkage analysis localises a Kartagener syndrome gene to a 3.5 cM region on chromosome 15q24-25. *Journal of Medical Genetics*, 2005, **43**, e1-e1.
- GHEBER L., PRIEL Z. Synchronization between beating cilia. *Biophysical journal*, 1989, **55**, 183-191.
- GHEBER L., KORNGREEN A., PRIEL Z. Effect of viscosity on metachrony in mucus propelling cilia. *Cell motility and the cytoskeleton*, 1998, **39**, 9-20.
- GHERMAN A., DAVIS E.E., KATSANIS N. The ciliary proteome database: an integrated community resource for the genetic and functional dissection of cilia. *Nature genetics*, 2006, **38**, 961-962.
- GINGER M.L., PORTMAN N., MCKEAN P.G. Swimming with protists: perception, motility and flagellum assembly. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, **6**, 838-850.
- GRALL A., GUAGUÈRE E., PLANCHAIS S., GROND S., BOURRAT E., HAUSSER I., HITTE C., LE GALLO M., DERBOIS C., KIM G.-J., LAGOUTTE L., DEGORCE-RUBIALES F., RADNER F.P.W., THOMAS A., KÜRY S., BENSIGNOR E., FONTAINE J., PIN D., ZIMMERMANN R., ZECHNER R., LATHROP M., GALIBERT F., ANDRÉ C., FISCHER J. PNPLA1 mutations cause autosomal recessive congenital ichthyosis in golden retriever dogs and humans. *Nature Publishing Group*, 2012, **44**, 140-147.
- GREENSTONE M., RUTMAN A., DEWAR A., MACKAY I., COLE P.J. Primary ciliary dyskinesia: cytological and clinical features. *The Quarterly journal of medicine*, 1988, **67**, 405-423.
- GRIESENBACH U., ALTON E.W. Expert opinion in biological therapy: update on developments in lung gene transfer. *Expert opinion on biological therapy*, 2013, **13**, 345-360.
- GUICHARD C., HARRICANE M.-C., LAFITTE J.-J., GODARD P., ZAEGEL M., TACK V., LALAU G., BOUVAGNET P. Axonemal Dynein Intermediate-Chain Gene (& i> DNAI1& i>) Mutations Result in Situs Inversus and Primary Ciliary Dyskinesia (Kartagener Syndrome). *The American Journal of Human Genetics*, 2001, **68**, 1030-1035.
- HACKETT B.P., BRODY S.L., LIANG M., ZEITZ I.D., BRUNS L.A., GITLIN J.D. Primary structure of hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 and characterization of gene expression in the developing respiratory and reproductive epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, **92**, 4249-4253.
- HAIMOWITZ D. The million-dollar dog. 11 valuable patient care lessons I learned from a really sick pet., 2012. 26-27- 34-25 p.
- HALBERT S.A., PATTON D.L., ZARUTSKIE P.W., SOULES M.R. Function and structure of cilia in the fallopian tube of an infertile woman with Kartagener's syndrome. *Human reproduction*, 1997, **12**, 55-58.
- HELLINCKX J., DEMEDTS M., DE BOECK K. Primary ciliary dyskinesia: evolution of pulmonary function. *European Journal of Pediatrics*, 1998, **157**, 422-426.

HEUSER T., RAYTCHEV M., KRELL J., PORTER M.E., NICASTRO D. The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella. *The Journal of Cell Biology*, 2009, **187**, 921-933.

HIBBS J.B. Infection and nitric oxide. *Journal of Infectious Diseases*, 2002, **185**, S9-S17.

HILDEBRANDT F., BENZING T., KATSANIS N. Ciliopathies. *N Engl J Med*, 2011, **364**, 1533-1543.

HJEIJ R., LINDSTRAND A., FRANCIS R., ZARIWALA M.A., LIU X., LI Y., DAMERLA R., DOUGHERTY G.W., ABOUHAMED M., OLBRICH H., LOGES N.T., PENNEKAMP P., DAVIS E.E., CARVALHO C.M.B., PEHLIVAN D., WERNER C., RAIDT J., KÖHLER G., HAFFNER K., REYES-MUGICA M., LUPSKI J.R., LEIGH M.W., ROSENFELD M., MORGAN L.C., KNOWLES M.R., LO C.W., KATSANIS N., OMRAN H. ARMC4 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Randomization of Left/Right Body Asymmetry. *The American Journal of Human Genetics*, 2013, **93**, 357-367.

HJEIJ R., ONOUFRIADIS A., WATSON C.M., SLAGLE C.E., KLENA N.T., DOUGHERTY G.W., KURKOWIAK M., LOGES N.T., DIGGLE C.P., MORANTE N.F.C., GABRIEL G.C., LEMKE K.L., LI Y., PENNEKAMP P., MENCHEN T., KONERT F., MARTIN J.K., MANS D.A., LETTEBOER S.J.F., WERNER C., BURGOYNE T., WESTERMANN C., RUTMAN A., CARR I.M., O'CALLAGHAN C., MOYA E., CHUNG E.M.K., SHERIDAN E., NIELSEN K.G., ROEPMAN R., BARTSCHERER K., BURDINE R.D., LO C.W., OMRAN H., MITCHISON H.M., CONSORTIUM U.K. CCDC151 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia by Disruption of the Outer Dynein Arm Docking Complex Formation. *The American Journal of Human Genetics*, 2014, **95**, 257-274.

HOLZMANN D., FELIX H. Neonatal respiratory distress syndrome--a sign of primary ciliary dyskinesia? *Eur J Pediatr*, 2000a, **159**, 857-860.

HOLZMANN D., FELIX H. Neonatal respiratory distress syndrome--a sign of primary ciliary dyskinesia? *European Journal of Pediatrics*, 2000b, **159**, 857-860.

HOM E.F., WITMAN G.B., HARRIS E.H., DUTCHER S.K., KAMIYA R., MITCHELL D.R., PAZOUR G.J., PORTER M.E., SALE W.S., WIRSHELL M., YAGI T., KING S.M. A unified taxonomy for ciliary dyneins. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 2011, **68**, 555-565.

HOOVER J.P., HOWARD-MARTIN M.O., BAHR R.J. Chronic bronchitis, bronchiectasis, bronchiolitis, broncholitis obliterans, and bronchopneumonia in a rottweiler with primary ciliary dyskinesia. *The Journal of the American Animal Hospital Association (USA)*, 1989.

HORANI A., DRULEY T.E., ZARIWALA M.A., PATEL A.C., LEVINSON B.T., VAN ARENDONK L.G., THORNTON K.C., GIACALONE J.C., ALBEE A.J., WILSON K.S., TURNER E.H., NICKERSON D.A., SHENDURE J., BAYLY P.V., LEIGH M.W., KNOWLES M.R., BRODY S.L., DUTCHER S.K., FERKOL T.W. Whole-Exome Capture and Sequencing Identifies HEATR2 Mutation as a Cause of Primary Ciliary Dyskinesia. *The American Journal of Human Genetics*, 2012, **91**, 685-693.

HORANI A., BRODY S.L., FERKOL T.W., SHOSEYOV D., WASSERMAN M.G., TA-SHMA A., WILSON K.S., BAYLY P.V., AMIRAV I., COHEN-CYMBERKNOH M., DUTCHER S.K., ELPELEG O., KEREM E. CCDC65 Mutation Causes Primary Ciliary Dyskinesia with Normal Ultrastructure and Hyperkinetic Cilia. *PloS one*, 2013a, **8**, e72299.

HORANI A., FERKOL T.W., SHOSEYOV D., WASSERMAN M.G., OREN Y.S., KEREM B., AMIRAV I., COHEN-CYMBERKNOH M., DUTCHER S.K., BRODY S.L., ELPELEG O., KEREM E. LRRC6 Mutation Causes Primary Ciliary Dyskinesia with Dynein Arm Defects. *PloS one*, 2013b, **8**, e59436.

HORNEF N., OLBRICH H., HORVATH J., ZARIWALA M.A., FLIEGAUF M., LOGES N.T., WILDHABER J., NOONE P.G., KENNEDY M., ANTONARAKIS S.E., BLOUIN J.-L., BARTOLONI L., NÜSSLEIN T., AHRENS P., GRIESE M., KUHL H., SUDBRAK R., KNOWLES M.R., REINHARDT R., OMRAN H. DNAH5 Mutations Are a Common Cause of Primary Ciliary Dyskinesia with Outer Dynein Arm Defects. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2006, **174**, 120-126.

HORVATH J., FLIEGAUF M., OLBRICH H., KISPERT A., KING S.M., MITCHISON H., ZARIWALA M.A., KNOWLES M.R., SUDBRAK R., FEKETE G., NEESEN J., REINHARDT R., OMRAN H. Identification and Analysis of Axonemal Dynein Light Chain 1 in Primary Ciliary Dyskinesia Patients. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2005, **33**, 41-47.

HOSSAIN T., KAPPELMAN M.D., PEREZ-ATAYDE A.R., YOUNG G.J., HUTTNER K.M., CHRISTOU H. Primary Ciliary Dyskinesia as a Cause of Neonatal Respiratory Distress: Implications for the Neonatologist. *Journal of Perinatology*, 2003, **23**, 684-687.

HOWARD M., FRIZZELL R.A., BEDWELL D.M. Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nature medicine*, 1996, **2**, 467-469.

HUFNAGEL R.B., AHMED Z.M., CORRÊA Z.M., SISK R.A. Gene therapy for Leber congenital amaurosis: advances and future directions. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2012, **250**, 1117-1128.

IBAÑEZ-TALLON I., GOROKHOVA S., HEINTZ N. Loss of function of axonemal dynein Mdnah5 causes primary ciliary dyskinesia and hydrocephalus. *Human molecular genetics*, 2002, **11**, 715-721.

IBAÑEZ-TALLON I., PAGENSTECHER A., FLIEGAUF M., OLBRICH H., KISPERT A., KETELSEN U.-P., NORTH A., HEINTZ N., OMRAN H. Dysfunction of axonemal dynein heavy chain Mdnah5 inhibits ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation. *Human molecular genetics*, 2004, **13**, 2133-2141.

ICHIOKA K., KOHEI N., OKUBO K., NISHIYAMA H., TERAJ A. Obstructive azoospermia associated with chronic sinopulmonary infection and situs inversus totalis. *Urology*, 2006, **68**, 204.e205-204.e207.

INGLIS P., BOROEVICH K., LEROUX M. Piecing together a ciliome. *Trends in Genetics*, 2006, **22**, 491-500.

ISHIKAWA T., SAKAKIBARA H., OIWA K. The Architecture of Outer Dynein Arms in Situ. *Journal of Molecular Biology*, 2007, **368**, 1249-1258.

JAIN K., PADLEY S.P.G., GOLDSTRAW E.J., KIDD S.J., HOGG C., BIGGART E., BUSH A. Primary ciliary dyskinesia in the paediatric population: range and severity of radiological findings in a cohort of patients receiving tertiary care. *Clinical Radiology*, 2007, **62**, 986-993.

JAIN L. Alveolar fluid clearance in developing lungs and its role in neonatal transition. *Clinics in perinatology*, 1999, **26**, 585-599.

JAIN R., PAN J., DRISCOLL J.A., WISNER J.W., HUANG T., GUNSTEN S.P., YOU Y., BRODY S.L. Temporal Relationship between Primary and Motile Ciliogenesis in Airway Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2010, **43**, 731-739.

- JEGANATHAN D. Loci for primary ciliary dyskinesia map to chromosome 16p12.1-12.2 and 15q13.1-15.1 in Faroe Islands and Israeli Druze genetic isolates. *Journal of Medical Genetics*, 2004, **41**, 233-240.
- JIAO J., WANG H., LOU W., JIN S., FAN E., LI Y., HAN D., ZHANG L. Regulation of ciliary beat frequency by the nitric oxide signaling pathway in mouse nasal and tracheal epithelial cells. *Experimental Cell Research*, 2011, **317**, 2548-2553.
- JL S. Kartagener's syndrome in a dog. *J AM Vet Radiol Soc*, 1976, **17**, 174-177.
- JL S. (2014). Kartagener's Syndrome in a dog.
- JONSSON M.S., MCCORMICK J.R., GILLIES C.G., GONDOS B. Kartagener's Syndrome with Motile Spermatozoa. *New England Journal of Medicine*, 1982, **307**, 1131-1133.
- JORISSEN M., VAN DER SCHUEREN B., TYBERGHEIN J., VAN DER BERGHE H., CASSIMAN J.J. Ciliogenesis and coordinated ciliary beating in human nasal epithelial cells cultured in vitro. *Acta oto-rhino-laryngologica Belgica*, 1989a, **43**, 67-73.
- JORISSEN M., VAN DER SCHUEREN B., VAN DEN BERGHE H., CASSIMAN J.J. The preservation and regeneration of cilia on human nasal epithelial cells cultured in vitro. *Archives of oto-rhino-laryngology*, 1989b, **246**, 308-314.
- JORISSEN M., BESSEMS A. Normal ciliary beat frequency after ciliogenesis in nasal epithelial cells cultured sequentially as monolayer and in suspension. *Acta oto-laryngologica*, 1995, **115**, 66-70.
- JORISSEN M., WILLEMS T., DE BOECK K. Diagnostic evaluation of mucociliary transport: from symptoms to coordinated ciliary activity after ciliogenesis in culture. *American journal of rhinology*, 2000a, **14**, 345-352.
- JORISSEN M., WILLEMS T., VAN DER SCHUEREN B., VERBEKEN E., DE BOECK K. Ultrastructural expression of primary ciliary dyskinesia after ciliogenesis in culture. *Acta oto-rhino-laryngologica Belgica*, 2000b, **54**, 343-356.
- KARADAG B., JAMES A.J., GÜLTEKIN E., WILSON N.M., BUSH A. Nasal and lower airway level of nitric oxide in children with primary ciliary dyskinesia. *The European respiratory journal*, 1999, **13**, 1402-1405.
- KARLSSON E.K., BARANOWSKA I., WADE C.M., SALMON HILLBERTZ N.H.C., ZODY M.C., ANDERSON N., BIAGI T.M., PATTERSON N., PIELBERG G.R., KULBOKAS E.J., COMSTOCK K.E., KELLER E.T., MESIROV J.P., VON EULER H., KÄMPE O., HEDHAMMAR Å., LANDER E.S., ANDERSSON G., ANDERSSON L., LINDBLAD-TOH K. Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nature genetics*, 2007, **39**, 1321-1328.
- KARTAGENER. Zur Pathologie der Bronchiektasien: Bronchiektasien bei Situs viscerum inversus. *Beitr Klin Tuberk*, 1933, 489-501.
- KATSUHARA K., KAWAMOTO S., WAKABAYASHI T., BELSKY J.L. Situs inversus totalis and Kartagener's syndrome in a Japanese population. *CHEST Journal*, 1972, **61**, 56-61.
- KELLER L.C., ROMIJN E.P., ZAMORA I., YATES I., JOHN R., MARSHALL W.F. Proteomic Analysis of Isolated Chlamydomonas Centrioles Reveals Orthologs of Ciliary-Disease Genes. *Current Biology*, 2005, **15**, 1090-1098.

KENNEDY M.P., NOONE P.G., CARSON J., MOLINA P.L., GHIO A., ZARIWALA M.A., MINNIX S.L., KNOWLES M.R. Calcium stone lithoptysis in primary ciliary dyskinesia. *Respiratory Medicine*, 2007a, **101**, 76-83.

KENNEDY M.P., NOONE P.G., LEIGH M.W., ZARIWALA M.A., MINNIX S.L., KNOWLES M.R., MOLINA P.L. High-Resolution CT of Patients with Primary Ciliary Dyskinesia. *American Journal of Roentgenology*, 2007b, **188**, 1232-1238.

KENNEDY M.P., OMRAN H., LEIGH M.W., DELL S., MORGAN L., MOLINA P.L., ROBINSON B.V., MINNIX S.L., OLBRICH H., SEVERIN T., AHRENS P., LANGE L., MORILLAS H.N., NOONE P.G., ZARIWALA M.A., KNOWLES M.R. Congenital Heart Disease and Other Heterotaxic Defects in a Large Cohort of Patients With Primary Ciliary Dyskinesia. *Circulation*, 2007c, **115**, 2814-2821.

KILLINGSWORTH C.R., SLOCOMBE R.F., WILSMAN N.J. Immotile cilia syndrome in an aged dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1987, **190**, 1567-1571.

KIM S.-J. Heterotaxy Syndrome. *Korean Circulation Journal*, 2011, **41**, 227.

KNIGHT D.A., HOLGATE S.T. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 2003, **8**, 432-446.

KNOWLES M.R., BOUCHER R.C. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *Journal of Clinical Investigation*, 2002, **109**, 571-577.

KNOWLES M.R., LEIGH M.W., CARSON J.L., DAVIS S.D., DELL S.D., FERKOL T.W., OLIVIER K.N., SAGEL S.D., ROSENFELD M., BURNS K.A., MINNIX S.L., ARMSTRONG M.C., LORI A., HAZUCHA M.J., LOGES N.T., OLBRICH H., BECKER-HECK A., SCHMIDTS M., WERNER C., OMRAN H., ZARIWALA M.A., CONSORTIUM F.T.G.D.O.M.C. Mutations of DNAH11 in patients with primary ciliary dyskinesia with normal ciliary ultrastructure. *Thorax*, 2012, **67**, 433-441.

KNOWLES M.R., LEIGH M.W., OSTROWSKI L.E., HUANG L., CARSON J.L., HAZUCHA M.J., YIN W., BERG J.S., DAVIS S.D., DELL S.D., FERKOL T.W., ROSENFELD M., SAGEL S.D., MILLA C.E., OLIVIER K.N., TURNER E.H., LEWIS A.P., BAMSHAD M.J., NICKERSON D.A., SHENDURE J., ZARIWALA M.A., CONSORTIUM T.G.D.O.M.C. Exome Sequencing Identifies Mutations in CCDC114 as a Cause of Primary Ciliary Dyskinesia. *The American Journal of Human Genetics*, 2013a, **92**, 99-106.

KNOWLES M.R., OSTROWSKI L.E., LOGES N.T., HURD T., LEIGH M.W., HUANG L., WOLF W.E., CARSON J.L., HAZUCHA M.J., YIN W., DAVIS S.D., DELL S.D., FERKOL T.W., SAGEL S.D., OLIVIER K.N., JAHNKE C., OLBRICH H., WERNER C., RAIDT J., WALLMEIER J., PENNEKAMP P., DOUGHERTY G.W., HJEIJ R., GEE H.Y., OTTO E.A., HALBRITZER J., CHAKI M., DIAZ K.A., BRAUN D.A., PORATH J.D., SCHUELER M., BAKTAI G., GRIESE M., TURNER E.H., LEWIS A.P., BAMSHAD M.J., NICKERSON D.A., HILDEBRANDT F., SHENDURE J., OMRAN H., ZARIWALA M.A. Mutations in SPAG1 Cause Primary Ciliary Dyskinesia Associated with Defective Outer and Inner Dynein Arms. *The American Journal of Human Genetics*, 2013b, **93**, 711-720.

KOTT E., DUQUESNOY P., COPIN B., LEGENDRE M., MOAL F.D.-L., MONTANTIN G., JEANSON L., TAMALET A., PAPON J.F., SIFFROI J.-P., RIVES N., MITCHELL V., DE BLIC J., COSTE A., CLÉMENT A., ESCALIER D., TOURÉ A., ESCUDIER E., AMSELEM S. Loss-of-Function Mutations in LRRC6, a Gene Essential for Proper Axonemal Assembly of Inner and Outer Dynein Arms, Cause Primary Ciliary Dyskinesia. *The American Journal of Human Genetics*, 2012, **91**, 958-964.

- KOZMINSKI K.G., JOHNSON K.A., FORSCHER P., ROSENBAUM J.L. A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, **90**, 5519-5523.
- KRAMER-ZUCKER A.G. Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. *Development*, 2005, **132**, 1907-1921.
- KRAWCZYSKI M.R., WITT M. PCD and RP: X-linked inheritance of both disorders? *Pediatric Pulmonology*, 2004, **38**, 88-89.
- KROON A.A., HEIJ J.M., KUIJPER W.A., VEERMAN A.J., VAN DER BAAN S. Function and morphology of respiratory cilia in situs inversus. *Clinical otolaryngology and allied sciences*, 1991, **16**, 294-297.
- KUBO A., YUBA-KUBO A., TSUKITA S., TSUKITA S., AMAGAI M. Sentan: a novel specific component of the apical structure of vertebrate motile cilia. *Molecular biology of the cell*, 2008, **19**, 5338-5346.
- KUEHNI C.E., FRISCHER T., STRIPPOLI M.-P.F., MAURER E., BUSH A., NIELSEN K.G., ESCRIBANO A., LUCAS J.S.A., YIALLOUROS P., OMRAN H., EBER E., O'CALLAGHAN C., SNIJDERS D., BARBATO A., CHILDREN F.T.E.T.F.O.P.C.D.I. Factors influencing age at diagnosis of primary ciliary dyskinesia in European children. *European Respiratory Journal*, 2010, **36**, 1248-1258.
- KUMAR S., TANA A., SHANKAR A. Cystic fibrosis — What are the prospects for a cure? *European Journal of Internal Medicine*, 2014, **25**, 803-807.
- LAMBLIN G., DEGROOTE S., PERINI J.M., DELMOTTE P., SCHARFMAN A., DAVRIL M., LO-GUIDICE J.M., HOUDRET N., DUMUR V., KLEIN A., ROUSSE P. Human airway mucin glycosylation: a combinatorial of carbohydrate determinants which vary in cystic fibrosis. *Glycoconjugate journal*, 2001, **18**, 661-684.
- LE GUINER C., MONTUS M., SERVAIS L., CHEREL Y., FRANCOIS V., THIBAUD J.-L., WARY C., MATOT B., LARCHER T., GUIGAND L., DUTILLEUL M., DOMENGER C., ALLAIS M., BEUVIN M., MORAUX A., LE DUFF J., DEVAUX M., JAULIN N., GUILBAUD M., LATOURNERIE V., VERON P., BOUTIN S., LEBORGNE C., DESGUE D., DESCHAMPS J.-Y., MOULLEC S., FROMES Y., VULIN A., SMITH R.H., LAROUDIE N., BARNAY-TOUTAIN F., RIVIÈRE C., BUCHER S., LE T.-H., DELAUNAY N., GASMI M., KOTIN R.M., BONNE G., ADJALI O., MASURIER C., HOGREL J.-Y., CARLIER P., MOULLIER P., VOIT T. Forelimb Treatment in a Large Cohort of Dystrophic Dogs Supports Delivery of a Recombinant AAV for Exon Skipping in Duchenne Patients. *Molecular Therapy*, 2014, **22**, 1923-1935.
- LEIGH M.W. Primary Ciliary Dyskinesia. Elsevier Inc., 2006. 902-909 p.
- LEQUARRÉ A.-S., ANDERSSON L., ANDRÉ C., FREDHOLM M., HITTE C., LEEB T., LOHI H., LINDBLAD-TOH K., GEORGES M. LUPA: A European initiative taking advantage of the canine genome architecture for unravelling complex disorders in both human and dogs. *The Veterinary Journal*, 2011, **189**, 155-159.
- LI D., SHIRAKAMI G., ZHAN X., JOHNS R.A. Regulation of Ciliary Beat Frequency by the Nitric Oxide–Cyclic Guanosine Monophosphate Signaling Pathway in Rat Airway Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2000, **23**, 175-181.

LI J.B., GERDES J.M., HAYCRAFT C.J., FAN Y., TESLOVICH T.M., MAY-SIMERA H., LI H., BLACQUE O.E., LI L., LEITCH C.C. Comparative Genomics Identifies a Flagellar and Basal Body Proteome that Includes the *BBS5* Human Disease Gene. *Cell*, 2004, **117**, 541-552.

LI S., FERNANDEZ J.-J., MARSHALL W.F., AGARD D.A. Three-dimensional structure of basal body triplet revealed by electron cryo-tomography. *The EMBO Journal*, 2011, **31**, 552-562.

LIN J., TRITSCHLER D., SONG K., BARBER C.F., COBB J.S., PORTER M.E., NICASTRO D. Building Blocks of the Nexin-Dynein Regulatory Complex in *Chlamydomonas* Flagella. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, **286**, 29175-29191.

LIN L., FARACO J., LI R., KADOTANI H., ROGERS W., LIN X., QIU X., DE JONG P.J., NISHINO S., MIGNOT E. The Sleep Disorder Canine Narcolepsy Is Caused by a Mutation in the *Hypocretin* Receptor 2 Gene. *Cell*, 1999, **98**, 365-376.

LINDBERG S., AND A.C., RUNER T. Nitric oxide (NO) production in the upper airways is decreased in chronic sinusitis. *Acta oto-laryngologica*, 1997, **117**, 113-117.

LINDBLAD-TOH K., WADE C.M., MIKKELSEN T.S., KARLSSON E.K., JAFFE D.B., KAMAL M., CLAMP M., CHANG J.L., KULBOKAS E.J., 3RD, ZODY M.C., MAUCELI E., XIE X., BREEN M., WAYNE R.K., OSTRANDER E.A., PONTING C.P., GALIBERT F., SMITH D.R., DEJONG P.J., KIRKNESS E., ALVAREZ P., BIAGI T., BROCKMAN W., BUTLER J., CHIN C.W., COOK A., CUFF J., DALY M.J., DECAPRIO D., GNERRE S., GRABHERR M., KELLIS M., KLEBER M., BARDELEBEN C., GOODSTADT L., HEGER A., HITTE C., KIM L., KOEPFLI K.P., PARKER H.G., POLLINGER J.P., SEARLE S.M., SUTTER N.B., THOMAS R., WEBBER C., BALDWIN J., ABEBE A., ABOUELLEIL A., AFTUCK L., AIT-ZAHRA M., ALDREDGE T., ALLEN N., AN P., ANDERSON S., ANTOINE C., ARACHCHI H., ASLAM A., AYOTTE L., BACHANTSANG P., BARRY A., BAYUL T., BENAMARA M., BERLIN A., BESSETTE D., BLITSHTEYN B., BLOOM T., BLYE J., BOGUSLAVSKIY L., BONNET C., BOUKHGALTER B., BROWN A., CAHILL P., CALIXTE N., CAMARATA J., CHESHATSANG Y., CHU J., CITROEN M., COLLYMORE A., COOKE P., DAWOE T., DAZA R., DECKTOR K., DEGRAY S., DHARGAY N., DOOLEY K., DOOLEY K., DORJE P., DORJEE K., DORRIS L., DUFFEY N., DUPES A., EGBIREMOLEN O., ELONG R., FALK J., FARINA A., FARO S., FERGUSON D., FERREIRA P., FISHER S., FITZGERALD M., FOLEY K., FOLEY C., FRANKE A., FRIEDRICH D., GAGE D., GARBER M., GEARIN G., GIANNOUKOS G., GOODE T., GOYETTE A., GRAHAM J., GRANDBOIS E., GYALTSEN K., HAFEZ N., HAGOPIAN D., HAGOS B., HALL J., HEALY C., HEGARTY R., HONAN T., HORN A., HOUDE N., HUGHES L., HUNNICUTT L., HUSBY M., JESTER B., JONES C., KAMAT A., KANGA B., KELLS C., KHAZANOVICH D., KIEU A.C., KISNER P., KUMAR M., LANCE K., LANDERS T., LARA M., LEE W., LEGER J.P., LENNON N., LEUPER L., LEVINE S., LIU J., LIU X., LOKYITSANG Y., LOKYITSANG T., LUI A., MACDONALD J., MAJOR J., MARABELLA R., MARU K., MATTHEWS C., MCDONOUGH S., MEHTA T., MELDRIM J., MELNIKOV A., MENEUS L., MIHALEV A., MIHOVA T., MILLER K., MITTELMAN R., MLENGA V., MULRAIN L., MUNSON G., NAVIDI A., NAYLOR J., NGUYEN T., NGUYEN N., NGUYEN C., NGUYEN T., NICOL R., NORBU N., NORBU C., NOVOD N., NYIMA T., OLANDT P., O'NEILL B., O'NEILL K., OSMAN S., OYONO L., PATTI C., PERRIN D., PHUNKHANG P., PIERRE F., PRIEST M., RACHUPKA A., RAGHURAMAN S., RAMEAU R., RAY V., RAYMOND C., REGE F., RISE C., ROGERS J., ROGOV P., SAHALIE J., SETTIPALLI S., SHARPE T., SHEA T., SHEEHAN M., SHERPA N., SHI J., SHIH D., SLOAN J., SMITH C., SPARROW T., STALKER J., STANGE-THOMANN N., STAVROPOULOS S., STONE C., STONE S., SYKES S., TCHUINGA P., TENZING P., TESFAYE S., THOULUTSANG D., THOULUTSANG Y., TOPHAM K., TOPPING I., TSAMLA T., VASSILIEV H., VENKATARAMAN V., VO A., WANGCHUK T., WANGDI T., WEIAND M., WILKINSON J., WILSON A., YADAV S., YANG S., YANG X., YOUNG G., YU Q., ZAINOUN J., ZEMBEK L., ZIMMER A., LANDER E.S. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, 2005, **438**, 803-819.

LIU Q., TAN G., LEVENKOVA N., LI T., PUGH E.N., RUX J.J., SPEICHER D.W., PIERCE E.A. The proteome of the mouse photoreceptor sensory cilium complex. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 2007, **6**, 1299-1317.

LOGES N.T., OLBRICH H., FENSKE L., MUSSAFFI H., HORVATH J., FLIEGAUF M., KUHL H., BAKTAI G., PETERFFY E., CHODHARI R., CHUNG E.M.K., RUTMAN A., O'CALLAGHAN C., BLAU H., TISZLAVICZ L., VOELKEL K., WITT M., ZIĘTKIEWICZ E., NEESEN J., REINHARDT R., MITCHISON H.M., OMRAN H. DNAI2 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Defects in the Outer Dynein Arm. *The American Journal of Human Genetics*, 2008, **83**, 547-558.

LOGES N.T., OLBRICH H., BECKER-HECK A., HAFFNER K., HEER A., REINHARD C., SCHMIDTS M., KISPERT A., ZARIWALA M.A., LEIGH M.W., KNOWLES M.R., ZENTGRAF H., SEITHE H., NURNBERG G., NURNBERG P., REINHARDT R., OMRAN H. Deletions and Point Mutations of LRRC50 Cause Primary Ciliary Dyskinesia Due to Dynein Arm Defects. *The American Journal of Human Genetics*, 2009, **85**, 883-889.

LUCAS J.S., BURGESS A., MITCHISON H.M., MOYA E., WILLIAMSON M., HOGG C., ON BEHALF OF THE NATIONAL PCD SERVICE U., LUCASY J., WALKER W., BURGESS A., EVANS H., ISMAIL-KOCH H., LOCK K., HARRIS A., PAGE A., GOGGIN P., JACKSON C., COLES J., THOMPSON J., BEHAN L., PACKHAM S., GOVE K., COLLINS S., HOGG C., CARR S., SHOEMARK A., DIXON M., OLLOSSON S., COLLINS N., BRACKEN-KING M., ROBERTS A., MARSH G., CARLTON A., KILPIN K., FROST E., MCKEE A., BOSWELL F., WILLIAMSON M., O'CALLAGHAN C., HIRST R., RUTMAN A., WILLIAMS G., CHETCUTI P., FERNANDEZ MOYA E., SCHOFIELD L., TRUSCOT A. Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Archives of Disease in Childhood*, 2014.

LUNDBERG J.O., WEITZBERG E., NORDVALL S.L., KUYLENSTIERNA R., LUNDBERG J.M., ALVING K. Primarily nasal origin of exhaled nitric oxide and absence in Kartagener's syndrome. *The European respiratory journal*, 1994, **7**, 1501-1504.

LYONS R.A. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Human Reproduction Update*, 2006, **12**, 363-372.

MAITI A.K., BARTOLONI L., MITCHISON H.M., MEEKS M., CHUNG E., SPIDEN S., GEHRIG C., ROSSIER C., DELOZIER-BLANCHET C.D., BLOUIN J., GARDINER R.M., ANTONARAKIS S.E. No deleterious mutations in the FOXJ1 (alias HFH-4) gene in patients with primary ciliary dyskinesia (PCD). *Cytogenetics and cell genetics*, 2000, **90**, 119-122.

MARTHIN J.K., PETERSEN N., SKOVGAARD L.T., NIELSEN K.G. Lung Function in Patients with Primary Ciliary Dyskinesia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2010a, **181**, 1262-1268.

MARTHIN J.K., PETERSEN N., SKOVGAARD L.T., NIELSEN K.G. Lung function in patients with primary ciliary dyskinesia: a cross-sectional and 3-decade longitudinal study. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010b, **181**, 1262-1268.

MARTHIN J.K., NIELSEN K.G. Choice of nasal nitric oxide technique as first-line test for primary ciliary dyskinesia. *European Respiratory Journal*, 2011, **37**, 559-565.

MASON J.M., ARNDT K.M. Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 2004, **5**, 170-176.

MASTRONARDE D.N., O'TOOLE E.T., MCDONALD K.L., MCINTOSH J.R., PORTER M.E. Arrangement of inner dynein arms in wild-type and mutant flagella of *Chlamydomonas*. *The Journal of Cell Biology*, 1992, **118**, 1145-1162.

MATSUI H., RANDELL S.H., PERETTI S.W., DAVIS C.W., BOUCHER R.C. Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from airway surfaces. *Journal of Clinical Investigation*, 1998, **102**, 1125-1131.

MATSUMOTO Y., GOTO S., HASHIMOTO H., KOKEGUCHI S., SHIOTANI M., OKADA H. A healthy birth after intracytoplasmic sperm injection using ejaculated spermatozoa from a patient with Kartagener's syndrome. *Fertility and Sterility*, 2010, **93**, 2074.e2017-2074.e2019.

MAZOR M., ALKRINAWI S., CHALIFA-CASPI V., MANOR E., SHEFFIELD V.C., AVIRAM M., PARVARI R. Primary Ciliary Dyskinesia Caused by Homozygous Mutation in DNAL1, Encoding Dynein Light Chain 1. *The American Journal of Human Genetics*, 2011, **88**, 599-607.

MCGRATH J., SOMLO S., MAKOVA S., TIAN X., BRUECKNER M. Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell*, 2003, **114**, 61-73.

MCSHANE P.J., NAURECKAS E.T., TINO G., STREK M.E. Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2013, **188**, 647-656.

MEEKS M., WALNE A., SPIDEN S., SIMPSON H., MUSSAFFI-GEORGY H., HAMAM H.D., FEHAID E.L., CHEEHAB M., AL-DABBAGH M., POLAK-CHARCON S., BLAU H., O'RAWE A., MITCHISON H.M., GARDINER R.M., CHUNG E. A locus for primary ciliary dyskinesia maps to chromosome 19q. *Journal of Medical Genetics*, 2000, **37**, 241-244.

MELLERSH C.S., PETTITT L., FORMAN O.P., VAUDIN M., BARNETT K.C. Identification of mutations in HSF4 in dogs of three different breeds with hereditary cataracts. *Veterinary ophthalmology*, 2006, **9**, 369-378.

MERVEILLE A.-C., DAVIS E.E., BECKER-HECK A., LEGENDRE M., AMIRAV I., BATAILLE G., BELMONT J., BEYDON N., BILLEN F., CLÉMENT A., CLERCX C., COSTE A., CROSBIE R., DE BLIC J., DELEUZE S., DUQUESNOY P., ESCALIER D., ESCUDIER E., FLIEGAUF M., HORVATH J., HILL K., JORISSEN M., JUST J., KISPERT A., LATHROP M., LOGES N.T., MARTIN J.K., MOMOZAWA Y., MONTANTIN G., NIELSEN K.G., OLBRICH H., PAPON J.F., RAYET I., ROGER G., SCHMIDTS M., TENREIRO H., TOWBIN J.A., ZELENKA D., ZENTGRAF H., GEORGES M., LEQUARRÉ A.-S., KATSANIS N., OMRAN H., AMSELEM S. CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs. *Nature Genetic*, 2011, **43**, 72-78.

MITCHELL D.R. Bend propagation drives central pair rotation in *Chlamydomonas reinhardtii* flagella. *The Journal of Cell Biology*, 2004, **166**, 709-715.

MITCHISON H.M., SCHMIDTS M., LOGES N.T., FRESHOUR J., DRITSOULA A., HIRST R.A., O'CALLAGHAN C., BLAU H., AL DABBAGH M., OLBRICH H., BEALES P.L., YAGI T., MUSSAFFI H., CHUNG E.M.K., OMRAN H., MITCHELL D.R. Mutations in axonemal dynein assembly factor DNAAF3 cause primary ciliary dyskinesia. *Nature Publishing Group*, 2012, **44**, 381-389.

MITTAL V., SHAH A. Situs Inversus Totalis: The Association of Kartagener's Syndrome With Diffuse Bronchiolitis and Azoospermia. *Archivos de Bronconeumología (English Edition)*, 2012, **48**, 179-182.

MIZUNO N., TASCHNER M., ENGEL B.D., LORENTZEN E. Structural Studies of Ciliary Components. *Journal of Molecular Biology*, 2012, **422**, 163-180.

- MOORE A. RPGR is mutated in patients with a complex X linked phenotype combining primary ciliary dyskinesia and retinitis pigmentosa. *Journal of Medical Genetics*, 2005, **43**, 326-333.
- MORRISON W.B., WILSMAN N.J., FOX L.E., FARNUM C.E. Primary ciliary dyskinesia in the dog. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 1987, **1**, 67-74.
- MUNRO N.C., CURRIE D.C., LINDSAY K.S., RYDER T.A., RUTMAN A., DEWAR A., GREENSTONE M.A., HENDRY W.F., COLE P.J. Fertility in men with primary ciliary dyskinesia presenting with respiratory infection. *Thorax*, 1994, **49**, 684-687.
- NAKANO H., IDE H., IMADA M., OSANAI S., TAKAHASHI T., KIKUCHI K., IWAMOTO J. Reduced Nasal Nitric Oxide in Diffuse Panbronchiolitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2000, **162**, 2218-2220.
- NAKHLEH N., FRANCIS R., GIESE R.A., TIAN X., LI Y., ZARIWALA M.A., YAGI H., KHALIFA O., KURESHI S., CHATTERJEE B., SABOL S.L., SWISHER M., CONNELLY P.S., DANIELS M.P., SRINIVASAN A., KUEHL K., KRAVITZ N., BURNS K., SAMI I., OMRAN H., BARMADA M., OLIVIER K., CHAWLA K.K., LEIGH M., JONAS R., KNOWLES M., LEATHERBURY L., LO C.W. High prevalence of respiratory ciliary dysfunction in congenital heart disease patients with heterotaxy. *Circulation*, 2012, **125**, 2232-2242.
- NARAYAN D., KRISHNAN S.N., UPENDER M., RAVIKUMAR T.S., MAHONEY M.J., DOLAN T.F., TEEBI A.S., HADDAD G.G. Unusual inheritance of primary ciliary dyskinesia (Kartagener's syndrome). *Journal of Medical Genetics*, 1994, **31**, 493-496.
- NEIL J.A., CANAPP S.O., COOK C.R., LATTIMER J.C. Kartagener's syndrome in a Dachshund dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 2002, **38**, 45-49.
- NEUGEBAUER D.-C., NEUWINGER J., JOCKENHÖVEL F., NIESCHLAG E. '9+ 0' Axoneme in spermatozoa and some nasal cilia of a patient with totally immotile spermatozoa associated with thickened sheath and short midpiece. *Human reproduction*, 1990, **5**, 981-986.
- NONAKA S., TANAKA Y., OKADA Y., TAKEDA S., HARADA A., KANAI Y., KIDO M., HIROKAWA N. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell*, 1998, **95**, 829-837.
- NONAKA S., SHIRATORI H., SAIJOH Y., HAMADA H. Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature*, 2002, **418**, 96-99.
- NOONE P.G., BALI D., CARSON J.L., SANNUTI A., GIPSON C.L., OSTROWSKI L.E., BROMBERG P.A., BOUCHER R.C., KNOWLES M.R. Discordant organ laterality in monozygotic twins with primary ciliary dyskinesia. *American journal of medical genetics*, 1999, **82**, 155-160.
- NOONE P.G., LEIGH M.W., SANNUTI A., MINNIX S.L., CARSON J.L., HAZUCHA M., ZARIWALA M.A., KNOWLES M.R. Primary Ciliary Dyskinesia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2004, **169**, 459-467.
- O'CALLAGHAN C., CHETCUTI P., MOYA E. High prevalence of primary ciliary dyskinesia in a British Asian population. *Arch Dis Child*, 2010, **95**, 51-52.
- O'CALLAGHAN C., RUTMAN A., WILLIAMS G.M., HIRST R.A. Inner dynein arm defects causing primary ciliary dyskinesia: repeat testing required. *Eur Respir J*, 2011, **38**, 603-607.

O'TOOLE E.T., GIDDINGS T.H., JR., DUTCHER S.K. Understanding microtubule organizing centers by comparing mutant and wild-type structures with electron tomography. *Methods Cell Biol*, 2007, **79**, 125-143.

OH E.C., KATSANIS N. Cilia in vertebrate development and disease. *Development*, 2012, **139**, 443-448.

OKADA Y., NONAKA S., TANAKA Y., SAIJOH Y., HAMADA H., HIROKAWA N. Abnormal nodal flow precedes situs inversus in iv and inv mice. *Molecular cell*, 1999, **4**, 459-468.

OLBRICH H., HAFFNER K., KISPERS A., VÖLKELE A., VOLZ A., SASMAZ G., REINHARDT R., HENNIG S., LEHRACH H., KONIETZKO N., ZARIWALA M., NOONE P.G., KNOWLES M., MITCHISON H.M., MEEKS M., CHUNG E.M.K., HILDEBRANDT F., SUDBRAK R., OMRAN H. Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. *Nature genetics*, 2002, **30**, 143-144.

OLBRICH H., HORVATH J., FEKETE A., LOGES N.T., STORMVAN&APOS;S GRAVESANDE K., BLUM A., HÖRMANN K., OMRAN H. Axonemal Localization of the Dynein Component DNAH5 Is Not Altered in Secondary Ciliary Dyskinesia. *Pediatric Research*, 2006, **59**, 418-422.

OLBRICH H., SCHMIDTS M., WERNER C., ONOUFRIADIS A., LOGES N.T., RAIDT J., BANKI N.F., SHOEMARK A., BURGOYNE T., AL TURKI S., HURLES M.E., KÖHLER G., SCHROEDER J., NURNBERG G., NURNBERG P., CHUNG E.M.K., REINHARDT R., MARTIN J.K., NIELSEN K.G., MITCHISON H.M., OMRAN H., CONSORTIUM6 U.K. Recessive HYDIN Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia without Randomization of Left-Right Body Asymmetry. *The American Journal of Human Genetics*, 2012, **91**, 672-684.

OMRAN H., HAFFNER K., VÖLKELE A., KUEHR J., KETELSEN U.-P., ROSS U.-H., KONIETZKO N., WIENKER T., BRANDIS M., HILDEBRANDT F. Homozygosity Mapping of a Gene Locus for Primary Ciliary Dyskinesia on Chromosome 5p and Identification of the Heavy Dynein Chain DNAH5 as a Candidate Gene. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2000, **23**, 696-702.

OMRAN H., KOBAYASHI D., OLBRICH H., TSUKAHARA T., LOGES N.T., HAGIWARA H., ZHANG Q., LEBLOND G., O'TOOLE E., HARA C., MIZUNO H., KAWANO H., FLIEGAUF M., YAGI T., KOSHIDA S., MIYAWAKI A., ZENTGRAF H., SEITHE H., REINHARDT R., WATANABE Y., KAMIYA R., MITCHELL D.R., TAKEDA H. Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature*, 2008, **456**, 611-616.

ONOUFRIADIS A., PAFF T., ANTONY D., SHOEMARK A., MICHA D., KUYT B., SCHMIDTS M., PETRIDIS S., DANKERT-ROELSE J.E., HAARMAN E.G., DANIELS J.M.A., EMES R.D., WILSON R., HOGG C., SCAMBLER P.J., CHUNG E.M.K., PALS G., MITCHISON H.M., UK10K11. Splice-Site Mutations in the Axonemal Outer Dynein Arm Docking Complex Gene CCDC114 Cause Primary Ciliary Dyskinesia. *The American Journal of Human Genetics*, 2013, **92**, 88-98.

OSTROWSKI L.E., BLACKBURN K., RADDE K.M., MOYER M.B., SCHLATZER D.M., MOSELEY A., BOUCHER R.C. A proteomic analysis of human cilia: identification of novel components. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 2002, **1**, 451-465.

PAN Y. Paternal isodisomy of chromosome 7 associated with complete situs inversus and immotile cilia. 1998, 1-28.

PANIZZI J.R., BECKER-HECK A., CASTLEMAN V.H., AL-MUTAIRI D.A., LIU Y., LOGES N.T., PATHAK N., AUSTIN-TSE C., SHERIDAN E., SCHMIDTS M., OLBRICH H., WERNER C., HAFFNER K.,

HELLMAN N., CHODHARI R., GUPTA A., KRAMER-ZUCKER A., OLALE F., BURDINE R.D., SCHIER A.F., O'CALLAGHAN C., CHUNG E.M.K., REINHARDT R., MITCHISON H.M., KING S.M., OMRAN H., DRUMMOND I.A. CCDC103 mutations cause primary ciliary dyskinesia by disrupting assembly of ciliary dynein arms. *Nature Publishing Group*, 2012, **44**, 714-719.

PAPON J.F., COSTE A., ROUDOT-THORAVALE F., BOUCHERAT M., ROGER G., TAMALET A., VOJTEK A.M., AMSELEM S., ESCUDIER E. A 20-year experience of electron microscopy in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *European Respiratory Journal*, 2010, **35**, 1057-1063.

PARKER H.G., OSTRANDER E.A. Canine genomics and genetics: running with the pack. *PLoS genetics*, 2005, **1**, e58.

PAZOUR G.J., DICKERT B.L., WITMAN G.B. The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly. *J Cell Biol*, 1999, **144**, 473-481.

PAZOUR G.J. Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *The Journal of Cell Biology*, 2005, **170**, 103-113.

PEDERSEN L.B., ROSENBAUM J.L. Chapter Two Intraflagellar Transport (IFT). In: Elsevier, 2008, 23-61.

PEDERSEN L.B., VELAND I.R., SCHRØDER J.M., CHRISTENSEN S.T. Assembly of primary cilia. *Developmental Dynamics*, 2008, **237**, 1993-2006.

PENNARUN G., ESCUDIER E., CHAPELIN C., BRIDOUX A.M., CACHEUX V., ROGER G., CLEMENT A., GOOSSENS M., AMSELEM S., DURIEZ B. Loss-of-function mutations in a human gene related to *Chlamydomonas reinhardtii* dynein IC78 result in primary ciliary dyskinesia. *The American Journal of Human Genetics*, 1999, **65**, 1508-1519.

PENNARUN G., CHAPELIN C., ESCUDIER E., BRIDOUX A.M., DASTOT F., CACHEUX V., GOOSSENS M., AMSELEM S., DURIEZ B. The human dynein intermediate chain 2 gene (DNAI2): cloning, mapping, expression pattern, and evaluation as a candidate for primary ciliary dyskinesia. *Human Genetics*, 2000, **107**, 642-649.

PENNARUN G., BRIDOUX A.-M., ESCUDIER E., DASTOT-LE MOAL F., CACHEUX V., AMSELEM S., DURIEZ B. Isolation and Expression of the Human hPF20 Gene Orthologous to *Chlamydomonas* pf20. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2002, **26**, 362-370.

PENNEKAMP P., KARCHER C., FISCHER A., SCHWEICKERT A., SKRYABIN B., HORST J., BLUM M., DWORNICZAK B. The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice. *Current biology : CB*, 2002, **12**, 938-943.

PERRONE C.A., TRITSCHLER D., TAULMAN P., BOWER R., YODER B.K., PORTER M.E. A novel dynein light intermediate chain colocalizes with the retrograde motor for intraflagellar transport at sites of axoneme assembly in *Chlamydomonas* and Mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 2003, **14**, 2041-2056.

PHILLIPS D.M., JOW W.W., GOLDSTEIN M. Testis factors that may regulate gene expression: evidence from a patient with Kartagener's syndrome. *Journal of andrology*, 1995, **16**, 158-162.

PICCO P., LEVERATTO L., CAMA A., VIGLIAROLO M.A., LEVATO G.L., GATTORNO M., ZAMMARCHI E., DONATI M.A. Immotile cilia syndrome associated with hydrocephalus and precocious

- puberty: a case report. *European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery ... [et al] = Zeitschrift für Kinderchirurgie*, 1993, **3 Suppl 1**, 20-21.
- PIFFERI M., MICHELUCCI A., CONIDI M.E., CANGIOTTI A.M., SIMI P., MACCHIA P., BONER A.L. New DNAH11 mutations in primary ciliary dyskinesia with normal axonemal ultrastructure. *Eur Respir J*, 2010, **35**, 1413-1416.
- PIFFERI M., BUSH A., CARAMELLA D., DI CICCO M., ZANGANI M., CHINELLATO I., MACCHIA P., BONER A.L. Agenesis of paranasal sinuses and nasal nitric oxide in primary ciliary dyskinesia. *European Respiratory Journal*, 2011, **37**, 566-571.
- PIGINO G., ISHIKAWA T. Axonemal radial spokes: 3D structure, function and assembly. *BioArchitecture*, 2012, **2**, 50-58.
- PIPERNO G., MEAD K., LEDIZET M., MOSCATELLI A. Mutations in the "dynein regulatory complex" alter the ATP-insensitive binding sites for inner arm dyneins in *Chlamydomonas* axonemes. *The Journal of Cell Biology*, 1994, **125**, 1109-1117.
- PITTMAN J.E. Characteristics of PCD in Children under 5 years of Age. 2011, 1-1.
- PIZZI S., CAZZATO S., BERNARDI F., MANTOVANI W., CENACCHI G. Clinico-pathological evaluation of ciliary dyskinesia: diagnostic role of electron microscopy. *Ultrastructural Pathology*, 2003, **27**, 243-252.
- PORTER M.E., BOWER R., KNOTT J.A., BYRD P., DENTLER W. Cytoplasmic dynein heavy chain 1b is required for flagellar assembly in *Chlamydomonas*. *Mol Biol Cell*, 1999, **10**, 693-712.
- PORTER M.E., SALE W.S. The 9+ 2 axoneme anchors multiple inner arm dyneins and a network of kinases and phosphatases that control motility. *The Journal of Cell Biology*, 2000, **151**, F37-F42.
- PROSCHOWSKY H.F., OLSEN J.B., JEPSEN B., FREDHOLM M. Evaluation of the present breeding programme against copper toxicosis in Danish Bedlington terriers. *Animal genetics*, 2003, **34**, 142-145.
- PRULIÈRE-ESCABASSE V., COSTE A., CHAUVIN P., FAUROUX B., TAMALET A., GARABEDIAN E.-N., ESCUDIER E., ROGER G. Otologic features in children with primary ciliary dyskinesia. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, 2010, **136**, 1121-1126.
- QIN H. Intraflagellar transport (IFT) cargo: IFT transports flagellar precursors to the tip and turnover products to the cell body. *The Journal of Cell Biology*, 2004, **164**, 255-266.
- RANDOLPH J.F., CASTLEMAN W.L. Immotile cilia syndrome in two Old English Sheepdog litter-mates. *Journal of Small Animal Practice*, 1984, **25**, 679-686.
- RAYNER C.F., RUTMAN A., DEWAR A., GREENSTONE M.A., COLE P.J., WILSON R. Ciliary disorientation alone as a cause of primary ciliary dyskinesia syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1996, **153**, 1123-1129.
- REICHLER I.M., HOERAUF A., GUSCETTI F., GARDELLE O., STOFFEL M.H., JENTSCH B., WALT H., ARNOLD S. Primary ciliary dyskinesia with situs inversus totalis, hydrocephalus internus and cardiac malformations in a dog. *Journal of Small Animal Practice*, 2001, **42**, 345-348.

- ROOMANS G.M., IVANOV A., SHEBANI E.B., JOHANNESSEN M. Transmission electron microscopy in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Upsala journal of medical sciences*, 2006, **111**, 155-168.
- ROTH Y., BAUM G.L., TADMOR R. Brain dysfunction in primary ciliary dyskinesia? *Acta neurologica Scandinavica*, 1988, **78**, 353-357.
- SAGEL S.D., DAVIS S.D., CAMPISI P., DELL S.D. Update of Respiratory Tract Disease in Children with Primary Ciliary Dyskinesia. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2011, **8**, 438-443.
- SALATHE M. Regulation of Mammalian Ciliary Beating. *Annual review of physiology*, 2007, **69**, 401-422.
- SANDERSON M.J., DIRKSEN E.R. A versatile and quantitative computer-assisted photoelectronic technique used for the analysis of ciliary beat cycles. *Cell motility*, 1985, **5**, 267-292.
- SANDERSON M.J., CHOW I., DIRKSEN E.R. Intercellular communication between ciliated cells in culture. *The American journal of physiology*, 1988, **254**, C63-74.
- SANTAMARIA F. Structural and Functional Lung Disease in Primary Ciliary Dyskinesia. *CHEST Journal*, 2008, **134**, 351.
- SATIR P. The role of axonemal components in ciliary motility. *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology*, 1989, **94**, 351-357.
- SATIR P., GUERRA C. Control of ciliary motility: A unifying hypothesis. *European journal of protistology*, 2003, **39**, 410-415.
- SATIR P., CHRISTENSEN S.T. Overview of Structure and Function of Mammalian Cilia. *Annual review of physiology*, 2007, **69**, 377-400.
- SATIR P., PEDERSEN L.B., CHRISTENSEN S.T. The primary cilium at a glance. *Journal of cell science*, 2010, **123**, 499-503.
- SCHWABE G.C., HOFFMANN K., LOGES N.T., BIRKER D., ROSSIER C., DE SANTI M.M., OLBRICH H., FLIEGAUF M., FAILLY M., LIEBERS U., COLLURA M., GAEDICKE G., MUNDLOS S., WAHN U., BLOUIN J.-L., NIGGEMANN B., OMRAN H., ANTONARAKIS S.E., BARTOLONI L. Primary ciliary dyskinesia associated with normal axoneme ultrastructure is caused by DNAH11 mutations. *Human Mutation*, 2008, **29**, 289-298.
- SCHWARTZ E.A., LEONARD M.L., BIZIOS R., BOWSER S.S. Analysis and modeling of the primary cilium bending response to fluid shear. *Am J Physiol*, 1997, **272**, F132-138.
- SCHWARTZ R.S., HILDEBRANDT F., BENZING T., KATSANIS N. Ciliopathies. *New England Journal of Medicine*, 2011, **364**, 1533-1543.
- SHAH A.S., BEN-SHAHAR Y., MONINGER T.O., KLINE J.N., WELSH M.J. Motile Cilia of Human Airway Epithelia Are Chemosensory. *Science (New York, N.Y.)*, 2009, **325**, 1131-1134.
- SHOEMARK A., DIXON M., CORRIN B., DEWAR A. Twenty-year review of quantitative transmission electron microscopy for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Journal of Clinical Pathology*, 2012, **65**, 267-271.

- SIEWERT. Ber einem Fall von Bronchiektasie bei einem Patienten mit Situs inversus viscerum. *Berl Klin Wchnschr*, 1904, **41**.
- SILVERMAN M.A., LEROUX M.R. Intraflagellar transport and the generation of dynamic, structurally and functionally diverse cilia. *Trends in Cell Biology*, 2009, **19**, 306-316.
- SINGLA V., REITER J.F. The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science (New York, N.Y.)*, 2006, **313**, 629-633.
- SIRONEN A., KOTAJA N., MULHERN H., WYATT T.A., SISSON J.H., PAVLIK J.A., MIILUNIEMI M., FLEMING M.D., LEE L. Loss of SPEF2 Function in Mice Results in Spermatogenesis Defects and Primary Ciliary Dyskinesia. *Biology of Reproduction*, 2011, **85**, 690-701.
- SLEIGH M.A. Primary ciliary dyskinesia. *Multiple values selected*, 1981, **2**, 476.
- SMITH E.F., SALE W.S. Regulation of dynein-driven microtubule sliding by the radial spokes in flagella. *Science (New York, N.Y.)*, 1992, **257**, 1557-1559.
- SMITH E.F. Regulation of flagellar dynein by the axonemal central apparatus. *Cell motility and the cytoskeleton*, 2002, **52**, 33-42.
- SMITH J.C., NORTHEY J.G., GARG J., PEARLMAN R.E., SIU K.W. Robust method for proteome analysis by MS/MS using an entire translated genome: demonstration on the ciliome of *Tetrahymena thermophila*. *Journal of proteome research*, 2005, **4**, 909-919.
- SOMMER J.U., SCHAFER K., OMRAN H., OLBRICH H., WALLMEIER J., BLUM A., HORMANN K., STUCK B.A. ENT manifestations in patients with primary ciliary dyskinesia: prevalence and significance of otorhinolaryngologic co-morbidities. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 2011, **268**, 383-388.
- SOROKIN S. Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *The Journal of Cell Biology*, 1962, **15**, 363-377.
- STANNARD W., RUTMAN A., WALLIS C., O'CALLAGHAN C. Central Microtubular Agenesis Causing Primary Ciliary Dyskinesia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2004, **169**, 634-637.
- STANNARD W.A., CHILVERS M.A., RUTMAN A.R., WILLIAMS C.D., O'CALLAGHAN C. Diagnostic Testing of Patients Suspected of Primary Ciliary Dyskinesia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2010, **181**, 307-314.
- STOLC V., SAMANTA M.P., TONGPRASIT W., MARSHALL W.F. Genome-wide transcriptional analysis of flagellar regeneration in *Chlamydomonas reinhardtii* identifies orthologs of ciliary disease genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, **102**, 3703-3707.
- STUBBS J.L., OISHI I., IZPISÚA BELMONTE J.C., KINTNER C. The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Nature genetics*, 2008, **40**, 1454-1460.
- STURGESS J.M., CHAO J., WONG J., ASPIN N., TURNER J.A.P. Cilia with Defective Radial Spokes. *New England Journal of Medicine*, 1979, **300**, 53-56.

- STURGESS J.M., CHAO J., TURNER J.A.P. Transposition of Ciliary Microtubules. *New England Journal of Medicine*, 1980, **303**, 318-322.
- SULIK K., DEHART D.B., IANGAKI T., CARSON J.L., VRABLIC T., GESTELAND K., SCHOENWOLF G.C. Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. *Developmental Dynamics*, 1994, **201**, 260-278.
- SUMMERS K.E., GIBBONS I.R. Adenosine triphosphate-induced sliding of tubules in trypsin-treated flagella of sea-urchin sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1971, **68**, 3092-3096.
- SUPP D.M., WITTE D.P., POTTER S.S., BRUECKNER M. Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in inversus viscerum mice. *Nature*, 1997, **389**, 963-966.
- SWITONSKI M. Dog as a model in studies on human hereditary diseases and their gene therapy. *Phytochemistry Letters*, 2014, **14**, 44-50.
- SWOBODA P., ADLER H.T., THOMAS J.H. The RFX-type transcription factor DAF-19 regulates sensory neuron cilium formation in *C. elegans*. *Mol Cell*, 2000, **5**, 411-421.
- TAKEDA S., YONEKAWA Y., TANAKA Y., OKADA Y., NONAKA S., HIROKAWA N. Left-right asymmetry and kinesin superfamily protein KIF3A: new insights in determination of laterality and mesoderm induction by *kif3A*^{-/-} mice analysis. *The Journal of Cell Biology*, 1999, **145**, 825-836.
- TANAKA Y., OKADA Y., HIROKAWA N. FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature*, 2005, **435**, 172-177.
- TARRAN R., GRUBB B.R., GATZY J.T., DAVIS C.W., BOUCHER R.C. The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition. *The Journal of general physiology*, 2001, **118**, 223-236.
- TAYLOR B.L., ZHULIN I.B. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 1999, **63**, 479-506.
- TEILMANN S.C., BYSKOV A.G., PEDERSEN P.A., WHEATLEY D.N., PAZOUR G.J., CHRISTENSEN S.T. Localization of transient receptor potential ion channels in primary and motile cilia of the female murine reproductive organs. *Molecular reproduction and development*, 2005, **71**, 444-452.
- TEILMANN S.C., CLEMENT C.A., THORUP J., BYSKOV A.G., CHRISTENSEN S.T. Expression and localization of the progesterone receptor in mouse and human reproductive organs. *The Journal of endocrinology*, 2006, **191**, 525-535.
- TORGERSEN J. Transposition of viscera, bronchiectasis and nasal polyps; a genetical analysis and a contribution to the problem of constitution. *Acta radiol*, 1947, **28**, 17-24.
- TOYAMA Y., SUMIYA H., FUSE H., SHIMAZAKI J. A case of an infertile man with short-tailed spermatozoa. *Andrologia*, 1996, **28**, 81-87.
- TRAAS A.M., CASAL M., HASKINS M., HENTHORN P. Genetic counseling in the era of molecular diagnostics. *Theriogenology*, 2006, **66**, 599-605.

- TSAI K.L., CLARK L.A., MURPHY K.E. Understanding hereditary diseases using the dog and human as companion model systems. *Mammalian Genome*, 2007, **18**, 444-451.
- VALLET C., ESCUDIER E., ROUDOT-THORAVAL F., BLANCHON S., FAUROUX B., BEYDON N., BOULÉ M., VOJTEK A.M., AMSELEM S., CLÉMENT A., TAMALET A. Primary ciliary dyskinesia presentation in 60 children according to ciliary ultrastructure. *European Journal of Pediatrics*, 2013, **172**, 1053-1060.
- VAN DE SLUIS B., ROTHUIZEN J., PEARSON P.L., VAN OOST B.A., WIJMENGA C. Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population. *Human molecular genetics*, 2002, **11**, 165-173.
- VAN GOOR F., HADIDA S., GROOTENHUIS P.D., BURTON B., CAO D., NEUBERGER T., TURNBULL A., SINGH A., JOUBRAN J., HAZLEWOOD A., ZHOU J., MCCARTNEY J., ARUMUGAM V., DECKER C., YANG J., YOUNG C., OLSON E.R., WINE J.J., FRIZZELL R.A., ASHLOCK M., NEGULESCU P. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, **106**, 18825-18830.
- VERHAGE H.G., BAREITHER M.L., JAFFE R.C., AKBAR M. Cyclic changes in ciliation, secretion and cell height of the oviductal epithelium in women. *The American journal of anatomy*, 1979, **156**, 505-521.
- VIEIRA J.P., LOPES P., SILVA R. Primary Ciliary Dyskinesia and Hydrocephalus With Aqueductal Stenosis. *Journal of Child Neurology*, 2012, **27**, 938-941.
- WALT H., CAMPANA A., BALERNA M., DOMENIGHETTI G., HEDINGER C., JAKOB M., PESCIA G., SULMONI A. Mosaicism of dynein in spermatozoa and cilia and fibrous sheath aberrations in an infertile man. *Andrologia*, 1983, **15**, 295-300.
- WANNER A., SALATHÉ M., O&APOS;RIORDAN T.G. Mucociliary clearance in the airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1996, **154**, 1868-1902.
- WARGO M.J., SMITH E.F. Asymmetry of the central apparatus defines the location of active microtubule sliding in Chlamydomonas flagella. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, **100**, 137-142.
- WARNER F.D., SATIR P. The substructure of ciliary microtubules. *Journal of cell science*, 1973, **12**, 313-326.
- WARNER F.D., SATIR P. The structural basis of ciliary bend formation. Radial spoke positional changes accompanying microtubule sliding. *The Journal of Cell Biology*, 1974, **63**, 35-63.
- WATSON P.J., HERRTAGE M.E., SARGAN D. Primary ciliary dyskinesia in Newfoundland dogs. *The Veterinary record*, 1998, **143**, 484.
- WESSELS M.W., DEN HOLLANDER N.S., WILLEMS P.J. Mild fetal cerebral ventriculomegaly as a prenatal sonographic marker for Kartagener syndrome. *Prenatal Diagnosis*, 2003, **23**, 239-242.
- WHITELAW A., EVANS A., CORRIN B. Immotile cilia syndrome: a new cause of neonatal respiratory distress. *Archives of Disease in Childhood*, 1981, **56**, 432-435.
- WILKERSON C.G., KING S.M., KOUTOULIS A., PAZOUR G.J., WITMAN G.B. The 78,000 M(r) intermediate chain of Chlamydomonas outer arm dynein is a WD-repeat protein required for arm assembly. *The Journal of Cell Biology*, 1995, **129**, 169-178.

WIRSHELL M., OLBRICH H., WERNER C., TRITSCHLER D., BOWER R., SALE W.S., LOGES N.T., PENNEKAMP P., LINDBERG S., STENRAM U., CARLÉN B., HORAK E., KÖHLER G., NURNBERG P., NURNBERG G., PORTER M.E., OMRAN H. The nexin-dynein regulatory complex subunit DRC1 is essential for motile cilia function in algae and humans. *Nature Publishing Group*, 2013, **45**, 262-268.

WODEHOUSE T., KHARITONOV S.A., MACKAY I.S., BARNES P.J., WILSON R., COLE P.J. Nasal nitric oxide measurements for the screening of primary ciliary dyskinesia. *European Respiratory Journal*, 2003, **21**, 43-47.

WORLITZSCH D., TARRAN R., ULRICH M., SCHWAB U., CEKICI A., MEYER K.C., BIRRER P., BELLON G., BERGER J., WEISS T., BOTZENHART K., YANKASKAS J.R., RANDELL S., BOUCHER R.C., DÖRING G. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Investigation*, 2002, **109**, 317-325.

WYATT T.A., FORGÈT M.A., ADAMS J.M., SISSON J.H. Both cAMP and cGMP are required for maximal ciliary beat stimulation in a cell-free model of bovine ciliary axonemes. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 2005, **288**, L546-551.

XING E.M., KNOX V.W., O&APOS;DONNELL P.A., SIKURA T., LIU Y., WU S., CASAL M.L., HASKINS M.E., PONDER K.P. The effect of neonatal gene therapy on skeletal manifestations in mucopolysaccharidosis VII dogs after a decade. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2013, **109**, 183-193.

YAMADA A., YAMAGA T., SAKAKIBARA H., NAKAYAMA H., OIWA K. Unidirectional movement of fluorescent microtubules on rows of dynein arms of disintegrated axonemes. *Journal of cell science*, 1998, **111 (Pt 1)**, 93-98.

YANG P., DIENER D.R., YANG C., KOHNO T., PAZOUR G.J., DIENES J.M., AGRIN N.S., KING S.M., SALE W.S., KAMIYA R. Radial spoke proteins of Chlamydomonas flagella. *Journal of cell science*, 2006, **119**, 1165-1174.

YU X., NG C.P., HABACHER H., ROY S. Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. *Nature genetics*, 2008, **40**, 1445-1453.

ZARIWALA M., NOONE P.G., SANNUTI A., MINNIX S., ZHOU Z., LEIGH M.W., HAZUCHA M., CARSON J.L., KNOWLES M.R. Germline Mutations in an Intermediate Chain Dynein Cause Primary Ciliary Dyskinesia. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2001, **25**, 577-583.

ZARIWALA M., O&APOS;NEAL W.K., NOONE P.G., LEIGH M.W., KNOWLES M.R., OSTROWSKI L.E. Investigation of the Possible Role of a Novel Gene, DPCD, in Primary Ciliary Dyskinesia. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2004, **30**, 428-434.

ZARIWALA M.A., LEIGH M.W., CEPPE F., KENNEDY M.P., NOONE P.G., CARSON J.L., HAZUCHA M.J., LORI A., HORVATH J., OLBRICH H., LOGES N.T., BRIDOUX A.-M., PENNARUN G., DURIEZ B., ESCUDIER E., MITCHISON H.M., CHODHARI R., CHUNG E.M.K., MORGAN L.C., DE IONGH R.U., RUTLAND J., PRADAL U., OMRAN H., AMSELEM S., KNOWLES M.R. Mutations of DNAI1 in Primary Ciliary Dyskinesia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2006, **174**, 858-866.

ZARIWALA M.A., OMRAN H., FERKOL T.W. The Emerging Genetics of Primary Ciliary Dyskinesia. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2011, **8**, 430-433.

ZARIWALA M.A., GEE H.Y., KURKOWIAK M., AL-MUTAIRI D.A., LEIGH M.W., HURD T.W., HJEIJ R., DELL S.D., CHAKI M., DOUGHERTY G.W., ADAN M., SPEAR P.C., ESTEVE-RUDD J., LOGES N.T., ROSENFELD M., DIAZ K.A., OLBRICH H., WOLF W.E., SHERIDAN E., BATTEN T.F.C., HALBRITTER J., PORATH J.D., KOHL S., LOVRIC S., HWANG D.-Y., PITTMAN J.E., BURNS K.A., FERKOL T.W., SAGEL S.D., OLIVIER K.N., MORGAN L.C., WERNER C., RAIDT J., PENNEKAMP P., SUN Z., ZHOU W., AIRIK R., NATARAJAN S., ALLEN S.J., AMIRAV I., WIECZOREK D., LANDWEHR K., NIELSEN K., SCHWERK N., SERTIC J., KÖHLER G., WASHBURN J., LEVY S., FAN S., KOERNER-RETTBERG C., AMSELEM S., WILLIAMS D.S., MITCHELL B.J., DRUMMOND I.A., OTTO E.A., OMRAN H., KNOWLES M.R., HILDEBRANDT F. ZMYND10 Is Mutated in Primary Ciliary Dyskinesia and Interacts with LRRC6. *The American Journal of Human Genetics*, 2013, **93**, 336-345.

ZIĘTKIEWICZ E., BUKOWY-BIERYŁO Z., VOELKEL K., KLIMEK B., DMEŃSKA H., POGORZELSKI A., SULIKOWSKA-ROWIŃSKA A., RUTKIEWICZ E., WITT M. Mutations in Radial Spoke Head Genes and Ultrastructural Cilia Defects in East-European Cohort of Primary Ciliary Dyskinesia Patients. *PloS one*, 2012, **7**, e33667.